

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY



Agata Król

**Kultury *in vitro* *Salvia apiana* – wzrost, profil
fitochemiczny oraz wybrane aspekty aktywności biologicznej**

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:

prof. dr hab. n. farm. Maria Łucziewicz

Promotor pomocniczy pracy:

dr n. farm. Adam Kokotkiewicz

Katedra i Zakład Farmakognozji

z Ogrodem Roślin Leczniczych

Gdańsk, 2024

Składam serdeczne podziękowania

Pani profesor Marii Łuczkiewicz, za wskazanie tematu pracy, poświęcony czas, cierpliwość, pomoc w przygotowaniu manuskryptu oraz prowadzeniu doświadczeń

Doktorowi Adamowi Kokotkiewiczowi, za wsparcie podczas realizacji projektu doktorskiego

Pani profesor Mirosławie Krauze-Baranowskiej, kierownikowi Katedry i Zakładu Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed, za stworzenie warunków dla realizacji projektu badawczego

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Farmakognozji,
za wsparcie oraz przyjazną atmosferę

Manuskrypt obejmuje wyniki dotychczas niepublikowane oraz zawarte w następujących pracach:

1. **Krol A.**, Kokotkiewicz A., Szopa A., Ekiert H., Luczkiewicz M., 2020, *Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production*, w: Ramawat, K.G., Ekiert, H.M., Goyal, S. (red.) “*Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry*”, Springer, Cham, DOI: 10.1007/978-3-030-30185-9_34 (**MEIN:20**)
2. **Krol A.**, Kokotkiewicz A., Luczkiewicz M., 2022, *White Sage (Salvia apiana) – a Ritual and Medicinal Plant of the Chaparral: Plant Characteristics in Comparison with Other Salvia Species*, „*Planta Medica*” 88, nr 08: 604-627, DOI:10.1055/a-1453-0964 (**IF: 2,700; MEIN: 100**)
3. **Krol A.**, Kokotkiewicz A., Gorniak M., Naczka A. M., Zabiegała B., Gebalski J., Graczyk F., Zaluski D., Buciniński A., Luczkiewicz M., 2023, *Evaluation of the yield, chemical composition and biological properties of essential oil from bioreactor-grown cultures of Salvia apiana microshoots*, „*Scientific Reports*” 13, nr 7141, DOI: 10.1038/s41598-023-33950-1 (**IF: 4,600; MEIN: 140**)

oraz komunikatach zjazdowych:

1. **Król A.**, Kokotkiewicz A., Zabiegała B., Łuczkiewicz M., *Pędowe systemy wzrostowe S. apiana źródłem unikatowej frakcji lotnej*, **XXVI Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**, Gdańsk, Polska, 28-29.01.2021, książka abstraktów: 30 (**wystąpienie ustne w języku polskim**)
2. **Król A.**, Kokotkiewicz A., Zabiegała B., Łuczkiewicz M., *Salvia apiana in vitro shoot system as a source of unique volatile fraction*, **51st International Symposium on Essential Oils (ISEO)**, Eskisehir, Turcja, 12-14.09.2021, książka abstraktów: 55 (**plakat w języku angielskim**)
3. **Król A.**, Kokotkiewicz A., Zabiegała B., Gębalski J., Zaluski D., Łuczkiewicz M., *Salvia apiana in vitro shoot system as source of volatile fraction with acetylcholinesterase inhibitory potential*, **PSE Trends in Natural Products Research: a PSE Young Scientists’ Meeting**, Kolympari, Kreta, Grecja, 23-26.05.2022, książka abstraktów: 101-102 (**wystąpienie ustne w języku angielskim**)
4. **Król A.**, Kokotkiewicz A., Królika A., Badura A., Lorenc A., Wróblewska-Marzec U., Buciniński A., Łuczkiewicz M., *Application of scaling up procedure for Salvia apiana in vitro excised and hairy root cultures*, **15th International Association for Plant Biotechnology Congress (IAPB 2023)**, Daejeon, Korea Południowa, 6-11.08.2023 Abs. P-235, 488 (**plakat w języku angielskim**)
5. **Król A.**, Kokotkiewicz A., Zabiegała B., Ciesielska-Figlon K., Witkowski J. M., Łuczkiewicz M., *Salvia apiana In Vitro Shoot System as a source of biologically active volatile fraction*, **53rd International Symposium On Essential Oils (ISEO)**, Milazzo, Włochy, 13-16.09.2023, książka abstraktów: YOL-2 (**wystąpienie ustne w języku angielskim**)
6. **Król A.**, Kokotkiewicz A., Królika A., Badura A., Lorenc A., Wróblewska-Marzec U., Buciniński A., Łuczkiewicz M., *Hairy and excised roots of Salvia apiana as in vitro systems for rosmarinic acid production*, **XXVII Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**, Gdynia, 28-29.09.2023, <https://ejtcm.gumed.edu.pl/articles/156> [dostęp: 28.09.2023] (**plakat w języku angielskim**).

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	7
SUMMARY	13
Wstęp i cel pracy	19
WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY.....	24
1 CZĘŚĆ TEORETYCZNA	26
1.1 Charakterystyka <i>Salvia apiana</i> Jepson	26
1.1.1 Stanowisko systematyczne.....	26
1.1.2 Występowanie.....	26
1.1.3 Morfologia	27
1.1.4 Zastosowanie etnofarmkologiczne.....	28
1.1.5 Profil fitochemiczny.....	28
1.1.6 Aktywność biologiczna badanego gatunku.....	29
1.2 Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach <i>in vitro</i> mikropędów, namnażanych w instalacjach wielkolaboratoryjnych, półtechnicznych oraz przemysłowych.	32
1.2.1 Rodzaje metabolitów wtórnych produkowanych w instalacjach o charakterze bioreaktorów	33
1.2.2 Rodzaje wykorzystywanych bioreaktorów	35
1.2.2.1 Bioreaktory z mieszaniem mechanicznym	36
1.2.2.2 Bioreaktory z mieszaniem pneumatycznym	40
1.2.2.3 Systemy okresowo-zalewowe oraz zalewowe	48
1.2.2.4 Bioreaktory natryskowe	59
2 BADANIA WŁASNE	66
2.1 Wstęp	66
2.2 Otrzymanie kultur <i>in vitro</i> <i>Salvia apiana</i> o różnym stopniu cytodyferencjacji	68
2.2.1 Otrzymanie kultur nietransformowanych	68
2.2.1.1 Kiełkowanie nasion oraz potwierdzenie tożsamości gatunkowej badanej rośliny	68
2.2.1.2 Wyprowadzenie kultur nietransformowanych <i>S. apiana</i>	71
2.2.1.3 Potwierdzenie tożsamości gatunkowej kultur nietransformowanych <i>S. apiana</i>	82
2.2.2 Otrzymanie kultur kolekcyjnych korzeni transformowanych <i>S. apiana</i>	83
2.3 Ocena potencjału biosyntetycznego kolekcyjnych kultur <i>in vitro</i> <i>S. apiana</i> w zakresie produkcji związków terpenowych i polifenolowych	89
2.3.1 Analiza fitochemiczna nietlotnych terpenów i polifenoli z kultur <i>in vitro</i> <i>S. apiana</i> oraz z upraw gruntowych.....	90
2.3.1.1 Przygotowanie surowców roślinnych do badań fitochemicznych	91
2.3.1.2 Wybór metody ekstrakcji i oczyszczania.....	91
2.3.1.3 Analiza jakościowa oraz ilościowa frakcji polifenolowych oraz nietlotnych terpenów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC-DAD-ESI/MS)....	92
2.3.2 Analiza fitochemiczna olejków eterycznych z kultur <i>in vitro</i> <i>S. apiana</i> oraz z upraw gruntowych	106
2.3.2.1 Przygotowanie surowców roślinnych do badań fitochemicznych	106
2.3.2.2 Wybór metody izolacji olejków eterycznych.....	107
2.3.2.3 Porównawcza analiza jakościowa i ilościowa olejków eterycznych z biomas <i>S. apiana</i> i <i>S. officinalis</i> z wykorzystaniem chromatografii gazowej (GC-MS i GC-FID).....	111

2.4	Morfogeniczne kultury ciągłe <i>S. apiana</i>	116
2.4.1	Kultura ciągła korzeni odciętych <i>S. apiana</i> : wzrost i profil metaboliczny.....	116
2.4.1.1	Optymalizacja warunków prowadzenia kultury ciągłej korzeni odciętych <i>S. apiana</i> w skali laboratoryjnej.....	117
2.4.1.2	Kultury bioreaktorowe korzeni odciętych <i>S. apiana</i>	123
2.4.2	Kultura ciągła korzeni transformowanych <i>S. apiana</i> : wzrost i profil metaboliczny.....	130
2.4.2.1	Optymalizacja warunków prowadzenia kultur ciągłych korzeni transformowanych <i>S. apiana</i> w skali laboratoryjnej.....	130
2.4.2.2	Korzenie transformowane <i>S. apiana</i> prowadzone w instalacjach wielkolaboratoryjnych	136
2.4.3	Kultury ciągłe mikropędów <i>S. apiana</i> – wzrost, akumulacja lotnych terpenów oraz wybrane aspekty aktywności biologicznej.....	141
2.4.3.1	Optymalizacja warunków prowadzenia kultur ciągłych mikropędów <i>S. apiana</i> w skali laboratoryjnej.....	142
2.4.3.2	Mikropędy <i>S. apiana</i> prowadzone w instalacjach wielkolaboratoryjnych.....	146
2.4.3.3	Badanie wybranych kierunków aktywności biologicznej frakcji lotnych z liści roślin gruntowych oraz mikropędów <i>S. apiana</i>	180
3	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	192
3.1	Materiały i metodyka badań biotechnologicznych.....	192
3.1.1	Materiał roślinny wykorzystywany do badań biotechnologicznych.....	192
3.1.2	Technika badań.....	192
3.1.3	Odczynniki i podłoża doświadczalne.....	193
3.1.4	Warunki prowadzenia kultywacji.....	195
3.1.5	Ocena przyrostu otrzymanych biomas <i>in vitro S. apiana</i>	196
3.1.6	Ocena makroskopowa otrzymanych biomas <i>in vitro S. apiana</i>	196
3.1.7	Ocena mikroskopowa otrzymanych biomas <i>in vitro S. apiana</i>	196
3.1.8	Wyprowadzenie kultur <i>in vitro S. apiana</i>	196
3.1.8.1	Sterylizacja i kiełkowanie nasion.....	196
3.1.8.2	Wyprowadzenie kultur <i>in vitro S. apiana</i> o różnym stopniu cytodyferencjacji.....	197
3.1.8.3	Wyprowadzenie kultur korzeni transformowanych.....	199
3.1.8.4	Wzrost oraz profil metaboliczny kultur kolekcyjnych (mikropędy oraz korzenie odcięte i transformowane).....	201
3.1.9	Morfogeniczne kultury ciągłe <i>S. apiana</i> : wzrost oraz profil metaboliczny.....	202
3.1.9.1	Kultury ciągłe korzeni odciętych <i>S. apiana</i>	202
3.1.9.2	Kultury ciągłe korzeni transformowanych <i>S. apiana</i>	205
3.1.9.3	Kultury ciągłe mikropędów <i>S. apiana</i>	207
3.2	Materiały i metodyka badań fitochemicznych.....	214
3.2.1	Materiał roślinny.....	215
3.2.2	Przygotowanie surowców roślinnych do badań – suszenie.....	215
3.2.3	Analiza fitochemiczna wybranych metabolitów wtórnych i ich zespołów w matrycach roślinnych z upraw gruntowych i kultur <i>in vitro</i>	216
3.2.3.1	Analiza związków lotnych.....	216
3.2.3.2	Analiza związków polifenolowych oraz nielotnych terpenów.....	217
3.3	Materiały i metodyka badań biologicznych.....	220
3.3.1	Wpływ wybranych frakcji lotnych <i>S. apiana</i> na aktywność inhibicyjną względem acetylocholinoesterazy, tyrozynazy oraz hialuronidazy.....	220
3.3.1.1	Materiał do badań.....	220
3.3.1.2	Badanie aktywności inhibicyjnej względem acetylocholinoesterazy.....	220

3.3.1.3	Badanie aktywności inhibicyjnej względem hialuronidazy	221
3.3.1.4	Badanie aktywności inhibicyjnej względem tyrozynazy	221
3.3.2	Wpływ olejków eterycznych z <i>S. apiana</i> oraz 1,8-cineolu na obwodowe limfocyty T u osób zdrowych.....	222
3.3.2.1	Materiał roślinny do badań	222
3.3.2.2	Badane osoby	222
3.3.2.3	Proliferacja limfocytów	222
3.3.2.4	Cytometria przepływowa	223
3.4	Analiza statystyczna.....	223
WYNIKI I WNIOSKI		225
BIBLIOGRAFIA.....		237
SPIS TABEL I RYCIN		261

STRESZCZENIE

W zaprezentowanej rozprawie doktorskiej przedstawiono wybrane aspekty otrzymywania roślinnych systemów *in vitro* na bazie szałwii białej (*Salvia apiana* Jeps.), stanowiących ciągle źródło wtórnych metabolitów z grupy terpenów i polifenoli, o określonych własnościach terapeutycznych, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu schorzeń cywilizacyjnych, w tym zespołów neurodegradacyjnych (choroba Alzheimera) oraz autoimmunologicznych.

Prace doświadczalne prowadzono na trzech współzależnych płaszczyznach, obejmujących badania biotechnologiczne, fitochemiczne oraz testy dotyczące wybranych aspektów aktywności biologicznej.

Część teoretyczna niniejszej dysertacji składa się z dwóch rozdziałów, których integralnymi fragmentami są anglojęzyczne, pełnotekstowe prace naukowe. W pierwszym podrozdziale, obejmującym również publikację pt.: “*White sage (Salvia apiana) – a Ritual and Medicinal Plant of the Chaparral: Plant Characteristics in Comparison with Other Salvia Species*” (*Planta medica*, 2022), poruszono zagadnienia związane z charakterystyką botaniczno-ekologiczną, zastosowaniem etnofarmakologicznym, składem chemicznym oraz aktywnością biologiczną omawianej rośliny. W drugim z rozdziałów, zawartych w części teoretycznej przedstawionego manuskryptu, w którego skład wchodzi także monografia pt.: “*Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production*”, opublikowana w książce pt.: “*Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites, 2020*”, podsumowano aktualny stan wiedzy na temat wykorzystania bioreaktorów do produkcji roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* mikropędów, pędów oraz w wykształconych roślinkach. Szczególną uwagę zwrócono na takie aspekty przeprowadzonych eksperymentów jak: rodzaj biosyntezy metabolitów wtórnych, wraz z osiąganą w systemie roślinnym produktywnością, oraz typ instalacji, zastosowany do namnażania biomasy.

Syntetyczne podsumowanie dotychczasowych badań nad szałwią białą oraz biotechnologicznymi metodami pozyskiwania metabolitów wtórnych z kultur mikropędów, zawarte we wstępie rozprawy, stanowiło punkt wyjścia do opracowania ciągłych kultur *in vitro* wybranego gatunku, prowadzonych w skali wielkolaboratoryjnej, wyróżniających się zdolnością do produkcji wyselekcjonowanych, biologicznie aktywnych fitozwiązków.

W drugiej części niniejszej dysertacji przedstawiono własne badania, dotyczące otrzymywania kultur *in vitro* *S. apiana* o różnym stopniu cytodyferencji oraz ich charakterystykę fitochemiczną opartą na analizach namnożonych biomas w zakresie składu jakościowego i ilościowego akumulowanych w nich związków terpenowych oraz polifenolowych. Powyższe eksperymenty umożliwiły realizację nadrzędnego celu projektu doktoranckiego, tj. uzyskania z wyselekcjonowanych „superproducentów” roślinnych systemów *in vitro*, z przeznaczeniem do otrzymywania, właściwych dla szałwii białej, zespołów połączeń naturalnych. Potwierdzenie potencjalnie prozdrowotnego charakteru syntezowanych w kulturach *in vitro* metabolitów wtórnych uzyskano w oparciu o badania inhibicji

acetylocholinoesterazy, tyrozynazy i hialuronidazy przez wspomniane zespoły (związki mono- i seskwiterpenowe) w testach *in vitro* oraz w ramach eksperymentów biologicznych prowadzonych na pierwotnych kulturach ludzkich limfocytów T (działanie immunosupresyjne).

W przypadku rodzaju *Salvia*, występowanie poszczególnych grup metabolitów wtórnych, tj. terpenów i polifenoli, jest często ograniczone do wąskich grup filogenetycznych omawianego taksonu. Wybrana do projektu doktoranckiego endemiczna roślina, *Salvia apiana* Jeps., łączy w sobie potencjał biosyntetyczny różnych, leczniczych gatunków szalwii, tj. charakteryzuje się szerokim profilem fitochemicznym w zakresie wymienionych klas związków zarówno w przypadku części nadziemnych, jak i korzeni (olejek eteryczny, diterpenoidy typu nor- i abietanu, kwasy fenolowe oraz flawonoidy).

Pierwszy etap doświadczeń biotechnologicznych, zawarty w projekcie doktoranckim, obejmował wyprowadzenie, po raz pierwszy, z materiału nasiennego, inicjalnych kultur *in vitro* szalwii białej, a następnie ich stabilizację na dobranych empirycznie podłożach wzrostowych. Jako eksplantaty inicjalne, do otrzymania właściwych hodowli, wykorzystano system korzeniowy oraz części liścieniowe i hipokotylowe uprzednio wysterylizowanej siewki. Dodatkowo, podjęto się próby uzyskania korzeni transformowanych badanego gatunku poprzez infekcję, w warunkach *in vitro*, tkanek szalwii białej, symbiotycznymi szczepami bakterii *Agrobacterium rhizogenes*: LBA9402, A4 oraz 15834. Ocena wyprowadzonych biomas kolekcyjnych (mikropędy, korzenie odcięte i transgeniczne oraz kalus) dotyczyła ich morfologii (konsystencja, barwa oraz stopień zróżnicowania tkankowego), tempa wzrostu (wyznaczenie parametrów przyrostu) oraz składu chemicznego w zakresie wtórnych metabolitów (analizy chromatograficzne olejków eterycznych oraz połączeń nielotnych zawartych w wyciągach metanolowych). Przeprowadzenie fitochemicznych analiz jakościowych i ilościowych otrzymanych matryc roślinnych możliwe było dzięki zoptymalizowaniu, w toku projektu, warunków ekstrakcji oraz chromatograficznego rozdzielania mieszanin metabolitów wtórnych uzyskanych z poszczególnych kultur *in vitro* oraz macierzystej rośliny gruntowej. Ponadto, ze względu na ewentualne przeznaczenie biomas *in vitro* szalwii białej do ogólnie rozumianych celów leczniczych, we wstępnych badaniach porównano potencjał metaboliczny wybranego do projektu gatunku ze składem chemicznym rodzimej szalwii lekarskiej (*S. officinalis* L.), stosowanej powszechnie w prewencji oraz terapii szeregu schorzeń. Podczas prowadzenia doświadczeń biotechnologicznych systematycznie kontrolowano również zawartość oraz skład zespołów wybranych połączeń naturalnych (terpeny i polifenole) w kulturach *in vitro*, porównując uzyskane wyniki z profilem metabolicznym rośliny macierzystej, celem określenia skuteczności stosowania poszczególnych procedur eksperymentalnych.

W rezultacie przeprowadzonych prac doświadczalnych, w wyniku selekcji eksplantatów, optymalizacji składu pożywek wzrostowych oraz warunków hodowli, otrzymano po raz pierwszy kultury kolekcyjne badanej rośliny, takie jak: mikropędy, kalusy oraz korzenie odcięte, natomiast nie udało się uzyskać z powyższych biomas parenchymatycznych stabilnej zawiesiny. Wyprowadzono również pięć linii klonalnych korzeni włóśnikowatych *S. apiana*, w wyniku infekcji biomas *in vitro*

(mikropędy) szczepami bakterii *A. rhizogenes*: LBA9402 oraz A4, których charakter transgeniczny potwierdzono na podstawie analizy PCR.

Otrzymane kultury kolekcyjne charakteryzowały się zróżnicowanymi wymaganiami pod względem podłoża. Mikropędy szałwii białej namnażano na stacjonarnej pożywce Schenka-Hildebrandta (SH), suplementowanej 2,0 mg L⁻¹ benzyloaminopuryny (BAP) i 0,22 mg L⁻¹ tidiazuronu (TDZ). Dwie kultury kalusa prowadzono na zestalonym agarem podłożu SH, wzbogaconym 2,0 mg L⁻¹ kwasu indoliloctowego (IAA) i 0,5 mg L⁻¹ kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) oraz, równolegle, na drugim medium Murashige'a-Skoog'a (MS), z dodatkiem 0,5 mg L⁻¹ kinetyny i 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D. Korzenie odcięte kultywowano w płynnej pożywce SH, suplementowanej 1,0 mg L⁻¹ kwasu indolilomasłowego (IBA), natomiast tkanki transgeniczne – w podłożu SH pozbawionym regulatorów wzrostu (SH₀).

Analiza mikroskopowa kultur nietransformowanych wykazała obecność wydłużonych i cienkościennych komórek miękiszowych strefy włósnikowej w biomasie korzeni anatomicznych oraz transgenicznych, niezróżnicowanych komórek parenchymatycznych w kalusach oraz struktur wydzielniczych, odpowiedzialnych za produkcję olejku eterycznego, w mikropędach. Nie stwierdzono czerwonego wybarwienia perydermy w komórkach korzeni odciętych, co wstępnie wskazywało na brak obecności metabolitów wtórnych o charakterze tanszinonów.

W toku prac fitochemicznych (hydrodestylacja matryc roślinnych w aparacie Clevengera; analizy chromatograficzne GC/MS oraz GC/FID frakcji lotnych) stwierdzono, że mikropędy testowanego gatunku zachowały zdolność do biosyntezy olejku eterycznego, ale na poziomie nieco niższym niż rośliny gruntowe *S. apiana* i *S. officinalis* (odpowiednio, 1,27 oraz 4,32 i 2,35% v/m). Jednocześnie, zespół lotnych terpenów, wyizolowany z biomas *in vitro*, charakteryzował się obecnością metabolitów wtórnych występujących w gatunku macierzystym. Dodatkowo, w powyższych matrycach roślinnych nie stwierdzono obecności tujonu, neurotoksycznego monoterpenu typowego dla rodzimej szałwii lekarskiej. Z kolei w toku prac fitochemicznych, komplementarnych do wyżej omówionych eksperymentów (wyczerpująca ekstrakcja metanolem biomas *in vitro* oraz poszczególnych części morfologicznych testowanego gatunku z upraw gruntowych; analizy otrzymanych wyciągów techniką HPLC-DAD-ESI/MS), wykazano, że wprowadzenie testowanej rośliny do kultur tkankowych spowodowało w poszczególnych matrycach roślinnych wyraźne zmiany szlaków biosyntezy nielotnych terpenów i polifenoli. W mikropędach *S. apiana* zidentyfikowano: kwas rozmarynowy (68,8 mg g⁻¹ DW), karnozol (6,15 mg g⁻¹ DW), hesperydynę (1,20 mg g⁻¹ DW), kwas karnozowy (0,41 mg g⁻¹ DW), rosmanol oraz kryptotanszinon (ilości śladowe), tj. związki charakterystyczne dla macierzystego gatunku. Co więcej, zawartości dwóch pierwszych z wymienionych metabolitów w zespole były wyższe, odpowiednio – 3,6- oraz 1,5-krotnie, w porównaniu do liści rośliny gruntowej. Kultury korzeni zarówno anatomicznych jak i włósnikowatych wykazywały zdolność do produkcji jedynie ubożego zespołu polifenoli, w którym dominował kwas rozmarynowy (korzenie odcięte – 17,22 mg g⁻¹ DW oraz transformowane – nie mniej niż 9,83 mg g⁻¹ DW), brak było natomiast diterpenoidów, występujących

w warunkach naturalnych. W kalusach szałwii białej (media SH oraz MS) zidentyfikowano wyłącznie kwas rozmarynowy, w ilości znacznie niższej niż w pozostałych biomasach (odpowiednio, 5,60 oraz 1,92 mg g⁻¹ DW).

W rezultacie, w wyniku przeprowadzonej analizy fitochemicznej do dalszych etapów prac biotechnologicznych, przeznaczono kultury korzeni anatomicznych i transgenicznych oraz mikropędów *S. apiana*, jako źródła, odpowiednio, kwasu rozmarynowego bądź frakcji lotnych. Zdecydowano się jednocześnie na rezygnację z kontynuowania eksperymentów w oparciu o biomasy kalusowe o zawężonym potencjale produkcyjnym w zakresie ocenianych metabolitów wtórnych, tak pod względem jakościowym, jak i ilościowym.

Zgodnie z przedstawionym we wstępie planem badań, w doświadczeniach ukierunkowanych na otrzymanie systemów *in vitro* szałwii białej, zdolnych do produkcji powyższych, aktywnych biologicznie związków, podjęto się adaptacji wymienionych kultur szałwii białej do wzrostu w bioreaktorach.

W pracach eksperymentalnych dotyczących biomas korzeniowych wykorzystano zarówno organy nietransformowane, jak i transgeniczne (klon TA1 pochodzący z infekcji materiału roślinnego bakteriami *A. rhizogenes* – szczep A4), ze względu na ich selektywną zdolność do produkcji kwasu rozmarynowego. Właściwe eksperymenty w skali wielkolaboratoryjnej poprzedziło scharakteryzowanie profili wzrostowych oraz morfologii otrzymanych hodowli na poziomie kultur wytrząsanych. Dodatkowo, w przypadku korzeni odciętych zoptymalizowano warunki namnażania materiału roślinnego modyfikując reżim oświetleniowy oraz zawartość regulatora wzrostu IBA w medium odżywczym. Na dalszych etapach prac eksperymentalnych, wspomniane biomasy szałwii białej kultywowano w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych o mechanizmie mieszania i napowietrzania opartym na barbotażu oraz w prototypowej instalacji natryskowej. W rezultacie, korzystniejszy wzrost korzeni odciętych stwierdzono podczas ich kultywacji w ciemności, w pożywce wzbogaconej IBA, w stężeniu 1,0 (SH_{IBA1,0}) lub 1,5 mg L⁻¹ (SH_{IBA1,5}). Profile wzrostowe omawianych kultur *S. apiana*, namnażanych w podłożach, wzbogaconych wspomnianym fitohormonem (organy nietransformowane) oraz w pożywce odżywczej bez dodatku regulatorów wzrostu (SH₀ – organy transgeniczne), wykreślone na podstawie zmian ilości świeżej i suchej masy w czasie, charakteryzowały się klasycznym, sigmoidalnym przebiegiem. Analiza HPLC-DAD-ESI/MS matryc roślinnych, zebranych podczas trwania fazy stacjonarnej, przy osiągniętych w tym okresie najwyższych wartościach współczynników przyrostu kultur (korzenie odcięte: $G_{i_{max}}^{48.dzień} = 2367,8\%$ – medium SH_{IBA1,0} oraz $G_{i_{max}}^{33.dzień} = 1658,2\%$ – podłoże SH_{IBA1,0}; linie transgeniczne: $2139,7\% < G_{i_{max}}^{60.dzień} < 2610,3\%$ – pożywka SH₀), wykazała, że testowane organy roślinne akumulowały wybiórczo kwas rozmarynowy (44,5 i 31,7 mg g⁻¹ DW – korzenie anatomiczne oraz 38,1 mg g⁻¹ DW – linia TA1 korzeni włóśnikowatych). Spośród kultywowanych w bioreaktorach biomas tkankowych, korzenie transformowane, rosnące przez 60 dni w urządzeniach natryskowych, charakteryzowały się najwyższą produktywnością kwasu rozmarynowego (9,66 mg L⁻¹ d⁻¹). Wyniki doświadczeń wskazały tym samym

na możliwość wykorzystania wspomnianych kultur wielkolaboratoryjnych do selektywnej produkcji niniejszego kwasu fenolowego o wielokierunkowej aktywności biologicznej.

Realizując kolejne zadanie badawcze, zoptymalizowano, na etapie prac laboratoryjnych, warunki hodowli mikropędów *S. apiana* modyfikując typ kultury: stacjonarne (płynne i agarowe) oraz wytrząsane. Materiał roślinny o najwyższym współczynniku przyrostu ($G_i = 641,3\%$) oraz morfologii najbardziej zbliżonej do części nadziemnych badanego gatunku (brak cech witrifikacji, nekrozy oraz obecności liści potwornych) uzyskano z biomas wytrząsanych w pożywce płynnej SH_B. Analizując krzywą wzrostową, sporządzoną dla systemu płynno-wytrząsanego, wykreśloną na podstawie zmian ilości suchej masy pędowej w czasie, stwierdzono, że omawiana kultura charakteryzuje się, w cyklu eksperymentalnym, dość dynamicznym wzrostem, a największy przyrost mikropędów uzyskano w dniu 21. (faza stacjonarna – $G_i = 734,3\%$). W doświadczeniach prowadzonych w skali wielkolaboratoryjnej (dalsza optymalizacja systemu wzrostowego) zastosowano bioreaktory o zróżnicowanym systemie dostarczania pożywki oraz napowietrzania (instalacje okresowo-zalewowe PLANTFORM[®] i RITA[®] oraz prototypowe urządzenie natryskowe). Mikropędy rosnące w wymienionych instalacjach charakteryzowały się gorszymi parametrami wzrostu oraz nieznacznie obniżoną zawartością frakcji lotnej w biomacie, względem odpowiednich kultur płynnych-wytrząsanych. W przypadku pędów *in vitro*, namnażanych w urządzeniu natryskowym, po czasie kultywacji wynoszącym 28 dni (medium SH_B), uzyskano dla nich zadowalający współczynnik przyrostu ($G_i = 575,9\%$) oraz najwyższą zawartość olejku eterycznego (1,27%). Z kolei najkorzystniejszą produktywność (0,93 mL L⁻¹ d⁻¹) osiągnięto podczas inkubacji omawianych tkanek roślinnych w bioreaktorze natryskowym, w 21. dniu hodowli. Wyniki doświadczeń wskazały tym samym na możliwość wykorzystania kultur wielkolaboratoryjnych mikropędów *S. apiana* jako alternatywnego źródła olejku eterycznego, którego głównym składnikiem, podobnie jak w roślinie gruntowej, był 1,8-cineol (30,4-55,0%).

Ostatni etap prac biotechnologicznych dotyczył wykorzystania wybranych strategii z zakresu elicytacji i dokarmiania celem stymulacji wzrostu mikropędów *S. apiana* oraz produkcji przez wspomniane biomasy olejku eterycznego. Ograniczenie zakresu prowadzenia powyższych doświadczeń do jednego typu kultury ciągłej szalwii białej oraz monitorowanie, w toku prac eksperymentalnych, tylko stężenie lotnych połączeń terpenowych podyktowane było wąskimi ramami czasowymi projektu doktoranckiego, w czasie którego przeprowadzenie eksperymentów dla każdego systemu *in vitro* oraz wszystkich grup związków naturalnych, występujących w testowanych matrycach roślinnych, byłoby niemożliwe. Mikropędy szalwii białej, namnażane w bioreaktorach okresowo-zalewowych RITA[®], na okres ostatnich trzech lub siedmiu dni kultywacji, poddano działaniu chitosanu (200 mg L⁻¹), ergosterolu (10 μM) i wyciągu drożdżowego (50 i 100 mg L⁻¹) oraz świeżego soku z liści *Urtica dioica* L. (2,5%), na czas całej inkubacji w instalacjach wielkolaboratoryjnych. W efekcie, stwierdzono, że jedyną skuteczną, spośród zastosowanych strategii stymulowania biosyntezy olejku eterycznego, jest aplikacja do pożywki ekstraktu drożdżowego, w wyższym z wymienionych stężeń (100 mg L⁻¹), na 7 dni przez zbiorem tkanek roślinnych, tj. bezpośrednio przed osiągnięciem przez kulturę fazy stacjonarnej.

W wyniku wykorzystania powyższej procedury podwyższono w biomasach, w porównaniu do kultury referencyjnej (1,10%), poziom akumulowanej frakcji lotnej o ok. 9% (1,20%). Wszystkie zastosowane elicytory oraz substancje odżywcze zawarte w soku z pokrzywy nasilały wybiórczo biosyntezę seskwiterpenów w mikropędach, czemu towarzyszyła niższa, względem kultury referencyjnej, zawartość w tkankach monoterenów utlenionych, w tym głównego składnika powyższej frakcji – 1,8-cineolu. Wyniki doświadczeń wskazały zatem na ograniczoną możliwość stymulacji metabolizmu wtórnych pędów *in vitro* szałwii białej z wykorzystaniem wymienionych zabiegów eksperymentalnych.

W ostatnim z obszarów badawczych, opisywanych w niniejszym projekcie doktoranckim, poddano ocenie aktywność biologiczną olejków eterycznych, wyizolowanych z liści *S. apiana*, pochodzących ze środowiska naturalnego, a także z mikropędów tego gatunku otrzymanych metodami biotechnologicznymi. Do testów włączono również główny składnik powyższych frakcji lotnych – 1,8-cineol. Zawężenie zakresu prowadzonych doświadczeń do olejku eterycznego, zawartego w mikropędach szałwii białej, wynikało z ograniczeń czasowych i finansowych projektu. Przeprowadzone eksperymenty dotyczyły zdolności lotnych terpenów *S. apiana* do hamowania, w warunkach *in vitro*, aktywności inhibicyjnej acetylocholinoesterazy (AChE), tyrozynazy (Tyr) oraz hialuronidazy (Hyal), a także określenie wpływu powyższego zespołu metabolitów wtórnych na limfocyty T (zdolność do supresji układu immunologicznego). W rezultacie przeprowadzonych doświadczeń, w testach enzymatycznych stwierdzono większą aktywność anty-AChE oraz anty-Tyr olejku eterycznego otrzymanego z liści rośliny gruntowej, w porównaniu z frakcją lotną pozyskaną z biomas *in vitro*, natomiast Hyal była silniej hamowana przez lotne terpeny syntezowane w mikropędach szałwii białej. Testy, prowadzone w kulturach pierwotnych limfocytów T, pochodzących od osób zdrowych, wykazały, zależne od dawki stężenia olejku, nasilenie apoptozy oraz ograniczenie proliferacji badanych komórek krwi.

Przeprowadzony cykl badań potwierdził użyteczność, otrzymanych po raz pierwszy, kultur *in vitro* szałwii białej, jako niezależnego od środowiska, źródła aktywnych biologicznie grup metabolitów wtórnych, takich jak: olejek eteryczny oraz frakcje polifenoli i nielotnych terpenów. Optymalizacja kultury wspomnianych biomas w bioreaktorach pozwala na otrzymanie, w jednym cyklu eksperymentalnym, znacznej ilości materiału roślinnego do wykorzystania w dalszych, pogłębionych badaniach fitochemicznych i biologicznych.

SUMMARY

This PhD dissertation presents selected aspects of developing *in vitro* plant systems based on white sage (*Salvia apiana* Jeps.), representing a continuous source of secondary metabolites (terpenes and polyphenols), with specific therapeutic properties, which may find application in the treatment of lifestyle diseases, including neurodegradation (Alzheimer's disease) and autoimmunity syndromes.

Experiments were carried out on three interdependent levels, covering biotechnological and phytochemical studies as well as tests on selected aspects of biological activity.

The theoretical part of this dissertation consists of two chapters, integral parts of which are English-language, full-text academic papers. The first chapter, which also includes the paper entitled *White sage (Salvia apiana) - a ritual and medicinal plant of the chaparral: plant characteristics in comparison with other Salvia species (Planta medica, 2022)*, addresses issues related to the botanical-ecological characteristics, ethno-pharmacological use, chemical composition and biological activity of the plant. The second theoretical chapter, which also includes a monograph entitled: *Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production*, published in the book *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites, 2020*, summarises the current state of knowledge on the use of bioreactors for the production of plant secondary metabolites in the *in vitro* cultures of microshoots, shoots and in developed plantlets. Special attention was paid to the type of secondary metabolites that were biosynthesised, together with the productivity achieved in the plant systems, and the type of installations used for biomass multiplication.

The concise summary of previous research on white sage and biotechnological methods of obtaining secondary metabolites from microshoot cultures, contained in the introduction of the dissertation, provided a starting point for the development of continuous *in vitro* cultures of the selected species, conducted on a large-laboratory scale, distinguished by their ability to produce selected, biologically active phytochemicals.

The second part of this dissertation presents our own research into obtaining *in vitro* cultures of *S. apiana* with different degrees of cytodifferentiation, as well as their phytochemical characterisation based on analyses of the proliferated biomasses in terms of the qualitative and quantitative composition of the terpene and polyphenolic compounds accumulated in them. These experiments laid the foundation necessary to achieve the main goal of the doctoral project, i.e. to obtain plant *in vitro* systems from selected 'superproducers', designed to produce the aforementioned natural compounds specific to white sage. The confirmation of the potentially health-promoting nature of the obtained secondary metabolites was based on studies of the inhibition of acetylcholinesterase, tyrosinase and hyaluronidase by these sets of natural compounds in the *in vitro* tests and in biological experiments conducted on primary cultures of human T lymphocytes (immunosuppressive effect) synthesized in mono- and sesquiterpene biomasses.

In the case of the genus *Salvia*, the occurrence of particular groups of secondary metabolites, i.e. terpenes and polyphenols, is often restricted to narrow phylogenetic groups of the taxon in question. The endemic plant *Salvia apiana* Jeps. has been selected for the PhD project as it combines the biosynthetic potential of various medicinal species of *Salvia*, in that it has a broad phytochemical profile rich in various compounds of the above mentioned classes in both the herb and the roots (volatile oil, nor- and abietane-type diterpenoids, phenolic acids and flavonoids).

The first stage of the biotechnological experiments, included in the doctoral project, involved the derivation, for the first time, of *in vitro* initial cultures of white sage from seed material and their subsequent stabilisation on empirically selected growth media. The root system and cotyledon and hypocotyl parts of a previously sterilized seedling were used as initial explants to obtain the target cultures. In addition, an attempt was made to obtain transformed roots of the tested species by infecting *in vitro* tissues of white sage with symbiotic strains of *Agrobacterium rhizogenes* bacteria: LBA9402, A4 and 15834. The evaluation of the derived biomass cultures (microshoots, adventitious roots and transgenic roots and callus) concerned their morphology (consistency, colour and degree of tissue differentiation), growth rate (determination of growth parameters) and chemical composition in terms of secondary metabolites (chromatographic analyses of essential oils and non-volatile compounds contained in methanol extracts). Qualitative and quantitative phytochemical analyses of the obtained plant matrices were possible thanks to the optimization of the extraction and separation conditions of the sets of secondary metabolites obtained from individual *in vitro* cultures and the parent intact plant of the species. Moreover, given the possible *in vitro* use of white sage biomasses for overall medicinal purposes, preliminary studies included a comparison of the metabolic potential of white sage with the chemical composition of medicinal sage native to Poland (*S. officinalis* L.), commonly used in the prevention and treatment of a number of conditions. During the biotechnological experiments, the content and composition of selected natural compounds (terpenes and polyphenols) in *in vitro* cultures were systematically controlled, comparing the obtained results with the metabolic profile of the intact plant in order to determine the effectiveness of individual experimental procedures.

The experimental work and the careful selection of explants, the composition of growth media and culture conditions, resulted for the first time in developing stable cultures of the tested plant, specifically, microshoots, callus and roots. However, it was not possible to obtain a stable suspension from the above mentioned parenchymatic biomasses. Five clonal lines of *S. apiana* hairy roots have also been developed as a result of *in vitro* infection of the biomass (microshoots) with *A. rhizogenes* bacterial strains LBA9402 and A4, whose transgenic nature was confirmed by PCR analysis.

The obtained cultures had diversified requirements in terms of the growth media. White sage microshoots were propagated on stationary Schenk-Hildebrandt (SH) medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ benzylaminopurine (BAP) and 0.22 mg L⁻¹ thidiazuron (TDZ). Two callus cultures were maintained on SH media solidified with agar and supplemented with 2.0 mg L⁻¹ indole-3-acetic acid (IAA) and 0.5 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and, in parallel, in the second Murashige-

Skoog (MS) medium, with the addition of 0.5 mg L⁻¹ kinetin and 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D. The adventitious roots were cultivated in liquid SH medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ of indole-3-butyric acid (IBA), while the transgenic roots were cultivated in SH medium without growth regulators (SH₀).

Microscopic analysis of untransformed cultures showed the presence of elongated and thin-walled parenchyma cells of the root hair zone in the biomass of anatomical and transgenic roots, undifferentiated parenchymatic cells in calli and secretory structures responsible for the production of essential oil in microshoots. There was no red discoloration of the periderm in the root cells, which is a preliminary indication of the absence of secondary metabolites of the tanshinone type.

Phytochemical work (hydrodistillation of plant matrices in a Clevenger apparatus; GC/MS and GC/FID chromatographic analyses of volatile fractions) revealed that the microshoots of the tested species retained the ability to biosynthesise essential oil, but at a level slightly lower than the intact plants of *S. apiana* and *S. officinalis* (1.27% v/m, 4.32% v/m and 2.35% v/m, respectively). At the same time, the set of volatile terpenes isolated from *in vitro* biomasses was characterised by the presence of secondary metabolites present in the parent species. In addition, thujone, a neurotoxic monoterpene typical of native medicinal sage, was absent from these plant matrices. Phytochemical work complementary to the above-discussed experiments (exhaustive methanol extraction of *in vitro* biomasses and individual morphological parts of the ground crops; HPLC-DAD-ESI/MS analyses of the resulting extracts) showed that the cultivation of the test species as tissue cultures resulted in marked changes in the biosynthetic pathways of non-volatile terpenes and polyphenols in individual plant matrices. Rosmarinic acid (68.8 mg g⁻¹ DW), carnosol (6.15 mg g⁻¹ DW), hesperidin (1.20 mg g⁻¹ DW), carnosic acid (0.41 mg g⁻¹ DW), rosmanol and cryptotanshinone (trace amounts), i.e. compounds specific to the parent plant, were all identified in the aforementioned microshoots. Moreover, the contents of the first two of these metabolites in the set were higher, i.e. 3.6- and 1.5-fold, respectively, compared to the leaves of the intact plant. Root cultures, both anatomical and transgenic, showed the ability to produce only a scanty set of polyphenols, dominated by rosmarinic acid (adventitious roots: 17.22 mg g⁻¹ DW and transformed roots: no less than 9.83 mg g⁻¹ DW), while naturally occurring diterpenoids were absent. Only rosmarinic acid was identified in white sage calli (SH and MS media), and that in much lower amounts than in other biomass cultures (5.60 and 1.92 mg g⁻¹ DW, respectively).

As a result of the phytochemical analysis, cultures of anatomical and transgenic roots and microshoots of *S. apiana* were used for further stages of biotechnological work as sources of rosmarinic acid and volatile fractions, respectively. At the same time, it was decided not to continue experiments based on callus biomasses, given their narrow production potential in terms of the secondary metabolites assessed, both qualitatively and quantitatively. In accordance with the research plan presented in the introduction, the experiments aimed at obtaining *in vitro* white sage systems capable of producing the above biologically active compounds were continued towards the adaptation of these white sage cultures for growth in bioreactors.

In experimental work on root biomasses, both untransformed and transgenic organs were used (clone TA1 derived from infection of plant material with *A. rhizogenes* bacteria – strain A4) due to their selective ability to produce rosmarinic acid. The actual large-laboratory scale experiments were preceded by a characterisation of the growth profiles and morphology of the resulting cultures at the level of liquid media cultures. Additionally, in the case of roots, the conditions for the multiplication of plant material were optimized by modifying the lighting regime and the content of the IBA growth regulator in the nutrient medium. In further experimental work, the white sage biomasses were cultivated in the immersion-column bioreactors with a barbotage-based mixing and aeration mechanism and in a prototype spray installation. As a result, it was determined that roots grew better when cultivated in darkness in media supplemented with IBA at 1,0 ($SH_{IBA1,0}$) or 1,5 $mg\ L^{-1}$ ($SH_{IBA1,5}$). The discussed *S. apiana* cultures cultivated in SH media supplemented with variable quantities of the growth regulator (untransformed organs) and in SH medium without growth regulators (transgenic organs), judging by the growth curve, drawn on the basis of fresh and dry weight over time, had growth profiles of a classic sigmoid shape. HPLC-DAD-ESI/MS analysis of the plant matrices collected during the stationary phase, with the highest growth rates achieved in the culture during this period (roots: $Gi_{max\ 48.day} = 2367.8\%$ – medium $SH_{IBA1,0}$ and $Gi_{max\ 33.day} = 1658.2\%$ – medium $SH_{IBA1,0}$; transgenic lines: $2139.7\% < Gi_{max} < 2610.3\%$ – SH_0 medium), showed that the investigated plant organs selectively accumulated rosmarinic acid (44.5 and 31.7 $mg\ g^{-1}\ DW$ – anatomical roots and 38.1 $mg\ g^{-1}\ DW$ – line TA1 of hairy roots). Among tissue biomasses cultivated in bioreactors, transformed roots grown in spraying devices for 60 days were characterized by the highest productivity of rosmarinic acid (9.66 $mg\ L^{-1}\ d^{-1}$). The experimental results indicated the possibility of using them as large laboratory cultures for the selective production of rosmarinic acid.

The next research task was to optimise, at the laboratory stage, the conditions for cultivating *S. apiana* microshoots by modifying the culture type: stationary (liquid and agar) or liquid ones. Plant material with the highest growth rate ($Gi = 641.3\%$) and a morphology most similar to the herb of the tested species (no signs of vitrification, necrosis or monster leaves) were obtained from biomass agitated in liquid medium. Analysing the growth curve drawn up for the liquid suspension system and plotted as changes in shoot dry matter over time, it was found that the culture in question was characterised by rather dynamic growth over the experimental cycle, with the greatest growth of micro-shoots obtained on day 21 (stationary phase – $Gi = 734.3\%$). In large-laboratory scale experiments (further optimisation of the growth system), bioreactors with different nutrient supply and aeration systems were used (PLANTFORM[®] and RITA[®] batch-flood installations and a prototype spray unit). Microshoots grown in these installations were characterised by inferior growth parameters, compared to the corresponding liquid cultures, and a slightly reduced volatile fraction in the biomass. In the case of *in vitro* shoots propagated in a spray device, after a cultivation time of 28 days (SH_B medium), a satisfactory growth rate ($Gi = 575.9\%$) and the highest essential oil content (1.27%) were obtained. In contrast, the most favourable productivity (0.93 $mL\ L^{-1}\ d^{-1}$) was achieved when the plant tissues in question were incubated

in a spray bioreactor on day 21 of culture. The results of the experiments thus indicated the possibility of using large-scale cultures of *S. apiana* microshoots as an alternative source of essential oil, the main component of which, as in the intact plant, was 1,8-cineol (30.4-55.0%).

The final stage of biotechnological work concerned the use of selected elicitation and feeding strategies to stimulate the growth of *S. apiana* microshoots and the production of essential oil by these biomasses. The limitation of the scope of the above experiments to a single type of white sage continuous culture (microshoots), and monitoring, in the course of the experimental work, only the volatile terpene compounds was dictated by the narrow timeframe of the PhD project, during which it would have been impossible to carry out experiments for each *in vitro* system and all groups of natural compounds present in the plant matrices tested. White sage microshoots propagated in RITA[®] batch-flood bioreactors, for the last three or seven days of cultivation were treated with chitosan (200 mg L⁻¹), ergosterol (10 µM), yeast extract (50 and 100 mg L⁻¹) and, for the duration of the entire incubation in large-scale installations, fresh leaf juice of *Urtica dioica* L. (2.5%). As a result, it was found that among those strategies used to stimulate essential oil biosynthesis, the only effective one was the application of yeast extract to the medium at the higher of the above mentioned concentrations (100 mg L⁻¹) seven days before harvesting the plant tissues, i.e. immediately before the culture reached stationary phase. As a result of using the above procedure, the level of the accumulated volatile fraction in the biomass was increased by approximately 9% (1.20%) compared to the reference culture (1.10%). All the elicitors and nutrients that were used enhanced the biosynthesis of sesquiterpenes in the microshoots, accompanied by a lower content of oxidised monoterpenes in the tissues, including the main component of the above fraction, 1,8-cineole, compared to the reference culture. Thus, the results of the experiments indicated the limited possibility of *in vitro* stimulation of secondary metabolism of white sage shoots using the aforementioned experimental treatments.

In the last of the research areas described in this PhD project, the biological activity of essential oils isolated from *S. apiana* leaves from the environment, as well as from microshoots of this species obtained by biotechnological methods, was assessed. The main component of the above volatile fractions, 1,8-cineol, was also included in the tests. The scope of the experiments was restricted to include only the essential oil contained in white sage microshoots due to the time and financial constraints of the project. The experiments that were carried out concerned the ability of volatile *S. apiana* terpenes to inhibit, *in vitro*, the activities of acetylcholinesterase (AChE), tyrosinase (Tyr) and hyaluronidase (Hyal), but also to determine the effect of the above set of secondary metabolites on T lymphocytes (ability to suppress the immune system). As a result of the experiments, enzyme tests revealed greater anti-AChE and anti-Tyr activity of the essential oil obtained from the leaves of the intact plant, compared to the volatile fraction extracted from *in vitro* biomasses, while Hyal was more strongly inhibited by volatile terpenes synthesised in white sage microshoots. The tests conducted on primary T-lymphocyte cultures from healthy individuals, showed a dose-dependent increase in apoptosis and a reduction in proliferation of the blood cells.

The series of studies confirmed the usefulness of *in vitro* cultures of white sage as a source of biologically active groups of secondary metabolites, such as essential oil and fractions of polyphenols and non-volatile terpenes. Optimising the cultivation of the aforementioned biomasses in bioreactors makes it possible to obtain, in a single experimental cycle, a significant amount of plant material for use in further in-depth phytochemical and biological studies.

Wstęp i cel pracy

Choroby cywilizacyjne stanowią główną przyczynę spadku komfortu życia społeczeństw oraz zgonów w krajach wysokorozwiniętych i szybko się rozwijających. Z tego powodu do priorytetów współczesnej medycyny należy rozwój obecnych metod ich leczenia, a także wprowadzenie w tym obszarze nowych standardów terapeutycznych oraz technologii (WHO, 2014, 2017; Kopp, 2019).

Spośród wspomnianych schorzeń, dużą uwagę poświęca się jednostkom chorobowym o charakterze demencyjnym oraz autoimmunologicznym istotnie utrudniającym pacjentom codzienne funkcjonowanie, a także przyczyniającym się do znacznego obciążenia systemu opieki zdrowotnej. Obecnie na całym świecie zdiagnozowano zespoły demencyjne u ponad 50 milionów ludzi, a w każdym kolejnym roku wykrywa się prawie 10 milionów nowych przypadków. Najczęstszą przyczyną rozwoju otępienia jest choroba Alzheimera (AD), stanowiąca 60–80% zachorowań na demencję (WHO, 2017). W późniejszych stadiach, schorzenie to uniemożliwia samodzielne funkcjonowanie pacjentów w życiu codziennym, natomiast śmierć następuje w czasie 5-12 lat od wystąpienia pierwszych objawów AD (Long i Holtzman, 2019). Istotny problem cywilizacyjny stanowią również choroby autoimmunologiczne, dotyczące ok. 5% społeczeństw, w tym ludzi młodych i aktywnych zawodowo, a stosowane w ich leczeniu procedury mają ograniczoną skuteczność (Amador-Patarroyo i in., 2012; Wang i in., 2015).

Wobec powyższego, szczególnie ważne jest opracowanie terapii poprawiających stan pacjentów w przebiegu wspomnianych chorób. Istotny problem stanowi jednak brak dokładnego rozpoznania patomechanizmów schorzeń demencyjnych i autoimmunologicznych. W przypadku AD, nie zidentyfikowano jak dotąd bezpośredniej przyczyny akumulacji toksycznego białka – β -amyloidu w mózgu. Zakłada się, że patogenezą wspomnianego zjawiska jest złożona, a kluczową rolę w przebiegu niniejszej choroby odgrywają procesy zapalne, stres oksydacyjny oraz zaburzenia wydzielania neuroprzekaźników (Zhou i in., 2016). Skomplikowany mechanizm rozwoju AD wskazuje zatem na istnienie różnych punktów uchwytu potencjalnych terapii. Także w kontekście leczenia schorzeń autoimmunologicznych, zasadne jest poszukiwanie metod terapeutycznych opartych o szerokie spektrum aktywności farmakologicznych, takich jak: działanie immunosupresyjne, przeciwzapalne, antyoksydacyjne i neuroprotektoryjne (Moudgil i Venkatesha, 2022). Za wspomnianym podejściem przemawia złożona etiologia chorób z autoagresji oraz fakt, że w ich rozwoju znaczenie mają zarówno genetyczne, jak i środowiskowe czynniki ryzyka (Amador-Patarroyo i in., 2012; Wang i in., 2015).

Przeprowadzona kwerenda literaturowa wykazała, że lotne i nielotne terpeny oraz polifenole, występujące w roślinach z rodzaju *Salvia*, mogą, jako potencjalne fitoterapeutyki, znaleźć zastosowanie w terapii AD oraz chorób autoimmunologicznych. Wspomniane połączenia naturalne, a w szczególności frakcje lotne, posiadają szerokie spektrum aktywności farmakologicznej, charakteryzując się m.in.: działaniem przeciwzapalnym, przeciwbólowym, antyoksydacyjnym,

cytotoksycznym oraz inhibicyjnym względem cholinoesteraz (Benny i Thomas, 2019; Marrelli i in., 2020; Barão Paixão i de Carvalho, 2021). Dostępne wyniki badań w tym zakresie świadczą o znacznym potencjale terapeutycznym jednego z amerykańskich gatunków, należących do rodzaju *Salvia*, a mianowicie: szałwii białej (*Salvia apiana* Jepson) (Krol i in., 2022).

Omawiany gatunek jest endemitem, charakterystycznym dla formacji roślinnej *chaparral*, obejmującym swoim zasięgiem stan Kalifornia w USA oraz północną część Meksyku. W żadnym z wymienionych państw nie ma on statusu rośliny chronionej czy zagrożonej wyginięciem, jednakże obszar jego naturalnego występowania ograniczony jest do ekoregionu *California Floristic Province*, uznawanego za jeden z najbogatszych, pod względem bioróżnorodności, a zarazem najbardziej zagrożonych obszarów globu (Krol i in., 2022).

Podobnie jak inne gatunki szałwii, *S. apiana* zawiera w składzie związku lotne, a także diterpeny, triterpeny, fenolokwasy oraz flawonoidy (Borek i in., 2006; Ali i in., 2015; Afonso i in., 2019b). Cechą wyróżniającą wspomnianą roślinę spośród innych przedstawicieli rodzaju jest wysoka zawartość olejku eterycznego (0,6-3,8%), porównywalna ze stężeniem frakcji lotnej w *S. officinalis* L. (1,2-3,7%) oraz *S. fruticosa* Mill. (0,3-4,0%). Należy zaznaczyć, że wymienione wyżej gatunki szałwii: lekarska i krzewiasta (grecka), uznawane są za najbogatsze źródła olejku lotnego w obrębie rodzaju *Salvia* (Grdiša i in., 2015; Cvetkovikj i in., 2015; Krol i in., 2022). Istotną zaletą zespołu lotnych terpenów w szałwii białej jest całkowity brak tujonu – monoterpenu o właściwościach silnie neurotoksycznych, związanych z inhibicją kanałów chlorkowych receptorów GABA. Wysoka zawartość wspomnianego związku znacząco ogranicza możliwość terapeutycznego wykorzystania olejku eterycznego syntezowanego w *S. officinalis* (Németh i Nguyen, 2020). Obok substancji lotnych, składnikami *S. apiana*, istotnymi z punktu widzenia aktywności biologicznej, są związki fenolowe (flawonoidy i kwasy fenolowe), a także diterpeny. Analizy składu chemicznego części podziemnych omawianego gatunku wykazały m.in. obecność kryptotanszinonu – diterpenoidu należącego do grupy tanszinonów (González i in., 1992; Hu i in., 2022). Wspomniany związek wykazuje szerokie spektrum aktywności farmakologicznej, m.in. działanie przeciwnowotworowe, neuroprotektoryjne oraz przeciwzapalne (Li i in., 2021). Jest on także jednym z głównych, aktywnych biologicznie, metabolitów *Salvia miltiorrhiza* Bunge, będącej chińską rośliną farmakopealną o udokumentowanej skuteczności terapeutycznej (Wang i in., 2016).

Tradycyjnie, plemiona rdzennych Amerykanów wykorzystywały szałwię białą w celach medycznych. Części podziemne rośliny stosowano w zaburzeniach miesiączkowania, ziele zaś jako środek przeciwprzeziębieniowy, przeciwzapalny oraz przeciwbólowy (Adams i Garcia, 2005a, 2005b, 2006). Ponadto, *S. apiana* używano w celach obrzędowych i przypisywano jej właściwości apotropaiczne, tj. chroniące przed złem (Adams i Garcia, 2005a, 2005b). Wyniki współcześnie prowadzonych badań naukowych w znacznej mierze potwierdziły słuszność tradycyjnych, leczniczych zastosowań szałwii białej. W testach biologicznych *in vitro*, wykonanych z użyciem ekstraktów i wyizolowanych frakcji *S. apiana*, wykazano m.in. działanie przeciwdrobnoustrojowe,

antyoksydacyjne, przeciwzapalne, hepatoprotekcyjne oraz cytotoksyczne niniejszej rośliny (Krol i in., 2022). Z uwagi na unikatowy profil metaboliczny oraz szerokie spektrum aktywności biologicznej, omawiany gatunek wydaje się niezwykle wartościowy i obiecujący, w kontekście prowadzenia badań zmierzających do opracowania nowych fitoterapeutyków, mogących znaleźć zastosowanie w zapobieganiu i leczeniu chorób neurodegeneracyjnych i zapalnych.

Czynnikiem utrudniającym ocenę wartości terapeutycznej ekstraktów z *S. apiana* jest, charakterystyczna dla rośliny, duża zmienność składu jakościowego i ilościowego syntezowanych w niej połączeń naturalnych, w tym wypadku przede wszystkim lotnych terpenów. Wykazano, że w środowisku naturalnym zawartość metabolitów wtórnych w poszczególnych gatunkach uzależniona jest od szeregu czynników, w tym m.in. od habitatu, pory zbioru materiału roślinnego, a także warunków atmosferycznych (Figueiredo i in., 2008). Jednym z rozwiązań powyższego problemu jest pozyskiwanie źródeł substancji naturalnych metodami biotechnologicznymi, wykorzystującymi systemy wzrostowe *in vitro*. Zapewniają one ciągły dostęp do surowca o stałej zawartości wtórnych metabolitów, stanowiąc źródło biomasy niezależne od zasobów naturalnych danego gatunku. Jest to szczególnie istotne w kontekście prowadzenia badań nad roślinami endemicznymi o znaczeniu leczniczym, takimi jak *S. apiana*, w przypadku których ograniczony zasięg występowania utrudnia pozyskiwanie matryc roślinnych do analiz fitochemicznych i testów związanych z aktywnością biologiczną. Docelowo, kultury *in vitro* szałwii białej mogą być wykorzystane jako alternatywne źródło biomasy i pośrednio ekstraktów do produkcji fitoterapeutyków, umożliwiając ich wytwarzanie bez nadmiernej eksploatacji naturalnych stanowisk tego gatunku (Leopold, 2019).

Z uwagi na powyższe, sformułowano podstawowy cel pracy doktorskiej, którym było uzyskanie roślinnych systemów wzrostowych *in vitro* szałwii białej (*Salvia apiana* Jeps.), wykazujących zdolność do ciągłej produkcji metabolitów wtórnych (olejek eteryczny, nietolne terpeny oraz związki fenolowe) o potencjalnych właściwościach immunosupresyjnych oraz inhibicyjnych względem acetylocholinoesterazy, tyrozynazy oraz hialuronidazy, z przeznaczeniem do zastosowania prewencyjnego oraz leczniczego w chorobach neurodegeneracyjnych i autoimmunologicznych. Należy podkreślić, że badany gatunek jest jak dotąd słabo poznany z uwagi na skład chemiczny oraz potencjał terapeutyczny. Brak jest również doniesień dotyczących prowadzenia eksperymentów biotechnologicznych nad omawianą rośliną.

Prace, zmierzające do zrealizowania przedstawionego celu badań, planowano prowadzić w trzech obszarach: biotechnologicznym, fitochemicznym i biologicznym. Na pierwszym etapie doświadczeń postanowiono otrzymać kultury *in vitro* *S. apiana* o różnym stopniu cytodyferencjacji, charakteryzujące się stabilnymi parametrami wzrostowymi i produkcyjnymi z uwagi na zawartość związków polifenolowych i terpenowych. Dodatkowo, zamierzano podjąć próby uzyskania kultur korzeni transformowanych szałwii białej stosując metodę wektorową z wykorzystaniem dzikich szczepów *Agrobacterium rhizogenes*. Powyższe doświadczenia, w połączeniu z równoległe prowadzonymi analizami fitochemicznymi otrzymanych biomas (terpeny oraz polifenole), miały na celu

wyselekcjonowanie tzw. „superproducentów”, tj. kultur charakteryzujących się szybkim wzrostem oraz stabilną zawartością wymienionych metabolitów (hodowle kolekcyjne). Dodatkowo, na wspomnianym etapie badań planowano potwierdzić metodami genetycznymi tożsamość gatunkową otrzymanych biomas *in vitro*. Dla uzyskanych kultur planowano opracować warunki do wzrostu w wytrząsanych hodowlach ciągłych oraz scharakteryzować ich profile wzrostowe i produkcyjne.

W toku dalszych prac biotechnologicznych, najbardziej wartościowe biomasy postanowiono zaadaptować do namnażania w instalacjach wielkolaboratoryjnych. W tym celu zamierzano wykorzystać dostępne, komercyjne systemy okresowo-zalewowe (RITA® i PLANTFORM®), jak również skonstruowane, w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed, prototypowe bioreaktory natryskowe, co umożliwiłoby otrzymanie materiału roślinnego, a w dalszej kolejności: ekstraktów oraz izolowanych frakcji metabolitów wtórnych, w ilościach wystarczających do prowadzenia szczegółowych badań fitochemicznych oraz testów dotyczących wybranych kierunków aktywności biologicznej.

Na końcowym etapie doświadczeń biotechnologicznych, zamierzano wykorzystać wybrane metody stymulacji biosyntezy aktywnych terapeutycznie metabolitów wtórnych w namnażanych biomasach, z uwzględnieniem strategii eksperymentalnych zindywidualizowanych w obrębie określonych zespołów związków oraz typów kultur. Obejmowały one dodatek do medium wzrostowego elicytorów biotycznych (ergosterol, chitosan i ekstrakt drożdżowy) oraz zespołu substancji o charakterze odżywczym (sok z *Urtica dioica* L.).

Integralną część projektu badawczego miała stanowić analiza fitochemiczna frakcji olejkowych, fenolowych oraz diterpenowych, pozyskanych z kultur *in vitro* oraz rośliny gruntowej *S. apiana*. Zespół lotnych terpenów planowano wyizolować z badanych matryc techniką hydrodestylacji (aparatus Clevengera), natomiast frakcje nielotne poprzez wielostopniową ekstrakcję ciała stałe-ciecz oraz ciecz-ciecz rozpuszczalnikami o zmiennej polarności. W ramach badań porównawczych, zamierzano również ocenić skład chemiczny frakcji lotnej, występującej w liściach rodzimego gatunku szalwii – *Salvia officinalis* L., otrzymanych z upraw gruntowych.

Analizę uzyskanych olejków eterycznych planowano przeprowadzić metodą chromatografii gazowej (GC), z zastosowaniem dwóch typów detekcji (spektrometria mas – MS – badania jakościowe; detektor płomieniowo-jonizacyjny – FID – badania ilościowe). W analizie nielotnych terpenów i związków fenolowych zamierzano natomiast wykorzystać wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją diodową oraz spektrometrią mas (HPLC/DAD/MS). Zoptymalizowane, w toku prac doświadczalnych, procedury fitochemiczne miały posłużyć do określenia składu zespołów wyżej wymienionych połączeń naturalnych oraz do oznaczenia poziomów akumulacji poszczególnych metabolitów wtórnych, występujących w biomasach *in vitro* szalwii białej (testy porównawcze) oraz w roślinie macierzystej (uzupełnienie stanu wiedzy dotyczącej badanego surowca).

Frakcje lotne *S. apiana*, pozyskane z kultur *in vitro* (mikropędy) oraz z materiału gruntowego (liście), a także główny składnik badanych olejków eterycznych (1,8-cineol), planowano poddać

wstępnej analizie pod kątem wybranych kierunków aktywności biologicznej. Obejmowała ona określenie ich działania proapoptotycznego oraz antyproliferacyjnego w stosunku do limfocytów ludzkich T. Ocenę stopnia proliferacji wspomnianej grupy komórek krwi obwodowej, zamierzano przeprowadzić z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Dodatkowo, w ramach projektu doktoranckiego, planowano wykonać, w warunkach *in vitro*, serię testów dotyczących zdolności hamowania, przez frakcje lotne pozyskane z kultur tkankowych oraz rośliny macierzystej *S. apiana*, aktywności takich enzymów jak: acetylocholinoesteraza, tyrozynaza oraz hialuronidaza. Skuteczność działania poszczególnych olejków eterycznych zamierzano porównać z aktywnością biologiczną związków stosowanych we współczesnej farmakoterapii (odpowiednio: donepezyl, kwas kojowy oraz escyna).

Zaplanowany cykl badań biotechnologicznych, fitochemicznych oraz biologicznych miał na celu otrzymanie, po raz pierwszy, kultur *in vitro* *S. apiana* o różnym stopniu cytodyferencjacji, a następnie określenie ich przydatności jako alternatywnych źródeł aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych (lotne i nielotne terpeny, kwasy fenolowe i flawonoidy). Ponadto, przeprowadzone prace miały pozwolić na wstępną ocenę potencjału terapeutycznego olejku eterycznego, pozyskanego z rośliny gruntowej oraz kultur *in vitro* szaławii białej, w terapii wybranych schorzeń cywilizacyjnych.

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

2,4-D	kwask 2,4-dichlorofenoksyoctowy
2iP	<i>N</i> ⁶ -(2-izopentenylo)-adenina
AChE	acetylocholinoesteraza
AD	<i>Alzheimer's disease</i> ; choroba Alzheimera
ALB	system typu <i>airlift</i>
B5	pożywka Gamborga (1968)
BAP	6-benzyloaminopuryna
BB	<i>balloon bioreactors</i> ; bioreaktor balonowy w kształcie stożka
BCB	bioreaktor typu <i>bubble column</i>
BTBB	<i>baloon type bubble bioreactors</i> ; bioreaktor balonowy w kształcie stożka
BPA	N-benzylotetrahydropiranyloadenina
CIB	<i>continuous immersion bioreactors</i> ; bioreaktor warunkujący ciągłe zanurzenie tkanek roślinnych
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i> ; dimetylosulfotlenek
DW	<i>dry weight</i> ; sucha masa
FW	<i>fresh weight</i> ; świeża masa
GA3	<i>gibberellic acid</i> ; kwas giberelinowy
Gi	<i>growth index</i> ; współczynnik przyrostu
GC-FID/MS	chromatografia gazowa, sprzężona z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym oraz spektrometrem mas
GPB	<i>gas-phase bioreactor</i> ; system natryskowy
GPS	<i>gas phase systems</i> ; system dostarczający pożywkę w postaci mgły
HPLC-DAD/ESI/MS	chromatografia cieczowa, sprzężona z detektorem diodowym oraz jonizacją typu <i>electrospray</i> i spektrometrem mas
HS-SPME	technika mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej
Hyal	hialuronidaza
IAA	kwask indolilo-3-octowy
IBA	kwask indolilo-3-masłowy
IPA	kwask indolilo-3-propionowy
LPS	lipopolisacharyd
LS	pożywka Linsmaiera i Skooga

ML	pożywka Murashige'a-Skooga (1962), suplementowana 3,0 mg L ⁻¹ 2iP, 1,0 mg L ⁻¹ BAP, 0,3 mg L ⁻¹ NAA i 73,0 mg L ⁻¹ jednowodnego siarczanu adeniny
MS	pożywka Murashige'a-Skooga (1962)
MS₀	pożywka Murashige'a-Skooga (1962), pozbawiona dodatku regulatorów wzrostu
MS_{stand}	pożywka Murashige'a-Skooga (1962), suplementowana 0,5 mg L ⁻¹ kinetyny oraz 1,0 mg L ⁻¹ 2,4-D
mT	<i>meta</i> -Topolin
NAA	kwask 1-naftylooctowy
NN	pożywka Nitsch i Nitscha (1963)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; reakcja łańcuchowa polimerazy
rBAP	rybozyd benzyloaminopuryny
RZS	reumatoidalne zapalenie stawów
R_t	<i>retention time</i> ; czas retencji
SAB	<i>simple aeration bioreactors</i> ; bioreaktor wyposażony w proste instalacje napowietrzające
SB	<i>spray bioreactor</i> ; bioreaktor z systemem dostarczania pożywki w formie kropeł
SH	pożywka Schenka-Hildebrandta (1972)
SH₀	pożywka Schenka-Hildebrandta (1972), pozbawiona dodatku regulatorów wzrostu
SH_B	pożywka Schenka-Hildebrandta (1972), suplementowana 0,22 mg L ⁻¹ TDZ oraz 2,0 mg L ⁻¹ BAP
SH_{IBA1,0}	pożywka Schenka-Hildebrandta (1972), suplementowana 1,0 mg L ⁻¹ IBA
SH_{IBA1,5}	pożywka Schenka-Hildebrandta (1972), suplementowana 1,5 mg L ⁻¹ IBA
SH_P	pożywka Schenka-Hildebrandta (1972), suplementowana 2,0 mg L ⁻¹ 2iP oraz 0,22 mg L ⁻¹ TDZ
SH_{stand}	pożywka Schenka-Hildebrandta (1972), suplementowana 2,0 mg L ⁻¹ IAA oraz 0,5 mg L ⁻¹ 2,4-D
TIB	<i>temporary immersion bioreactor</i> ; bioreaktor okresowo-zalewowy
TDZ	tidiazuron
TLC	cienkowarstwowa chromatografia cieczowa
Tyr	tyrozynaza
UV	promieniowanie ultrafioletowe

1 CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.1 Charakterystyka *Salvia apiana* Jepson

Przedstawiona w niniejszym rozdziale charakterystyka szałwii białej przywołuje jedynie najważniejsze informacje uzyskane w wyniku kwerendy literaturowej dotyczącej wspomnianego gatunku. Dane szczegółowe, w tym analizę porównawczą *Salvia apiana* Jeps. na tle najczęściej wykorzystywanych w lecznictwie roślin z rodzaju *Salvia* zawarto w publikacji przeglądowej, dołączonej do prezentowanego manuskryptu i stanowiącej integralną część rozprawy doktorskiej (Krol i in., 2022).

1.1.1 Stanowisko systematyczne

Stanowisko systematyczne *Salvia apiana* Jepson (Jepson, 1901) przedstawiono poniżej

Królestwo:	<i>Plantae</i>	Haeckel (1866)
Podkrólestwo:	<i>Viridiplantae</i>	Cavalier-Smith (1981)
Infrakrólestwo:	<i>Streptophyta</i>	C. Jeffrey (1967)
Nadgromada:	<i>Embryophyta</i>	Endlicher (1836)
Gromada:	<i>Magnoliophyta</i>	
Podgromada:	<i>Spermatophytina</i>	
Klasa:	<i>Magnoliopsida</i>	
Nadrząd:	<i>Lamianae</i>	
Rząd:	<i>Lamiales</i>	
Rodzina:	<i>Lamiaceae</i>	
Rodzaj:	<i>Salvia</i>	L. Takhtajan (2009)
Gatunek:	<i>Salvia apiana</i>	Jepson (1901)

Nazwy zwyczajowe i obcojęzyczne gatunku to: szałwia biała (pl.); *white sage*, *bee sage* (ang.); *khapshikh*, *xapcix* (język rdzennych Amerykanów Chumash) (Krol i in., 2022).

1.1.2 Występowanie

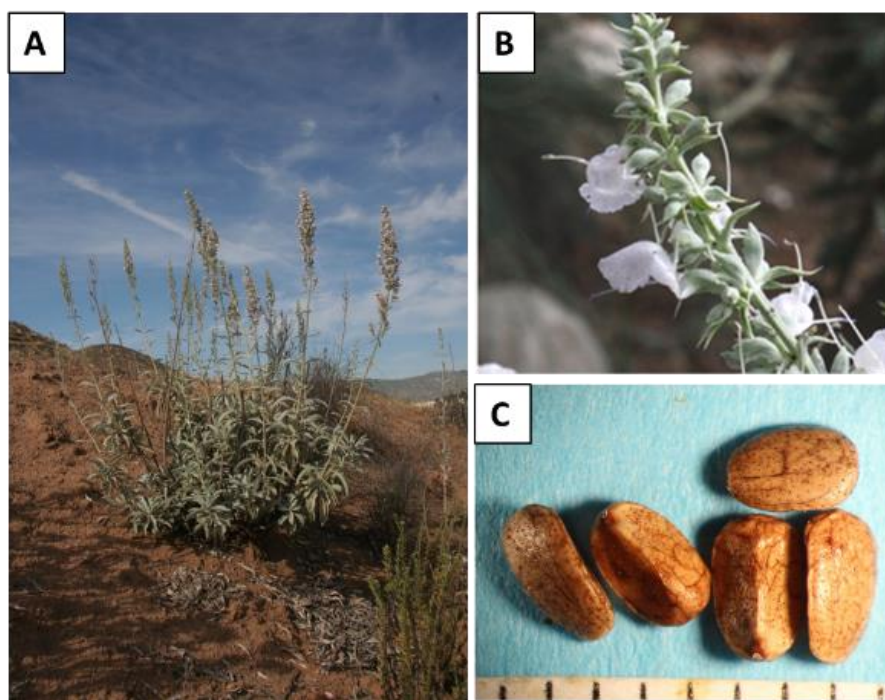
Obszar naturalnego występowania szałwii białej obejmuje zachodnią część Ameryki Północnej. *S. apiana* jest gatunkiem charakterystycznym dla znajdującej się pod wpływem klimatu śródziemnomorskiego zimozielonej formacji roślinnej *chapparal*. Roślina ta preferuje suche stanowiska poniżej 1500 m n.p.m. z piaszczysto-kamienistymi glebami. Szałwia biała wykazuje się odpornością na

suszę, co jest istotne gdyż w obszarze jej występowania panują wysokie temperatury letnie, a opady roczne wynoszą między 250 a 450 mm (Montalvo i in., 2017).

Roślina często sąsiaduje z takimi gatunkami jak: szałwia czarna (*S. mellifera* Greene), pokoślin kalifornijski (*Eriogonum fasciculatum* Michx.), bylica kalifornijska (*Artemisia californica* Less.) i szałwia purpurowa (*S. leucophylla* Greene). *S. apiana* może spontanicznie tworzyć hybrydy z innymi rodzimymi szałowami o takiej samej liczbie chromosomów, w tym: *S. mellifera*, *S. munzii* Epling, *S. leucophylla* i *S. clevelandii* Greene (Grant i Grant, 1964; Ott i in., 2016; Montalvo i in., 2017).

1.1.3 Morfologia

S. apiana to zimozielona, wieloletnia roślina zielna lub półkrzew. Osiąga ona od 1 do 3 metrów wysokości (Ryc. 1A). Posiada rozgałęziony system korzeniowy, sięgający nawet do 1,5 metra głębokości. Dodatkowym przystosowaniem do wzrostu w suchym klimacie, obok silnie rozwiniętych części podziemnych, jest gęsta pokrywa włosków na powierzchni pędów. Kutner, tworzony zarówno z włosków mechanicznych, jak i wydzielniczych, nadaje roślinie szarzielony kolor (Jepson, 1901, 1943; Montalvo i in., 2017).



Ryc. 1. Kwitnący okaz *Salvia apiana* Jepson;

A – widok ogólny (Thorsted, 2016), B – zbliżenie na kwiaty (Smith, 2015), C – nasiona (Akulova, 2011).

Szałwia biała kwitnie od kwietnia do września. Kwiaty, koloru od białego do różowego, skupione są w nibyokółkach i tworzą duże, szczytowe, wiechowate kwiatostany lub pozorne kłosy (Jepson, 1943). Opisywany gatunek wyróżnia, spośród innych z rodzaju *Salvia*, nietypowa budowa

korony. Kwiaty są grzbieciste (Ryc. 1B), co stanowi wspólną cechę roślin z rodziny Lamiaceae, jednakże dolna warga jest w tym wypadku wyraźnie większa (4-5 mm) w stosunku do wargi górnej (poniżej 2 mm). Specyficzna struktura kwiatu *S. apiana* odzwierciedla nietypowy mechanizm zapylenia rośliny – gatunek przystosował się do kontaktu z dużymi owadami z rodzaju *Xylocopa* (Ott i in., 2016). Owocem jest błyszczący, jasnobrązowy, prostokątny orzeszek o średnicy 5-3 mm (Ryc. 1C; Montalvo i in., 2017).

1.1.4 Zastosowanie etnofarmkologiczne

S. apiana ma długą tradycję stosowania, wśród rdzennych Indian Ameryki Północnej z plemienia Chumash, jako roślina lecznicza oraz rytualna. W ich praktykach terapeutycznych wyciągi wodne oraz wodno-alkoholowe z części nadziemnych gatunku znajdowały zastosowanie jako środki uspokajające, przeciwbólowe, przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe (Stevens i O'Brien, 2003; Montalvo, 2004), zaś korzenie wykorzystywano ze względu na działanie wspomagające regenerację po porodzie oraz w zaburzeniach miesiączkowania (Adams i Garcia, 2006). Nasiona szalwii białej, nazywane *chia*, stanowiły źródło pożywienia dla rdzennej ludności Kalifornii (Timbrook, 1986, 1990).

1.1.5 Profil fitochemiczny

Szałwia biała charakteryzuje się unikatowym profilem metabolicznym, bogatym w związki terpenowe oraz polifenolowe. Mono- i seskwiterpeny wchodzą w skład olejku eterycznego syntezowanego w częściach nadziemnych gatunku (Borek i in., 2003, 2006; Takeoka i in., 2010; Ali i in., 2015). Nielotne diterpeny występują zaś zarówno w częściach nadziemnych jak i w korzeniach rośliny, gdzie są licznie reprezentowane przez pochodne abietanowe (Kintzios, 2000; Abreu i in., 2008). Badania fitochemiczne wykazały ponadto obecność w *S. apiana* triterpenoidów oraz specyficznych dla tego gatunku trójcyklicznych terpenów C₂₃ z grupy hassananów i apiananów (Luis i in., 1996a, 1996b; Hafez Ghoran i in., 2022). Wśród związków polifenolowych, syntezowanych w roślinie, można wymienić flawonoidy oraz kwasy fenolowe (Krol i in., 2022).

Szałwia biała, analogicznie jak inne gatunki szalwii, zawiera w częściach nadziemnych olejek eteryczny. Cechą wyróżniającą niniejszą roślinę, spośród innych z rodzaju *Salvia*, jest wysoki poziom frakcji lotnej (0,6-3,8%), syntezowanej na poziomie porównywalnym z gatunkami uznanymi za najbogatsze źródło lotnych terpenów w tym taksonie, takimi jak: szalwia krzewiasta (2,7-4,2%) oraz szalwia lekarska (1,2-3,7%) (Leontaritou i in., 2020; Krol i in., 2022).

Porównując skład chemiczny olejków eterycznych zawartych w trzech wyżej wymienionych, gatunkach należy zwrócić uwagę na brak w szalwii białej tujonu – silnie neurotoksycznego monoterpenu, powodującego hamowanie kanałów chlorkowych w receptorach GABA (Németh i Nguyen, 2020). Dominującymi składnikami frakcji lotnej *S. apiana* są: 1,8-cineol (26,1-71,1%), α -pinen (5,1-10,14%), β -pinen (3,8-10,6%), kamfora (2,1-21,7%), limonen (1,5-3,5%), δ -3-karen (1,3-6,3%), kamfen (0,4-5,5%) oraz mircen (0,5-3,2%) (Krol i in., 2022).

Jak już wspomniano, obok wymienionych związków lotnych, w częściach nadziemnych szaławii białej, zidentyfikowano również metabolity wtórne o charakterze nielotnych terpenów (kwas karnozowy, karnozol oraz rosmanol), zaliczane do powszechnie występujących w rodzaju *Salvia* pochodnych abietanu o budowie trójcyklicznej. Porównawcze analizy fitochemiczne w tym taksonie wykazały, że *S. apiana* charakteryzuje się znaczną akumulacją powyższych związków. Zawiera ona najwięcej kwasu karnozowego spośród 60 badanych gatunków szaławii (21,8 mg g⁻¹ suchego ekstraktu), przewyższając pod tym względem również *S. officinalis* L. (14,6 mg g⁻¹ suchego wyciągu) (Abreu i in., 2008).

W 1996 roku Luis wraz z zespołem wykrył, w oznaczanym gatunku, nietypowe związki terpenowe o strukturze opartej o szkielet C23 (Luis i in., 1996a, 1996b). Terpenoidy o 23 atomach węgla w cząsteczce występują niezwykle rzadko w świecie roślin (Li i in., 2019; Hafez Ghoran i in., 2022). Jak dotąd w rodzaju *Salvia*, oprócz szaławii białej, wyizolowano je jedynie z: *S. officinalis* L. (Miura i in., 2001; Li i in., 2019), *S. przewalskii* Maxim. (Zhang i in., 2018) oraz *S. yangii* B.T.Drew (Jiang i in., 2013).

Analizy fitochemiczne części podziemnych szaławii białej były do tej pory prowadzone w ograniczonym zakresie (González i in., 1992; Hu i in., 2022). W korzeniach omawianego gatunku stwierdzono obecność tanszynonów, w tym kryptotanszynonu (González i in., 1992). Związki te, obok kwasów fenolowych, są aktywnymi biologicznie składnikami chińskiej rośliny farmakopealnej – *S. miltiorrhiza* Bunge (Lili Wang i in., 2016).

W szaławii białej stwierdzono ponadto bogatą frakcję polifenolową. Wśród aktywnych biologicznie związków z tej grupy można wyróżnić kwasy fenolowe – w tym, charakterystyczny dla podrodziny *Nepetoideae*, kwas rozmarynowy – oraz flawonoidy: hesperydynę, salwigeninę, cirsimarytynę oraz heksozyd kwercetyny (wyciągi wodne oraz etanolowe) (Srivedavyasari i in., 2017; Afonso i in., 2019b; Krol i in., 2022).

1.1.6 Aktywność biologiczna badanego gatunku

Dotychczas przeprowadzone badania nad aktywnością biologiczną wykazały działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwbólowe, cytotoksyczne, przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwnowotworowe badanej rośliny. Zasadniczo uważa się, że działanie farmakologiczne szaławii białej warunkowane jest obecnością związków terpenowych oraz polifenolowych (Krol i in., 2022).

W licznych badaniach wykazano aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów z części nadziemnych szaławii białej (Dentali, 1991; Dentali i Hoffmann, 1992; Allison i in., 2017; Afonso i in., 2019b; Agatonovic-Kustrin i in., 2023). Najbardziej szczegółowe eksperymenty prowadził Dentali wraz z zespołem (Dentali, 1991; Dentali i Hoffmann, 1992). W oparciu o wstępną analizę wyciągu dichlorometanowego z surowca, przy zastosowaniu metody seryjnych rozcieńczeń, oceniono działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze poszczególnych składników ekstraktu wobec takich szczepów jak: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Candida brassicae*. Stwierdzono,

że metabolitami wtórnymi o największej aktywności przeciwdrobnoustrojowej są: kwas karnozowy i kwas 16-hydroksykarnozowy. Przeprowadzone doświadczenia wykluczyły również, aby olejek eteryczny obecny w *S. apiana* odgrywał istotną rolę w obserwowanych działaniach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych surowca (Dentali, 1991; Dentali i Hoffmann, 1992).

Oprócz opisanej powyżej aktywności, szalwia biała posiada wyraźnie zaznaczone działanie przeciwzapalne, zbadane w warunkach *in vitro*. Właściwości przeciwzapalne surowca oceniono poprzez określenie wpływu wyciągu wodnego z rośliny na produkcję NO w stymulowanych LPS komórkach RAW264.7. Zdolność niwelowania stanu zapalnego, w połączeniu z aktywnością przeciwdrobnoustrojową, może uzasadniać znaczącą rolę nadziemnych części szalwii białej jako surowca przeciwpriężbiennowego, wykorzystywanego przez rdzennych mieszkańców Ameryki Północnej (Afonso i in., 2019b).

W kolejnych badaniach, wyciąg etanolowy otrzymany z liści *S. apiana* wykazał umiarkowaną aktywność wobec receptorów kanabinoidowych typu pierwszego. Izolacja poszczególnych składników ekstraktu alkoholowego oraz ich analiza biologiczna wskazała na wpływ diterpenu – sageonu na receptory kanabinoidowe typu pierwszego i drugiego. Ponadto, powyższy metabolit cechowała umiarkowana aktywność wobec receptora μ -opiodowego (Srivedavyasari i in., 2017).

Prace doświadczalne, prowadzone w warunkach *in vitro* na wyciągu wodnym, otrzymanym z części nadziemnych *S. apiana*, wykazały ich wyraźnie zaznaczoną, selektywną aktywność cytotoksyczną dotyczącą linii komórek nowotworowych: HepG2 (ludzki nowotwór wątroby), HeLa (ludzki nowotwór szyjki macicy) oraz MCF-7 (linia raka piersi) (Afonso i in., 2019b). Efekty chemoterapeutyczne ekstraktu metanolowego z surowca zaobserwowano również dla kultury pierwotnej, wyprowadzonej z komórek ostrej białaczki limfoblastycznej CCRF-CEM (Saeed i in., 2016).

Przytoczone wyżej dane literaturowe jedynie w niewielkim zakresie wyjaśniają rolę poszczególnych związków naturalnych występujących w szalwii białej w prozdrowotnym działaniu omawianego surowca. Aspekt ten został szerzej przebadany metodą bioautografii bezpośredniej, umożliwiającą separację składników testowanych ekstraktów, na płycie TLC, przy jednoczesnej detekcji biologicznej. Analizy skryningowe wyciągów metanolowych, etanolowych i octanowych, przygotowanych z części nadziemnych szalwii białej, wskazały na powiązanie aktywności przeciwcukrzycowej surowca z obecnością w nim flawonoidów i pochodnych kwasu kawowego (inhibicja α -amylazy). Dodatkowo, przeprowadzone eksperymenty ujawniły hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy przez, obecne we wspomnianych ekstraktach, diterpenoidy typu abietanu (rosmanol, 16-hydroksyrosmanol i kwas 16-hydroksykarnozowy), co przekładało się na działanie neuroprotektoryjne omawianego surowca (Agatonovic-Kustrin i in., 2023).

Przedstawione w niniejszym rozdziale dotychczasowe wyniki eksperymentów dotyczących aktywności biologicznej badanej rośliny, były efektem prac prowadzonych przede wszystkim na wyciągach otrzymywanych z części nadziemnych gatunku. Korzenie, również wykorzystywane

w tradycyjnej medycynie rdzennych mieszkańców Ameryki Północnej, zostały przebadane jedynie pod kątem efektów przeciwdrobnoustrojowych wobec patogenów bakteryjnych i grzybowych. Ekstrakt heksanowy z powyższego surowca, w badaniu z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej, hamował rozwój: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia faecalis* oraz *Candida albicans*, natomiast nie ograniczał wzrostu *E. coli* oraz *C. tropicalis* (Cordova-Guerrero i in., 2016).

Podsumowując, dostępne dane literaturowe dowodzą, że *Salvia apiana*, z uwagi na unikatowy zespół syntezowanych metabolitów wtórnych oraz określone wstępnie kierunki aktywności biologicznej może stanowić niezwykle ciekawy obiekt badań farmakognostycznych oraz farmakologicznych, ukierunkowanych na otrzymanie nowoczesnych, skutecznych fitoterapeutyków z przeznaczeniem do stosowania w wybranych jednostkach chorób o podłożu cywilizacyjnym.

1.2 Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* mikropędów, namnażanych w instalacjach wielkolaboratoryjnych, póltechnicznych oraz przemysłowych

W niniejszym rozdziale omówiono aktualny stan wiedzy na temat wykorzystania bioreaktorów do produkcji roślinnych metabolitów wtórnych, syntezowanych w kulturach *in vitro* mikropędów, pędów oraz mikroroślinek. Krytyczny przegląd literaturowy, związany z powyższą tematyką, przedstawiono szczegółowo w rozdziale pt.: „*Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production, 2020*”, zawartym w książce zatytułowanej „*Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites, 2020*” (edytorzy: K. G. Ramawat, H. M. Ekiert oraz S. Goyal). Powyższy artykuł dołączono do prezentowanego manuskryptu jako integralną część rozprawy doktorskiej (Krol i in., 2020). Poniżej omówiono jedynie najważniejsze aspekty dotyczące bioreaktorowych kultur mikropędów, ukierunkowanych na produkcję roślinnych metabolitów wtórnych, niezbędne do prawidłowego zaplanowania, a następnie przeprowadzenia prac eksperymentalnych zawartych w części biotechnologicznej projektu.

Kultury *in vitro* stanowią jeden z głównych nurtów nowoczesnej biotechnologii roślin i służą celom praktycznym, takim jak masowe, wegetatywne rozmnażanie roślin lub pozyskiwanie z nich pożądaných metabolitów wtórnych, znajdujących zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Mają one szczególne znaczenie, kiedy niemożliwe jest opłacalne pozyskiwanie omawianych związków poprzez ich izolację z roślin pochodzących ze stanu naturalnego lub upraw. Wówczas kultury *in vitro* mogą stanowić potencjalnie nieograniczone, niezależne od wpływu warunków klimatycznych, sezonowości czy zasobów środowiskowych, źródło określonych substancji roślinnych (Dörnenburg i Knorr, 1995; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Verpoorte i in., 2002; Wink i in., 2005; Smetanska, 2008).

W skali przemysłowej najłatwiejsze jest namnażanie roślinnych biomas zawieszinowych, ze względu na ich zdolność do wzrostu w bioreaktorach komercyjnych, przeznaczonych do hodowli bakterii oraz grzybów (Doran, 1993; Wink i in., 2005; Eibl i Eibl, 2008; Eibl i Eibl, 2009; Steingroewer i in., 2013). Z kolei czynnikiem limitującym wykorzystanie omawianego typu kultur jest ich genetyczna niestabilność oraz ograniczona, lub wręcz zerowa, zdolność biomas parenchymatycznych do wytwarzania związków będących produktami specyficznych szlaków biosyntezy, zachodzących tylko w zróżnicowanych komórkach (Wink i in., 2005; Gerth i in., 2007; Weathers i in., 2010; Steingroewer i in., 2013). Z tego względu kultywacja organów roślinnych, tj. korzeni odciętych i transformowanych oraz pędów i mikroroślinek może stanowić niekiedy jedyną możliwość pozyskiwania wybranych grup metabolitów wtórnych w warunkach *in vitro*. Wśród związków, których akumulacja zachodzi niemal wyłącznie w wyspecjalizowanych strukturach, można wyróżnić artemizynę (Barbacka i Baer-

Dubowska, 2011), hiperycynę (Zobayed i in., 2003; Zobayed, Murch, Rupasinghe, i Saxena, 2004; Karppinen, Hohtola i in., 2006, Karppinen, György i in. 2006; Murthy i in., 2014) oraz olejki eteryczne (Hilton i in., 1995; Gounaris, 2010). Z uwagi na powyższe, w eksperymentach biotechnologicznych ukierunkowanych na produkcję połączeń farmakologicznie aktywnych, w wielkoskalowych kulturach *in vitro* roślin wyższych, wyróżnić można kierunek badawczy skupiający się na opracowaniu bioreaktorów, uwzględniających specyficzne wymagania organów roślin (m.in. wrażliwość komórek na siły ścinające, swobodny dostęp do medium wzrostowego i światła oraz odpowiednia wymiana gazowa). Zazwyczaj, stosowana aparatura ma charakter prototypowy i nie jest dostępna w sprzedaży komercyjnej.

W dotychczasowych pracach przeglądowych szeroko omówiono wykorzystanie bioreaktorów do namnażania kultur korzeni odciętych (Murthy i in., 2008, 2016; Baque i in., 2012) oraz transformowanych (Georgiev i in., 2007; Mishra i Ranjan, 2008; Pistelli i in., 2010). Ze względu na brak równie obszernych opracowań poświęconych mikropędom (Steingroewer i in., 2013; Park i Paek, 2014), a także biorąc pod uwagę specyfikę prezentowanego projektu doktorskiego, w niniejszym rozdziale podsumowano aktualny stan wiedzy dotyczący produkcji w bioreaktorach aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych przez mikropędy oraz mikroroślinki. Wyniki omawianych doświadczeń zaprezentowano przede wszystkim w formie tabelaryzowanej, uwzględniając produktywność wybranych połączeń naturalnych oraz niektóre kluczowe parametry techniczne stosowanych instalacji.

1.2.1 Rodzaje metabolitów wtórnych produkowanych w instalacjach o charakterze bioreaktorów

Z danych literaturowych wynika, że mikropędy *in vitro*, pochodzące z kultur wielkoskalowych, najczęściej wykorzystywane są jako źródło polifenoli, co z jednej strony wiąże się ze znacznym rozpowszechnieniem w surowcach roślinnych powyższego zespołu metabolitów wtórnych, z drugiej zaś ze stale rosnącym popytem na związki z niniejszej grupy, charakteryzujące się udokumentowanymi właściwościami prozdrowotnymi (Matkowski, 2008). Wśród omawianych połączeń naturalnych, otrzymanych z biomas *in vitro* na drodze ich kultywacji w bioreaktorach, można wyróżnić izoflawony (Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2005; Sharma i in., 2011), flawony (Zobayed, Murch, Rupasinghe, De Boer i in., 2004), ksantony (Kokotkiewicz i in., 2015), kwasy fenolowe (Jones i in., 2009; Kiferle i in., 2014; Szopa, Kokotkiewicz, i in., 2018; Szopa i in., 2019), lignany (Szopa i in., 2017) oraz naftodiantrony (Murthy i in., 2014). Przykładowo, proces akumulacji izoflawonów badano, głównie ze względu na ich właściwości estrogenomimetyczne oraz potencjalne działanie przeciwnowotworowe, w kulturach pędów roślin strączkowych, takich jak *Genista tinctoria* L. (Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2005), *Pueraria tuberosa* (Willd.) DC. (Sharma i in., 2011) i *Cyclopia genistoides* (L.) R.Br. (Kokotkiewicz i in., 2015). Z kolei, mikropędy *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., w tym odmianę *Sadova* No. 1, zaadaptowano do wzrostu w bioreaktorach o różnej konstrukcji, uzyskując, alternatywnie,

wobec materiału gruntowego, źródło lignanów dibenzocyklooktadienowych (Szopa i in., 2017; Szopa, Klimek-Szczykutowicz, i in., 2018).

Jak już wspomniano, specyfika biosyntezy olejków eterycznych, tj. niemożność ich produkcji, a także akumulacji w komórkach niezróżnicowanych, stanowiła przesłankę do wykorzystania kultur mikropędów *Mentha piperita* L. do przemysłowej produkcji frakcji lotnej. Niestety powyższy system nie pozwolił w pełni odtworzyć szlaków biosyntezy, charakterystycznych dla rośliny macierzystej. Otrzymana biomasa akumulowała jedynie pulegon, prekursor pożądanego mentolu (Hilton i in., 1995). Podobnie, w trakcie kultywacji mikropędów *Ledum palustre* L., prowadzonych w bioreaktorach różnego typu (natryskowe oraz zalewowe i okresowo-zalewowe), dochodziło do zahamowania, w biomacie roślinnej, produkcji ledolu i palustrolu, tj. połączeń dominujących w roślinie gruntowej, natomiast omawiana kultura biosyntezerowała, nieobecny w surowcu wyjściowym, tlenek ledenu (Jesionek i in., 2017, 2018). Powyższe rezultaty dowodzą, że mimo uzyskania, w powyższej kulturze *in vitro*, zróżnicowania komórkowego, niezbędnego do produkcji poszczególnych składników frakcji lotnych, zachodzi w tym wypadku istotne ryzyko niepełnego odtworzenia szlaków biochemicznych odpowiedzialnych za biosyntezę mono- oraz seskwiterpenów charakterystycznych dla testowanego gatunku (Jesionek i in., 2017, 2018).

Kolejną grupą wtórnych metabolitów, których poziom akumulacji w roślinnych kulturach wielkoskalowych jest niejednokrotnie obniżony, w porównaniu z gatunkiem macierzystym, są alkaloidy. Przykładowo, zawartość taksanów w mikropędach *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc., namnażanych w bioreaktorze rozpyłowym była znacznie niższa niż w igłach rośliny gruntowej (Oledzka i in., 2009). Powyższe połączenia naturalne produkuje się obecnie na skalę przemysłową jedynie z wykorzystaniem kultur zawiesinowych *Taxus* spp. (Zhong, 2002; Tabata, 2004; Frense, 2007; Malik i in., 2011).

Innym alkaloidami o aktywności przeciwnowotworowej, interesującymi z punktu widzenia biotechnologii przemysłowej, są pochodne indolowe, pozyskiwane z *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Zawiesiny powyższego gatunku, w warunkach wielkoskalowych kultur *in vitro*, były całkowicie niezdolne do biosyntezy poświadanych alkaloidów bisindolowych, tj. winblastyny oraz winkrystyny, natomiast produkowały pochodne monoindolowe: ajmalicynę, serpentynę i katarantynę (Moreno i in., 1995; Verpoorte i in., 2002; Zhao i Verpoorte, 2007; Pietrosiuk i in., 2007). Jakkolwiek stwierdzono możliwość akumulacji alkaloidów bisindolowych w mikropędach wspomnianego gatunku, to niska zawartość omawianych związków w niniejszych biomasach nie zachęcała do podejmowania prób opracowania, na ich podstawie, wielkoskalowego systemu *in vitro* (van Der Heijden i in., 1989; Pietrosiuk i in., 2007). W dostępnej literaturze znaleziono tylko jedno doniesienie dotyczące wytwarzania alkaloidów indolowych w mikropędach *C. roseus*, rosnących w bioreaktorach. Niniejsza kultura, utrzymywana w instalacji z pożywką eksperymentalną w postaci mgły, akumulowała jednak tylko monoindolowe pochodne, tj. windolinę i katarantynę (Yingjin i Zongding, 1994).

W literaturze opisano również wykorzystanie bioreaktorów okresowo-zalewowych do namnażania pędów *Camptotheca acuminata* Decne., zdolnych do biosyntezy kamptotecyny (Sankar-Thomas i Lieberei, 2011).

Przedstawione powyżej ograniczenia, wynikające niejednokrotnie z niskiego stopnia zróżnicowania komórek w prowadzonych kulturach, wystąpiły również w przypadku produkcji galantaminy – inhibitora acetylocholinoesterazy (AChE), wykorzystywanego w terapii choroby Alzheimera (Berkov i in., 2014). Wykazano, że biosynteza powyższego połączenia naturalnego możliwa jest w kulturze mikropędów *Leucojum aestivum*, prowadzonej w bioreaktorach o różnej konstrukcji (Ivanov i in., 2011; Schumann i in., 2012; Georgiev i in., 2012; Berkov i in., 2014).

Jak wynika z piśmiennictwa, również zdolność do produkcji alkaloidów tropanowych, przez pędy oraz teratomy pędowe szeregu gatunków z rodziny Solanaceae (monokultury), jest znacznie ograniczona (Subroto, Hamill, i in., 1996). Wynika to z faktu, że w naturze biosynteza hioscyjminy zachodzi w korzeniach, podczas gdy pędy pełnią funkcję organu magazynującego i miejsca, gdzie zachodzą dalsze etapy biokonwersji omawianej grupy metabolitów wtórnych (Mahagamasekera i Doran, 1998). Z uwagi na powyższe, możliwa jest natomiast produkcja powyższych związków w kokulturach korzeni włósnikowatych oraz teratomów pędowych gatunków należących do powyższej rodziny, prowadzonych w bioreaktorach (Subroto, Kwok, i in., 1996; Mahagamasekera i Doran, 1998).

Ostatnią, szerzej badaną grupą metabolitów wtórnych, możliwą do otrzymywania w warunkach wielkoskalowych kultur *in vitro*, są glikozydy nasercowe (Verma i in., 2016; Kreis, 2017). W toku prowadzonych badań stwierdzono, że zawiesina *Digitalis lanata* Ehrh., namnażana w większej skali, nie była zdolna do produkcji aktywnych farmakologicznie związków z tej grupy, natomiast mikropędy roślin z rodzaju *Digitalis*, inkubowane w bioreaktorach okresowo-zalewowych, akumulowały digitoksynę oraz digoksynę (Pérez-Alonso i in., 2009, 2012).

Podsumowując, kultury *in vitro* o charakterze mikropędów, prowadzone w skali wielkolaboratoryjnej mogą stanowić alternatywne źródło roślinnych metabolitów wtórnych. Niemniej w szeregu przypadków, stężenia pożądaných związków naturalnych w biomasach roślinnych są zbyt niskie, aby otrzymać je wspomnianą techniką na skalę przemysłową.

1.2.2 Rodzaje wykorzystywanych bioreaktorów

Dotychczas kultury mikropędów prowadzono w bioreaktorach o różnej konstrukcji, w tym w instalacjach z mieszaniem mechanicznym lub pneumatycznym, w urządzeniach natryskowych, okresowo-zalewowych oraz zalewowych. Pierwsze bioreaktory do namnażania wymienionych organów zaprojektowano w celu zwiększenia wydajności masowego rozmnażania wegetatywnego roślin w warunkach *in vitro* (Takayama i Akita, 1994; Paek i in., 2005). Dały one początek dalszym pracom biotechnologicznym, w zakresie doskonalenia konstrukcji poszczególnych instalacji, ukierunkowanych na produkcję biomas pędowych jako źródła metabolitów wtórnych o znaczeniu farmakologicznym

(Takayama i Akita, 1994; Etienne i Berthouly, 2002; Paek i in., 2005; Towler i in., 2007; Eibl i Eibl, 2008; Steingroewer i in., 2013; Georgiev i in., 2014).

1.2.2.1 Bioreaktory z mieszaniem mechanicznym

Instalacje z mieszaniem mechanicznym są najszerzej wykorzystywanym typem urządzeń w biotechnologii przemysłowej (Paek i in., 2005; Steingroewer i in., 2013). Namnażanie biomas przebiega przede wszystkim w urządzeniach mieszająco-napowietrzających (ang. *stirred-tank bioreactor*), szczególnie w przypadku kultur bakterii (Paek i in., 2005; Georgiev i in., 2009). Dalsze modyfikacje konstrukcji powyższych bioreaktorów, m.in. poprzez zmianę kształtu mieszadeł mechanicznych, pozwoliły zredukować obecność naprężeń ścinających w układzie ciecz-ciało stałe i wykorzystać je również do prowadzenia roślinnych kultur zawieszonych (obj. robocza do 75 000 L) (Doran, 1993; Takayama i Akita, 1994; Paek i in., 2005; Steingroewer i in., 2013; Valdiani i in., 2019). W przypadku mikropędów, mimo udoskonań takich elementów konstrukcyjnych jak port do inokulacji biomas (Kawamura i in., 1996) oraz wprowadzenie siatek immobilizujących, chroniących podatny na uszkodzenia materiał roślinny (Steingroewer i in., 2013), zwiększanie objętości roboczej urządzeń było znacznie utrudnione ze względu na fotoautotroficzny wzrost eksplantatów. W związku z powyższym, mimo postępów w obszarze inżynierii bioprocusowej, instalacjami z wyboru do prowadzenia kultur mikropędów stały się tańsze bioreaktory z mieszaniem pneumatycznym oraz systemy okresowo-zalewowe (Takayama i Akita, 1994; Etienne i Berthouly, 2002; Paek i in., 2005). W rezultacie, jak zaprezentowano w Tab. 1., liczba opracowanych roślinnych systemów *in vitro* do produkcji metabolitów wtórnych w bioreaktorach z mieszadłem mechanicznym jest dosyć ograniczona.

Spośród interesujących, prototypowych rozwiązań technologicznych, do namnażania biomas roślinnych, można wymienić instalację nazwaną „*The Roller Bioreactor*”, wykorzystaną do produkcji stewiozydów w roślinkach *Stevia rebaudiana* Bertoni (Bondarev i in., 2002, 2003). Wymieniony bioreaktor stanowił układ zamknięty złożony z pojedynczych zbiorników hodowlanych, o jednostkowej objętości roboczej 0,32 L, umieszczonych na wale obrotowym. Konstrukcja urządzenia była zbliżona do koncepcji instalacji „*Auxophyton*”, zastosowanej uprzednio do proliferacji eksplantatów korzeniowych marchwi (Steward i in., 1952; Etienne i Berthouly, 2002).

Na szczególną uwagę zasługuje również bioreaktor *Lab Rocker*, o obj. roboczej wynoszącej 1,0 L, a także, podobny w konstrukcji, „*The Rocker Platform*”. Powyższe dwa systemy użyto do namnażania mikropędów, odpowiednio: *Echinacea purpurea* oraz *Curcuma longa* (Jones i in., 2009; Adelberg i Fári, 2010). W drugim z przywołanych bioreaktorów udało się uzyskać ponad dwukrotnie większą, w porównaniu do kultur stacjonarnych, wydajność w zakresie produkcji masy roślinnej, przy jednoczesnej, relatywnie wysokiej (biorąc pod uwagę wymagania świetlne kultury) objętości roboczej urządzenia, wynoszącej 5 L (Adelberg i Fári, 2010). Innym typem instalacji wielkoskalowej, w której zastosowano mieszanie oparte na kołysaniu naczynia hodowlanego, jest „*Artificial Plant Ovary*” (APO). W porównaniu do „*Lab Rocker*” i „*The Rocker Platform*”, system APO jest bardziej złożony

i umożliwia precyzyjną regulację zanurzenia eksplantatów w medium hodowlanym, wymianę pożywki i kontrolę przestrzeni nad roztworem (Adelberg i Fári, 2010). Powyższe urządzenie, zaprojektowane z myślą o mikrorozmnażaniu roślin, składało się z wielu cylindrycznych naczyń, z których każde było podzielone na dwie koncentryczne komory. *Inoculum* umieszczano w jednej z komór, a pojemnik napełniano podłożem. Ruch obrotowy modułów wzrostowych zapewniał mieszanie pożywki oraz napowietrzanie kultury, a także umożliwił okresowe zanurzanie eksplantatów w płynnym medium (Adelberg i Fári, 2010).

Tab. 1. Produkcja metabolitów wtórnych w mono- oraz kokulturach *in vitro* pędów roślin wyższych, w bioreaktorach z mieszaniem mechanicznym

Typ mieszadła i inne szczegóły konstrukcyjne bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Strumień powietrza [vvm]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Metabolit wtórny	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Mieszadło magnetyczne	1000	28	0,11	Kokultura korzeni włośnikowatych <i>Atropa belladonna</i> oraz teratomów pędowych hybrydy <i>Duboisia</i>	Hybryda <i>Atropa belladonna</i> L. oraz <i>Duboisia leichhardtii</i> x <i>D. myoporoides</i>	Hioscyjamina	8,00x10 ⁻² w teratomach pędowych	3,14x10 ⁻² w teratomach pędowych	Wpływ różnych konstrukcji bioreaktorów na produkcję biomasy i akumulację skopolaminy	(Subroto, Kwok, i in., 1996)
						Skopolamina	2,20x10 ⁻¹ w teratomach pędowych	8,64x10 ⁻² w teratomach pędowych		
Mieszadło magnetyczne; podwójny bioreaktor z umieszczoną centralnie siatką immobilizującą kulturę korzeni	3000 + 3000	28	0,037-0,067	Kokultura korzeni włośnikowatych <i>Atropa belladonna</i> oraz teratomów pędowych hybrydy <i>Duboisia</i>	Hybryda <i>Atropa belladonna</i> L. oraz <i>Duboisia leichhardtii</i> x <i>D. myoporoides</i>	Hioscyjamina	2,20x10 ⁻¹ w teratomach pędowych	8,51x10 ⁻² w teratomach pędowych	Wpływ różnych konstrukcji bioreaktorów na produkcję biomasy i akumulację skopolaminy	(Subroto, Kwok, i in., 1996)
						Skopolamina	1,50x10 ⁻¹ w teratomach pędowych	5,80x10 ⁻² w teratomach pędowych		
Mieszadło magnetyczne oraz mieszadło turbinowe	2000 + 2000	29	0,20	Kokultura korzeni włośnikowatych <i>Atropa belladonna</i> oraz teratomów pędowych hybrydy <i>Duboisia</i>	Hybryda <i>Atropa belladonna</i> L. oraz <i>Duboisia leichhardtii</i> x <i>D. myoporoides</i>	Hioscyjamina	ND	NA	Produkcja metabolitów wtórnych w monokulturach oraz międzygatunkowych kokulturach	(Mahagamasekera i Doran, 1998)
						Skopolamina	4,80x10 ¹ w teratomach pędowych	6,62x10 ⁻⁴ w teratomach pędowych		
Mieszadło magnetyczne	1000	28	0,11	Kultura teratomów pędowych	<i>Atropa belladonna</i> L.	Skopolamina	ND	NA	Wpływ różnych konstrukcji bioreaktorów na produkcję biomasy i akumulację skopolaminy	(Subroto, Hamill, i in., 1996)
Mieszadło magnetyczne	3500	28	0,029-0,057	Kultura teratomów pędowych	<i>Atropa belladonna</i> L.	Skopolamina	ND	NA	Wpływ różnych konstrukcji bioreaktorów na morfologię teratomów pędowych oraz zawartość skopolaminy	(Subroto, Hamill, i in., 1996)

Tab. 1. Produkcja metabolitów wtórnych w mono- oraz kokulturach *in vitro* pędów roślin wyższych, w bioreaktorach z mieszaniem mechanicznym – c.d.

Typ mieszadła i inne szczegóły konstrukcyjne bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Strumień powietrza [vvm]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Metabolit wtórny	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Dwa mieszadła z czterema płaskimi łopatkami 100 obr./min.	2500	15	1,4	Kultura pędów	<i>Digitalis purpurea</i> L.	Digitoksyna	4,18x10 ⁻²	4,29x10 ⁻²	Wpływ mieszania mechanicznego na wzrost komórek i zawartość digitoksyny	(Hagimori i in., 1984)
Bioreaktor 'Southern Sun Liquid Lab Rocker' z wymuszonym ruchem kołyszającym [30 s ON/ 132 s OFF]	100	12	NS	Kultura roślinek	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	Kwas cykoriowy	2,19x10 ¹ 9. dzień doświadczenia	NA	Wpływ GA3, paklobutrazolu oraz unikonazolu na metabolizm wtórny	(Jones i in., 2009)
Mieszadło wykonujące 10 obr./min.; system wyposażony w czujniki temperatury, tlenu oraz pH-metr	4800	23	NS	Kultura pędów	<i>Ruta graveolens</i> L.	Furano-kumaryny	NA	2,00x10 ¹	Wpływ konstrukcji bioreaktorów na produkcję furanokumaryn	(Gontier i in., 2005)
The Roller Bioreactor – przepływ pożywki wewnątrz naczyni, wykonujących 4 obr./min.	4	35	NS	Kultura pędów	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni	Stewiozyd	6,42x10 ⁰ w liściach	4,27x10 ⁻¹	Wpływ składu pożywki na wzrost biomasy i akumulację glikozydów stewiolowych	(Bondarev i in., 2003)
						Rebaudiozyd A	2,50x10 ⁰ w liściach	1,66x10 ⁻¹		
						Rebaudiozyd C	1,20x10 ⁰ w liściach	7,98x10 ⁻²		
The Roller Bioreactor – przepływ pożywki wewnątrz naczyni, wykonujących 4 obr./min.	4	35	NS	Kultura pędów	<i>Stevia Rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni	Stewiozyd	6,37x10 ⁻¹ w liściach	5,74x10 ⁻¹	Wpływ składu pożywki na wzrost biomasy i akumulację glikozydów stewiolowych	(Bondarev i in., 2002)
						Rebaudiozyd A	2,53x10 ⁻¹ w liściach	1,08x10 ⁻¹		
						Rebaudiozyd C	1,20x10 ⁻¹ w liściach	1,08x10 ⁻¹		

NA – dane niedostępne

NS – danych nie określono

ND – nie stwierdzono obecności metabolitu wtórnego

GA3 – kwas giberelinowy

1.2.2.2 Bioreaktory z mieszaniem pneumatycznym

Analogicznie jak bioreaktory opisane w poprzednim podrozdziale 1.2.2.1, instalacje z mieszaniem pneumatycznym są powszechnie stosowane w biotechnologii przemysłowej. W porównaniu do wcześniej omawianego typu urządzeń, powyższe systemy charakteryzują się niższym zużyciem energii i słabszymi siłami ścinającymi, działającymi na tkanki roślinne (Paek i in., 2005; Steingroewer i in., 2013). Ze względu na brak wirnika, ten rodzaj bioreaktorów jest szczególnie korzystny do namnażania korzeni, mikropędów, zarodków somatycznych i roślinek, również przy zastosowaniu większych objętości roboczych w systemach (Takayama i Akita, 1994; Paek i in., 2005). Co więcej, instalacje z mieszaniem pneumatycznym są tańsze niż ich odpowiedniki z mieszaniem mechanicznym. Dodatkowo, istnieje możliwość szeregowego łączenia tego typu urządzeń, zwiększając wydajność bioprocessu. Za wady bioreaktorów pneumatycznych można uznać ograniczoną sprawność mieszania biomasy w medium wzrostowym oraz trudności w kultywacji materiału roślinnego w skali technicznej (m.in. niska aeracja pożywki). Nie mają one jednak istotnego znaczenia przy namnażaniu mikropędów. W tym wypadku ogólny spadek produktywności w systemie, towarzyszący stosowaniu wysokich objętości roboczych badanych układów, powodowany jest raczej utrudnionym dostępem światła do wewnętrznych warstw biomasy roślinnej.

W zależności od stosunku wysokości do średnicy zbiornika hodowlanego (h/d), systemy z mieszaniem pneumatycznym można podzielić na proste instalacje napowietrzające – ang. *simple aeration bioreactors* – SAB, $h/d < 3$) oraz bioreaktory typu *bubble column* – BCB, $h/d > 3$ (Takayama i Akita, 1994).

Aby zredukować pienienie pożywki wzrostowej, opracowano również bioreaktory balonowe w kształcie stożka (ang. *balloon bioreactors* – BB, alternatywnie określane terminem *baloon type bubble bioreactors* – BTBB) (Paek i in., 2005). Z kolei systemy typu *airlift* (ALB) wyposażone są w zanurzoną rurkę, stanowiącą jednocześnie rusztowanie do wzrostu inkubowanej biomasy, dzięki czemu unika się w nich obecności nadmiernych sił ścinających (Takayama i Akita, 1994; Steingroewer i in., 2013). Bioreaktory z mieszaniem pneumatycznym typu SAB, BCB i BB były częstym przedmiotem badań nad zwiększaniem skali kultur mikropędów, roślinek i zarodków somatycznych, ukierunkowanych na produkcję metabolitów wtórnych. Najczęściej stosowano naczynia hodowlane o pojemności do 5 L. Dodatkowymi częściami wyposażenia bioreaktorów mogą być elementy immobilizujące pędy, takie jak: kosze (Raj i in., 2014; Jang i in., 2016; Szopa, Kokotkiewicz, i in., 2018), tratwy (Sharma i in., 2011) lub siatki (Jang i in., 2016; Liu i in., 2003). Powyższe rozwiązania konstrukcyjne poprawiały kondycję fizjologiczną eksplantatów, poprzez redukcję naprężeń mechanicznych działających na materiał roślinny, oraz znacząco obniżały udział zwitryfikowanych pędów w biomacie (częściowe zanurzenie eksplantatów) (Etienne i Berthouly, 2002; Paek i in., 2005; Ducos i in., 2009).

W dołączonej tabeli (Tab. 2) zestawiono wyniki doświadczeń dotyczących metabolizmu wtórnego kultur pędów utrzymywanych w urządzeniach z mieszaniem pneumatycznym. Spośród interesujących, prototypowych rozwiązań technologicznych można wymienić bioreaktor o pojemności 500 L z wewnętrznym oświetleniem, używany do produkcji mikropędów *Stevia rebaudiana* (Akita i in., 1994; Takayama i Akita, 1994). W cytowanych doświadczeniach, namnażanie materiału roślinnego w większej skali nie miało negatywnego wpływu na wydajność produkcji biomasy, jednakże tkanki stewii, znajdujące się w głębszych warstwach kultury, charakteryzowały się gorszą kondycją, wynikającą z niedoboru światła. Brak analiz fitochemicznych namnożonych mikropędów *S. rebaudiana* uniemożliwia ocenę wpływu konstrukcji powyższej instalacji na biosyntezę metabolitów wtórnych (Akita i in., 1994; Takayama i Akita, 1994). Opracowano także jednorazowe i relatywnie tanie systemy z mieszaniem pneumatycznym do kultywacji mikropędów, takie jak: bioreaktor *Growtek* (Tarsons, Indie) (Sharma i in., 2011) i *LifeReactor* (Osmotek, Izrael) (Ducos i in., 2009).

Tab. 2. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym

Typ bioreaktora ^a	Objętość robocza [mL]	Okres kultywacji [dni]	Strumień powietrza [<i>vvm</i>]	Konstrukcja dyszy napowietrzającej	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Metabolit wtórny	Maksymalna zawartość metabolitu [$\text{mg g}^{-1} \text{DW}$]	Maksymalna produktywność metabolitu [$\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$]	Badane parametry	Ref.
ALB	2000	25	1	Perforowana pionowa rurka, umieszczona w osi bioreaktora	Kultura pędów	<i>Artemisia annua</i> L.	Artemizyna	$1,80 \times 10^{-1}$	$5,81 \times 10^{-1}$	Wpływ konstrukcji bioreaktora na produkcję biomasy i akumulację artemizyny	(Liu i in., 2003)
ALB	5000	56	0,1	NS	Komórki emriogeniczne	<i>Eleutherococcus divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i> (Nakai) C.H.Kim & B.Y.Sun	Eleuterozyd B	$5,6 \times 10^{-2}$ w roślinkach	NA	Produkcja roślinek	(Jeong i in., 2005)
							Eleuterozyd E	$3,83 \times 10^{-1}$ w roślinkach	NA		
							Eleuterozyd E1	$3,80 \times 10^{-1}$ w roślinkach	NA		
SAB ‘LifeReactor’	NS	28	NS	NS	Kultura mikroroślinek	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Bajkalina	$1,58 \times 10^{-3}$	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na produkcję biomasy i akumulację flawonoidów	(Zobayed, Murch, Rupasinghe, De Boer i in., 2004)
							Bajkaleina	$4,40 \times 10^{-4}$	NA		
							Wogonina	$3,20 \times 10^{-5}$	NA		
SAB ‘Growtek’	400	28	0,1-0,3 ^b	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Pueraria tuberosa</i> (Roxb. ex Willd.) DC.	Całkowita zawartość izoflawonoidów	$1,89 \times 10^0$ napowietrzanie 20 <i>v/v</i>	NA	Wpływ intensywności napowietrzania na wzrost biomasy i akumulację izoflawonoidów	(Sharma i in., 2011)
							Pueraryna	$1,48 \times 10^0$ napowietrzanie 20 <i>v/v</i>	NA		
							Daidzeina	$1,26 \times 10^{-1}$ napowietrzanie 20 <i>v/v</i>	NA		
							Genisteina	$3,26 \times 10^{-2}$ bez napowietrzania	NA		
							Genistina	$2,51 \times 10^{-1}$ napowietrzanie 20 <i>v/v</i>	NA		
SAB ‘Growtek’	150	28	NS	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Kwas rozmarynowy	$5,12 \times 10^1$	$1,10 \times 10^0$	Wpływ typu bioreaktora na produkcję biomasy i zawartość kwasu rozmarynowego	(Kiferle i in., 2014)

Tab. 2. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym – c.d.

Typ bioreaktora ^a	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Strumień powietrza [<i>vvm</i>]	Konstrukcja dyszy napowietrzającej	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Metabolit wtórny	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g^{-1} DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [$\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$]	Badane parametry	Ref.
SAB	500	56	0,1	NS	Kultura pędów	<i>Leucojum aestivum</i> L.	Galantamina	$5,20 \times 10^{-1}$	$4,08 \times 10^{-2}$	Wpływ konstrukcji i skali bioreaktora na produkcję biomasy i zawartości galantaminy	(Schumann i in., 2012)
SAB	450	15; 18; 30	0,08	Bełkotka umieszczona na dnie zbiornika	Kultura mikroślinek	<i>Artemisia annua</i> L.	Kamfora	$3,48 \times 10^{0c}$ Etefon elicytacja	$3,37 \times 10^{-1}$ Etefon elicytacja	Wpływ kwasu giberelinowego i etefonu na akumulację terpenoidów	(Fulzele i in., 1995)
							1,8-cineol	$7,50 \times 10^{-1c}$ Kwas giberelinowy elicytacja	$1,26 \times 10^{-1}$ Kwas giberelinowy elicytacja		
							β -kariofilen	$6,50 \times 10^{-1c}$ Etefon elicytacja	$6,42 \times 10^{-2}$ Etefon elicytacja		
SAB "Growtek"	NS	40	0,1	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst.	Całkowita zawartość polifenoli	$3,4 \times 10^{1d}$	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację polifenoli	(Jain i in., 2012)
SAB	500	30; 60	1,0	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Schizandryna	$5,51 \times 10^{-1}$ 30. dzień doświadczenia	$1,47 \times 10^{-1}$ 30. dzień doświadczenia	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację lignanów dibenzocyclooktadienowych	(Szopa i in., 2017)
							Deoksychizandryna	$4,32 \times 10^{-1}$ 30. dzień doświadczenia	$1,15 \times 10^{-1}$ 30. dzień doświadczenia		
							Gomisyna A	$3,86 \times 10^{-1}$ 30. dzień doświadczenia	$1,03 \times 10^{-1}$ 30. dzień doświadczenia		
SAB immobilizacja biomasy z zastosowaniem półki	500	30; 60	1,0	Dysza napowietrzająca umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Całkowita zawartość kwasów fenolowych	$3,16 \times 10^{-1}$ 30. dzień doświadczenia	$8,35 \times 10^{-2}$ 30. dzień doświadczenia	Wpływ konstrukcji bioreaktora i modelu kultury na wzrost biomasy oraz akumulację kwasów fenolowych i flawonoidów	(Szopa i in., 2019)
							Kwas chlorogenowy	$2,46 \times 10^{-2}$ 30. dzień doświadczenia	$6,63 \times 10^{-3}$ 30. dzień doświadczenia		

Tab. 2. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym – c.d.

Typ bioreaktora ^a	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Strumień powietrza [<i>vvm</i>]	Konstrukcja dyszy napowietrzającej	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Metabolit wtórny	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
SAB immobilizacja biomasy z zastosowaniem półki	500	30; 60	1,0	Dysza napowietrzająca umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Kwas galusowy	8,50x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	2,29x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	Wpływ konstrukcji bioreaktora i modelu kultury na wzrost biomasy oraz akumulację kwasów fenolowych i flawonoidów	(Szopa i in., 2019)
							Kwas protokatechowy	8,38x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	2,26x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
							Kwas salicylowy	5,09x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	1,37x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
							Całkowita zawartość flawonoidów	2,20x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	5,93x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
							Kwercytryna	1,83x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	4,94x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
SAB bioreaktor wyposażony w kosz immobilizujący	600	70	1,33	NA	Kultura pędów	<i>Securinega suffruticosa</i> (Pall.) Rehder	Sekuryryna	3,29x10 ⁰ suplementacja lizyną w 20. dniu doświadczenia	1,39x10 ⁰ suplementacja lizyną w 20. dniu doświadczenia	Wpływ dodatku prekursorów biosyntezy (chlorowodorek lizyny) na wzrost biomasy oraz zawartość alkaloidów indolizydynowych	(Raj i in., 2014)
							Allosekuryryna	3,44x10 ⁰ suplementacja lizyną w 20. dniu doświadczenia	1,33x10 ⁰ suplementacja lizyną w 20. dniu doświadczenia		
BCB	1500	19	1,3	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hiperycyna	7,74x10 ⁻²	1,87x10 ⁻¹	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację metabolitów wtórnych	(Karppinen, György i in., 2006)
							Hiperforyna	3,99x10 ⁰	3,36x10 ⁰		
							Pseudohiperycyna	2,23x10 ⁻¹	6,52x10 ⁻¹		
BCB	1500	NS	1,3	NS	Kultura pędów	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hiperycyna	7,71x10 ⁻²	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację metabolitów wtórnych	(Karppinen, György i in., 2006)
							Hiperforyna	3,67x10 ⁰	NA		
							Pseudohiperycyna	3,03x10 ⁻¹	NA		

Tab. 2. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym – c.d.

Typ bioreaktora ^a	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Strumień powietrza [<i>vvm</i>]	Konstrukcja dyszy napowietrzającej	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Metabolit wtórny	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
BB bioreaktor z siatką immobilizującą	1000	56	0,1	NS	Kultura pędów	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Całkowita zawartość polifenoli	3,90x10 ¹	9,93x10 ⁰	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację polifenoli i flawonoidów	(Jang i in., 2016)
							Całkowita zawartość flawonoidów	1,31x10 ¹	3,34 x10 ⁰		
BB	1000	56	0,1	NS	Kultura pędów	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Całkowita zawartość polifenoli	3,92x10 ^{1 d}	17,0 x10 ^{0 d}	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację polifenoli oraz flawonoidów	(Jang i in., 2016)
							Całkowita zawartość flawonoidów	1,33x10 ^{1 e}	5,75x10 ^{0 e}		
BB	750	84	0,03; 0,06; 0,09; 0,12	NS	Kultura mikroroślinek	<i>Anoectochilus formasanus</i> Hayata	Całkowita zawartość polifenoli	1,03x10 ^{1 d}	NA	Wpływ intensywności napowietrzania oraz gęstości <i>inoculum</i> na wzrost biomasy	(Wu i in., 2010)
							Całkowita zawartość flawonoidów	2,00x10 ^{-1 e}	NA		
BB	NS	28	NS	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura mikroroślinek	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Baikalina	1,41x10 ⁻³	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację metabolitów wtórnych	(Zobayed, Murch, Rupasinghe, De Boer i in., 2004)
							Baikaleina	3,90x10 ⁻⁴	NA		
							Wogonina	4,72x10 ⁻⁵	NA		
BB	500	30; 60	1,0	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Całkowita zawartość kwasów fenolowych	4,67x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	1,07x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację polifenoli i flawonoidów	(Szopa i in., 2019)
							Kwas chlorogenowy	4,65x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	1,07x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
							Kwas galusowy	1,00x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	2,30x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
							Kwas protokatechowy	1,63x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	3,74x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
							Kwas salicylowy	5,91x10 ⁻² 60. dzień doświadczenia	1,52x10 ⁻² 60. dzień doświadczenia		
							Całkowita zawartość flawonoidów	2,08x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	4,23x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
							Kwercytryna	1,84x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	4,22x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		

Tab. 2. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym – c.d.

Typ bioreaktora ^a	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Strumień powietrza [vvm]	Konstrukcja dyszy napowietrzającej	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Metabolit wtórny	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
BB	500	30; 60	1,0	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Schizandryna	6,73x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	1,53x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację lignanów dibenzocykloktadienowych	(Szopa i in., 2017)
							Deoksychizandryna	4,28x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	9,71x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
							Gomisina A	3,49x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	7,90x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
BB bioreaktor z sekcjami wewnętrznymi	1000	35	0,15; 0,30; 0,45	Ceramiczna dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Leucojum aestivum</i> L.	Galantamina	1,7x10 ⁰ 0,30 obr./min. oraz temp. 22°C	4,86x10 ⁻² 0,30 obr./min. oraz temp. 22°C	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację galantaminy	(Georgiev i in., 2012)
BB	NS	56	0,3	NS	Kultura pędów	<i>Leucojum aestivum</i> L.	Galantamina	6,80x10 ⁻¹	3,29x10 ⁻²	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację galantaminy	(Schumann i in., 2012)
BB dwa kosze ze stali nierdzewnej, umieszczone koncentrycznie	1000	60	0,8	Napowietrzanie zapewniane przez wąż silikonowy umieszczony w dnie naczynia wzrostowego	Kokultura pędów i korzeni włośnikowatych	<i>Genista tinctoria</i> L.	Genistyna	6,94x10 ¹ 40. dzień doświadczenia	1,38x10 ³	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację izoflawonów	(Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2005)
							Genisteina	6,74x10 ⁻¹ 26. dzień doświadczenia	7,94x10 ⁰		
							Daidzeina	3,29x10 ⁰ 50. dzień doświadczenia	7,99x10 ¹		
							Daidzina	1,65x10 ¹ 54. dzień doświadczenia	4,35x10 ²		

Tab. 2. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym – c.d.

Typ bioreaktora ^a	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Strumień powietrza [<i>vvm</i>]	Konstrukcja dyszy napowietrzającej	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Metabolit wtórny	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g^{-1} DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [$\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$]	Badane parametry	Ref.
BB	2000	42	0,1	NS	Zarodki somatyczne	<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i> (Rupr. & Maxim.) S.Y.Hu	Całkowita zawartość eleuterozydów	$1,48 \times 10^{-1}$	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację eleuterozydów	(Shohael i in., 2005)
							Kwas chlorogenowy	$3,40 \times 10^{-2}$	NA		
							Całkowita zawartość flawonoidów	$1,84 \times 10^1$	NA		
							Całkowita zawartość polifenoli	$1,67 \times 10^1$	NA		
BB	1000	25	0,1	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura mikrooślinek	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hiperycyna	$3,36 \times 10^{-2}$	$4,51 \times 10^{-3}$	Wpływ konstrukcji bioreaktora na akumulację metabolitów wtórnych	(Zobayed, Murch, Rupasinghe, i Saxena, 2004)
							Pseudohiperycyna	$5,24 \times 10^{-1}$	$7,01 \times 10^{-2}$		
							Hiperforyna	$4,04 \times 10^0$	$5,44 \times 10^{-1}$		
BB	1000	25	NS	Dysza umieszczona na dnie zbiornika	Kultura pędów	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hiperycyna	$3,18 \times 10^{-2}$ dodatek sacharozy 45 g/l	$1,5 \times 10^{-2}$ dodatek sacharozy 30 g/l	Wpływ dodatku sacharozy na wzrost biomasy oraz akumulację metabolitów wtórnych	(Zobayed i in., 2003)
							Pseudohiperycyna	$5,08 \times 10^{-1}$ dodatek sacharozy 45 g/l	$1,50 \times 10^{-1}$ dodatek sacharozy 45 g/l		
							Hiperforyna	$5,35 \times 10^{-1}$ dodatek sacharozy 15 g/l	$2,97 \times 10^{-1}$ dodatek sacharozy 15 g/l		

NA – dane niedostępne

NS – danych nie określono

^a – rozwinięcie skrótów: ALB – bioreaktor typu *airlift*; SAB – bioreaktor napowietrzający; BCB – bioreaktor typu *bubble column*; BB – bioreaktor balonowy w kształcie stożka

^b – jednostka wyrażona jako *v/v*

^c – jednostka wyrażona jako mg% FW

^d – jednostka wyrażona jako ekwiwalent kwasu galusowego [mg GAE g^{-1} DW lub $\text{mg GAE L}^{-1} \text{d}^{-1}$]

^e – jednostka wyrażona jako ekwiwalent (+)-katechiny [mg g^{-1} DW lub $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$]

1.2.2.3 Systemy okresowo-zalewowe oraz zalewowe

Bioreaktory okresowo-zalewowe (ang. *temporary immersion bioreactors* – TIB) zaprojektowano w celu ograniczenia skutków ubocznych związanych z ciągłym zanurzeniem materiału roślinnego w pożywce, takich jak hipoksja lub nieprawidłowa morfologia eksplantatów, w tym ich szklistość i wysoki udział tkanek nekrotycznych w biomasie. Dane przytoczone w dostępnym piśmiennictwie dowodzą, że konstrukcja powyższych instalacji, warunkująca ograniczony czasowo kontakt medium wzrostowego i mikropędów, sprzyja zachowywaniu prawidłowej kondycji fizjologicznej namnażanych kultur (Etienne i Berthouly, 2002; Watt, 2012). Jednocześnie opisywane urządzenia są relatywnie tanie i łatwe w skalowaniu. Systemy okresowo-zalewowe rozwijane od lat 80. XX wieku, stopniowo stały się najpopularniejszymi bioreaktorami stosowanymi w masowym rozmnażaniu roślin w warunkach *in vitro* (Etienne i Berthouly, 2002; Ducos i in., 2008; Watt, 2012; Steingroewer i in., 2013; Georgiev i in., 2014). Zagadnienie to zostało szczegółowo omówione przez Etienne i Berthouly (Etienne i Berthouly, 2002), a ostatnio przez Watta (Watt, 2012) oraz Georgieva i in. (Georgiev i in., 2014).

W najprostszej postaci, bioreaktor okresowo-zlewowy może stanowić układ złożony z dwóch kolb, wielkości nawet do 20 L. Tego typu prototypowe urządzenia są jednymi z najczęściej stosowanych w mikrorozmnażaniu roślin (Etienne i Berthouly, 2002; Ducos i in., 2008; Watt, 2012; Georgiev i in., 2014), a także w badaniach nad ich metabolizmem wtórnym (Tab. 3).

Obecnie większość wykorzystywanych bioreaktorów okresowo-zalewowych wykonanych jest z przezroczystych tworzyw sztucznych, składających się z dwóch komór (zbiornik pożywki i pojemnik wzrostowy), funkcjonujących w jednym układzie. W opisywanym systemie stosuje się mieszanie typu pneumatycznego, co minimalizuje koszty eksploatacji urządzenia, a jego jednozbiornikowa konstrukcja oszczędza miejsce na półkach hodowlanych (Etienne i Berthouly, 2002; Georgiev i in., 2014). Najpopularniejszym komercyjnym systemem do namnażania mikropędów jest RITA[®] (*Vitropic*, Francja), wprowadzony na rynek biotechnologiczny w 1995 roku (Ducos i in., 2008; Watt, 2012; Georgiev i in., 2014). Pomimo stosunkowo małej objętości roboczej (zwykle ok. 200 mL podłoża wzrostowego) omawiany bioreaktor jest często stosowany w badaniach nad metabolizmem wtórnym roślin (Tab. 3). Niedawno wprowadzona instalacja PLANTFORM[®] (*Plant Form AB*, Szwecja) (Welander i in., 2014), o nieco większej objętości roboczej, wynoszącej do 500 mL, jest także szeroko wykorzystywana w tego typu eksperymentach (Jesionek i in., 2017; Szopa i in., 2017, 2019; Szopa, Klimek-Szczykutowicz, i in., 2018; Szopa, Kokotkiewicz, i in., 2018).

Warto w tym miejscu zauważyć, że pod względem jakości namnożonego materiału roślinnego skuteczniejsze są systemy okresowo-zalewowe aniżeli bioreaktory warunkujące ciągłe zanurzenie tkanek roślinnych (ang. *continuous immersion bioreactors* – CIB). Niemniej, w niektórych przypadkach, kultury prowadzone w drugim z wymienionych urządzeń wykazywały szybszy wzrost (Kiferle i in., 2014) w porównaniu z pędami kultywowanymi przy okresowym kontakcie z pożywką.

Czasami, w prototypowych bioreaktorach opisanych w literaturze, stosowano okresowe napowietrzanie stale zanurzonej biomasy, dlatego można je sklasyfikować jako hybrydowe urządzenia z mieszaniem pneumatycznym i ciągłym zanurzeniem, w zależności od konfiguracji: CIB-SAB lub CIB-BB. Przykładowo, wynikiem prac badawczych, prowadzonych nad kulturą pędów *Leucojum aestivum* L., ukierunkowanych na produkcję roślinnych metabolitów wtórnych w bioreaktorze CIB-SAB, było zwiększenie wydajności biosyntezy galantaminy w porównaniu z systemem okresowo-zalewowym (Schumann i in., 2012).

Rezultaty badań dotyczących wytwarzania metabolitów wtórnych w kulturach pędów namnażanych w TIB i CIB podsumowano w Tab. 3. W wielu przypadkach prowadzone doświadczenia skupiały się na optymalizacji częstotliwości zanurzenia biomas w pożywkach, która jest kluczowym parametrem wpływającym na produktywność systemu *in vitro*.

Tab. 3. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych

Typ bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Czas zanurzenia [min./h]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
RITA®	250	28; 56	1/3; 1/6	Kultura pędów	<i>Camptotheca acuminata</i> Decne.	Kamptotecyna	2,60x10 ⁰ czas zanurzenia 1/6 oraz TS 28 d	NA	Wpływ typu systemu <i>in vitro</i> na zawartość kamptotecyny	(Sankar-Thomas i Lieberei, 2011)
RITA®	200	4; 9; 21	5/24	Kultura pędów	<i>Castilleja tenuiflora</i> Benth.	Całkowita zawartość polifenoli	2,95x10 ¹ a N 1,32 mM 21. dzień doświadczenia	1,40x10 ⁰ a N 1,32 mM 21. dzień doświadczenia	Wpływ niedoboru azotu (N) i substancji odżywczych na morfogenezę oraz akumulację polifenoli	(Cortes-Morales i in., 2018)
						Werbaskozyd	2,83x10 ² N 0,66 mM 21. dzień doświadczenia	1,35x10 ¹ N 1,32 mM 21. dzień doświadczenia		
						Izowerbaskozyd	9,00x10 ¹ N 1,32 mM 21. dzień doświadczenia	4,64x10 ¹ N 1,32 mM 21. dzień doświadczenia		
						Aukubina	1,25x10 ¹ N 0,00 mM 21. dzień doświadczenia	6,90x10 ⁻¹ N 25,74 mM 21. dzień doświadczenia		
RITA®	200	21	30/3; 30/12; 30/24; 5/3; 5/12; 5/24	Kultura pędów	<i>Castilleja tenuiflora</i> Benth.	Całkowita zawartość polifenoli	3,06x10 ¹ a czas zanurzenia 30/24	NA	Wpływ częstotliwości zanurzenia pędów na morfogenezę oraz akumulację polifenoli i flawonoidów	(Valdez-Tapia i in., 2014)
						Całkowita zawartość flawonoidów	4,58x10 ⁻² b czas zanurzenia 30/24	NA		
RITA®	500	25	5/3	Kultura mikro-roślinek	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hiperycyna	3,39x10 ⁻²	2,33x10 ⁻³	Wpływ konstrukcji bioreaktora na akumulację polifenoli	(Zobayed, Murch, Rupasinghe, i Saxena, 2004)
						Pseudohiperycyna	5,41x10 ⁻¹	3,75x10 ⁻²		
						Hiperforyna	2,20x10 ⁻³	1,52x10 ⁻¹		
RITA® Okresowe zanurzenie korzeni	500	25	5/30	Kultura mikro-roślinek	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hiperycyna	4,47x10 ⁻²	3,57x10 ⁻³	Wpływ konstrukcji bioreaktora na akumulację polifenoli	(Zobayed, Murch, Rupasinghe, i Saxena, 2004)
						Pseudohiperycyna	8,80x10 ⁻¹	6,94x10 ⁻²		
						Hiperforyna	3,29x10 ⁻³	2,56x10 ⁻¹		

Tab. 3. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych – cd.

Typ bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Czas zanurzenia [min./h]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
RITA®	200	35	15/6; 15/8; 15/10; 15/12	Kultura pędów	<i>Leucojum aestivum</i> L.	Galantamina	1,06x10 ⁻¹ czas zanurzenia 15/8 oraz temp. 26°C	3,79x10 ⁻² czas zanurzenia 15/8 oraz temp. 26°C	Wpływ częstotliwości zanurzenia pędów oraz temperatury na wzrost biomasy i akumulację alkaloidów	(Ivanov i in., 2011)
						Likoryna	7,83x10 ⁻⁴ czas zanurzenia 15/10 oraz temp. 26°C	2,43x10 ⁻⁴ czas zanurzenia 15/10 oraz temp. 26°C		
						Norgalantamina	2,60x10 ⁻¹ czas zanurzenia 15/8 oraz temp. 22°C	5,54x10 ⁻² czas zanurzenia 15/8 oraz temp. 22°C		
RITA®	200	35	15/4; 15/6; 15/7; 15/10; 15/12	Kultura pędów	<i>Leucojum aestivum</i> L.	Galantamina Hamaina Likoryna	NA – stosunek czasu zanurzenia i temperatura wpływały na produkcję biomasy i akumulację alkaloidów	Wpływ częstotliwości zanurzenia pędów oraz temperatury otoczenia na wzrost biomasy i akumulację alkaloidów	(Ivanov i in., 2012)	
RITA®	150	28	1/12	Kultura pędów	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Kwas rozmarynowy	1,55x10 ²	1,07x10 ⁰	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację kwasu rozmarynowego	(Kiferle i in., 2014)
RITA®	200	35	15/6; 15/12; 15/24	Kultura pędów	<i>Pancreatum maritimum</i> L.	Hemantamina	9,00x10 ⁻¹ czas zanurzenia 15/12	1,03x10 ⁻¹ czas zanurzenia 15/12	Wpływ częstotliwości zanurzenia pędów na wzrost biomasy i akumulację metabolitów	(Georgiev i in., 2014)
						Likoryna	8,00x10 ⁻¹ czas zanurzenia 15/12	9,45x10 ⁻² czas zanurzenia 15/12		
RITA®	200	28	5/1,5	Kultura pędów	<i>Rhododendron tomentosum</i> Harmaja	Olejek eteryczny p-cymen alloaromadendren tlenek ledenu (II)	5,00x10 ^{-3c} całkowita zawartość olejku eterycznego	3,57x10 ^{-3c} całkowita produktywność olejku eterycznego	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację olejku eterycznego	(Jesionek i in., 2017)
RITA®	200	28	5/1,5	Kultura pędów	<i>Rhododendron tomentosum</i> Harmaja	Olejek eteryczny p-cymen alloaromadendren tlenek ledenu (II)	5,67x10 ^{-3c} całkowita zawartość olejku eterycznego przy elicytacji ekstraktem z mszyc (<i>Aphididae</i>)	3,93x10 ^{-3c} całkowita produktywność olejku eterycznego przy elicytacji ekstraktem z mszyc (<i>Aphididae</i>)	Wpływ elicytacji biotycznej oraz abiotycznej na biosyntezę olejku eterycznego	(Jesionek i in., 2018)

Tab. 3. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych – cd.

Typ bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Czas zanurzenia [min./h]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
RITA®	NS	28	5/3	Kultura mikro-roślinek	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Bajkalina	2,75x10 ⁻³	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację flawonoidów	(Zobayed, Murch, Rupasinghe, De Boer i in., 2004)
						Bajkaleina	2,10x10 ⁻³	NA		
						Wogonina	1,05x10 ⁻⁴	NA		
RITA®	200	30; 60	5/1,5	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Bail	Schizandryna	7,86x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	1,94x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację lignanów dibenzocyklooktadienowych	(Szopa i in., 2017)
						Deoksyzschizandryna	5,03x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	1,24x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia		
						Gomisyna A	5,27x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	1,30x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia		
						Całkowita zawartość polifenoli	3,27x10 ^{-1 a} 30. dzień doświadczenia	8,15x10 ^{-2 a} 30. dzień doświadczenia		
						Kwas chlorogenowy	2,32x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	5,79x10 ⁻³ 30. dzień doświadczenia		
						Kwas galusowy	8,87x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	2,21x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
RITA®	200	30; 60	NS	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Bail	Kwas protokatechowy	9,87x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	2,46x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację kwasów fenolowych i flawonoidów	(Szopa i in., 2019)
						Kwas salicylowy	5,27x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	2,46x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
						Całkowita zawartość flawonoidów	2,13x10 ^{-1 b} 30. dzień doświadczenia	5,31x10 ^{-2 b} 30. dzień doświadczenia		
						Kwercytryna	1,85x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	4,62x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
						Tapsigargina	3,37x10 ⁰ dla ½ MS oraz elicytacji MeJa	NA		
						Nortrilobolid	2,15x10 ¹ dla ½ MS oraz elicytacji MeJa	NA		
RITA®	200	3; 6; 12; 18	3/6	Kultura pędów	<i>Thapsia garganica</i> L.	Tapsigargina	3,37x10 ⁰ dla ½ MS oraz elicytacji MeJa	NA	Wpływ elicytacji oraz redukcji zawartości makro- i mikroelementów w pożywce na metabolizm wtórny	(López i in., 2018)

Tab. 3. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych – cd.

Typ bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Czas zanurzenia [min./h]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
RITA®	300	60	15/24	Kultura pędów	<i>Zeltnera beyrichii</i> (Torr.) G.Mans.	Swertiamaryna	1,31x10 ¹ dodatek fruktozy	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację ksantonów oraz glikozydów sekoirydoidowych	(Radović i in., 2013)
						Gentiopikryna	2,18x10 ¹ dodatek fruktozy	NA		
						Swerozyd	1,22x10 ¹ dodatek fruktozy	NA		
PLANT-FORM®	NS	28	5/1,5	Kultura pędów	<i>Rhododendron tomentosum</i> Harmaja	Olejek eteryczny <i>p</i> -cymen alloaromadendren tlenek ledenu (II)	1,91x10 ^{-3 d} całkowita zawartość oleju eterycznego	NA	Wpływ warunków hodowlanych i konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację oleju eterycznego	(Jesionek i in., 2017)
PLANT-FORM®	500	30; 60	5/1,5	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Bail	Schizandryna	1,18x10 ⁰ 30. dzień doświadczenia	2,45x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację lignanów dibenzocyklooktadienowych	(Szopa i in., 2017)
						Deoksyzschizandryna	7,77x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	1,60x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia		
						Gomisyna A	6,79x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	1,40x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia		
PLANT-FORM®	500	30; 60	NS	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Bail	Całkowita zawartość polifenoli	3,46x10 ^{-1 a} 30. dzień doświadczenia	7,18x10 ^{-2 a} 30. dzień doświadczenia	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację kwasów fenolowych i flawonoidów	(Szopa i in., 2019)
						Kwas chlorogenowy	2,98x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	6,19x10 ⁻³ 30. dzień doświadczenia		
						Kwas galusowy	7,45x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	1,53x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
						Kwas protokatechowy	1,09x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	2,26x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
						Kwas salicylowy	5,84x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia	1,21x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		
						Całkowita zawartość flawonoidów	2,05x10 ^{-1 b} 30. dzień doświadczenia	4,25x10 ^{-2 b} 30. dzień doświadczenia		
						Kwercytryna	1,75x10 ⁻¹ 30. dzień doświadczenia	3,64x10 ⁻² 30. dzień doświadczenia		

Tab. 3. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych – cd.

Typ bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Czas zanurzenia [min./h]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
PLANT-FORM®	500	30	5/1,5	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> odmiana Sadowa (Turcz.) Bail	Schizandryna	1,44x10 ⁰ Elicytacja ekstraktem drożdżowym	NA	Wpływ elicytacji na wzrost biomasy i akumulację lignanów dibenzocyklooktadienowych	(Szopa, Klimek-Szczykutowicz, i in., 2018)
						Angeloilogramisyna Q	2,23x10 ⁻¹ Elicytacja ekstraktem drożdżowym	NA		
						Gomisyna A	4,26x10 ⁻¹ Elicytacja ekstraktem drożdżowym	NA		
						Angeloilogramisyna H	4,51x10 ⁻¹ Elicytacja ekstraktem drożdżowym	NA		
Bioreaktor z przewodem silikonowym (napowietrzanie bezpiecznikowe)	NS	28	60/1	Kultura mikro-roślinek	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Bajkalina	1,53x10 ⁻³	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację kwasów fenolowych i flawonoidów	(Zobayed, Murch, Rupasinghe, De Boer i in., 2004)
						Bajkaleina	4,00x10 ⁻⁴	NA		
						Wogonina	6,36x10 ⁻⁵	NA		
Prototypowy	NS	28	5/90	Kultura pędów	<i>Rhododendron tomentosum</i> Harmaja	Olejek eteryczny <i>p</i> -cymen alloaromadendren tlenek ledeń (II)	2,92x10 ^{-3 c} (całkowita zawartość olejku eterycznego)	NA	Wpływ warunków hodowlanych i konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i produkcję olejku eterycznego	(Jesionek i in., 2017)
Prototypowy	500	56	5/4	Kultura pędów	<i>Leucojum aestivum</i> L.	Galantamina	6,00x10 ⁻²	1,44x10 ⁻³	Wpływ konstrukcji bioreaktora i masy <i>inoculum</i> na wzrost biomasy i akumulację galantaminy	(Schumann i in., 2012)
Prototypowy	200	28	5/3; 15/12	Kultura pędów	<i>Gynura procumbens</i> (Lour.) Merr.	Całkowita zawartość flawonoidów	3,07x10 ^{1 b} czas zanurzenia 15/12h oraz pożywka MS, z dodatkiem IAA (2,0 mg L ⁻¹) oraz BAP (8,00 mg L ⁻¹)	2,74x10 ^{-1 b} czas zanurzenia 15/12h oraz pożywka MS, z dodatkiem IAA (2,0 mg L ⁻¹) oraz BAP (8,00 mg L ⁻¹)	Wpływ regulatorów wzrostu oraz częstotliwości zanurzania pędów na wzrost biomasy i akumulację flawonoidów	(Pramita i in., 2018)

Tab. 3. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych – cd.

Typ bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Czas zanurzenia [min./h]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Prototypowy	250	28	2/2; 2/4; 2/6; 2/12	Kultura pędów	<i>Digitalis purpurea</i> L.	Digitoksyna	3,25x10 ⁻² czas zanurzenia 2/2h	9,57x10 ⁻³ czas zanurzenia 2/2h	Wpływ częstotliwości zanurzenia pędów na wzrost biomasy i akumulację kardenolidów	(Pérez-Alonso i in., 2009)
						Digoksyna	2,06x10 ⁻² czas zanurzenia 2/4h	1,71x10 ⁻² czas zanurzenia 2/4h		
						Lanatozyd C	ND	ND		
Prototypowy	250	28	2/4	Kultura pędów	<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.	Lanatozyd C	3,16x10 ⁻¹ elicytacja Chitoplant	1,53x10 ⁻¹ elicytacja Chitoplant	Wpływ elicytacji biotycznej na wzrost biomasy i biosyntezę kardenolidów	(Pérez-Alonso i in., 2012)
						Digoksyna	2,84x10 ⁻² elicytacja Chitoplant	1,71x10 ⁻² elicytacja Chitoplant		
						Digitoksyna	ND	ND		
Prototypowy	1000	14	3/4	Kultura mikro-roślinek	<i>Deschampsia antarctica</i> É.Desv.	Kwas szikimowy	1,71x10 ⁰ dla UV-B	NA	Wpływ promieniowania UV-B na akumulację polifenoli	(Sequeira i in., 2012)
						Kwas wanilinowy	3,97x10 ⁻¹ dla UV-B+B	NA		
						Kwas chlorogenowy	6,49x10 ⁰ dla UV-B+B	NA		
						Skopoletyna	7,81x10 ⁰ dla UV-B+B	NA		
						Rutyna	1,40x10 ⁰ dla UV-B+B	NA		
						Kwas galusowy	2,01x10 ⁰ dla UV-B+B	NA		
						Izokwercytryna	3,15x10 ⁻¹ dla UV-B+B	NA		
Prototypowy	2000	56	5/4	Kultura pędów	<i>Fabiana imbricata</i> Ruiz & Pav.	Kwas oleanolowy	1,00x10 ⁻²	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na akumulację kwasu oleanolowego	(Gontier i in., 2005)
Prototypowy	2000	56	5/4	Kultura pędów	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	α -cytral	3,50x10 ⁻¹	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na akumulację α - i β -cytralu	(Gontier i in., 2005)
						β -cytral	5,40x10 ⁻¹	NA		
Prototypowy	2000	56	5/4	Kultura pędów	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hiperycyna	1,80x10 ⁻¹	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na akumulację hiperycyny	(Gontier i in., 2005)
Prototypowy	2000	56	5/4	Kultura pędów	<i>Lavandula officinalis</i> Chaix	Kwas rozmarynowy	5,70x10 ⁰	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na akumulację kwasu rozmarynowego	(Gontier i in., 2005)

Tab. 3. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych – cd.

Typ bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Czas zanurzenia [min./h]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Prototypowy	2500	42; 56	5/4	Kultura pędów	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Całkowita zawartość polifenoli	9,7x10 ^{0a} dla pojemników o obj. 5 L oraz okresu kultury 42 dni	NA	Wpływ napowietrzania kultury gazem bogatym w CO ₂ , zmniejszonej częstotliwości zanurzenia pędów, objętości naczyń hodowlanych oraz czasu kultury biomasy na zawartość polifenoli	(Tapia i in., 2007)
						Całkowita zawartość flawonoidów	5,10x10 ^{0b} przy zredukowanym czasie zanurzenia pędów	NA		
						Kwas kawowy	1,65x10 ¹ dla pojemników o obj. 10L oraz czasie kultury 42 dni	NA		
						Kwas chlorogenowy	1,94x10 ² przy zredukowanym czasie zanurzenia pędów	NA		
						Kwas neochlorogenowy	1,19x10 ² przy zredukowanym czasie zanurzenia pędów	NA		
						Kwas <i>p</i> -hydroksybenzoesowy	9,90x10 ¹ dla pojemników o obj. 10L oraz czasu kultury 42 dni	NA		
Prototypowy	300	32; 60	45/0,75	Kultura pędów	<i>Cyclopia genistoides</i> (L.) R.Br.	Mangiferyna	2,62x10 ¹ czas kultury 60 dni	5,48x10 ⁰ czas kultury 60 dni	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację polifenoli	(Kokotkiewicz i in., 2015)
						Izomangiferyna	7,55x10 ⁰ czas kultury 60 dni	1,58x10 ⁰ czas kultury 60 dni		
						3-C-β-glukozyd iriflofenonu	6,50x10 ⁰ czas kultury 32 dni	3,04x10 ⁰ czas kultury 60 dni		

Tab. 3. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych – cd.

Typ bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Czas zanurzenia [min./h]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Prototypowy	2000	42	30/6	Zarodki somatyczne	<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i> (Rupr. & Maxim.) S.Y.Hu	Całkowita zawartość eleuterozydów	1,48x10 ⁻¹ dla skielkowanych zarodków	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację eleuterozydów	(Shohael i in., 2005)
						Kwas chlorogenowy	3,40x10 ⁻² dla skielkowanych zarodków	NA		
						Całkowita zawartość flawonoidów	1,84x10 ¹ dla skielkowanych zarodków	NA		
						Całkowita zawartość polifenoli	1,67x10 ¹ dla skielkowanych zarodków	NA		
Prototypowy bioreaktor 'Dual-Vessel System'	200; 400	28; 56	1/3; 1/6	Kultura pędów	<i>Camptotheca acuminata</i> Decne.	Kamptotecyna	2,12x10 ⁰ dla częstotliwości zainoczenia pędów 1/3h oraz czasu kultury 56 dni	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację kamptotecyny	(Sankar-Thomas i Lieberei, 2011)
Prototypowy bioreaktor typu <i>balloon</i>	1000	56	NS	Kultura pędów	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Całkowita zawartość polifenoli	2,38x10 ^{1 a}	3,14x10 ^{0 a}	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy i akumulację polifenoli	(Jang i in., 2016)
						Całkowita zawartość flawonoidów	8,00x10 ^{0 d}	1,04x10 ^{0 d}		
Prototypowy bioreaktor typu <i>balloon</i> z siatką	1000	56	NS	Kultura pędów	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Całkowita zawartość polifenoli	2,58x10 ^{1 a}	9,64x10 ^{-1 a}		
						Całkowita zawartość flawonoidów	1,10x10 ^{1 d}	3,93x10 ^{-1 d}		
Bioreaktor prototypowy o poj. 5L	NS	90	60/1	Kultura pędów	<i>Ruta graveolens</i> L.	Furanokumaryny Bergapten Psoralen Ksantotoksyna	2,25x10 ¹ dla całkowitej zawartości furanokumaryny	NA	Wpływ zwiększania skali kultury na metabolizm wtórny	(Diwan i Malpathak, 2008)

Tab. 3. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych – cd.

Typ bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Czas zanurzenia [min./h]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Prototypowy bioreaktor o poj. 2L	NS	90	60/1	Kultura pędów	<i>Ruta graveolens</i> L.	Furanokumariny Bergapten Psoralen Ksantotoksyna	8,67x10 ⁰ dla całkowitej zawartości furanokumaryn	NA	Wpływ zwiększania skali kultury na metabolizm wtórny	(Diwan i Malpathak, 2008)
CIB-BB (napowietrzanie 4 x dziennie po 5 min.)	NS	56	60/1	Kultura pędów	<i>Leucojum aestivum</i> L.	Galantamina	7,20x10 ⁻¹	2,89x10 ⁻²	Wpływ zwiększania skali kultury na produkcję biomasy oraz akumulację galantaminy	(Schumann i in., 2012)
CIB-SAB (napowietrzanie 12 x dziennie po 5 min.)	500	56	60/1	Kultura pędów	<i>Leucojum aestivum</i> L.	Galantamina	2,40x10 ⁰	2,15x10 ⁻¹	Wpływ konstrukcji bioreaktora oraz masy <i>inoculum</i> na produkcję biomasy i akumulację galantaminy	(Schumann i in., 2012)

BAP – 6-benzyloaminopuryna

CIB-BB – bioreaktor balonowy w kształcie stożka, o konstrukcji warunkującej ciągłe zanurzenie tkanek roślinnych

CIB-SAB – bioreaktor napowietrzający o konstrukcji warunkującej ciągłe zanurzenie tkanek roślinnych

IAA – kwas indolilo-3-octowy

N – azot

NA – dane niedostępne

NS – danych nie określono

ND – nie stwierdzono obecności metabolitu wtórnego

MS – pożywka Murashige i Skoog'a

MeJa – jasmonian metylu

^a – jednostka wyrażona jako ekwiwalent kwasu galusowego [mg GAE g⁻¹ DW lub mg GAE L⁻¹ d⁻¹]

^b – jednostka wyrażona jako ekwiwalent kwercetyny [mg CE g⁻¹ DW lub mg CE L⁻¹ d⁻¹]

^c – wyrażone jako [μL g⁻¹ DW lub μL L⁻¹ d⁻¹]

^d – jednostka wyrażona jako ekwiwalent (+)-katechiny [mg g⁻¹ DW lub mg L⁻¹ d⁻¹]

1.2.2.4 Bioreaktory natryskowe

Innym rozwiązaniem konstrukcyjnym pozwalającym na redukcję zjawiska hipoksji i ograniczenie naprężeń ścinających działających na delikatne pędy, są systemy natryskowe (ang. *gas phase bioreactors* – GPB) (Tab. 4). W powyższych urządzeniach pożywka może być dostarczana w formie kropeł (Φ 10-103 μm – ang. *spray bioreactors* - SB) lub mgły (Φ 0,01-10 μm – ang. *gas phase systems* – GPS), bezpośrednio na rosnącą biomasę (Towler i in., 2007). Odpowiedni stopień rozproszenia medium uzyskuje się za pomocą dyszy hydraulicznej (Grzegorzczuk i Wysokińska, 2010; Jesionek i in., 2017; Szopa i in., 2017), atomizera (Yingjin i Zongding, 1994; Hilton i in., 1995) lub ultradźwiękowego generatora mgły (Liu i in., 1998, 2003). Odrębnym rozwiązaniem konstrukcyjnym jest instalacja z przepływowym obiegiem pożywki (bioreaktor hydrauliczny; ang. *hydraulic bioreactor* – HB), wykorzystana do hodowli pędów *Artemisia annua* (Liu i in., 1998).

Warto w tym miejscu zauważyć, że omawiany typ urządzenia zaprojektowano z myślą o wymaganiach kultur korzeni (Liu i in., 1999; Towler i in., 2007), ale wdrożono je z sukcesem również w przypadku hodowli pędów (Etienne i Berthouly, 2002; Georgiev i in., 2014). Zalety opisywanych bioreaktorów, takie jak: dobra wymiana gazowa i niskie naprężenia ścinające, okazały się przydatne przy kultywacji mikropędów, zapewniając ich dobry wzrost i wyższą produkcję metabolitów wtórnych w porównaniu z innymi systemami *in vitro* (Liu i in., 2003; Jesionek i in., 2017). Główną wadą zastosowania urządzeń GPB jest ich względna złożoność konstrukcyjna, w porównaniu z instalacjami z mieszaniem pneumatycznym lub systemami okresowo-zalewowymi, co sprawia, że są one bardziej podatne na ewentualne uszkodzenia. Mimo powyższych ograniczeń, bioreaktory GPB były stopniowo doskonalone na przestrzeni lat, przede wszystkim poprzez implementację bardziej niezawodnych przetworników ultradźwiękowych (Towler i in., 2007). Kolejnym problemem związanym z użyciem niniejszego typu instalacji było nieefektywne wykorzystanie objętości reaktora; w większości przypadków rosnącą biomasę rozmieszczano na jednej półce (Piątczak i in., 2005; Grzegorzczuk i Wysokińska, 2010; Piątczak i in., 2015; Grzegorzczuk-Karolak i in., 2017; Jesionek i in., 2017; Szopa i in., 2017). Jakkolwiek część opisanych w literaturze systemów wyposażono w rusztowania wielopoziomowe, inokulacja biomas była w niniejszych urządzeniach zarówno utrudniona jak i czasochłonna (Liu i in., 1998, 2003). Warto w tym miejscu nadmienić, że w przeciwieństwie do TIB, które są dostępne komercyjnie, bioreaktory GPB zazwyczaj stanowią konstrukcje prototypowe (Tab. 4).

Tab. 4. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, w bioreaktorach natryskowych

Szczegóły konstrukcyjne bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultywacji [dni]	Cykl zraszania ON/OFF [min/min]	Strumień przepływu pożywki [mL/min.]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Ultradźwiękowy generator mgły; bioreaktor wyposażony w siatkę immobilizującą ze stali nierdzewnej	1000	28	10/50	2,0	Kultura pędów	<i>Artemisia annua</i> L.	Artemizyna	3,00x10 ^{-1 a}	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora natryskowego na wzrost biomasy oraz akumulację artemizyny	(Sharaf-Eldin i Elkholy, 2009)
Ultradźwiękowy generator mgły; bioreaktor ze złożem kaolinowym	1000	28	10/50	2,0	Kultura pędów	<i>Artemisia annua</i> L.	Artemizyna	3,60x10 ^{-1 a}	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora natryskowego na wzrost biomasy oraz akumulację artemizyny	(Sharaf-Eldin i Elkholy, 2009)
Ultradźwiękowy generator mgły; bioreaktor z trójpoziomą siatką ze stali nierdzewnej	400	25	3/90	NS	Kultura pędów	<i>Artemisia annua</i> L.	Artemizyna	3,60x10 ^{-1 a}	1,89x10 ^{0 a}	Wpływ konstrukcji bioreaktora natryskowego na wzrost biomasy oraz akumulację artemizyny	(Liu i in., 2003)
Bioreaktor 'Multi-plate radius-flow bioreactor'; stała cyrkulacja medium bez zraszania, trójpoziomowe rusztowanie	400	25	NA	2,0	Kultura pędów	<i>Artemisia annua</i> L.	Artemizyna	3,20x10 ^{-1 a}	1,38x10 ^{0 a}	Wpływ konstrukcji bioreaktora natryskowego na wzrost biomasy oraz akumulację artemizyny	(Liu i in., 2003)
Ultradźwiękowy generator mgły; 'Modified inner-loop ultrasonic nutrient mist bioreactor'; bioreaktor z trójpoziomą siatką ze stali nierdzewnej	400	5; 10; 15; 20; 25; 30	3/30; 3/60; 3/90; 3/120; 3/150; 3/180	NS	Kultura pędów	<i>Artemisia annua</i> L.	Artemizyna	3,20x10 ^{-1 a} dla czasu kultywacji 25 dni i cyklu zraszania 3/90	1,88x10 ^{0 a} dla czasu kultywacji 25 dni i cyklu zraszania 3/90	Wpływ czasu zraszania na wzrost biomasy oraz akumulację artemizyny	(Liu i in., 1998)

Tab. 4. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, w bioreaktorach natryskowych – cd.

Szczegóły konstrukcyjne bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultywacji [dni]	Cykl zraszania ON/OFF [min/min]	Strumień przepływu pożywki [mL/min.]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Bioreaktor z dyszą przepływową; obieg medium wymuszony pompą perystaltyczną	NS	21; 28	40/1,5	112	Kultura pędów	<i>Centaurium erythraea</i> Rafn	Gentiopikrozyd	2,20x10 ¹ dla czasu kultywacji 21 dni	9,67x10 ⁰ dla czasu kultywacji 21 dni	Wpływ konstrukcji bioreaktora natryskowego na wzrost biomasy oraz akumulację sekoirydoidów	(Piatczak i in., 2005)
							Swerozyd	8,00x10 ⁰ dla czasu kultywacji 21 dni	3,48x10 ⁰ dla czasu kultywacji 21 dni		
							Swertiamaryna	6,00x10 ⁰ dla czasu kultywacji 28 dni	2,50x10 ⁰ dla czasu kultywacji 28 dni		
Atomizer; bioreaktor wyposażony w dwie siatki ze stali nierdzewnej	12000	60	60/60	200	Teratomy pędowe	<i>Mentha citrate</i> Ehrh.	Linalol	3,80x10 ⁻³	5,28x10 ⁻³	Wpływ temperatury, światła oraz składu pożywki na wzrost biomasy oraz akumulację monoterpenoidów	(Hilton i in., 1995)
							Octan linalilu	6,91x10 ⁻²	2,43x10 ⁻¹		
Atomizer; bioreaktor wyposażony w dwie siatki ze stali nierdzewnej	12000	60	60/60	200	Teratomy pędowe	<i>Mentha x piperita</i> L.	Pulegon	2,34x10 ⁻¹	1,13x10 ⁰	Wpływ temperatury, światła oraz składu pożywki na wzrost biomasy oraz akumulację monoterpenoidów	(Hilton i in., 1995)
							Mentofuran	6,78x10 ⁻²	3,21x10 ⁻¹		
Bioreaktor z dyszą przepływową; obieg medium wymuszony pompą perystaltyczną	1000	28	0,67/3	90	Kultura pędów	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) DC.	Całkowita zawartość polifenoli	5,87x10 ^{1 a}	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację polifenoli	(Piatczak i in., 2014)
							Całkowita zawartość flawonoidów	1,94x10 ^{1 b}	NA		

Tab. 4. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, w bioreaktorach natryskowych – cd.

Szczegóły konstrukcyjne bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultywacji [dni]	Cykl zraszania ON/OFF [min/min]	Strumień przepływu pożywki [mL/min.]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Bioreaktor z dyszą przepływową; obieg medium wymuszony pompą perystaltyczną	NS	28	5/85	100	Kultura pędów	<i>Rhododendron tomentosum</i> Harmaja	Olejek eteryczny <i>p</i> -cymen alloaromadendren tlenek ledenu (II)	5,30x10 ⁻³ (całkowita zawartość olejku eterycznego) ^c	NA	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz akumulację olejku eterycznego	(Jesionek i in., 2017)
Bioreaktor z dyszą przepływową; obieg medium wymuszony pompą perystaltyczną	1000	21	0,67/0,83	105	Kultura pędów	<i>Salvia officinalis</i> L.	Kwas rozmarynowy	2,62x10 ¹	2,81x10 ¹	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy oraz produkcję kwasu rozmarynowego i diterpenoidów	(Grzegorzcyk i Wysokińska, 2010)
							Kwas karnozowy	1,74x10 ¹	1,87x10 ⁻¹		
							Karnozol	1,34x10 ¹	1,44x10 ⁻¹		
Bioreaktor z dyszą przepływową; obieg medium wymuszony pompą perystaltyczną	500	30; 60	0,5/10	100	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Schizandryna	8,52x10 ⁻¹ dla czasu kultywacji 30 dni	2,19x10 ⁻¹ dla czasu kultywacji 30 dni	Wpływ konstrukcji bioreaktorów na wzrost biomasy, regenerację roślin oraz akumulację lignanów dibenzocyklooktadienowych	(Szopa i in., 2017)
							Deoksyzschizandryna	5,79x10 ⁻¹ dla czasu kultywacji 30 dni	1,49x10 ⁻¹ dla czasu kultywacji 30 dni		
							Gomisina A	5,25x10 ⁻¹ dla czasu kultywacji 30 dni	1,35x10 ⁻¹ dla czasu kultywacji 30 dni		

Tab. 4. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, w bioreaktorach natryskowych – cd.

Szczegóły konstrukcyjne bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultury [dni]	Cykl zraszania ON/OFF [min/min]	Strumień przepływu pożywki [mL/min.]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Bioreaktor z dyszą przepływową; obieg medium wymuszony pompą perystaltyczną	500	30; 60	0,5/10	100	Kultura pędów	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Całkowita zawartość polifenoli	3,96x10 ⁻¹ a dla czasu kultury 30 dni	1,02x10 ⁻¹ a dla czasu kultury 30 dni	Wpływ konstrukcji bioreaktorów na wzrost biomasy, regenerację roślin oraz akumulację polifenoli	(Szopa i in., 2019)
							Kwas chlorogenowy	3,75x10 ⁻² dla czasu kultury 30 dni	9,70x10 ⁻³ dla czasu kultury 30 dni		
							Kwas galusowy	8,87x10 ⁻² dla czasu kultury 30 dni	2,29x10 ⁻² dla czasu kultury 30 dni		
							Kwas protokatechowy	1,22x10 ⁻¹ dla czasu kultury 30 dni	3,16x10 ⁻² dla czasu kultury 30 dni		
							Kwas salicylowy	6,74x10 ⁻² dla czasu kultury 30 dni	1,74x10 ⁻² dla czasu kultury 30 dni		
							Całkowita zawartość flawonoidów	2,90x10 ⁻¹ b dla czasu kultury 30 dni	7,51x10 ⁻² b dla czasu kultury 30 dni		
							Kwercytryna	2,10x10 ⁻¹ dla czasu kultury 30 dni	5,43x10 ⁻² dla czasu kultury 30 dni		
Bioreaktor z dyszą przepływową; obieg medium wymuszony pompą perystaltyczną	NS	35	0,67/2	90	Kultura pędów	<i>Scutellaria alpina</i> L.	Bajkalina	1,52x10 ¹	7,11x10 ⁻¹	Wpływ konstrukcji bioreaktora na wzrost biomasy, regenerację roślin oraz akumulację metabolitów wtórnych	(Grzegorzczak-Karolak i in., 2017)
							Werbaskozyd	6,95x10 ⁰	3,23x10 ⁻¹		
							Wogonozyd	4,08x10 ⁰	1,91x10 ⁻¹		
							Luteolina	5,15x10 ⁰	2,41x10 ⁻¹		
							7-glukozyd luteoliny	1,45x10 ⁰	6,86x10 ⁻²		

Tab. 4. Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, w bioreaktorach natryskowych – cd.

Szczegóły konstrukcyjne bioreaktora	Objętość robocza [mL]	Okres kultywacji [dni]	Cykl zraszania ON/OFF [min/min]	Strumień przepływu pożywki [mL/min.]	Typ kultury <i>in vitro</i>	Gatunek	Związek	Maksymalna zawartość metabolitu [mg g ⁻¹ DW]	Maksymalna produktywność metabolitu [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Badane parametry	Ref.
Ultradźwiękowy generator mgły	400	25	3/90	500	Kultura pędów	<i>Artemisia annua</i> L.	Artemizyna	3,5x10 ⁻¹ ^a	1,88x10 ⁰ ^a	Wpływ konstrukcji bioreaktora natryskowego na wzrost biomasy, regenerację roślin oraz akumulację artemizyny	(Liu i in., 1999)

NA – dane niedostępne

NS – danych nie określono

^a – jednostka wyrażona jako ekwiwalent kwasu galusowego [mg GAE g⁻¹ DW lub mg GAE L⁻¹ d⁻¹]

^b – jednostka wyrażona jako ekwiwalent kwercetyny [mg CE g⁻¹ DW lub mg CE L⁻¹ d⁻¹]

^c – wyrażone jako [μL g⁻¹ DW or μL L⁻¹ d⁻¹]

Podsumowując, zaprezentowane wyniki dotyczące produktywności oraz zawartości wybranych metabolitów wtórnych w mikropędach roślin wyższych, namnażanych w poszczególnych bioreaktorach (Tab. 1-4), dowodzą, że możliwa jest adaptacja omawianego typu kultur do wzrostu w większej skali, przy czym otrzymany materiał biologiczny może być źródłem takich grup metabolitów wtórnych jak: polifenole, alkaloidy oraz olejki eteryczne. Należy jednak pamiętać, że wymagania tego typu kultur (fotoautotroficzny wzrost, utrudniona wymiana gazowa w kulturach o dużej gęstości) stanowią znaczne wyzwanie podczas opracowania wielkoskalowych systemów *in vitro* o objętościach roboczych przekraczających 10 L. Ze względu na powyższe, skuteczniejszym podejściem do zwiększenia skali produkcji biomas roślinnych, syntezujących połączenia naturalne, wydaje się być wykorzystanie wielu małych, komercyjnie dostępnych bioreaktorów, w przypadku których szeregowo łączenie pojedynczych instalacji pozwala osiągać wyższą wydajność całego systemu. Warto nadmienić, że o ile rozwój biotechnologii roślin w obszarze inżynierii bioprocessowej pozwolił wdrożyć szereg z omówionych powyżej urządzeń do otrzymywania wtórnych metabolitów na skalę techniczną, to otrzymany materiał roślinny charakteryzuje z reguły ograniczona produktywność. Jak do tej pory, pędy namnażane w warunkach *in vitro* nie są ekonomicznie opłacalnym źródłem substancji chemicznych na rynku komercyjnym. Niemniej jednak stanowią one stabilne, alternatywne systemy do produkcji niektórych połączeń naturalnych, szczególnie przy ograniczonym dostępie do surowców gruntowych.

2 BADANIA WŁASNE

2.1 Wstęp

Podstawowym celem niniejszego projektu doktoranckiego było otrzymanie, metodami biotechnologicznymi, roślinnych systemów *in vitro*, mogących stanowić ciągłe źródło metabolitów wtórnych z grupy terpenów i polifenoli, o określonych własnościach terapeutycznych, potencjalnie mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób cywilizacyjnych, w tym schorzeń neurodegradacyjnych (choroba Alzheimer) oraz autoimmunologicznych.

Wspomniane zespoły połączeń naturalnych współwystępują w szeregu roślin z rodziny Lamiaceae. Wśród nich rodzaj *Salvia*, tradycyjnie stosowany w lecznictwie, stanowi bogate źródło powyższych grup związków. Z części nadziemnych szalwii izoluje się olejki eteryczne, w których można wyróżnić aktywne biologicznie mono- i seskwiterpeny. Charakteryzują się one znacznym potencjałem terapeutycznym w odniesieniu do schorzeń autoimmunologicznych (Anastasiou i Buchbauer, 2017) oraz neurozwyrodnieniowych (Rashed i in., 2021). Ponadto, części podziemne roślin z powyższego taksonu, pochodzące z Azji oraz Ameryki Północnej, są źródłem unikatowej grupy związków diterpenowych, pochodnych abietanu – tanszinonów (Kabouche i Kabouche, 2008; Qiao i in., 2009; Zhang, Jiang i in., 2012; Jiang i in., 2019). Utrudnieniem w możliwościach powszechnego wykorzystania opisanych surowców do celów farmaceutycznych są m.in. ograniczone zasoby środowiska (Zhang, Jiang i in., 2012; Jiang i in., 2019).

Gatunkiem z rodzaju *Salvia*, który łączy w sobie wysoki potencjał biosyntetyczny, w zakresie produkcji zarówno klasy związków polifenolowych, jak i terpenowych, jest endemiczny takson *Salvia apiana* Jeps. Powyższa roślina, pochodząca z południowo-zachodniego rejonu USA, wyróżnia się obecnością, w częściach nadziemnych, bogatego zespołu nietlotnych terpenoidów, w tym pochodnych abietanu, a także charakteryzuje się zdolnością do akumulacji znacznych ilości olejku eterycznego. W częściach podziemnych niniejszego gatunku zidentyfikowano ponadto tanszinony, występujące również w *S. multiorrhiza* Bunge (Krol i in., 2022).

Z uwagi na powyższe, w ramach prezentowanego projektu, zdecydowano się otrzymać, po raz pierwszy, roślinne systemy do produkcji metabolitów wtórnych z grupy terpenów i polifenoli, na bazie kultur *in vitro* szalwii białej. Do prac eksperymentalnych włączono szeroki zakres zróżnicowanych tkankowo biomas testowanego gatunku. Prócz celu utylitarne powyższego projektu, jakim było otrzymanie alternatywnego, wobec środowiska naturalnego, nowego źródła materiału roślinnego do wykorzystania w lecznictwie po przeprowadzeniu serii stosownych eksperymentów, kultury *in vitro* szalwii białej posłużyły również jako układy modelowe do prowadzenia prac biotechnologicznych dotyczących biosyntezy związków terpenowych i polifenolowych w kulturach tkankowych. Doświadczenia w tym zakresie przełożyły się na pełniejsze rozpoznanie zależności między zdolnością

do akumulacji wspomnianych metabolitów w biomasach, a stopniem cytodyferencjacji materiału roślinnego.

Komplementarną częścią prac doświadczalnych były analizy jakościowe oraz ilościowe frakcji terpenowych i polifenolowych, wyekstrahowanych z biomas *in vitro* szałwii białej, przeprowadzone metodami chromatograficznymi (GC-FID/MS i HPLC-DAD-ESI/MS). Porównanie profili metabolicznych otrzymanych kultur z surowcem gruntowym umożliwiło, w dalszej kolejności, wytypowanie materiału roślinnego *in vitro* do prowadzenia bardziej zaawansowanych eksperymentów biotechnologicznych. Obejmowały one adaptację wyselekcjonowanych typów matryc roślinnych do wzrostu w większej skali, w bioreaktorach, oraz stymulowanie biosyntezy wybranych, aktywnych biologicznie związków, wykorzystując elicytację i dokarmianie kultur substancjami odżywczymi.

Realizacja zasadniczego celu pracy obejmowała także wstępne badania biologiczne wyizolowanych frakcji lotnych, pochodzących z biomas *in vitro* szałwii białej oraz rośliny gruntowej, w zakresie zdolności do hamowania procesów patologicznych, towarzyszących wspomnianym uprzednio chorobom cywilizacyjnym. W niniejszych pracach testowano: aktywność inhibicyjną, występujących w powyższych surowcach, olejków eterycznych względem acetylocholinoesterazy, tyrozinazy oraz hialuronidazy (terapia chorób neurodegeneracyjnych oraz związanych z procesami starzeniowymi), a także określono wpływ frakcji lotnych terpenów oraz ich podstawowego składnika – tj. 1,8-cineolu na limfocyty T u osób zdrowych (zdolność do supresji układu immunologicznego).

Skorelowanie eksperymentów biotechnologicznych, fitochemicznych i biologicznych pozwoliło na zrealizowanie podstawowego celu projektu doktoranckiego, jakim było otrzymanie roślinnych systemów *in vitro*, z przeznaczeniem do produkcji charakterystycznych dla *Salvia apiana*, aktywnych biologicznie terpenów i polifenoli oraz wstępne określenie ich przydatności terapeutycznej.

2.2 Otrzymanie kultur *in vitro* *Salvia apiana* o różnym stopniu cytodyferencjacji

Wstępny etap prac biotechnologicznych, opisanych w prezentowanej pracy doktorskiej, obejmował wyprowadzenie, po raz pierwszy, kultur *in vitro* szaławii białej o różnym stopniu cytodyferencjacji (biomasy korzeni anatomicznych i transformowanych, mikropędy oraz kalusy). Niniejsze zadanie badawcze, w przypadku kultur o charakterze hodowli nietransformowanych, zostało zrealizowane z wykorzystaniem materiału nasiennego szaławii białej (rozdz. 3.1.1). Korzenie włóśnikowate testowanego gatunku wyprowadzono z uzyskanych mikropędów (rozdz. 3.1.8.2.4), infekowanych wybranymi szczepami *Agrobacterium rhizogenes*: LBA 9402, A4 oraz 15834 (rozdz. 3.1.8.3).

Wstępne prace doświadczalne na kulturach o charakterze hodowli nietransformowanych obejmowały sterylizację materiału nasiennego, jego kiełkowanie a następnie izolację poszczególnych elementów jałowej siewki, z których bezpośrednio wyprowadzono właściwe, inicjalne biomasy *in vitro*. Ukierunkowanie procesów morfogenezy w otrzymanych biomasach szaławii białej uzyskano poprzez modyfikację składu podłoża wzrostowych, przede wszystkim, z uwagi na zawartość regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin.

2.2.1 Otrzymanie kultur nietransformowanych

2.2.1.1 Kielkowanie nasion oraz potwierdzenie tożsamości gatunkowej badanej rośliny

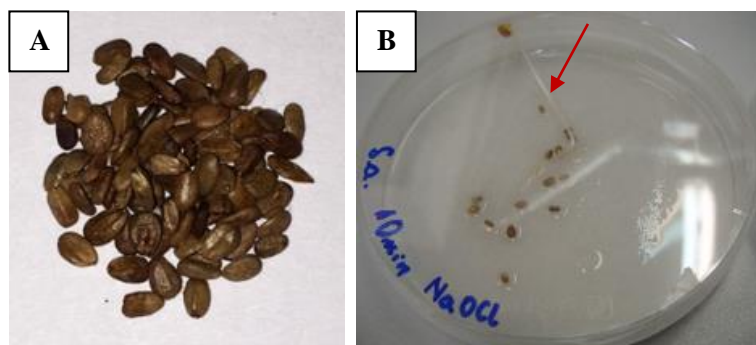
Wybór nasion, jako eksplantatów inicjalnych, podyktowany był względami praktycznymi. Szałwia biała jest rośliną endemiczną, a obszar jej występowania ogranicza się do niewielkiego rejonu Ameryki Północnej. Możliwość uprawy powyższego gatunku poza tym terenem jest utrudniona (Adlof, 2015; Leopold, 2019; Krol i in., 2022). Skłonność do zamierania i wysokie wymagania hodowlane sprawiają, że jedynie w obszarze jej naturalnego występowania możliwe jest pozyskanie odpowiedniej ilości materiału do wyprowadzenia kultur *in vitro* w oparciu o rozwinięte części wegetatywne, takie jak wierzchołki pędów lub pąki boczne. Nasiona nie wymagały natomiast dodatkowych zabiegów konserwacyjnych i mogły być łatwo przetransportowane do Europy, bez istotnego ryzyka utraty juvenilności.

Wykorzystanie materiału nasiennego do inicjacji kultur *in vitro* szaławii białej umożliwiło również równoległe wyprowadzenie, poprzez etap jednej siewki, zróżnicowanych tkankowo, ale genetycznie jednorodnych, biomas roślinnych. Odcięcie odpowiedniego fragmentu skielkowanego nasienia od eksplantatu pierwotnego (merystem wierzchołkowy, korzeniowy lub części hipokotylowe) i umieszczenie go na medium wzbogaconym o wybrane regulatory wzrostu z grupy auksyn i cytokinin, pozwoliło ukierunkować jego dalsze różnicowanie w typ kultury o określonym statusie morfogenicznym (Ikeuchi i in., 2019).

Wykorzystany w eksperymencie materiał roślinny pozyskano z firmy Strictly Medicinal®, specjalizującej się w dostarczaniu wysokojakościowych nasion z zachodniej części USA. Mając na względzie otrzymanie jak największej liczby jałowych, żywotnych siewek do dalszych badań biotechnologicznych, zastosowanym w niniejszej pracy zabiegiem, poprawiającym zdolność nasion do kiełkowania, była ich stratyfikacja, prowadzona w temp. $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ przez okres 2 tygodni. Zgodnie z danymi literaturowymi, w przypadku amerykańskich gatunków szałwii jest to jeden ze skutecznych sposobów aktywacji zarodka (Meyer, 2008).

Wykorzystanie nasion jako eksplantatów pierwotnych pozwoliło również na zastosowanie stosunkowo agresywnej metody wyjaławiania chemicznego materiału roślinnego, związkami o szerokim spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego. W ramach opisywanego etapu prac eksperymentalnych, w oparciu o dane literaturowe, zdecydowano się na wybór 5,25% wodnego roztworu podchlorynu sodu (NaOCl) jako środka sterylizującego. Związek ten, w szerokim zakresie stężeń, wykazuje znaczną skuteczność wyjaławiającą również w przypadku dużego stopnia zakażenia materiału roślinnego drobnoustrojami (grzyby, bakterie a nawet wirusy) (Fay, 1994; Abdalla i in., 2022).

W ramach prowadzonych badań, ok. 90 nasion (Ryc. 2A) poddano wieloetapowej sterylizacji powierzchniowej, obejmującej mycie materiału roślinnego płynem powierzchniowo-czynnym, płukanie go w wodzie ultraczystej oraz odtłuszczenie w 70% (v/v) etanolu. Tak przygotowane nasiona podzielono na trzy porcje, poddawane właściwej sterylizacji, w różnych przedziałach czasowych (5, 8 i 10 min.), z użyciem komercyjnie dostępnego preparatu Chloraxid, zawierającego podchloryn sodu w stężeniu 5,25%. Kontakt z utleniaczem, w każdym z zastosowanych wariantów doświadczalnych, powodował odbarwienie nasion na kolor jasnobrązowy. W ostatnim etapie opisywanego procesu, materiał roślinny przepłukano 3-krotnie jałową wodą ultraczystą i przeniesiono do szalek Petriego z tworzywa sztucznego, wyłożonych sterylną bibułą, nasiąkniętą jałową wodą wodociągową, a następnie inkubowano je w fitotronie, w ciemności, w temp. $24\pm 1^{\circ}\text{C}$.



Ryc. 2. Nasiona *S. apiana* Jeps.;

A – nasiona przed sterylizacją; B – nasiona, na szalce Petriego, w 15. dniu po sterylizacji (widoczna jedna wykształcona siewka).

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że niezależnie od czasu kontaktu nasion z podchlorynem sodu, zastosowanie powyższego utleniacza, w stężeniu 5,25% i czasie właściwej sterylizacji wynoszącym co najmniej 5 minut, pozwoliło uzyskać 100% jałowych eksplantatów pierwotnych. Niemniej jednak, tak przygotowany materiał roślinny charakteryzował się niską, nieprzekraczającą 4%, żywotnością. Stopniowe pojawianie się siewek zaobserwowano począwszy od 8. poprzez 10., 13. i 37. dzień doświadczenia (Ryc. 2B). Nieliczne skielkowane nasiona (4 siewki) pochodziły z modyfikacji eksperymentalnych, dla których czas właściwej sterylizacji wynosił 5 oraz 10 minut (po 2 siewki w każdym wariacie czasowym).

Dostępne dane literaturowe wykazały, że współczynnik kiełkowania dla badanego gatunku wynosi 42% (Meyer, 2008), zatem uzyskana w opisywanym doświadczeniu kiełkowność materiału nasiennego, jedynie na poziomie ok. 4%, może świadczyć o zbyt agresywnym charakterze zastosowanej procedury. W tym miejscu należy również zaznaczyć, że tak niski wskaźnik kiełkowania pierwotnych eksplantatów nie znajduje odzwierciedlenia w przeprowadzonych uprzednio badaniach dotyczących wprowadzenia innych gatunków z rodzaju *Salvia* do kultur *in vitro* (Mascarello i in., 2006; Erdag i in., 2010; Darwesh i Alayafi, 2018; Erişen i in., 2020). Przykładowo, sterylizacja nasion *S. dorystaechas* B. T. Drew, 4,5% wodnym roztworem podchlorynu sodu, prowadzona przez 15 min., nie przyczyniła się do tak drastycznego obumierania testowanego materiału roślinnego, a ilość otrzymanych siewek odpowiadała liczbie żywych nasion, wyznaczonej w teście tetrazolinowym (Erdag i in., 2010). Wobec powyższego, poczynione obserwacje mogą raczej wskazywać na szeroko rozumianą złą jakość zakupionych nasion szałwii białej.

W efekcie z 90 nasion, sterylizowanych w różnych warunkach eksperymentalnych otrzymano 4 siewki, które wyłożono następnie na podłoże MS, bez dodatku regulatorów wzrostu (MS₀), celem zmęźnienia i otrzymania łatwych do izolacji fragmentów liścieni, korzonków i hypokotyli, stanowiących eksplantaty wtórne, służące do wyprowadzenia kultur *in vitro* różniących się statusem morfogenetycznym. W wyniku powyższego zabiegu, stwierdzono, że znaczną żywotnością charakteryzowało się jedynie nasiono, które wykiełkowało jako pierwsze. Po 7 dniach od jego wyłożenia na podłoże MS₀, otrzymano eksplantat inicjalny, który przeznaczono do dalszych prac biotechnologicznych. Pozostałe siewki w ciągu kilku dni obumarły.

Podsumowując, w toku przeprowadzonych wstępnych doświadczeń biotechnologicznych stwierdzono, że 5-10 minutowa sterylizacja nasion szałwii białej za pomocą 5,25% wodnego roztworu podchlorynu sodu, a następnie ich inkubacja w ciemności, w temp. 24±1°C, na szalkach Petriego wyłożonych wilgotną bibułą (rozdz. 3.1.8.1) pozwoliła na otrzymanie 100% sterylnej materiału roślinnego o bardzo niskiej juwenilności, prawdopodobnie spowodowanej złą jakością kupionych nasion oraz zastosowaniem agresywnej procedury wyjaławiającej. W tym miejscu należy zaznaczyć, że na potrzeby niniejszego projektu doktoranckiego, otrzymanie nawet jednej, żywej i sterylnej siewki było wystarczające do kontynuowania prowadzonych badań biotechnologicznych, wydłużając jedynie wstępny etap wyprowadzenia kolekcyjnych kultur *in vitro* *S. apiana*. Należy również wspomnieć, że

uzyskanie z jednej siewki biomas roślinnych o różnym stopniu zróżnicowania morfogenetycznego wiąże się ze znaczną jednorodnością genetyczną poszczególnych kultur, sprzyjającą ich długoterminowej stabilności z uwagi na pierwotny i wtórny metabolizm (Malepszy, 2012).

2.2.1.2 Wyprowadzenie kultur nietransformowanych *S. apiana*

Istotnym utrudnieniem kolejnego etapu projektu doktoranckiego, tj. wyprowadzenia kultur nietransformowanych szałwii białej, o różnym stopniu zróżnicowania morfogenetycznego, była ograniczona do jednego liczba eksplantatów wtórnych – zmężniała siewka, z której otrzymano poszczególne biomasy kolekcyjne. W efekcie niemożliwe było dobranie podłoży wzrostowych, a przede wszystkim, zawartego w nich, zespołu regulatorów wzrostu, które warunkowałyby selektywną i wydajną morfogenezę fragmentów liścieni, hypokotyli i korzonka *S. apiana*, na drodze systematycznego, empirycznego testowania szerokiego spektrum mediów hodowlanych oraz fitohormonów stosowanych w kulturach *in vitro* roślin wyższych. Na opisywanym etapie badań wytypowano więc, w oparciu o kwerendę literaturową oraz doświadczenie własne Promotor, jedynie 3 pożywki, na których obserwowano stopniową cytodyferencjację wymienionych powyżej eksplantatów wtórnych. Właściwej optymalizacji składu podłoży wzrostowych oraz warunków hodowli podjęto się dopiero podczas prowadzenia kultur ciągłych *S. apiana* (rozdz. 3.1.9), gdy dysponowano wystarczającą ilością biomas do wykonania tego typu doświadczeń.

Dane literaturowe wskazują, że rośliny z rodziny *Lamiaceae*, w tym również należące do rodzaju *Salvia*, wykazują znaczne zróżnicowanie międzygatunkowe, jeżeli chodzi o wzrost oraz profil metaboliczny w identycznych warunkach eksperymentalnych. W efekcie, dobór odpowiedniej pożywki do inicjacji kultur wymaga częściowo podejścia zindywidualizowanego (Mascarello i in., 2006; Marchev i in., 2014; Gokdogan i Burun, 2022). Ogólnie, prowadzone do tej pory badania dotyczące namnażania *Salvia* ssp. w warunkach *in vitro* wykazały, że niniejszy rodzaj preferuje tzw. podłoża bogate, charakteryzujące się wysokim stężeniem soli mineralnych oraz podstawowych składników organicznych (Marchev i in., 2014; Deepa i Thomas, 2022). Medium najszerszej testowanym w tym zakresie była pożywka opisana przez Murashiga i Skooga (MS), wyróżniająca się wysoką zawartością azotanów oraz jonów potasowych (Murashige i Skoog, 1962; Frett, 1987; Morimoto i in., 1994; Cuenca i Amo-Marco, 2000; Liu i in., 2018; Gokdogan i Burun, 2022). Wśród podłoży ubogich w składniki mineralne, rzadziej stosowanych w kulturach *in vitro* gatunków z rodzaju *Salvia*, można wymienić pożywki: Gamborga (B5), Linsmaiera i Skooga (LS) oraz Nitscha i Nitscha (NN) (Olszowska i Furmanowa, 1990; Hosoki i Tahara, 1993; Avato i in., 2005; Echeverrigaray i in., 2010). Ze względu na powyższe, w pracach nad otrzymaniem kultur *in vitro* szałwii białej zdecydowano się zastosować medium MS (Murashige i Skoog, 1962), do którego dołączono pożywkę Schenka-Hildebrandta (SH) (Schenk i Hildebrandt, 1972), na której z dużym sukcesem kultywowano, w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed, wybrane rośliny z rodzaju *Lamiaceae* (Luczkiewicz i in., 2015).

2.2.1.2.1 Wprowadzenie kultury kolekcyjnej korzeni odciętych *S. apiana*

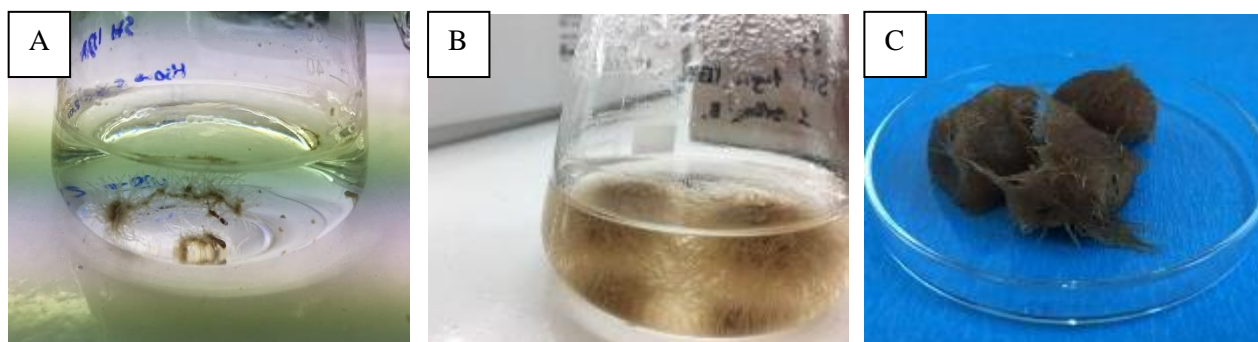
W ramach prezentowanych doświadczeń, stymulację ryzogenezę wyizolowanego ze zmężniałej siewki korzonka *S. apiana* (rozd. 3.1.8.2.1) postanowiono prowadzić poprzez dodatek do podstawowego medium eksperymentalnego SH regulatorów wzrostu z grupy auksyn.

Powyższa klasa fitohormonów jest najczęściej stosowana w tego typu pracach, ze względu na szeroki potencjał w zakresie regulacji procesów morfogenezy roślin, przy czym w zależności od zastosowanego stężenia, może wywierać zarówno efekt hamujący, jak i stymulujący ryzogenezę (Mironova i in., 2010; Hussain i in., 2022). Dostępne dane literaturowe wskazują, że do indukcji korzeni w kulturach *in vitro* roślin z rodzaju *Salvia* przeważnie wykorzystywano, indywidualnie lub w zespołach, kwas indolilo-3-masłowy (IBA) oraz indolilio-3-octowy (IAA), rzadziej natomiast używano kwasu indolilo-3-propionowego (IPA) (Liu i in., 2000; Kabir i in., 2014; Yadav i in., 2019; Deepa i Thomas, 2022; Martini i in., 2022). Przykładowo, w kulturze korzeni przybyszowych *S. miltiorrhiza*, przy zastosowanym płynnym podłożu B5, dodatek IBA w stężeniu 0,5-1,0 mg L⁻¹, pozwolił uzyskać 20-krotny przyrost biomasy w ciągu 8 tygodni, przy jednoczesnym korzystnym wpływie niniejszej auksyny na metabolizm wtórny badanej hodowli (Shimomura i in., 1991).

Ze względu na powyższe dane literaturowe oraz doświadczenie własne Promotor (Jaremicz, Luczkiewicz, Kisiel i in., 2014, Jaremicz, Luczkiewicz, Kokotkiewicz i in., 2014; Dziomba i in., 2015), do prac wytypowano podłoże wzrostowe Schenk-Hildebrandta (SH), zawierające wysokie zawartości jonów NH₄⁺, NO₃⁻, K⁺ oraz węglowodanów, które wzbogacono o IBA w stężeniu 1,0 mg L⁻¹ (SH_{IBA1,0}). Odcięty od zmężniałej siewki niewielki system korzeniowy przeniesiono do wspomnianej, płynnej pożywki w kolbach Erlenmeyera i inkubowano w fitotronie, na wytrząsarce, bez dostępu do światła (rozd. 3.1.8.2.1).

Już od pierwszego dnia, po wprowadzeniu wspomnianego korzonka do płynnego medium, merystem podjął wzrost i systematycznie, przez trzy tygodnie obserwowano w kulturze pojawianie się nowych włośników (Ryc. 3A). Uzyskaną, po rozdzieleniu na 5 drobniejszych fragmentów, biomasa pasażowano w ok. 25-dniowych odstępach czasowych, przez około pięć miesięcy aż do uzyskania materiału roślinnego w ilości wystarczającej do podjęcia dalszych badań biotechnologicznych. Powstające korzonki charakteryzowały się jasnobrązową barwą, a w trakcie trwania cyklu wzrostowego miały tendencję do zawiązywania się w sferyczne skupiska (Ryc. 3B). Pod koniec eksperymentu medium odżywcze pozostawało klarowne i charakteryzowało się nieznacznie jasnobrązowym zabarwieniem. Biomasa inicjalna nie wykazywała niekorzystnych cech, takich jak: nekroza szczytowych części włośników lub spontaniczne zahamowania wzrostu. W kolejnych cyklach doświadczalnych obserwowano jedynie różne tempo przyrostu korzeni, inkubowanych w indywidualnych kolbkach. Nieregularność w zakresie tempa przyrastania korzonków świadczyła o dużej heterogenności wyprowadzonej kultury. Niemniej, uzyskane rezultaty wskazują, że pożywka SH, suplementowana auksyną IBA w stężeniu 1,0 mg L⁻¹, w testowanych warunkach eksperymentalnych, okazała się właściwa do inicjacji korzeni odciętych badanego gatunku. Z uwagi na powyższe

obserwacje, świadczące o braku stresu troficznego wyprawdzonych kultur *in vitro*, dalsze pasażowanie biomas prowadzono w podłożach wzrostowych, identycznych jak opisane powyżej.



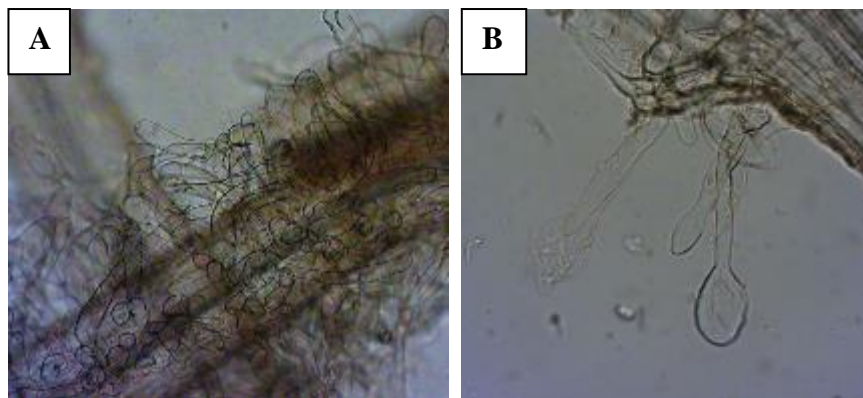
Ryc. 3. Inicjacja kultur korzeni anatomicznych *Salvia apiana* Jeps. w medium SH_{IBA1.0};

A – korzonek inicjalny w ostatnim, 25. dniu pierwszego cyklu wzrostowego; B – biomasa inicjalna w ostatnim dniu trzeciego pasażu; C – biomasa pochodząca z kultury kolekcyjnej w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego.

Po okresie ok. 5 miesięcy, obserwacje makroskopowe korzeni anatomicznych *S. apiana* namnażanych we wspomnianym medium wykazały, że niniejsza kultura osiągnęła znaczną stabilność i mogła być traktowana jako kolekcyjna, będąca stałą pulą tkanek służących do dalszych eksperymentów. Eksplantaty, przenoszone w 3-tygodniowych odstępach czasu, do świeżego podłoża SH_{IBA1.0}, charakteryzowały się pożądaną morfologią, tj. jasnobrązową barwą, obecnością licznych primordiów korzeniowych oraz brakiem tendencji do kalusowania (Ryc. 3C). Obserwacje mikroskopowe otrzymanego materiału roślinnego wykazały, w polu widzenia, obecność wydłużonych i cienkościennych komórek mięksiszowych, charakterystycznych dla strefy włósnikowej, ze sporadycznie pojawiającymi się mechanicznymi włoskami okrywającymi (Ryc. 4). Brak opallescencji w główkach powyższych struktur sugeruje, że nie mają one charakteru tkanki wydzielniczej. Dodatkowo, nie obserwowano w preparacie czerwonego wybarwienia obszaru perydermy, co jest charakterystycznym zjawiskiem, związanym z ekspresją genów *SmDXS2*, *SmCPS1*, *SmKSL1*, *SmCYP76AK1* i *SmCYP71D375* w korzeniach *S. miltiorrhiza* Bunge i wiąże się z produkcją przez te komórki czerwono-pomarańczowych pigmentów diterpenowych (Lin i in., 2022; *European Pharmacopoeia* 11.0, 2023). Powyższe spostrzeżenia mogą wstępnie świadczyć o braku zdolności wyprawdzonej kultury do akumulacji tanszinońców.

Wysoki współczynnik przyrostu, obliczony dla otrzymanej biomasy, w ostatnim, 21. dniu eksperymentu, wyniósł ok. $1070,0 \pm 197,0\%$ co, wraz z obserwowanymi cechami makroskopowymi korzeni, świadczy o korzystnym wpływie na ich kondycję zastosowanego medium wzrostowego. Jednocześnie przedstawione wyniki potwierdzają dane literaturowe dotyczące skuteczności stosowania IBA w pożywkach przeznaczonych do stymulowania ryzogenezy fragmentów inokularnych oraz do dalszego namnażania powstałych biomas korzeniowych innych przedstawicieli rodzaju *Salvia* (Shimomura i in., 1991; Skała i in., 2014; Deepa i Thomas, 2022; Martini i in., 2022).

Wyprowadzone kultury korzeniowe *S. apiana* poddano fitochemicznej analizie jakościowej i ilościowej z uwagi na obecność związków terpenowych i polifenolowych (rozdz. 3.2.3-3.2.3.2). Uzyskany system *in vitro* korzeni odciętych szalwii białej posłużył także jako źródło materiału roślinnego w dalszych, bardziej zaawansowanych badaniach biotechnologicznych (rozdz. 3.1.9.1).



Ryc. 4. Obraz mikroskopowy kultur korzeni odciętych *Salvia apiana*;
A – powiększenie 10-krotne; B – powiększenie 40-krotne.

Podsumowując, w toku przeprowadzonych prac badawczych wykazano, że płynna pożywka SH_{IBA1,0} stanowi medium właściwe dla rozwoju, pobranego z siewki, inicjalnego eksplantatu, jakim jest zdolny do ciągłego wzrostu system korzeniowy. Zastosowanie powyższego podłoża pozwalało wydajnie stymulować ryzogenezę, zarówno na etapie kultur inicjalnych, jak i kolekcyjnych, tj. ustabilizowanych w toku kolejnych pasażów. Ok. 5-miesięczna kultywacja otrzymanych biomas, w wyniku stopniowej, spontanicznej oraz ukierunkowanej dodatkami auksyny zmiany statusu morfotycznego tkanek, pozwoliła wyprowadzić, po raz pierwszy, stabilną, kolekcyjną hodowlę korzeni anatomicznych szalwii białej. Pożyteczne okazało się zastosowanie analizy mikroskopowej tkanek do wstępnej oceny potencjału metabolicznego uzyskanego materiału roślinnego. Stwierdzenie obecności lub braku opalizujących włosków gruczołowych lub czerwonego wybarwienia perydermy, umożliwiło już na wczesnym etapie doświadczeń przewidywać, czy poddana obserwacji biomasa ma zdolność do akumulacji, odpowiednio, olejku eterycznego lub tanszynonów.

Otrzymaną kulturę kolekcyjną korzeni odciętych szalwii białej, rosnącą aktywnie w pożywce SH_{IBA1,0}, przeznaczono do dalszych prac fitochemicznych i biotechnologicznych.

2.2.1.2.2 Wyprowadzenie kultury kolekcyjnej kalusa *S. apiana*

Do wyprowadzenia kultury kalusa *S. apiana* wykorzystano, jako eksplantat inicjalny, część hipokotylową, wyizolowaną ze zmęźniałej siewki, otrzymanej w toku wcześniejszych prac biotechnologicznych (rozdz. 3.1.8.1).

Do badań włączono, analogicznie jak w przypadku stymulacji ryzogenezы, w kulturze inicjalnej korzeni odciętych szalwii białej (rozdz. 2.2.1.2.1), podłożę bogate w składniki mineralne i węglowodany, w tym wypadku medium MS. Ponadto, indukcję kalusa prowadzono poprzez dodatek

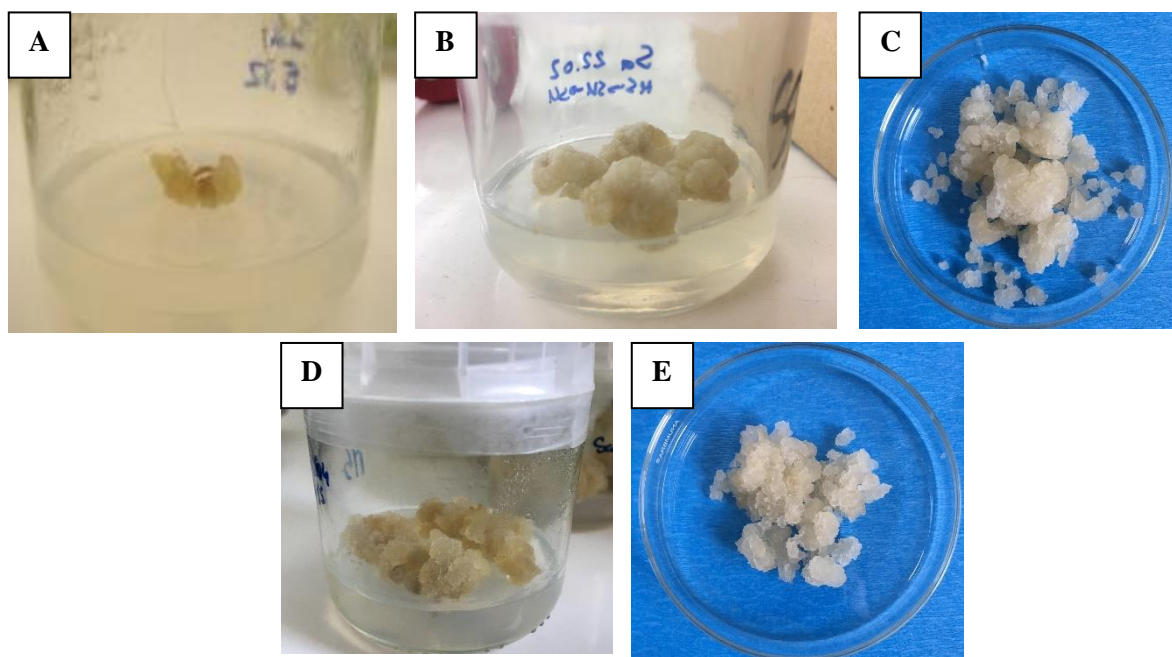
do podstawowej pożywki eksperymentalnej regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin, modyfikując poszczególne fitohormony w zespole zarówno pod względem jakości jak i wzajemnych proporcji, zgodnie ze wskazaniami podanymi w piśmiennictwie (Marchev i in., 2014, Kruglova i in., 2023). Dane literaturowe wskazują, że zarówno rodzaj, jak i stężenie stosowanych do inicjacji kalusa fitohormonów ustalano eksperymentalnie, a także indywidualnie dla każdego z badanych gatunków szalwii (Caruso i in., 2000; Huang i van Staden, 2002; Leelavathi i Kuppan, 2013; Jafari i in., 2017; Grzegorzczak-Karolak i in., 2021). Podczas kwerendy literaturowej w tym zakresie stwierdzono, że modele doświadczalne charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem dotyczącym zarówno stosowanych regulatorów wzrostu, rodzajów podłoża oraz innych czynników wpływających na powstawanie i następnie wzrost tkanki przyrannej, bądź morfogenezę. W efekcie nie można było wyróżnić procedury, która byłaby, w badanym zakresie, skuteczna dla wszystkich lub kilku gatunków z rodzaju *Salvia*. Przykładowo, w przypadku *S. africana-lutea* L., skuteczniej indukowano kalus z wykorzystaniem fragmentów hipokotylowych, aniżeli liścieni oraz pierwotnych liści. Wykazano, że włączenie kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) do pożywki silnie promowało powstawanie tkanki przyrannej, natomiast nie indukowało przypadkowej organogenezy (Makunga i van Staden, 2008). Prowadzenie hodowli kalusa *S. miltiorrhiza* Bunge możliwe było natomiast zarówno na podłożach wzbogaconych o regulatory wzrostu z grupy cytokinin i auksyn, jak i pozbawionych ich dodatku (Dong i in., 2010; Zhao i in., 2010; Marchev i in., 2014). Ze względu na powyższe oraz biorąc pod uwagę doświadczenie własne Promotor w tym zakresie (Łuczkiwicz i Głód, 2003), zdecydowano się na suplementację pożywki MS kinetyną oraz 2,4-D (rozdz. 3.1.8.2.2). Ponadto, posiłkując się danymi literaturowymi, dotyczącymi namnażania kultur szeregu gatunków z rodzaju *Salvia* w warunkach *in vitro*, które świadczyły dodatkowo o stymulującym wpływie światła na produkcję wtórnych metabolitów w tkance przyrannej, zarówno w zakresie olejku eterycznego, jak i nietlonych terpenów (Bassolino i in., 2015; Kozłowska i in., 2022), postanowiono prowadzić eksperymenty przy oświetleniu cyklicznym (rozdz. 3.1.4).

W celu wyprowadzenia kultur kalusa *S. apiana*, odcięto część hipokotylową zmęźniałej siewki i podzielono ją na ok. jednocentymetrowe fragmenty, a otrzymane eksplantaty inicjalne umieszczono horyzontalnie na zestalonej agarze pożywce MS, suplementowanej 0,5 mg L⁻¹ kinetyny oraz 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D (MS_{stand}). Jak już wspomniano, eksperyment prowadzono w warunkach standardowych (rozdz. 3.1.4).

W toku doświadczeń zawartych w niniejszej pracy, w trakcie pierwszego cyklu wzrostowego, trwającego 15 dni, na wspomnianym podłożu, eksplantaty inicjalne podjęły wzrost, a na płaszczyznach ich cięcia obserwowano formowanie się kalusa o jasnobrązowej barwie (Ryc. 5A). W tym czasie nie stwierdzono obecności tkanek objętych nekrozą. Dopiero w trakcie drugiego cyklu wzrostowego, trwającego również ok. 2 tygodni, obserwowano sporadyczne brązowienie peryferyjnych części biomasy. Można przypuszczać, że zjawisko to spowodowane było szokiem mechanicznym związanym z przeniesieniem materiału roślinnego na świeże medium odżywcze. Alternatywnie, rozważano również

stres troficzny, będący efektem nieoptymalizowanej właściwie pożywki. Ze względu na powyższe obserwacje, w kolejnych okresach wzrostu, do badań włączono drugie, bogate medium – SH, suplementowane $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D i $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ kwasu indoliloctowego (IAA) (SH_{stand}), wykorzystywane z sukcesem w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed do namnażania kalusów szeregu roślin wyższych (Łuczkiwicz i Głód, 2003; Kokotkiewicz i in., 2009, 2014).

Dalsze pasażowanie omawianej tkanki przyrannej, prowadzone równoległe na obydwu testowanych podłożach, przez okres ok. 5 miesięcy, pozwoliło uzyskać żywotne biomasy o kremowym kolorze. Kalus kultywowany na pożywce SH_{stand} był bardziej zwarty („kalafiorowaty”; Ryc. 5B), podczas gdy ten otrzymany na medium MS_{stand} miał wygląd bezpostaciowej, histologicznie bezładnej masy (Ryc. 5D). W świetle powyższych obserwacji, wcześniejsze, jak się okazało, przejściowe zmiany nekrotyczne przypisano okresowi inicjacji kultury, a obydwie podłoża uznano za właściwe do dalszej kultywacji kolekcyjnej tkanki przyrannej badanego gatunku.

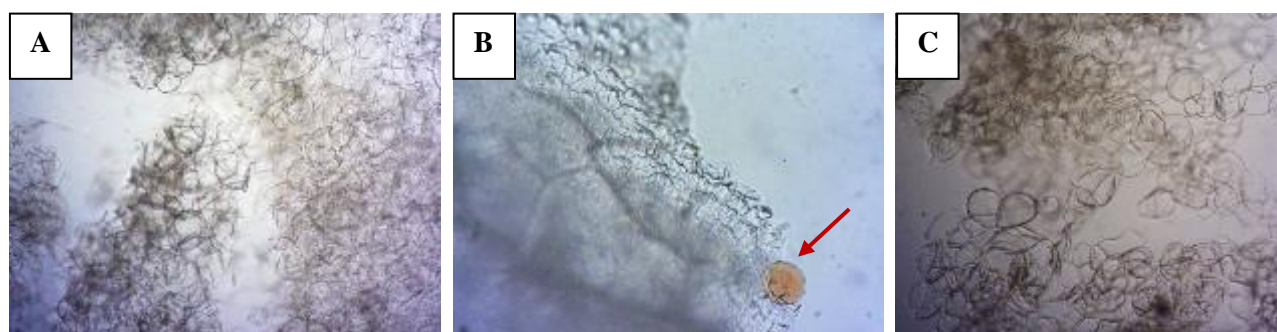


Ryc. 5. Tkanka przyranna *Salvia apiana* Jeps.;

A – inicjalna biomasa kalusa (pierwszy pasaż, na podłożu MS_{stand}); B – kalus w ostatnim dniu trzeciego cyklu wzrostowego, na pożywce SH_{stand}; C – biomasa kalusowa pochodząca z kultury kolekcyjnej (SH_{stand}); D – kalus w ostatnim dniu trzeciego cyklu wzrostowego, na pożywce MS_{stand}; E – biomasa kalusowa pochodząca z kultury kolekcyjnej (MS_{stand}).

Po okresie ok. siedmiu miesięcy od inicjacji, obserwacje makroskopowe obydwu kultur kalusa szalwii białej wykazywały stabilność, zarówno co do wzrostu jak i cech morfologicznych otrzymanej biomasy (Ryc. 5C i 5E). Współczynniki przyrostu dla tkanek przyranych kultywowanych na pożywkach MS_{stand} oraz SH_{stand} w ostatnim, 21. dniu ich cyklu wzrostowego, wynosiły, odpowiednio,

1020,0 ± 211,0% i 920,0 ± 181,0%. Wyprowadzone biomasy charakteryzowały się miękką i luźną konsystencją oraz znacznym stopniem uwodnienia (ok. 98,6%) w całym, 21-dniowym cyklu eksperymentalnym. Nie stwierdzono także dla powyższych kalusów spontanicznych zmian nekrotycznych czy też skłonności do organogenezy. Obserwacje mikroskopowe otrzymanego materiału roślinnego wykazały w kulturze obecność komórek o charakterze parenchymatycznym (Ryc. 6A i 6C). Dodatkowo, w przypadku biomas pasażowanych na podłożu SH_{stand}, w polu widzenia, znaleziono pojedyncze gruczoły typu *Labiatae* oraz włoski mechaniczne o haczykowatym kształcie (Ryc. 6B). Wykształcenie struktur wydzielniczych może sugerować o zdolności otrzymanej kultury do akumulacji olejku eterycznego. W tym miejscu warto zaznaczyć, że możliwość biosyntezy frakcji lotnej przez kalus stwierdzono dla innych gatunków szalwii, takich jak: *S. rosmarinus* Spenn. i *S. dolomitica* Codd. (Boix i in., 2013; Bassolino i in., 2015). Wysokie tempo przyrostu oraz juwenilność biomas, świadczą o korzystnym wpływie obydwu zastosowanych mediów odżywczych na kondycję powyższych kultur.



Ryc. 6. Obraz mikroskopowy tkanki przyrannej *Salvia apiana* (powiększenie 10. krotne);

A – kalus pasażowany na pożywce SH_{stand}; B – nieznacznie zróżnicowany kalus (medium SH_{stand}) z wykształconymi włoskami gruczołowymi typu *Labiatae* (czerwona strzałka); C – biomasa kalusa pasażowanego na pożywce MS_{stand}.

Podsumowując, fragmenty hipokotylowe siewki *S. apiana*, w testowanych warunkach eksperymentalnych, stanowiły właściwy materiał inicjalny do otrzymania tkanki przyrannej badanego gatunku. Powstałe biomasy wykazały szeroką tolerancję względem podłoża, tj. możliwe było ich namnażanie na pożywkach z różną kombinacją makro- i mikroelementów (MS, SH), suplementowanych samymi auksynami (2,4-D i IAA), jak i kompozycją fitohormonów złożoną z auksyny (2,4-D) i cytokininy (kinetyna). Powyższe warunki wzrostu były odpowiednie zarówno dla kultury na etapie inicjacji, jak i hodowli ciągłej tkanki przyrannej (biomasa kolekcyjna). Kultywacja kalusów, prowadzona w czasie ok. siedmiu miesięcy, w wyniku stopniowego uzależnienia się biomas od egzogennych fitohormonów, pozwoliła otrzymać, po raz pierwszy, dwie kolekcyjne kultury kalusa *S. apiana*. Otrzymane tkanki przyranne złożone były z niezróżnicowanych komórek o charakterze parenchymatycznym. Jedynie, zastosowanie 2,4-D i IAA (medium SH_{stand}) skutkowało sporadycznie występującej cytodyferencjacji.

Otrzymane kalusy *S. apiana* poddano fitochemicznej analizie jakościowej oraz ilościowej na obecność związków terpenowych i polifenolowych (rozdz. 3.1.8.4). Wyprowadzone kultury posłużyły także jako źródło materiału roślinnego w dalszych badaniach biotechnologicznych prowadzonych w skali laboratoryjnej.

2.2.1.2.2.1 Otrzymanie kultur zawieszinowych *S. apiana*

Otrzymałą, w toku wstępnych badań, stabilną kulturę kalusa szałwii białej, namnażaną na zestalonym agarze podłożu MS_{stand}, ze względu na żywotność oraz pożądane cechy anatomiczne (niezróżnicowane komórki o charakterze parenchymatycznym) i morfologiczne (miękką, luźną konsystencją), uznano za odpowiednią do wyprowadzenia zawiesziny. Na opisywanym etapie prac doświadczalnych zamierzano opracować warunki do jej ciągłego wzrostu, po uprzedniej optymalizacji metody rozpraszania kalusa w medium, tak aby można było uzyskać homogenną zawiesinę, z przeznaczeniem do dalszych prac biotechnologicznych.

Powyższe zadanie badawcze umotywowane było wcześniej prowadzonymi eksperymentami nad kulturami *in vitro* innych gatunków z rodzaju *Salvia*. Wykazano, że zawiesziny komórkowe powyższych roślin są zdolne do produkcji związków terpenowych (tanshinony) oraz polifenolowych (kwas rozmarynowy), a zawartości niniejszych metabolitów wtórnych mogą osiągać poziomy właściwe roślinom gruntowym (Wu i in., 2003; Krajewska-Patan i in., 2007; Wu i in., 2016). Szczególną uwagę zwrócono również na możliwości technologiczne adaptacji tego rodzaju kultur do wzrostu w większej skali, w bioreaktorach, w tym komercyjnych, przeznaczonych do standardowego namnażania drobnoustrojów (Marchev i in., 2014; Marchev i in., 2020; Wawrosch i Zotchev, 2021).

W tym celu kalus, pochodzący z ostatniego, 21. dnia cyklu wzrostowego na medium MS_{stand} (biomasa mniej zwarta), umieszczono w niewielkiej ilości płynnej pożywki o tożsamym składzie i rozpraszano mechanicznie, z wykorzystaniem takich narzędzi jak: szklany pistel oraz pęseta. Kultury inicjalne prowadzono w świetle, na wytrząsarce orbitalnej (rozdz. 3.1.8.2.3).

Pierwszy okres kultury, obejmujący ok. 3 tygodnie (3 pasaży), w którym gęstniejącą zawiesinę rozcieńczano świeżym podłożem i rozlewano, w równych ilościach, do dwóch kolejnych kolb, wykazał względną stabilność otrzymanych biomas (obserwacje makroskopowe). Uzyskana zawieszina charakteryzowała się jasnobrązową barwą i stopniowo się zagęszczała. Niestety stwierdzono w niej szereg skupisk wielokomórkowych, nierozpadających się na drobniejsze agregaty. Z czasem zmieniały one zabarwienie z jasnobrązowego na szary. Świadczyło to o postępującej nekrozie i wynikało najprawdopodobniej z utrudnionego dostępu poszczególnych komórek do składników odżywczych. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że próby wtórnego, mechanicznego rozpraszania powstających agregatów były nieskuteczne i nie przyczyniały się do poprawy żywotności otrzymanej zawiesziny.

Dalsze pasażowanie komórek, prowadzone przez ok. miesiąc, bez względu na podjęte zabiegi mechanicznego rozbijania powstających skupisk komórkowych, prowadziło do obumarcia całej

biomasy. Nasilone zjawisko agregacji, stwarzające trudności w podtrzymaniu prawidłowej kondycji zawiesziny, zostało udokumentowane również dla innych gatunków szalwii (Marchev i in., 2014). W świetle powyższych obserwacji oraz danych literaturowych, stwierdzono, że w zastosowanych warunkach nie było możliwe otrzymanie stabilnej kultury zawieszinowej *S. apiana*. W efekcie, z uwagi na ograniczony czas trwania projektu oraz mało interesujący profil metaboliczny kalusa szalwii białej (rozd. 2.3), zaniechano dalszych prac w tym zakresie.

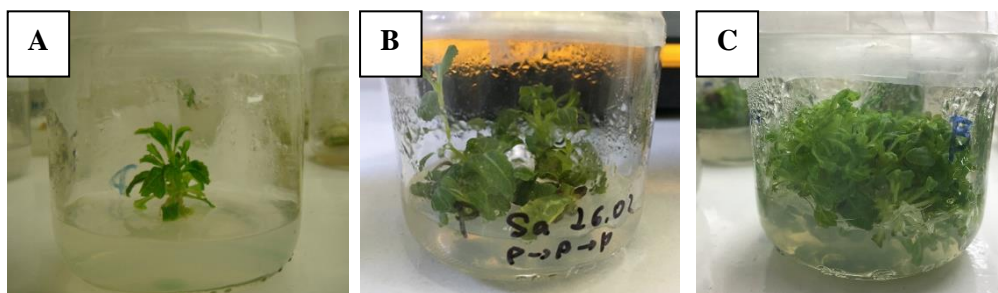
2.2.1.2.3 Wyprowadzenie kultury kolekcyjnej mikropędów *S. apiana*

Zgodnie z założeniami pracy, ostatnim typem wyprowadzonych, nietransformowanych kultur *in vitro* szalwii białej były mikropędy.

Analogicznie jak w przypadku hodowli korzeni anatomicznych oraz kalusa (rozd. 2.2.1.2.1-2.2.1.2.2), w opisywanych eksperymentach zastosowano pożywkę bogatą w składniki mineralne oraz organiczne, tj. medium SH. Dobór fitohormonów w podłożu podyktowany był natomiast zarówno zamiarem otrzymania pędów o pożądanej morfologii, zbliżonej do rośliny gruntowej, jak i chęcią przełamania silnej dominacji wierzchołkowej, charakterystycznej dla rodzaju *Salvia* (Cuenca i Amo-Marco, 2000; Gostin, 2008; Grzegorzczak-Karolak i in., 2021). W pracach doświadczalnych nad innymi szalwiami korzystano z cytokinin purynowych, takich jak: 6-benzyloaminopuryna (BAP), N-benzylotetrahydropiranyloadenina (BPA), rybozyd benzyloaminopuryny (rBAP) i *meta*-Topolin (mT) oraz z pochodnych mocznika, w tym z tidiazuronu (TDZ), który niekiedy powodował negatywne zmiany w morfologii primordiów pędowych (szklistość, zrastanie) wynikające z indywidualnej reakcji mikroroślinek na zastosowany fitohormon (Hosoki i Tahara, 1993; Ghanbar i in., 2016; Tsai i in., 2016; Erişen i in., 2020; Grzegorzczak-Karolak, Hnatuszko-Konka i in., 2020, Grzegorzczak-Karolak i in., 2021; Jan i in., 2023).

Ze względu na powyższe oraz z uwagi na doświadczenie własne Promotor w mikrorozmnażaniu roślin z rodziny Lamiaceae (Luczkiewicz i in., 2015), do opisywanego eksperymentu włączono pożywkę zawierającą dwie cytokininy: pochodną mocznika (TDZ) oraz adeniny (N^6 -(2-izopentenylo)-adenina – 2iP). Część szczytową hipokotylu pochodzącego ze zmężniałej siewki, z której wywodziły się również eksplantaty inicjalne wykorzystane do założenia kultury korzeni anatomicznych i kalusa *S. apiana*, umieszczono na zestalonej agarowo pożywkę SH, suplementowanej 2,0 mg L⁻¹ 2iP oraz 0,22 mg L⁻¹ TDZ (SH_P). Doświadczenia prowadzono w warunkach standardowych, przy oświetleniu okresowym (rozd. 3.1.4).

Po wyłożeniu na powyższe medium szczytowej części hipokotylu, eksplantat inicjalny podjął natychmiastowy wzrost. Obserwowano stopniowe wykształcanie się liści właściwych o budowie zbliżonej do pochodzących z rośliny gruntowej. W trakcie pierwszego cyklu wzrostowego, trwającego 34 dni, pojedyncze liście przekształciły się w dobrze rozwinięte pączki szczytowe, które następnie rozkrzewiły się, tworząc kępki mikropędów. Eksplantat nie wykazywał cech szklistości i miał żywo zielony kolor (Ryc. 7A).



Ryc. 7. Kultura mikropędów *Salvia apiana* Jeps.;

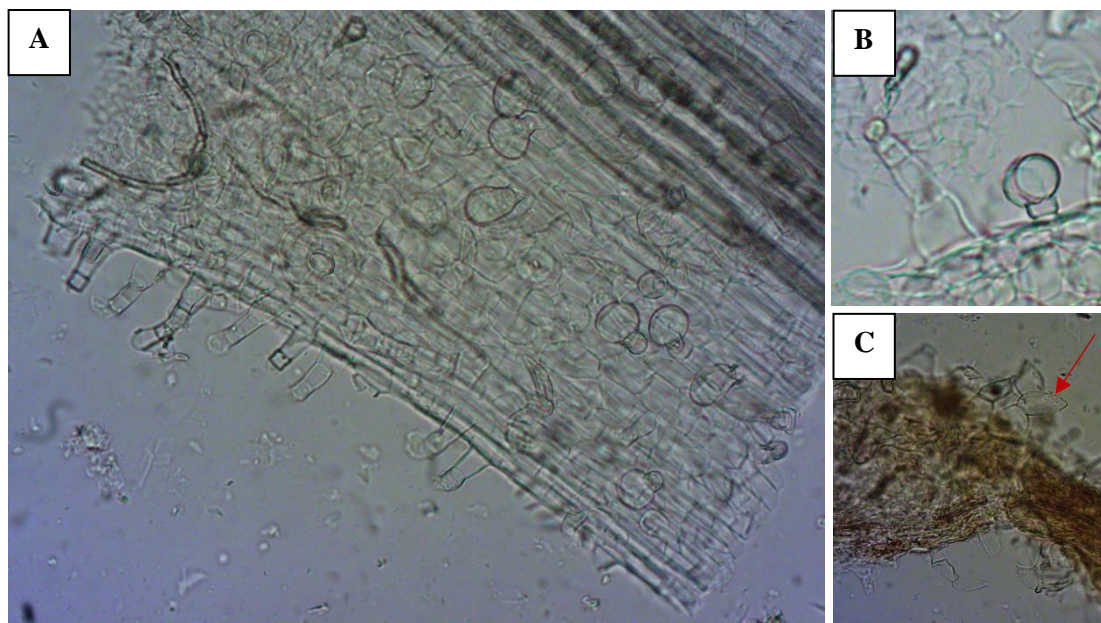
A – 20. dzień pierwszego pasażu (SH_P); B – ostatni dzień trzeciego, 28-dniowego pasażu (SH_P); C – ostatni, 21. dzień pasażu na pożywce SH_B (kultura kolekcyjna).

Dalsze dwa pasáže (każdy trwający ok. 28 dni), ujawniły nieznaczną skłonność biomasy do tworzenia liści potwornych. Gdziekolwiek, mikropędy charakteryzowały się także nasiloną wityfikacją oraz obecnością kalusa u podstawy kultury (Ryc. 7B). Niekorzystne zmiany morfologiczne mogły być związane z wpływem TDZ na kondycję eksplantatów, co jest dobrze udokumentowane w dostępnej literaturze (Grzegorzczuk i Wysokińska, 2004; Skała i in., 2007; Petrova i in., 2015). Mogły one mieć również charakter przejściowy i wynikać z wczesnego etapu inicjacji kultury (wpływ endogennych fitohormonów). Problemy w fazie adaptacji mikropędów, manifestujące się sporadyczną nekrozą i zaburzoną gospodarką wodną eksplantatów, opisano również dla *S. officinalis* (Avato i in., 2005). Ze względu na powyższe, dalsze namnażanie badanych biomas prowadzono zarówno na opisywanym powyżej podłożu, biorąc pod uwagę przejściową niestabilność kultury, jak i na dwóch dodatkowych mediach, zróżnicowanych zarówno na poziomie podstawowego składu mikro- i makroelementów, jak i ze względu na rodzaj użytych regulatorów wzrostu. Zgodnie z powyższym, do badań włączono pożywkę MS, suplementowaną 3,0 mg L⁻¹ 2iP, 1,0 mg L⁻¹ BAP, 0,3 mg L⁻¹ kwasu naftylo-1-octowego (NAA) i 73,0 mg L⁻¹ jednowodnego siarczanu adeniny (podłoże ML) oraz medium SH, z dodatkiem 0,22 mg L⁻¹ TDZ i 2,0 mg L⁻¹ BAP (SH_B). Eksperymenty prowadzone na innych gatunkach szalwii wskazują, że cytokinina BAP, wykorzystana w obu wybranych podłożach, skutecznie stymulowała powstawanie primordiów pędowych w kulturach *in vitro* takich gatunków jak: *S. officinalis* L. (Avato i in., 2005; Luwańska i in., 2013; Petrova i in., 2015), *S. fruticosa* Mill. (Arikat i in., 2004), *S. dorystoechas* B.T. Drew (Erdag i in., 2010), *S. canariensis* L. (Mederos-Molina, 2004), *S. sclarea* L. (Erişen i in., 2020) oraz *S. splendens* Sellow ex Nees (Yu i in., 2015) i tylko sporadycznie przyczyniała się do nasilenia wityfikacji mikroroślinek (Hosoki i Tahara, 1993; Cuenca i Amo-Marco, 2000; Gostin, 2008; Echeverrigaray i in., 2010).

Dalsze pasażowanie kępek pędów *S. apiana* na powyższych pożywkach, prowadzone przez okres ok. 6 miesięcy, umożliwiło uzyskanie stabilnych i homogennych kultur mikropędów jedynie w przypadku podłoża SH_B (Ryc. 7C). Współczynnik przyrostu (Gi) biomas, w 21. dniu cyklu wzrostowego wynosił 580,0 ± 79,0%, co jest wartością zadowalającą dla lekkich i delikatnych mikropędów (Jesionek, Łuczkiwicz, i in., 2019). Na pozostałych pożywkach biomasa roślinna

charakteryzowała się dużą chimerycznością, utrzymującą się w kolejnych okresach wzrostu. Obserwowano także regularnie nasilające się tendencje eksplantatów do nekrozy oraz skłonność do tworzenia liści potwornych. Również współczynniki przyrostu mikropędów na pożywkach ML i SH_P były znacznie niższe (odpowiednio: $280,0 \pm 90,0\%$ i $348,0 \pm 85,0\%$). Wyniki opisanych eksperymentów, zdają się wskazywać na korzystny, synergistyczny efekt BAP i TDZ w zakresie indukcji pędów, dotyczący także ich późniejszego wzrostu i rozkrzewiania (kultura kolekcyjna). Skuteczność stymulacji rozwoju primordiów pędowych za pomocą kombinacji tych dwóch regulatorów wzrostu opisano także dla *Salvia x jamensis* J. Compton (Fraternale i in., 2013). Ze względu na powyższe, dalsze pasażowanie mikropędów szałwii białej, prowadzono jedynie na podłożu SH_B.

Mikropędy *S. apiana*, pochodzące z kultury kolekcyjnej (pożywka SH_B), charakteryzowały się żywo zieloną barwą, a ich morfologia była zbliżona do rośliny macierzystej. Biomasa wydzieliała, zwłaszcza po roztarciu, charakterystyczny, eukaliptusowy zapach, co wstępnie świadczyło o zachowaniu zdolności kultury do biosyntezy frakcji lotnej. Obecność struktur wydzielniczych potwierdziły również obserwacje mikroskopowe. Na powierzchni liści, w skórcie, zaobserwowano gruczoły typu *Labiatae*, składające się z ośmiu komórek gruczołowych i zbiornika olejowego, utworzonego pod powierzchnią kutykuli, oraz włoski z kilkukomórkowym trzonkiem, zakończone jednokomórkową, jajowatą główką (Ryc. 8A). Szczytowa komórka, w pierwszej z opisanych powyżej struktur, pełni funkcję gruczołu wydzielającego związki lotne, a obecność olejku eterycznego widoczna jest jako opalizujące wypełnienie. Na powierzchni skórki zaobserwowano również włoski okrywowe z jednokomórkowym trzonkiem oraz dwukomórkową główką (Ryc. 8B). Poza występującymi strukturami wydzielniczymi, w skórcie obecne były także włoski mechaniczne o jedno- lub dwukomórkowym trzonku i ostro zakończonej, pochylonej główce z brodawkowatym naskórkiem (Ryc. 8C). Powyższe obserwacje wskazują wstępnie na zachowanie, przez otrzymaną kulturę tkankową szałwii białej, zdolności do biosyntezy frakcji lotnej. Wykształcenie przez biomasy *in vitro* szałwii struktur anatomicznych, odpowiedzialnych za produkcję i magazynowanie olejku eterycznego, zostało potwierdzone również dla takich gatunków jak: *S. rosmarinus* Spenn. i *S. officinalis* (Avato i in., 2005; Boix i in., 2013).



Ryc. 8. Obraz mikroskopowy mikropędów *Salvia apiana*;
A – powiększenie 10-krotne; B, C – powiększenie 40-krotne.

Reasumując, przeprowadzone prace doświadczalne wykazały, że pożywka SH, suplementowana $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ oraz $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP (SH_B), stanowi odpowiednie medium do rozwoju eksplantatu inicjalnego, jakim jest szczytowa część hipokotyli siewki szałwii białej. Ogólnie, właściwa morfologia otrzymanych mikropędów tożsama z rośliną macierzystą oraz zdolność biomasy do odtwarzania primordiów pędowych na etapie zarówno kultur inicjalnych, jak i kolekcyjnych jest również bezpośrednią konsekwencją zastosowania w bogatym medium SH dodatku dwóch wspomnianych cytokin (TDZ oraz BAP). Ok. 6-miesięczna kultywacja otrzymanych biomas, połączona z selekcją najbardziej juwenilnych struktur, w wyniku stopniowej zmiany statusu morfotycznego mikroroślinek (zanik obecności tkanki przyrannej), pozwoliła na wyprowadzenie kolekcyjnej hodowli mikropędów szałwii białej. W efekcie, otrzymano stabilne źródło materiału roślinnego do dalszych prac fitochemicznych i biotechnologicznych.

2.2.1.3 Potwierdzenie tożsamości gatunkowej kultur nietransformowanych *S. apiana*

Ze względu na endemiczny charakter badanej rośliny, w ramach prowadzonych prac eksperymentalnych, potwierdzono również tożsamość gatunkową wyprowadzonych, w warunkach *in vitro*, nietransformowanych biomas szałwii białej. W tym celu wykonano analizę sekwencji regionów ITS1 oraz ITS2 jądrowego rDNA, genu *matK* i DNA chloroplastowego *trnL – trnF* biomas inicjalnych, a następnie porównano uzyskane wyniki z bazą GenBank. Powyższe badanie zostało przeprowadzone we współpracy z Katedrą Genetyki Ewolucyjnej i Biosystematyki Uniwersytetu Gdańskiego.

Pochodzenie testowanego materiału roślinnego określono poprzez scharakteryzowanie fragmentów DNA zlokalizowanych zarówno w jądrze komórkowym (np. ITS1, ITS2), jak i chloroplastie (*trnL*, *matK*). Wykazano podobieństwo sekwencji, na poziomie 99,19% (identyczność

nukleotydów 611/616 z wyszukiwania BLAST), do całej rośliny (nr dostępu Gen-Bank KP852768.1) oraz 99,03% podobieństwa (610/616) do innych okazów *S. apiana* (KX147526.1, KP852780.1, KP852777.1, KP852774.1, KP852773.1, KP852772.1, KP852771.1, KP852770.1, KP852769.1, KP852767.1). Zaobserwowane różnice wynikają z heterogeniczności w obrębie regionu ITS, co związane jest z polimorfizmem występującym w obrębie testowanego gatunku. Z kolei porównanie sekwencji z dwóch markerów, z genomu plastydu (*trnL-trnF* i *matK*), w badanym materiale roślinnym, wykazało 100% podobieństwo do *S. apiana* JBW 3202 (nr dostępu KP85289 i KP852718, odpowiednio dla powyższych markerów).

Tym samym przeprowadzona analiza potwierdziła tożsamość taksonomiczną materiału roślinnego *in vitro*, otrzymanego z siewki *S. apiana* Jeps.

Podsumowując dotychczas opisane prace biotechnologiczne, na potrzeby prezentowanego projektu doktoranckiego uzyskano, po raz pierwszy, stabilne i zdolne do ciągłego wzrostu biomasy szalwii białej o różnym stopniu cytodyferencjacji: korzenie odcięte, dwie kultury kalusa oraz mikropędy. Wyprowadzone hodowle, o charakterze biomas nietransformowanych, zostały otrzymane na drodze sterowania procesem morfogenezy we fragmentach pochodzących z jednej siewki badanego gatunku, co wiąże się ze znaczną jednorodnością genetyczną poszczególnych typów kultur i sprzyja ich długoterminowej stabilności (Malepszy, 2012). Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na złożoność procesów regulujących organogenezę w kulturach *in vitro* *S. apiana*. Aby wyciągnąć szersze wnioski, szczególnie na temat wpływu regulatorów wzrostu oraz innych składników pożywek na proces morfogenezy w szalwii białej, należałoby rozszerzyć prezentowane doświadczenie, co może stanowić odrębny temat kolejnego projektu. Uzyskane biomasy *in vitro* przeznaczono do dalszych badań biotechnologicznych oraz analiz fitochemicznych.

2.2.2 Otrzymanie kultur kolekcyjnych korzeni transformowanych *S. apiana*

Zgodnie z założeniami pracy, obok dotychczas opisywanych biomas szalwii białej o charakterze kultur nietransformowanych (rozdz. 2.2.1), do badań biotechnologicznych postanowiono włączyć również próby wyprowadzenia korzeni transgenicznych badanego gatunku.

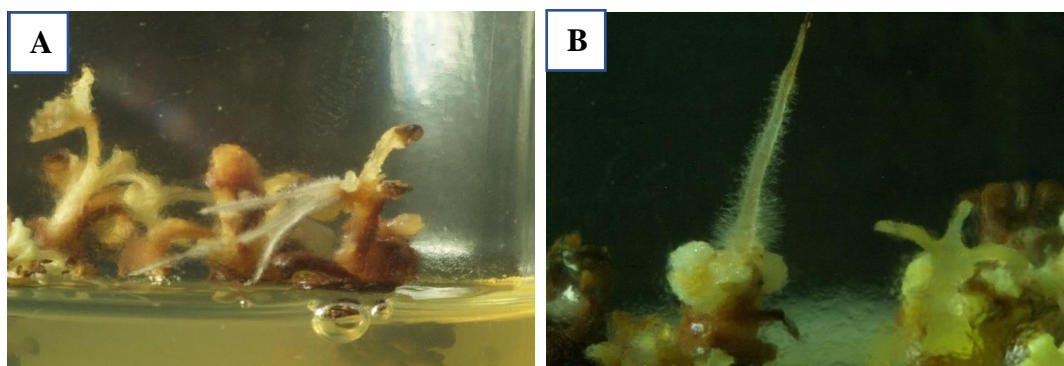
Wśród różnych systemów roślinnych stosowanych do otrzymywania metabolitów wtórnych, charakterystycznych dla rodzaju *Salvia*, znajdują się również kultury korzeni włośnikowatych (Zhi i Alfermann, 1993; Kuźma i in., 2006, 2008; Kentsop i in., 2021). Dokonanie zmian na poziomie genomu roślin, przeprowadzone w wyniku transformacji wektorem bakteryjnym *Agrobacterium rhizogenes*, może regulować endogenną biosyntezę regulatorów wzrostu, wpływać na metabolizm wtórny i przyczyniać się do poprawy parametrów wzrostowych oraz produktywności biomas *in vitro*. Ponadto, kultury korzeni włośnikowatych wyróżnia spośród innych modeli roślinnych wysoka

stabilność, niskie koszty wytwarzania oraz łatwość skalowania produkcji materiału biologicznego (Georgiev i in., 2007; Mishra i Ranjan, 2008; Pistelli i in., 2010; Kowalczyk i in., 2016).

Ze względu na powyższe, podjęto próbę otrzymania korzeni transformowanych szaławii białej, wykorzystując do tego agropinowe szczepy *A. rhizogenes* – A4, 15834 oraz LBA9402. Zastosowanie powyższych bakterii, cechujących się wysokim stopniem wirulencji, pozwala zwiększyć szansę na powodzenie transformacji z udziałem wektora bakteryjnego (Kowalczyk i in., 2016). Eksplantaty inicjalne, wykorzystane w opisywanym doświadczeniu, stanowiły fragmenty liści i odcinki łodyg mikropędów *in vitro* szaławii białej, wyprowadzonych w toku wcześniejszych prac biotechnologicznych (rozdz. 2.2.1.2.3).

W eksperymentach izolowano z mikroroślinek fragmenty blaszki liściowej oraz odcinki pędów, a następnie, poprzez zadrapanie powierzchni eksplantatów lub nakłuwanie tkanki roślinnej igłą zanurzoną w stacjonarnej kulturze bakteryjnej, zainfekowano je drobnoustrojami transformującymi. Kokultywację powyższego materiału prowadzono na podłożu SH₀ w ciemności (2 dni). W kolejnym etapie opisywanych doświadczeń, zakażone eksplantaty przeniesiono do pożywki SH₀ z dodatkiem antybiotyków (karbenicylina 0,5 mg L⁻¹ i cefotaksym 0,5 mg L⁻¹). Część matryc roślinnych, szczególnie przerośniętych bakteriami transformującymi, usuwano w trakcie przenoszenia kokultur do świeżego medium. Otrzymane biomasy pasażowano, w powyższej pożywce, w odstępach ok. 7-dniowych.

Po ok. 20 dniach od zainfekowania tkanek szaławii białej, na eksplantatach zakażonych szczepami A4 oraz LBA9402, zaobserwowano pojawienie się, w miejscu uprzedniego zadrapania zakażoną bakteriami transformującymi igłą, drobnych wiązek korzeni (Ryc. 9). Niewielka ilość korzonków, w szczytowych częściach, wykazywała zmiany nekrotyczne. Jednocześnie, równoległe do obserwowanego procesu ryzogenezy, w miejscu zranienia, na materiale roślinnym stwierdzono rozrastanie się kalusa o jasnobrązowym zabarwieniu i miękkiej konsystencji. W przypadku eksplantatów zakażonych szczepem 15834 nie stwierdzono obecności korzeni, a dalsze ich pasażowanie, na medium SH₀, w obecności wyżej opisanych antybiotyków, prowadziło do obumarcia materiału roślinnego.



Ryc. 9. Wiązki korzeni na eksplantatach inicjalnych *S. apiana*, powstałe w wyniku infekcji materiału roślinnego bakteriami *A. rhizogenes* (metoda nanoszenia powierzchniowego);

A – infekcja szczepem A4; B – infekcja szczepem LBA9402.

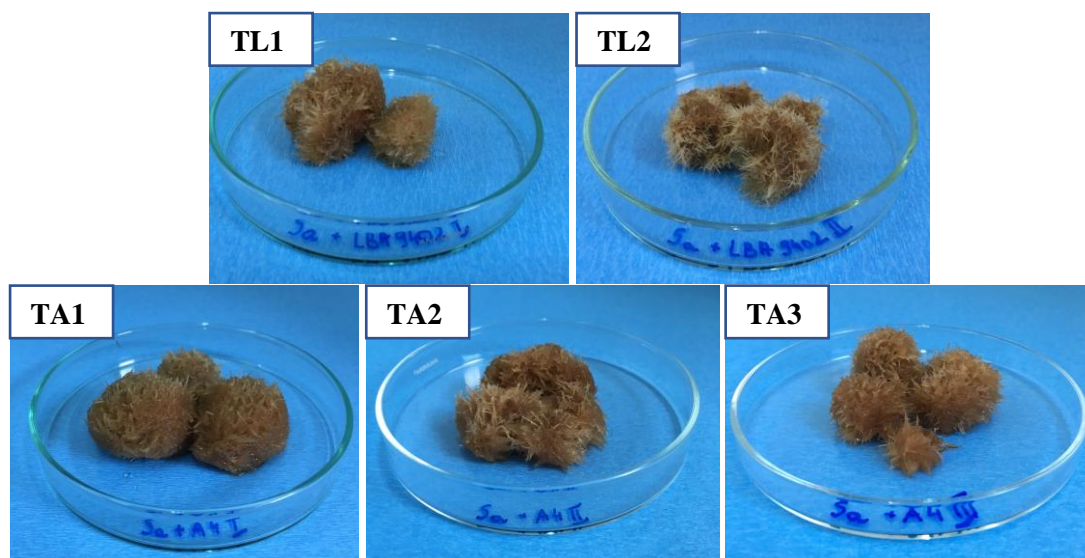
Z grupy licznych, drobnych korzeni, obecnych na powierzchni eksplantatów zainfekowanych szczepem A4 (późniejsze klony TA1-3), wyizolowano trzy wydłużone struktury primordialne, oraz dwa korzonki, powstałe w wyniku zakażenia fragmentów mikropędowych szczepem LBA9402 (TL1-2). Transformanty charakteryzowały się białą barwą włóśników, świadcząca o znacznej żywotności. Umieszczono je w płynnej pożywce SH₀, suplementowanej wyżej opisywanymi antybiotykami.

Dalsze pasażowanie matryc roślinnych, prowadzone przez okres ok. 3 miesięcy, nie ujawniło obecności bakterii transformujących w kulturze, manifestującej się jako zmętnienie pożywki. Tym samym wnioskowano, że namnażanie otrzymanych klonów TA1-3 oraz TL1-2, w medium wzbogaconym o antybiotyki (karbenicylina 0,5 mg L⁻¹ i cefotaksym 0,5 mg L⁻¹), pozwoliło na całkowite usunięcie bakterii transformujących z kokultury. Potwierdzenie powyższego faktu na poziomie badań molekularnych (reakcja łańcuchowa polimerazy – PCR) przeprowadzono na późniejszym etapie prac badawczych. W danym momencie natomiast, opierając się jedynie na opisywanych obserwacjach makroskopowych, dalszą kultywację korzonków zdecydowano się prowadzić w podłożu SH₀ bez dodatku antybiotyków. W tym miejscu należy zaznaczyć, że po rezygnacji z powyższych czynników selekcyjnych w medium wzrostowym, kondycja wszystkich linii klonalnych uległa poprawie, tj. nastąpiła redukcja zmian nekrotycznych w korzonkach, które charakteryzowały się znacznie większą dynamiką przyrostu w trakcie trwania cyklu wzrostowego. Poczynione obserwacje wskazują na ograniczoną tolerancję komórek roślinnych szalwii białej wobec zastosowanych antybiotyków.

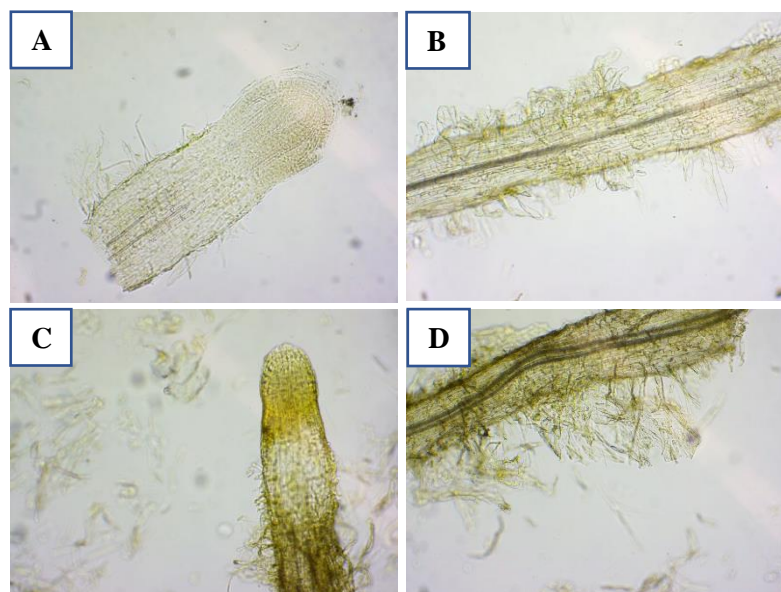
Otrzymane jałowe klony, pasażowane w systemie ciągłym, bez względu na rodzaj zastosowanego do transformacji szczepu bakteryjnego, nie różniły się między sobą morfologią. Zachowały również, typową dla kultur korzeni odciętych badanego gatunku, skłonność do zawiązywania zwartych, kulistych matryc. Wspomniane klony, w porównaniu z organami anatomicznymi charakteryzowały się nieznacznie krótszymi korzeniami i większą liczbą odgałęzień bocznych (Ryc. 10). Ponadto, wyprowadzone transformanty posiadały cechy typowe dla korzeni włóśnikowatych, takie jak: ujemny geotropizm oraz zdolność do wzrostu w podłożu pozbawionym regulatorów wzrostu (SH₀). Pasażowanie opisywanych biomas prowadzono w odstępach ok. 3,5 tygodniowych, tzn. nieznacznie dłuższych w porównaniu do korzeni odciętych (21 dni). Obserwacje mikroskopowe otrzymanego materiału roślinnego wykazały, w polu widzenia, liczne fragmenty korzeni zakończonych kopulasto zaokrąglonymi wierzchołkami wzrostu (transformant TA1 – Ryc. 11A oraz klon TL1 – 11C), a także obecność, poniżej tkanek o charakterze merystemów, wydłużonych i cienkościennych komórek mięksiszowych, charakterystycznych dla strefy włóśnikowej (Ryc. 11 B oraz 11D). W trakcie trwania cyklu wzrostowego biomasy korzeni transgenicznych silnie przyrastały, co pozwalało traktować powyższe kultury jako cenny materiał roślinny do dalszych prac biotechnologicznych nad uzyskaniem wysokowydajnego, roślinnego systemu *in vitro* z przeznaczeniem do produkcji metabolitów wtórnych występujących w rodzaju *Salvia*. Współczynniki przyrostu Gi hodowli TA1-3, w 25. dniu cyklu wzrostowego, wynosiły, odpowiednio: 1002,0 ± 179,0%, 925,9 ± 103,3% oraz 906,8 ± 188,6%, zaś w przypadku klonów TL1-2 – 1020,3 ± 155,0% oraz 997,9 ± 87,6%.

Na danym etapie prac eksperymentalnych potwierdzono transgeniczny charakter otrzymanych korzeni szalwii białej stosując metodę PCR ze starterami: *rolB*, *rolC* oraz *virG*. Powyższe analizy zostały zrealizowane w ramach współpracy z dr hab. inż. Aleksandrą Królicką, prof. UG (Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed). Badania przeprowadzono na dwóch wybranych liniach korzeniowych: TL1 oraz TA2. Próbę kontrolną stanowiły, pochodzące z kultury ciągłej, korzenie odcięte. Wyniki reakcji PCR, wykonanej dla testowanych korzeni szalwii białej, przedstawiono na Ryc. 12 i 13.

Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR wykazał obecność onkogenów *rolB* i *rolC*, tym samym potwierdzając ich trwałą integrację z DNA badanych matryc roślinnych. Ekspresja powyższych genów jest istotna dla fenotypu powstałych korzeni i wiąże się z podwyższeniem wrażliwości tkanek roślinnych na auksyny i cytokiny (Wysokińska, 2000a, 2000b; Kowalczyk i in., 2016). Przeprowadzone analizy nie ujawniły natomiast, w testowanych liniach korzeniowych, obecności onkogeny *virC*, tym samym potwierdzając trwałą eliminację bakterii transformujących z wyprowadzonych kultur TA i TL. Ponadto, w przypadku linii korzeni TL, stwierdzono włączenie do genomu roślinnego genów odpowiedzialnych za syntezę opiu (fragmenty *ags*) oraz genów *Tr*. Uzyskane rezultaty potwierdzają przeprowadzone do tej pory i opisane w literaturze doświadczenia, zgodnie z którymi gatunki z rodzaju *Salvia* są podatne na transformację z wykorzystaniem szczepów LBA9402 oraz A4 (Wang i Wu, 2010; Wojciechowska i in., 2020). Udaną transfekcję opisano także dla szczepu 15834 (Chen i in., 2001; Wang i Wu, 2010; Li i in., 2016), jednakże nie zostało to osiągnięte w ramach prezentowanej pracy doktorskiej. Niepowodzenie w tym zakresie może wiązać się z opornością względem transformacji będącą indywidualną cechą badanego gatunku (Malepszy, 2012, Wasilewska i Królicka, 2005).

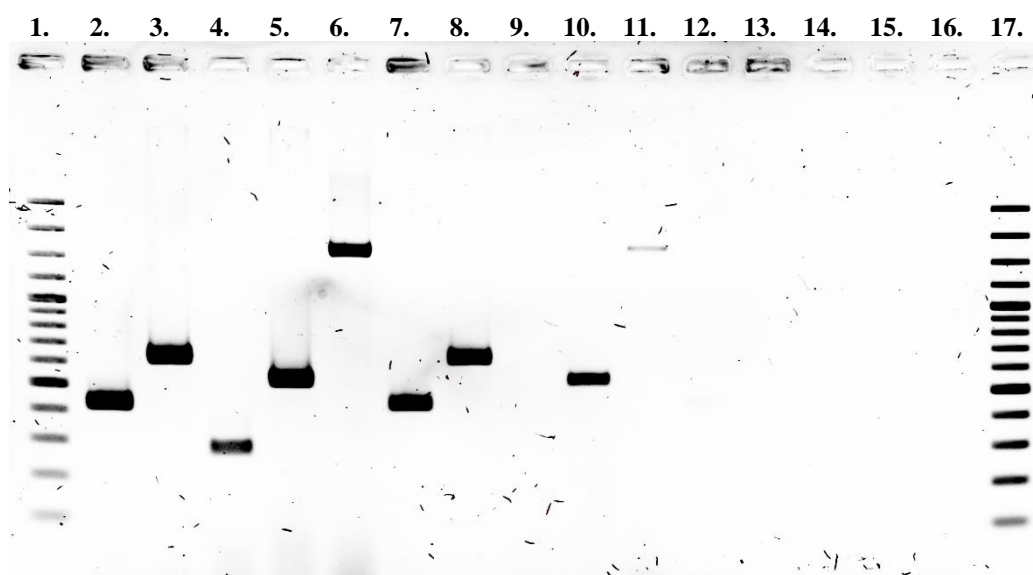


Ryc. 10. Biomasy korzeni transformowanych *Salvia apiana*, uzyskane po infekcji fragmentów pędów *in vitro* bakteriami *A. rhizogenes*: szczepy LBA9402 (TL1-2) oraz A4 (TA1-3).

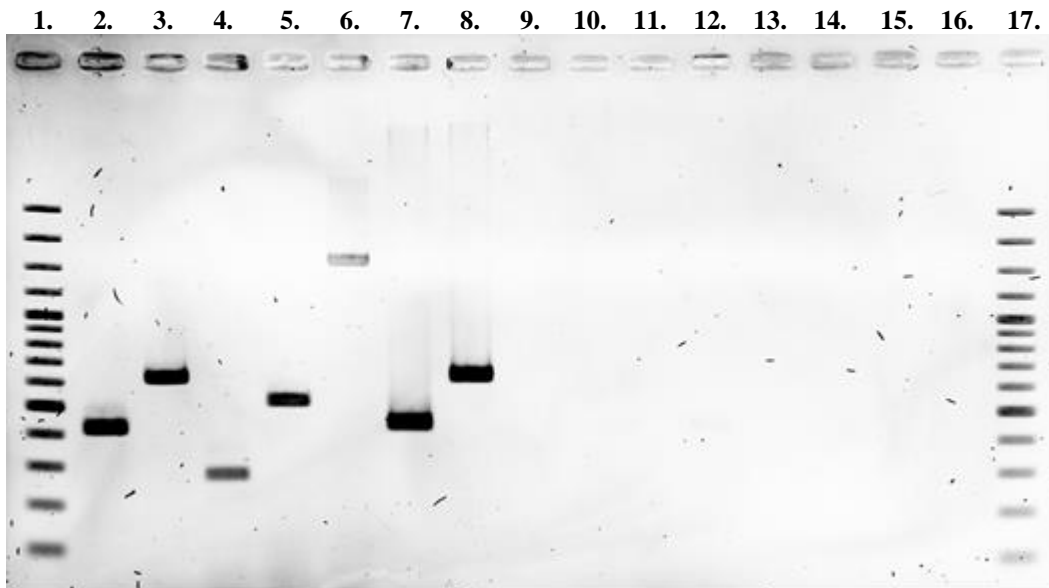


Ryc. 11. Obraz mikroskopowy kultur korzeni transformowanych *Salvia apiana* linii TA1 oraz TL1 (powiększenie 10. krotne);

A – szczytowa (apikalna) część korzenia TA1; B – fragment korzenia TA1 okryty ryzodermą z wykształconymi włosnikami; C – szczytowa (apikalna) część korzenia TL1; D – fragment korzenia TL1 okryty ryzodermą z wykształconymi włosnikami.



Ryc. 12. Analiza PCR *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 [pasma 2-6], korzenie transformowane – klon TL1 [pasma 7-11] i nietransformowane *Salvia apiana* [pasma 12-16]. GeneRuler™ 100 pb Plus DNA ladder (pasma 1, 17). Amplifikowane fragmenty genów *rolB* (423 bp; pasma 2, 7, 12), *rolC* (626 bp; pasma 3, 8, 13), *virG* (273 bp; pasma 4, 9, 14), *Tr* (1672 bp, pasma 5, 10, 15) i *ags* (512 bp, pasma 6, 11, 16).



Ryc. 13. Analiza PCR *Agrobacterium rhizogenes* A4 [pasma 2-6], korzenie transformowane – klon TA2 [pasma 7-11] i nietransformowane *Salvia apiana* [pasma 12-16]. GeneRuler™ 100 pb Plus DNA ladder (pasma 1, 17). Amplifikowane fragmenty genów *rolB* (423 bp; pasma 2, 7, 12), *rolC* (626 bp; pasma 3, 8, 13), *virG* (273 bp; pasma 4, 9, 14), *Tr* (1672 bp, pasma 5, 10, 15) i *ags* (512 bp, pasma 6, 11, 16).

Podsumowując, w toku przeprowadzonych prac biotechnologicznych, otrzymano po raz pierwszy stabilne, zdolne do ciągłego wzrostu kultury korzeni transformowanych *S. apiana*. Analizy PCR potwierdziły transgeniczny charakter otrzymanych biomas, zarówno tych pochodzących z infekcji szczepami bakterii *A. rhizogenes* LBA 9402, jak i A4. Otrzymane klony charakteryzowały się stabilnym wzrostem, jasnobrązową barwą korzeni oraz tendencją do tworzenia zwartych kulistych matryc. Wyprowadzone linie transgeniczne, w kolejnych etapach badań, poddano selekcji, tj. na podstawie tempa wzrostu (rozdz. 2.4.2.1.1) i profilu metabolicznego (rozdz. 2.3) wytypowano jeden klon do dalszych prac biotechnologicznych, prowadzonych w większej skali.

2.3 Ocena potencjału biosyntetycznego kolekcyjnych kultur *in vitro* *S. apiana* w zakresie produkcji związków terpenowych i polifenolowych

Celem prowadzonych badań fitochemicznych było rozpoznanie potencjału biosyntetycznego wyprowadzonych biomas kolekcyjnych szałwii białej, w zakresie produkcji związków polifenolowych oraz lotnych i nielotnych terpenów. W efekcie, po określeniu profili metabolicznych poszczególnych tkanek i porównaniu ich z odpowiednimi w roślinie macierzystej, możliwe było wytypowanie tzw. „superproducentów” powyższych połączeń naturalnych w kulturach *in vitro* do dalszych prac biotechnologicznych. Dodatkowo, w oparciu o opracowane protokoły analizy fitochemicznej, ukierunkowane na wybrane połączenia roślinne, zamierzano prowadzić ciągłą kontrolę kultur *S. apiana*, namnażanych na wszystkich etapach doświadczeń, aby ocenić skuteczność stosowanych zabiegów eksperymentalnych mających za zadanie stymulować produkcję związków naturalnych. Na końcowym etapie realizacji projektu doktorskiego zoptymalizowane procedury analityczne planowano również włączyć jako część składową (tzw. *downstream*) procesu biotechnologicznego otrzymywania aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych, będącą integralnym elementem systemów biotechnologicznych i wykorzystać do izolacji produktów otrzymanych w biomasach *in vitro*.

Konieczność eksperymentalnego określenia potencjału biosyntetycznego kultur *in vitro* wynika z tego, że pomimo postępu jaki dokonał się w obszarze analizy danych, dotyczących mechanizmów regulujących metabolizm roślin, możliwość prognozowania zmian aktywności katalitycznych matryc roślinnych, w zależności od warunków hodowlanych, pozostaje ograniczona (Patra i in., 2013; Trócsányi i in., 2020; Zhang i in., 2023). Sam metabolizm wtórny roślin może być modulowany poprzez zmianę składu pożywki, zastosowanie fitohormonów, czy też techniki elicytacji i dokarmiania; istotne znaczenie mają także takie czynniki jak oświetlenie i temperatura (Smetanska, 2008; Isah i in., 2018; Kozłowska i in., 2022).

Rozpoznanie zdolności biomas *in vitro* szałwii białej do produkcji metabolitów wtórnych wpisuje się także w nowoczesne trendy w analizie fitochemicznej, które zbliżają ten obszar badań do metabolomiki, rozumianej jako gałąź biologii systemów (Zhang i in., 2023). *S. apiana* stanowi niezwykle interesującą, na tle innych szałwii, roślinę modelową do badań w tym zakresie. Omawiana roślina łączy w sobie cechy fitochemiczne różnych taksonów z powyższego rodzaju, rozumiane jako zdolności katalityczne biosyntezy szerokiego zakresu związków diterpenoidowych pochodnych abietanu. W częściach nadziemnych powyższej rośliny obecny jest kwas karnozowy i karnozol, co jest charakterystyczne dla europejskich gatunków szałwii, takich jak: *S. officinalis* L. i *S. rosmarinus* Spenn., natomiast w korzeniach produkowane są tanszynony, co z kolei jest cechą typową dla wschodnio-azjatyckich taksonów, w tym: *S. milthiorizza* Bunge, *S. bulleyana* Diels i *S. przewalskii* Maxim. (Kintzios, 2000; Li i in., 2010; Hu i in., 2022). Ponadto, *S. apiana* wyróżnia się wysoką zawartością

lotnych terpenów w obrębie części nadziemnych. Dominującymi metabolitami wtórnymi, w powyższym surowcu, o charakterze polifenoli są: kwas rozmarynowy, kwasy salwianolowe, hesperydyna, kwercetyna oraz cirsimarytyna (Afonso i in., 2019b; Krol i in., 2022).

Dane literaturowe wskazują, że profile transkryptomyczne oraz metabolomiczne komórek pochodzących z korzeni oraz części nadziemnych szalwii białej charakteryzuje aktywność, odpowiednio, 40 i 50 genów, związanych z biosyntezą związków polifenolowych i diterpenoidów. Szczegółowe analizy wskazują na istotne różnice w poziomie ekspresji powyższych genów między korzeniami a częściami nadziemnymi badanej rośliny. Wysoki poziom transkrypcji enzymów CYP76AH, CYP76AK oraz 2-ODD w korzeniach wskazuje na ich znaczącą rolę w akumulacji, w tych tkankach roślinnych, tanszironów, natomiast aktywność CYP76AK w liściach jest najprawdopodobniej związana z biosyntezą kwasu karnozowego. Wyróżniającą cechą badanego taksonu jest również mutacja w rodzinie genów lakaz, co wiąże się z upośledzoną aktywnością katalityczną tej klasy enzymów oraz z brakiem zdolności omawianego gatunku do biosyntezy kwasu salwianolowego B, będącego, charakterystycznym dla *S. milthiorizza*, dimerem kwasu rozmarynowego (Hu i in., 2022).

W przypadku innych taksonów z rodziny *Lamiaceae*, w tym tych z rodzaju *Salvia*, stwierdzono, że namnażanie biomas roślinnych w kulturach *in vitro* w znaczący sposób wpływa na przebieg podstawowych szlaków biosyntezy, stąd poszczególne komórki roślinne charakteryzują się zmienionym metabolizmem w zakresie produkcji terpenów i polifenoli w porównaniu z normalnie zróżnicowanymi komórkami pochodzącymi z roślin gruntowych. W tym względzie obserwuje się różnice, w obrębie produktywności omawianych klas związków, zarówno na poziomie jakościowym, jak i ilościowym (Bulgakov i in., 2012; Marchev i in., 2014; Swamy i in., 2018; Marchev i in., 2020).

Z uwagi na powyższe, omówione poniżej prace fitochemiczne, dotyczące rozpoznania profilu metabolicznego kultur *in vitro* *S. apiana* różniących się stopniem zróżnicowania morfogenetycznego realizowano dwutorowo, zarówno w odniesieniu do lotnych terpenów (GC/MS i GC/FID), jak również polifenoli i nielotnych diterpenów (HPLC-DAD-ESI/MS). Do badań porównawczych, z uwagi na syntezowane związki, włączono roślinę gruntową *S. apiana* oraz, na etapie analizy olejku eterycznego, również *S. officinalis*. Wybór drugiego z wymienionych gatunków jako roślinnej matrycy referencyjnej podyktowany był jego powszechnym wykorzystaniem w lecznictwie i tym samym zamiarem szerszego przedyskutowania ewentualnego wykorzystania szalwii białej w medycynie oficynalnej.

2.3.1 Analiza fitochemiczna nielotnych terpenów i polifenoli z kultur *in vitro* *S. apiana* oraz z upraw gruntowych

W pierwszym z przedstawionych powyżej obszarów doświadczalnych, wysuszone liofilizacyjnie matryce roślinne (kolekcyjne kultury *in vitro* – rozdz. 3.1.8.4 oraz ziele i korzenie rośliny gruntowej *S. apiana*) poddano procedurom ekstrakcji celem uzyskania oczyszczonych frakcji polifenolowych oraz nielotnych terpenów, skierowanych następnie do chromatograficznej analizy

jakościowej oraz ilościowej (HPLC, rozdz. 3.2.3.2.2) z zamiarem scharakteryzowania zdolności wspomnianych biomas do akumulacji związków właściwych dla rośliny macierzystej.

Dobór warunków otrzymania zespołów wymienionych powyżej metabolitów wtórnych oparto na szeroko udokumentowanych w literaturze procedurach ekstrakcyjnych opracowanych wcześniej dla polifenoli oraz nietlotnych terpenów zawartych w *S. apiana* i gatunkach pokrewnych (Rajbhar i in., 2015; Mojzer i in., 2016; Jiang i in., 2016; Das i in., 2023; Xavier i in., 2023). Ewentualne optymalizacje eksperymentalne dotyczące doboru rozpuszczalników oraz warunków ekstrakcji pominięto, w części dyskusyjnej manuskryptu, ze względu na jego obszerność i przedstawiono jedynie końcowy wybór w tym zakresie.

2.3.1.1 Przygotowanie surowców roślinnych do badań fitochemicznych

Kwestia odpowiedniego przygotowania próbek, uwarunkowana zastosowaną techniką analityczną, ma szczególne znaczenie w kontekście efektywności ekstrakcji oraz trwałości badanych związków. Zarówno polifenole jak i nietlotne terpenoidy są znacznie zróżnicowaną grupą związków pod względem właściwości fizykochemicznych. Między innymi, charakteryzują się one, a w szczególności diterpeny, znaczną podatnością na procesy utleniania i degradacji termicznej (Zhang, Smuts i in., 2012, Rajbhar i in., 2015; Mojzer i in., 2016; Jiang i in., 2016; Xavier i in., 2023).

W prezentowanej pracy doktorskiej, uwzględniając wymienione powyżej czynniki, zdecydowano się na suszenie biomas *in vitro* metodą liofilizacji. W przypadku liści rośliny gruntowej, sprowadzono już surowiec suchy, natomiast korzenie suszono w 30°C przez 24 h. Materiał roślinny rozdrabniano na fragmenty wielkości < 1 mm, bezpośrednio przed procesem ekstrakcji (rozdz. 3.2.3.2). Powyższa procedura przygotowania matryc naturalnych jest powszechnie stosowana w toku analiz fitochemicznych surowców z rodziny Lamiaceae (Hossain i in., 2010; Argyropoulos i Müller, 2014; Uribe i in., 2016; Kwaśniewska-Karolak i Mostowski, 2021).

2.3.1.2 Wybór metody ekstrakcji i oczyszczania

Kolejny etap prac fitochemicznych nad biomasami *S. apiana* obejmował wybór metody ekstrakcji frakcji nietlotnych terpenów i polifenoli z badanych matryc roślinnych.

Jak podają dane literaturowe, do otrzymania wyciągów, zawierających flawonoidy oraz kwasy fenolowe zawarte w roślinach z rodziny Lamiaceae, często jako rozpuszczalniki stosuje się, w zależności od formy magazynowanego metabolitu (np. glikozydy lub aglikony), metanol, etanol, aceton, eter dietylowy oraz octan etylu, a także wodę (Rajbhar i in., 2015; Mojzer i in., 2016). W przypadku terpenoidów należy pamiętać, że stanowią one jedną z bardziej zróżnicowanych strukturalnie grup połączeń naturalnych. Dla tych o charakterze związków nietlotnych (>15 atomów węgla w cząsteczce), w zależności od ich polarności, warunkowanej obecnością dodatkowych grup funkcyjnych, wykorzystuje się rozpuszczalniki o różnym stopniu polarności, takie jak heksan, aceton, metanol i etanol (Wan i in., 2009; Jiang i in., 2016; Das i in., 2023). Dodatkowo, jak już wspomniano,

z analitycznego punktu widzenia istotnym utrudnieniem jest fakt, iż połączenia z powyższej grupy, charakterystyczne dla rodzaju *Salvia*, podatne są na procesy rozkładu pod wpływem temperatury i światła (Zhang, Smuts i in., 2012; Meim i in., 2019).

Uwzględniając powyższe dane literaturowe, w ramach prowadzonych prac eksperymentalnych, wyciągi pierwotne, zawierające całą pulę polifenoli oraz nietlotnych terpenów, akumulowanych w badanych surowcach (kultury kolekcyjne *S. apiana* oraz liście i korzenie rośliny gruntowej), otrzymywano z wykorzystaniem ekstrakcji ciało stałe-ciecz, przy pomocy 99,8% metanolu, w warunkach nie powodujących degradacji termicznej związków wrażliwych na temperaturę (21°C). Powyższy proces prowadzono 3-stopniowo, bez dostępu światła. W ramach prac optymalizujących warunki i sposób ekstrakcji wtórnych metabolitów zawartych w badanych matrycach roślinnych, w oparciu o dostępną literaturę, testowano poza alkoholem metylowym również inne rozpuszczalniki [mieszanina metanolu i wody – 8 : 2 (v/v), aceton oraz *n*-heksan], które jednak nie warunkowały satysfakcjonujących poziomów zarówno terpenów jak i polifenoli w wyciągu pierwotnym (wyniki eksperymentów nie omawiane w manuskrypcie). Ostatecznie, wyczerpującą ekstrakcję surowców roślinnych umożliwił jedynie metanol (analiza HPLC pozostałości poekstrakcyjnej), aczkolwiek protonowy charakter powyższego rozpuszczalnika sprzyja procesowi degradacji: kwasu karnozowego i karnozolu, co ostatecznie może skutkować zwiększeniem zawartości rosmanolu i epirosmanolu w ekstraktach (Zhang, Smuts i in., 2012). Z tego względu wyciągi z wszystkich surowców roślinnych przygotowano bezpośrednio przed analizą chromatograficzną. W tym miejscu należy zaznaczyć, że metanol jest rozpuszczalnikiem z wyboru, służącym do otrzymywania ekstraktów zawierających diterpeny zawarte w rodzaju *Salvia*, wielu grup badawczych. Tym samym uzyskane w toku projektu doktorskiego wyniki badań fitochemicznych można było porównać z rezultatami prac eksperymentalnych innych autorów (Abreu i in., 2008; Kentsop i in., 2021; Wan i in., 2009; Skała i in., 2014).

Otrzymane wyciągi metanolowe z testowanych matryc roślinnych zawierały, obok oznaczanych połączeń, również związki o charakterze balastów, w tym chlorofil, jednak z uwagi na nietrwałość diterpenów w ekstraktach nie zdecydowano się na ich dalsze oczyszczanie i przeznaczono, w pierwotnej formie, do jakościowych i ilościowych analiz chromatograficznych (HPLC-DAD/ESI-MS) polifenoli i nietlotnych terpenów, zawartych w biomasach *S. apiana* z upraw gruntowych i kultur *in vitro*.

2.3.1.3 Analiza jakościowa oraz ilościowa frakcji polifenolowych oraz nietlotnych terpenów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC-DAD-ESI/MS)

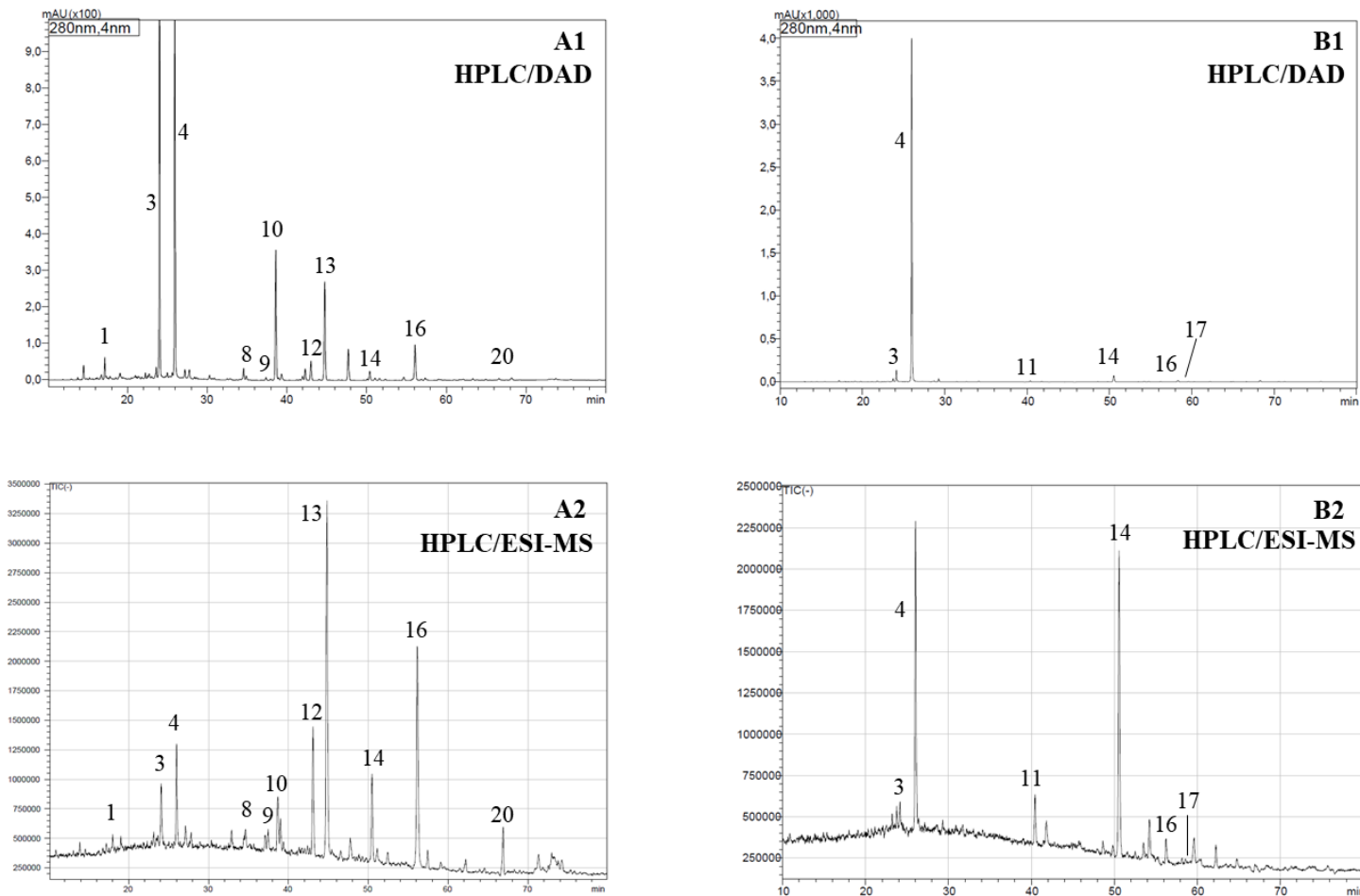
Otrzymane w toku prac fitochemicznych metanolowe wyciągi ze zliofilizowanych biomas, pochodzących z kultur kolekcyjnych *S. apiana*, oraz z wysuszonych surowców gruntowych, poddano chromatograficznym analizom jakościowym i ilościowym, celem oceny potencjału biosyntetycznego wspomnianych matryc w zakresie produkcji połączeń polifenolowych i terpenowych.

W analizie roślin z rodziny Lamiaceae, z uwagi na obecność połączeń nielotnych, zwykle wykorzystuje się technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z różnymi metodami rejestracji oraz identyfikacji metabolitów (detektor spektrofotometryczny o matrycy diodowej – DAD, spektrometria mas – ESI-MS, również w wersji tandemowej – MS/MS) (Ziaková i Brandšteterová, 2003; Skendi i in., 2017; Simeoni i in., 2018). Ze względu na powyższe, w opisywanych pracach eksperymentalnych, zastosowano HPLC-DAD-ESI/MS, co pozwoliło na analizowanie szerokiego spektrum związków obecnych w badanych matrycach roślinnych, tj. kwasów fenolowych, flawonoidów, diterpenoidów typu abietanu oraz triterpenoidów (rozdz. 3.2.3.2.2). W pracach doświadczalnych wykorzystano warunki chromatograficzne polecane dla omawianych metabolitów wtórnych, rozdzielając zespoły połączeń naturalnych w tzw. układach faz odwróconych, stosując kolumnę żelową RP18 jako fazę stacjonarną oraz mieszaninę acetonitrylu, wody i modyfikatora kwasowego (CH₃COOH) jako fazę ruchomą (rozdz. 3.2.3.2.2). Z uwagi na wieloskładnikowy charakter badanych wyciągów posłużono się elucją gradientową. Przepływ gradientu, proporcje rozpuszczalników w fazie ruchomej oraz czas trwania analizy optymalizowano empirycznie, metodą prób i błędów, na ekstraktach oraz mieszaninie substancji wzorcowych. Z uwagi na złożony charakter projektu doktorskiego tę część prac doświadczalnych, o dość rutynowym przebiegu, pominięto w dyskusji (Tzima i in., 2018).

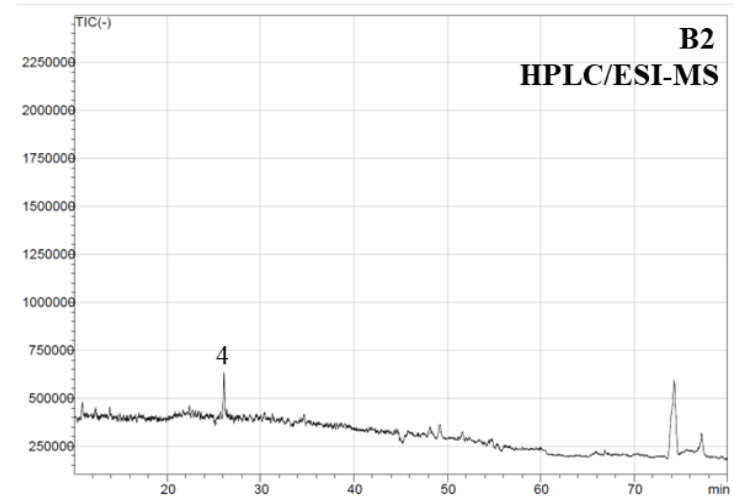
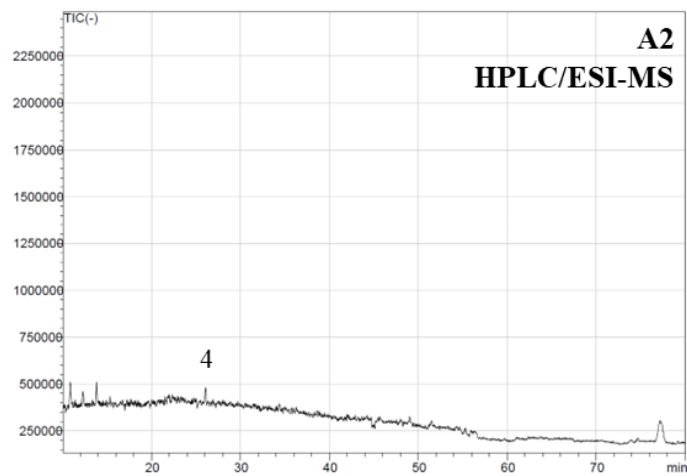
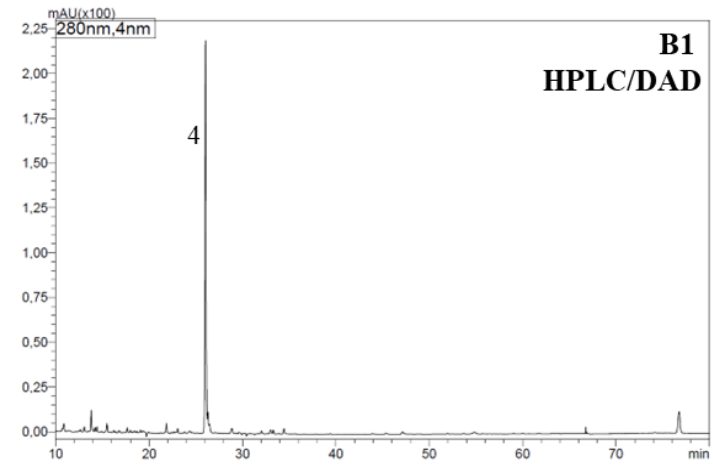
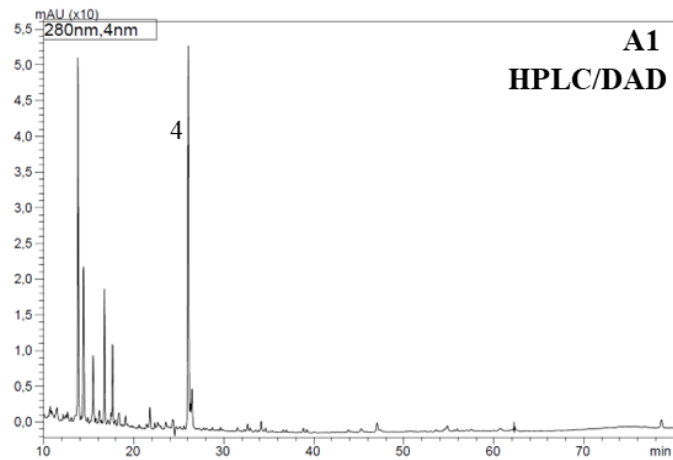
Ze względu na budowę chemiczną identyfikowanych połączeń, warunkującą ich zdolność do absorpcji promieniowania UV, w pracach chromatograficznych wykorzystano detektor DAD ($\lambda=280$ nm) (Afonso i in., 2019b, Vaccaro i in., 2019). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że HPLC sprzężona z matrycą fotodiodową generalnie nie jest bardzo czułą metodą wykrywania terpenów, w przeciwieństwie do polifenoli, jako że niniejsze metabolity mają ograniczoną zdolność do pochłaniania określonych długości fal UV (Li i in., 2013; Paloukopoulou i in., 2022), niemniej jednak wykorzystuje się ją do rozdzielania zespołów diterpenoidowych typu abietanu (Xu i in., 2008; Jiang i in., 2016; Vaccaro i in., 2019; Don i in., 2020). Opisywany tryb postępowania stosuje się szczególnie podczas opracowywania profili metabolicznych surowców naturalnych, gdy próbuje się podczas jednej analizy chromatograficznej rozdzielić zróżnicowane chemicznie połączenia roślinne współwystępujące w tej samej matrycy (Tzima i in., 2018). Testowane ekstrakty analizowano także z użyciem detektora ESI-MS, zarówno w trybie jonów ujemnych, co ma szczególne znaczenie przy identyfikacji kwasów fenolowych, flawonoidów oraz diterpenoidów typu abietanu obecnych w badanych matrycach roślinnych (Cvetkovikj i in., 2013; Afonso i in., 2019b), jak i dodatnich, pozwalających na rejestrację jonów pseudomolekularnych, pochodnych nor-abietanu (tanszinony) (Seong i in., 2019). Połączenie tych dwóch metod detekcji, tj. DAD i MS, pozwoliło dostarczyć dokładnych informacji na temat, odpowiednio, widma UV (określenie klasy połączeń naturalnych) oraz masy i częściowo struktury badanych związków (Tzima i in., 2018). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że w przypadku zastosowanych procedur wchodzących w zakres niniejszej pracy, czas pojedynczej analizy wynosił aż

105 min. Jedynie w powyższych warunkach możliwe było rozdzielenie tak szerokiego spektrum związków.

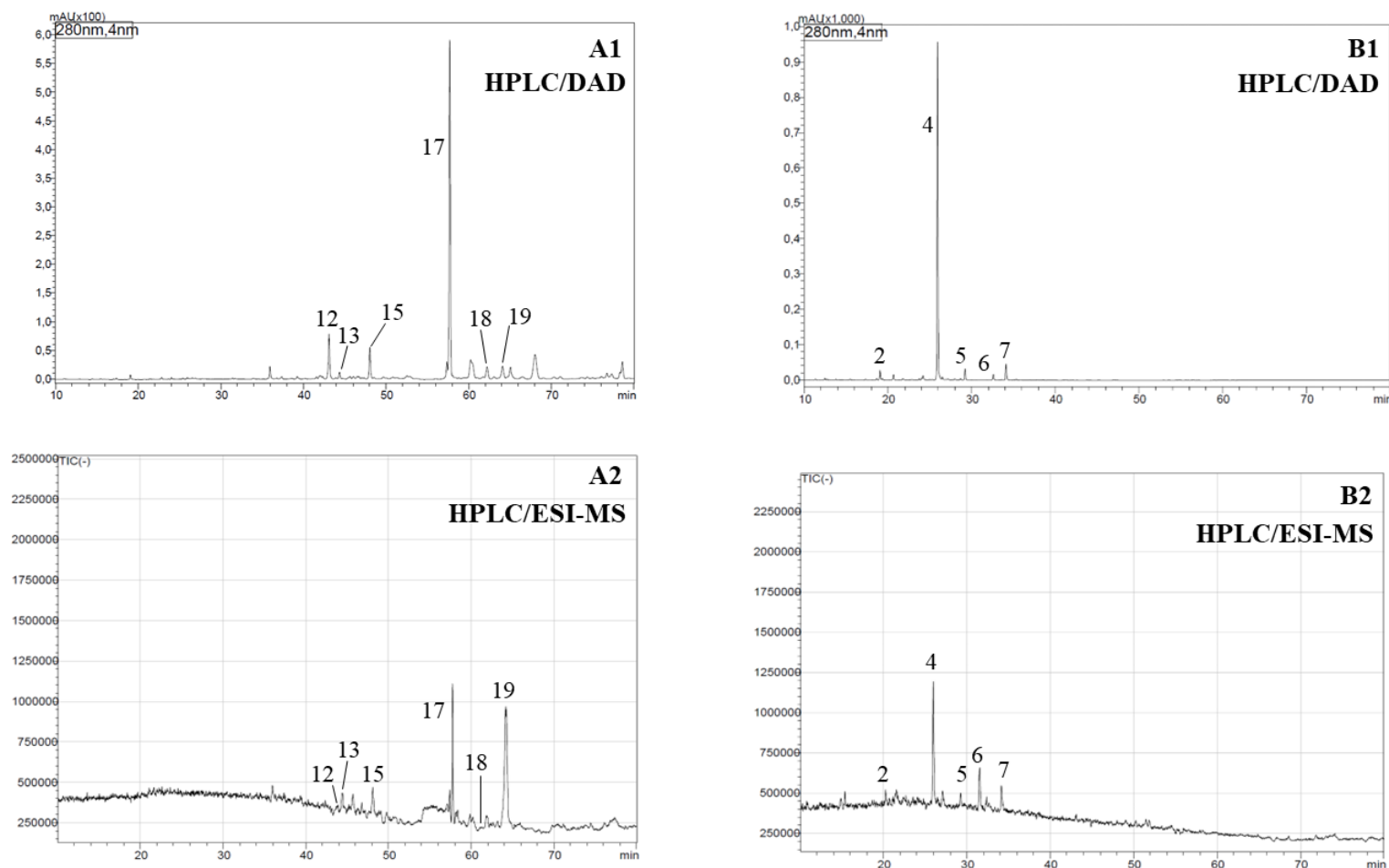
Na podstawie współczynników retencji (kochromatografia z substancjami wzorcowymi), zarejestrowanych widm UV oraz sygnałów m/z zidentyfikowano w badanych surowcach następujące związki: kwas rozmarynowy, hesperydynę, kwas karnozowy, karnozol, tanszinon 2A oraz kryptotanszinon. Tożsamość pozostałych, wybranych metabolitów wtórnych (główne składniki zespołów), określono w oparciu o zarejestrowane sygnały m/z oraz widma UV i porównanie poszczególnych wartości z danymi literaturowymi (Pereira i in., 2018; Afonso i in., 2019a, 2019b; Zengin, Mahomoodally i in., 2019; Grzegorzczak-Karolak, Krzemińska i in., 2020; Hu i in., 2022). W tym miejscu należy zaznaczyć, że w toku analiz widm ESI-MS, zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych, oprócz specyficznych jonów pseudomolekularnych, nie zarejestrowano jonów pochodzących z fragmentów badanych związków ani ewentualnych adduktów. Uzyskane dane chromatograficzne przedstawiono na Ryc. 14-17 oraz, w formie podsumowania, w Tab. 5 (badania jakościowe). Wyniki analiz ilościowych wybranych metabolitów w matrycach *S. apiana*, zaprezentowano w Tab. 6-7. Parametry walidacyjne dla zastosowanej metody HPLC, przedstawiono w Tab. 8.



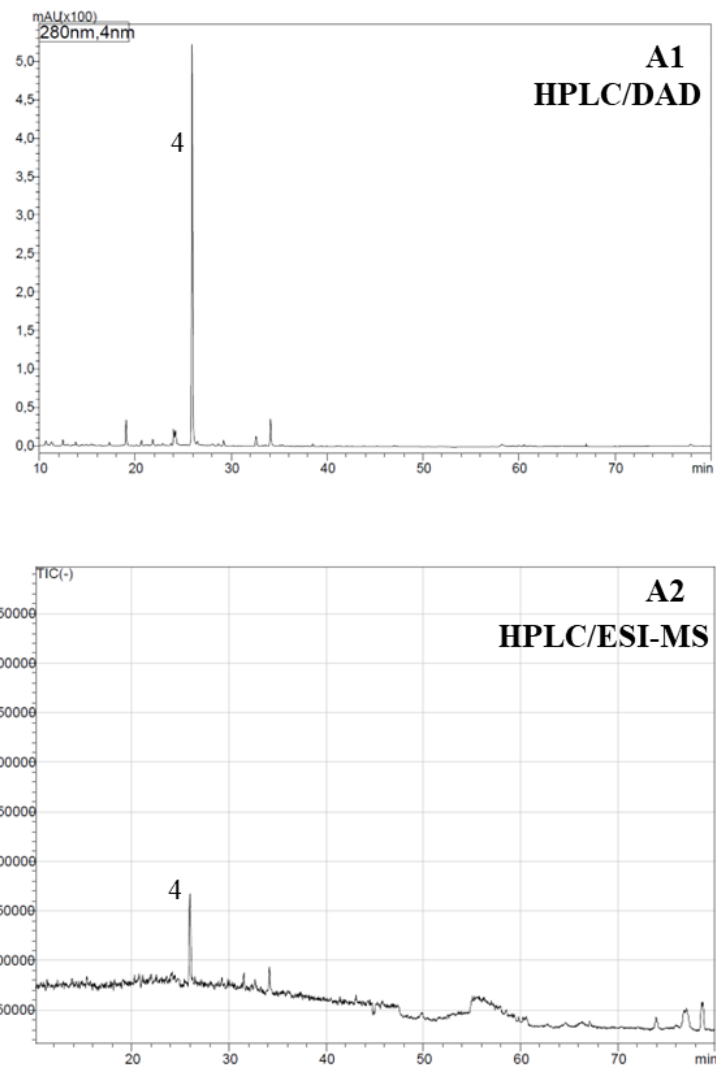
Ryc. 14. Chromatogramy HPLC-DAD-ESI/MS ($\lambda = 280 \text{ nm}$) frakcji terpenowych i polifenolowych w badanych matrycach roślinnych; A1-2 – liście rośliny gruntowej *S. apiana*; B1-2 – kultury kolekcyjne mikropędów *S. apiana* (medium SH_B). Piki: 1 – kwas neochlorogenowy; 3 – hesperydydy; 4 – kwas rozmarynowy; 8 – epirosmanol; 9 – rosmanol; 10 – cirsimarytyna; 11,12 – izomer rosmanolu; 13 – kwas hydroksykarnozowy; 14 – karnozol; 16 – kwas karnozowy; 17 – kryptotanszynon; 20 – kwas ursolowy.



Ryc. 15. Chromatogramy HPLC-DAD-ESI/MS ($\lambda = 280 \text{ nm}$) frakcji terpenowych i polifenolowych z biomas *in vitro* *Salvia apiana*; A1-2 – kalus namnażany na zmodyfikowanej pożywce MS (medium MS_{stand}); B1-2 – kalus namnażany na zmodyfikowanej pożywce SH (medium SH_{stand}). Piki: 4 – kwas rozmarynowy.



Ryc. 16. Chromatogramy HPLC-DAD-ESI/MS ($\lambda = 280$ nm) frakcji terpenowych i polifenolowych w badanych matrycach roślinnych; A1-2 – korzeń rośliny gruntowej *S. apiana*; B1-2 – kultura kolecyjna korzeni odciętych *S. apiana* (medium SH_{IBA1,0}). Piki: 2 – heksozyd kwasu sinapowego, 4 – kwas rozmarynowy, 5 – rozmarynian metylu, 6 – kwas salwianolowy F, 7 – izomer kwasu salwianolowego F, 12 – izomer rosmanolu; 13 – kwas hydroksykarnozowy; 15 – izomer kwasu hydroksykarnozowego; 17 – kryptotanszinton; 18 – tanszinton 2A; 19 - 1,6,6,9a-tetrametylo-1,2,4,5,5a,6,7,8,9,9a-dekahydrofenantro[1,2-b]furan-10,11-dion.



Ryc. 17. Chromatogram HPLC-DAD-ESI/MS ($\lambda = 280 \text{ nm}$) frakcji terpenowej i polifenolowej z biomas *in vitro* *Salvia apiana*; A1-2 – korzenie transformowane TA1 (medium SH₀). Piki: 4 – kwas rozmarynowy.

Tab. 5. Dane chromatograficzne i spektralne wykorzystane do identyfikacji związków terpenowych i polifenolowych w wyciągach z kultur kolekcyjnych oraz z surowców gruntowych *Salvia apiana* (liście, korzeń).

Numer piku ^a	Czas retencji [min]	λ_{\max} [nm]	Jon pseudomolekularny (<i>m/z</i>)	Proponowana struktura	Próbka roślinna ^b	Ref.
1	14,49	324	[M-H]: 353	Kwas <i>cis</i> 3-O-kawoilochinowy (neochlorogenowy)	LRG	(Afonso i in., 2019a, 2019b)
2	17,16	323	[M-H]: 385	Heksozyd kwasu sinapowego	K _{IV}	(Zengin, Mahomoodally i in., 2019; Grzegorzczak-Karolak, Krzemińska i in., 2020)
3	24,01	283	[M-H]: 609	Hesperydyna*	LRG, M _{IV}	(Afonso i in., 2019b)
4	25,93	229, 283, 331	[M-H]: 359	Kwas rozmarynowy*	LRG, M _{IV} , K-SH _{IV} , K-MS _{IV} , K _{IV} , K _{TL1-2} , K _{TA1-3}	(Afonso i in., 2019a, 2019b)
5	29,21	328	[M-H]: 373	Rozmarynian metylu	K _{IV}	Grzegorzczak-Karolak, Krzemińska, i in., 2020)
6	32,63	338	[M-H]: 313	Kwas salwianolowy F	K _{IV}	Grzegorzczak-Karolak, Krzemińska, i in., 2020)
7	34,14	337	[M-H]: 313	Izomer kwasu salwianolowego F	K _{IV}	Grzegorzczak-Karolak, Krzemińska, i in., 2020)
8	34,59	-	[M-H]: 345	Epirosmanol	LRG	(Velamuri i in., 2020)
9	37,39	273	[M-H]: 345	Rosmanol	LRG	(Velamuri i in., 2020)
10	38,61	274, 333	[M-H]: 313	Cirsimarytyna	LRG	(Afonso i in., 2019b)
11	40,44	288	[M-H]: 345	Izomer rosmanolu	M _{IV}	(Velamuri i in., 2020; F. Hu i in., 2022)
12	43,02	-	[M-H]: 345	Izomer rosmanolu	LRG, K _{RG}	(Velamuri i in., 2020; F. Hu i in., 2022)
13	44,72	285	[M-H]: 347	Kwas hydroksykarnozowy	LRG, K _{RG}	(Afonso i in., 2019b)
14	50,41	284	[M-H]: 329	Karnozol*	LRG, M _{IV}	(Afonso i in., 2019b)
15	50,79	260	[M-H]: 347	Izomer kwasu hydroksykarnozowego	K _{RG}	(Hu i in., 2022)
16	56,11	284	[M-H]: 331	Kwas karnozowy*	LRG, M _{IV}	
17	58,66	222, 264	[M+H]: 297	Kryptotanszinon*	K _{RG} , M _{IV}	(Hu i in., 2022)
18	62,67	-	[M+H]: 295	Tanszinon 2A*	K _{RG}	(Hu i in., 2022)
19	64,59	-	[M+H]: 315	1,6,6,9a-tetrametylo-1,2,4,5,5a,6,7,8,9,9a-dekahydrofenantrol[1,2-b]furan-10,11-dion	K _{RG}	(Hu i in., 2022)
20	66,60	-	[M-H]: 455	Kwas ursolowy*	LRG	

^aNumer piku odpowiada numeracji zastosowanej na Ryc. 14-17.

^bPróbki roślinne: kultury *in vitro* – mikropędy (M_{IV}), kalus kultywowany na podłożu SH_{stand} (K-SH_{IV}) i pożywce MS_{stand} (K-MS_{IV}), korzenie odcięte (K_{IV}); roślina gruntowa: liście (LRG), korzenie (K_{RG})

*Identyfikacja związku z wykorzystaniem substancji wzorcowej

Tab. 6. Zawartość wybranych związków terpenowych i polifenolowych w kulturach kolekcyjnych oraz roślinach gruntowych *S. apiana*.

Wartości przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.

Związek	Liście rośliny gruntowej	Mikropędy (medium SH _B ; cykl wzrostowy 21 dni; Gi \approx 580%)	Kalus SH (medium SH _{stand} ; cykl wzrostowy 21 dni; Gi \approx 920%)	Kalus MS (medium MS _{stand} ; cykl wzrostowy 21 dni; Gi \approx 1020%)
	Zawartość mg g ⁻¹ DW	Zawartość mg g ⁻¹ DW	Zawartość mg g ⁻¹ DW	Zawartość mg g ⁻¹ DW
Kwas rozmarynowy	18,96 \pm 2,12	68,81 \pm 4,25	5,60 \pm 1,04	1,92 \pm 0,29
Cirsimarytyna	2,17 \pm 0,04	ND	ND	ND
Hesperydyna	8,59 \pm 0,57	1,20 \pm 0,17	ND	ND
Karnozol	3,73 \pm 0,77	6,15 \pm 1,42	ND	ND
Kwas karnozowy	10,77 \pm 1,09	0,41 \pm 0,10	ND	ND
Kwas hydroksykarnozowy	27,04 \pm 1,58	ND	ND	ND
Kryptotanszynon	ND	T	ND	ND

ND - nie stwierdzono obecności związku

T - śladowe ilości

Tekst pogrubiony dotyczy najwyższych stwierdzonych stężeń danego związku w badanych matrycach roślinnych

Tab. 7. Zawartość wybranych związków terpenowych i polifenolowych w kulturach kolekcyjnych oraz roślinach gruntowych *S. apiana*.

Wartości przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.

Związek	Korzeń rośliny gruntowej	Korzenie odcięte (medium SH _{BA1,0} ; cykl wzrostowy 21 dni; Gi \approx 1070%)	Korzenie transformowane TA1 (medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 1002%)	Korzenie transformowane TA2 (medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 926%)	Korzenie transformowane TA3 (medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 907%)	Korzenie transformowane TL1 (medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 1020%)	Korzenie transformowane TL2 (medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 998%)
	Zawartość [mg g ⁻¹ DW]	Zawartość [mg g ⁻¹ DW]	Zawartość [mg g ⁻¹ DW]	Zawartość [mg g ⁻¹ DW]	Zawartość [mg g ⁻¹ DW]	Zawartość [mg g ⁻¹ DW]	Zawartość [mg g ⁻¹ DW]
Kwas rozmarynowy	ND	17,22 \pm 0,33	12,76 \pm 0,09	11,01 \pm 0,28	9,83 \pm 0,19	15,32 \pm 0,39	12,97 \pm 0,06
Kryptotanszynon	3,71 \pm 0,20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tanszynon 2A	T	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND - nie stwierdzono obecności związku

T - śladowe ilości

Tekst pogrubiony dotyczy najwyższych stwierdzonych stężeń danego związku w badanych matrycach roślinnych

Tab. 8. Parametry walidacyjne dla metody HPLC, wykorzystanej do prowadzenia analiz ilościowych związków polifenolowych oraz nietlotnych terpenów w badanych matrycach roślinnych *S. apiana*.

Wzorzec	Hesperydyna	Kwas rozmarynowy	Flawon	Karnozol	Kwas karnozowy	Kryptotanszynon
R _i [min]	24,01	25,93	38,61	50,41	56,11	59,66
Zakres liniowości [mg mL ⁻¹]	0,03-0,600	0,01-2,00	0,03-0,25	0,03-0,25	0,03-1,00	0,05-1,50
Równanie regresji	$y = 2 \times 10^6 x - 24,005$	$y = 9 \times 10^6 x - 331457$	$y = 3 \times 10^7 x - 91625$	$y = 2 \times 10^7 x - 10218$	$y = 2 \times 10^6 x - 620549$	$y = 2 \times 10^7 x - 620549$
Współczynnik regresji	0,9999	0,9989	0,9976	0,9959	0,9971	0,9954

R_i-czas retencji

Jak wynika z danych zaprezentowanych w Tab. 5, w otrzymanych wyciągach z kultur kolekcyjnych oraz z rośliny gruntowej *S. apiana* zidentyfikowano, w badanych grupach metabolitów wtórnych, 20 składników (Ryc. 14-17). Biomasy *in vitro* produkowały polifenole (7 połączeń, w tym 5 kwasów fenolowych i 2 flawonoidy), diterpenoidy (12 związków, uwzględniając występujące izomery) oraz triterpenoidy (1 metabolit wtórny). Analogicznie, w częściach nadziemnych rośliny gruntowej oznaczono 4 polifenole, 6 diterpenoidów oraz 1 triterpen (Tab. 5). W efekcie, można wnioskować, że wyprowadzone kultury kolekcyjne zachowały zdolność do biosyntezy jedynie części metabolitów wtórnych charakterystycznych dla rośliny macierzystej. Należy jednak zaznaczyć, że poddane analizom fitochemicznym biomasy, na opisywanym etapie eksperymentów, nie były jeszcze poddawane żadnym zabiegom biotechnologicznym w celu poprawy ich zdolności do akumulacji badanych połączeń naturalnych, co wydaje się możliwe ze względu na liczne doniesienia literaturowe (Isah i in., 2018; Fazili i in., 2022).

Ocena potencjału biosyntetycznego mikropędów oraz kalusów *S. apiana* w zakresie nietlotnych terpenów i polifenoli oraz porównanie ich profilu metabolicznego z zespołem połączeń naturalnych w roślinie gruntowej

Analizy fitochemiczne uzyskanych, w toku prowadzonych doświadczeń biotechnologicznych, mikropędów (medium SH_B) oraz kalusów (pożywki SH_{stand} oraz MS_{stand}), a także liści rośliny gruntowej badanego gatunku z upraw gruntowych (rozd. 3.2.1), wykazały wyraźne zmiany w obrębie biosyntezywanego zespołu związków terpenowych i polifenolowych w ocenianych kulturach *in vitro* (Ryc. 14-15). Obserwowane różnice miały zarówno charakter jakościowy, jak i ilościowy (Tab. 5-6).

W przypadku materiału roślinnego pochodzącego z gruntu, uzyskane wyniki są zgodne z danymi piśmiennictwa, wykazującymi, że części nadziemne szalwii białej stanowią bogate źródło kwasu rozmarynowego (Krol i in., 2022). Surowiec, przebadany w ramach prezentowanych doświadczeń, zawierał 18,96 mg g⁻¹ DW powyższego polifenolu (Tab. 6). Opierając się na wynikach analiz wyciągów metanolowych z części nadziemnych innych roślin z rodziny Lamiaceae (Hajimehdipoor i in., 2012), *S. apiana*, oceniana w prezentowanym eksperymencie, zawierała ilość kwasu rozmarynowego typową dla pozostałych przedstawicieli jasnotowatych. Spośród 60

przebadanych gatunków z tego taksonu, w tym 6 *Salvia* spp., najwyższą zawartością omawianego związku charakteryzowała się *Mentha spicata* L. (58,5 mg g⁻¹ DW). Co warto nadmienić, kwas rozmarynowy jest metabolitem wtórnym, którego biosynteza w roślinie jest ściśle związana z czynnikami edaficznymi, warunkami klimatycznymi oraz fenofazą (Del Baño i in., 2003; Stafiniak i in., 2021). Komercyjne pozyskanie badanego surowca w projekcie, a co za tym idzie brak znajomości warunków zbioru, uniemożliwiło ocenę jego jakości w kontekście powyższych czynników.

Wśród metabolitów wtórnych o charakterze flawonoidów, zidentyfikowanych w liściach rośliny gruntowej (Ryc. 14), można wyróżnić hesperydynę (8,59 mg g⁻¹ DW) oraz cirisimarytynę (2,17 mg g⁻¹ DW) (Tab. 6). Obecność powyższych związków, w częściach nadziemnych zarówno szaławii białej jak i innych gatunków *Salvia*, była opisywana już wcześniej (Lu i Foo, 2002; Afonso i in., 2019b; Hu i in., 2022; Lee i in., 2022).

Dominującymi ilościowo, w liściach surowca gruntowego diterpenoidami, były: kwas hydroksykarnozowy (27,04 mg g⁻¹ DW), kwas karnozowy (10,77 mg g⁻¹ DW) i karnozol (3,73 mg g⁻¹ DW) (Tab. 6). Uzyskane wyniki są zbliżone do rezultatów wcześniej prowadzonych badań nad szaławią białą, gdzie, dla wyciągów metanolowych z powyższego surowca, stwierdzone zawartości kwasu karnozowego oraz karnozolu wynosiły, odpowiednio: 21,8 i 0,3 mg g⁻¹ DW (Abreu i in., 2008). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że w przytoczonym badaniu szaławia biała charakteryzowała się najwyższą zawartością opisywanych metabolitów wtórnych spośród 60 przebadanych gatunków szaławii.

W testowanych ekstraktach z liści szaławii białej obecne były także inne pochodne abietanu, takie jak: rosmanol i epirosmanol (Ryc. 14; Tab. 6). Stanowiły one jednak jedynie niewielką część występującej w surowcu sumy diterpenoidów. Rosmanol jest także produktem rozpadu kwasu karnozowego oraz karnozolu, a powyższy proces zachodzi pod wpływem światła i temperatury (Zhang, Smuts i in., 2012), zatem obecność tych związków w wyciągach mogła również wynikać z procesów degradacji zachodzących w trakcie ekstrakcji liści i przechowywania otrzymanych wyciągów szaławii białej, chociaż starano się by warunki eksperymentalne, poprzedzające analizy chromatograficzne, miały charakter ochronny.

Jak już wspomniano, zaobserwowano wyraźne różnice w obrębie biosyntezerowanego zespołu związków terpenowych i polifenolowych między mikropędami *S. apiana* a liśćmi rośliny gruntowej (Ryc. 14). W pędach *in vitro* zidentyfikowano 6 połączeń naturalnych, tj.: kwas rozmarynowy, karnozol, hesperydyna, rosmanol, kwas karnozowy oraz kryptotanszinon (Ryc. 14; Tab. 5), natomiast tylko dwa pierwsze z wymienionych metabolitów wtórnych występowały, w opisywanym surowcu, w ilościach przekraczających 5 mg g⁻¹ DW (Tab. 6). Co ciekawe, kryptotanszinon, obecny w śladowych ilościach w mikropędach szaławii białej (Ryc. 14), został zidentyfikowany w częściach nadziemnych gatunku po raz pierwszy (Hu i in., 2022; Lee i in., 2022). Generalnie, możliwość biosyntezy tanszironów przez organy nadziemne roślin była opisywana dla bardzo ograniczonej liczby gatunków szaławii, w tym *S. przewalskii* Maxim. i *S. miltiorrhiza* Bunge (Li i in., 2010).

Oznaczenia chromatograficzne przeprowadzone na ekstraktach metanolowych z mikropędów *S. apiana* wykazały że omawiane kultury charakteryzowały się bardzo wysoką produkcją kwasu

rozmarynowego (68,81 mg g⁻¹ DW), co stanowi ok. 3,6-krotny wzrost zawartości tego związku względem rośliny gruntowej (18,96 mg g⁻¹ DW) (Tab. 6). Co ważne, osiągnięte w biomasie wartości przewyższają również te obliczone dla *Mentha spicata* (58,5 mg g⁻¹ DW), opisywanej jako gatunek niezwykle bogaty w powyższy metabolit (Hajimehdipoor i in., 2012). W przypadku drugiego z dominujących, w mikropędach szałwii białej, związku – karnozolu, jego zawartość w kulturach *in vitro* okazała się być 1,47-krotnie wyższa względem badanych liści rośliny gruntowej. Uzyskane wyniki są odmienne do rezultatów wcześniejszych eksperymentów nad mikropędami *S. officinalis* L., gdzie kultywacja, w warunkach *in vitro*, wiązała się ze spadkiem zawartości wspomnianego metabolitu wtórnego w biomasach (Grzegorzcyk i in., 2005).

Otrzymane w toku projektu doktorskiego wyniki świadczą o tym, że mikropędy szałwii białej stanowią potencjalnie, nowe, wydajne źródło biomas do otrzymywania dwóch metabolitów charakterystycznych dla badanej rośliny, tj. kwasu rozmarynowego i karnozolu.

Przechodząc do kolejnych, wyprowadzonych, w ramach prac biotechnologicznych, biomas, a mianowicie kultur kalusowych, namnażanych na podłożu SH_{stand} oraz MS_{stand}, to niestety charakteryzowały się one znacznie uboższym profilem metabolicznym (Ryc. 15; Tab. 6). Wspomniane tkanki przyranne zachowały zdolność do biosyntezy jedynie kwasu rozmarynowego na poziomie, odpowiednio: 5,60 i 1,92 mg g⁻¹ DW. Przytoczone wyniki są zbliżone do rezultatów wcześniejszych badań nad kulturami parenchymatycznymi z rodzaju *Salvia* (Huang i van Staden, 2002; Krajewska-Patan i in., 2007; Wu i in., 2016). Brak możliwości biosyntezy kwasu karnozowego i karnozolu lub bardzo niskie ich zawartości, przy zachowanej zdolności do produkcji kwasu rozmarynowego, w kalusie pochodzącym z fragmentów hipokotylowych sterylnych siewek, opisano również dla *S. officinalis* (Grzegorzcyk i in., 2005). Jednocześnie, przeciwnie do podanych powyżej danych, tkanka przyranna, pochodząca z fragmentów liści *S. milthiorizza*, zachowała zdolność do biosyntezy znacznych ilości tanszidonów (do 4,59 mg g⁻¹ DW) (Wu i in., 2003). Uzyskane rezultaty sugerują, że akumulacja metabolitów wtórnych z grupy diterpenoidów, pochodnych abietanu, w omawianych kulturach *in vitro*, jest wypadkową charakterystyki gatunkowej rośliny oraz stopnia zróżnicowania tkankowego.

Ze względu na zdolność do biosyntezy jedynie niewielkich ilości kwasu rozmarynowego oraz trudności technologicznych w otrzymaniu stabilnej zawiesiny, opisane w rozdz. 2.2.1.2.2.1, zaniechano dalszych prac doświadczalnych nad kulturami tkanki przyrannej szałwii białej.

Ocena potencjału biosyntetycznego korzeni odciętych i transformowanych *S. apiana* w zakresie nietlotnych terpenów i polifenoli oraz porównanie ich profili metabolicznych z zespołem połączeń naturalnych w roślinie gruntowej

Analizy fitochemiczne uzyskanych kolekcyjnych korzeni odciętych (medium SH_{IBA1,0}) oraz transformowanych (pożywka SH₀) *S. apiana*, a także części podziemnych badanego gatunku z upraw gruntowych (rozdz. 3.2.1), wykazały wyraźne zmiany w zespole biosyntezy terpenowych i polifenolowych w kulturach *in vitro* względem tych, pozyskanych ze środowiska naturalnego.

W wyciągu metanolowym, pochodzącym z surowca gruntowego, stwierdzono obecność 6 diterpenoidów typu abietanu (Ryc. 16), przy czym dominującym składnikiem ocenianej frakcji był kryptotanszinon (3,71 mg g⁻¹ DW) (Tab. 5 i 7). Dla porównania, w korzeniach rośliny gruntowej *S. miltiorrhiza*, charakteryzującej się nadekspresją genów HMGR2, regulujących produkcję tanszinoń, wykazano stężenie opisywanego metabolitu wtórnego na poziomie 9,17 mg g⁻¹ DW (Majewska i in., 2022). Powyższe dane wskazują, że szalwią białą można rozpatrywać jako alternatywne, wobec szalwii czerwonokorzeniowej, nieco uboższe źródło tego związku. W otrzymanych, w ramach projektu doktorskiego, wyciągach z korzeni *S. apiana* brak natomiast metabolitów wtórnych należących do polifenoli, mimo że wcześniej w organach podziemnych szalwii białej identyfikowano tego typu związki (Hu i in., 2022).

Niezwykle zaskakujący okazał się wynik analizy chromatograficznej ekstraktów z korzeni anatomicznych badanego gatunku, pochodzących z kultur *in vitro* (Ryc. 16; Tab. 5). Stwierdzono, że charakteryzują się one profilem metabolicznym skrajnie odmiennym od korzeni z upraw gruntowych. Jako dominujący składnik w badanej matrycy roślinnej został zidentyfikowany kwas rozmarynowy (17,22 mg g⁻¹ DW – Ryc. 16; Tab. 7). Ta pochodna fenylopropanoidowa występuje, w znacznych stężeniach, w częściach nadziemnych rodzaju *Salvia* (marker chemotaksonomiczny dla podrodziny Nepetoideae), natomiast w korzeniach szalwii, w tym również w organach podziemnych *S. apiana*, syntezowana jest w mniejszych ilościach (Stafiniak i in., 2021; Hu i in., 2022). W testowanej biomase korzeni odciętych szalwii białej obecne były także inne fenolokwasy: kwas salwianolowy F oraz heksozyd kwasu sinapowego (Ryc. 16).

W otrzymanym wyciągu z korzeni anatomicznych nie stwierdzono natomiast obecności typowych, dla części podziemnych szalwii białej, pochodnych nor-abietanu, takich jak: kryptotanszinon, tanszinon 2A oraz miltiron. Omawiana biomasa nie akumulowała również kwasu karnozowego oraz rosmanolu, które zostały zidentyfikowane wcześniej w korzeniach szalwii białej, pochodzących z gruntu (Hu i in., 2022). Powyższe wyniki sugerują istotne zmiany transkryptyczne i metaboliczne u roślin rosnących w warunkach *in vitro*, jednakże dokładny mechanizm regulujący, leżący u podstaw tych zmian, nie został dotychczas opisany w literaturze. Należy zauważyć, że uzyskane w projekcie doktorskim rezultaty badań są dosyć zaskakujące, jako że korzenie *S. miltiorrhiza*, wprowadzone do kultur *in vitro*, zachowują zdolność do akumulacji tanszinoń (Shimomura i in., 1991).

Jak już wspomniano, w prowadzonych analizach fitochemicznych, zbadano także, z uwagi na oceniany profil metaboliczny, wyciągi metanolowe otrzymane z korzeni transformowanych szalwii białej. W testowanych kulturach stwierdzono, analogicznie jak w przypadku korzeni odciętych, ubogi zespół polifenoli oraz całkowity brak produkcji diterpenoidów (Ryc. 17). Wśród zidentyfikowanych związków dominował kwas rozmarynowy (Tab. 5). Klony TL1-2 charakteryzowały się nieznacznie wyższą zawartością powyższego metabolitu (12,97-15,32 mg g⁻¹ DW) wobec transformantów TA1-3 (9,83-12,76 mg g⁻¹ DW). Warto zauważyć, że korzenie odcięte szalwii białej nadal pozostawały nieznacznie bogatszym źródłem tego połączenia naturalnego (17,22 mg g⁻¹ DW). Uwzględniając

wysokie współczynniki przyrostu transformantów ($G_i \approx 1000\%$; Tab. 7), należy się jednak spodziewać wysokiej produktywności kwasu rozmarynowego w omawianym systemie *in vitro*. Warto również dodać, że przeprowadzona analiza chromatograficzna otrzymanych korzeni transformowanych, uwzględniająca syntezowane związki naturalne, była pierwszym etapem w selekcji klonu przeznaczonego do dalszych prac biotechnologicznych.

W rezultacie należy stwierdzić, że proces transformacji nie przyczynił się do otrzymania bardziej złożonych matryc korzeniowych w zakresie produkowanych związków. Podobne zjawisko opisano również dla *S. bulleyana* Diels, która w częściach podziemnych posiada układy enzymatyczne niezbędne do biosyntezy tanszynonów. Transformanty tego gatunku, otrzymane poprzez zainfekowanie materiału roślinnego szczepami *A. rhizogenes* A4, również produkowały jedynie kwasy fenolowe, z kwasem rozmarynowym jako związkiem dominującym (Li i in., 2010; Wojciechowska i in., 2020). Powyższe wyniki sugerują zatem, że transformacja szaławii przy pomocy wektora bakteryjnego *A. rhizogenes* nie stanowi skutecznej metody stymulacji produkcji metabolitów wtórnych z grupy nietlotnych terpenów i polifenoli w kulturach *in vitro* wspomnianych gatunków.

Podsumowując, w ramach projektu doktoranckiego, zoptymalizowano warunki analizy jakościowej oraz ilościowej, metodą HPLC-DAD/ESI-MS, nietlotnych terpenów oraz polifenoli, charakterystycznych dla szaławii białej. Posłużyły one następnie do badań porównawczych wszystkich kultur kolekcyjnych *S. apiana* oraz rośliny gruntowej w zakresie profili metabolicznych powyższych zespołów połączeń naturalnych. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono istotne różnice metaboliczne między nadziemnymi i podziemnymi organami badanego gatunku, a kulturami *in vitro*, różniącymi się w zakresie statusu morfotycznego. Ogólnie wykazano, że pod względem jakościowym roślina gruntowa syntezuje najbogatszy zespół metabolitów wtórnych z badanych klas, jednak to biomasy pędowe akumulowały znacznie więcej kwasu rozmarynowego oraz karnozolu przez co mogły być rozważane jako nowe źródło omawianych połączeń. W przeciwieństwie do mikropędów, zarówno korzenie odcięte jak i włośnikowate, w stosunku do rośliny macierzystej, całkowicie zmieniły profil metaboliczny, stając się wybiórczym źródłem kwasu rozmarynowego, nie występującego w organach podziemnych testowanej szaławii białej (Ryc. 16-17). Zaskakujący brak obecności nietlotnych terpenów w korzeniach *in vitro* wymaga przeprowadzenia dalszych badań na poziomie molekularnym. Należy dodać, że sam proces transformacji nie miał zasadniczego wpływu na opisane zjawisko, a mógł jedynie powodować zwiększenie ogólnej produktywności kwasu rozmarynowego w systemie roślinnym z uwagi na intensywny przyrost biomasy. Również kalusy syntezowały wybiórczo kwas rozmarynowy, ale w przeciwieństwie do korzeni, uzyskane w tkankach przyrannych *S. apiana* niewielkie ilości niniejszego metabolitu, nie dorównujące nawet poziomem oznaczonym w roślinie gruntowej, wykluczyły je z dalszych badań biotechnologicznych. Na zakończenie należy dodać, że zoptymalizowana metoda analizy chromatograficznej nietlotnych terpenów i polifenoli przyczyniła się nie tylko do opracowania profili metabolicznych poszczególnych matryc roślinnych, ale zgodnie z planem badawczym była następnie wykorzystana do fitochemicznych analiz skринingowych kultur korzeni i pędów poddawanych kolejnym zabiegom doświadczalnym.

2.3.2 Analiza fitochemiczna olejków eterycznych z kultur *in vitro* *S. apiana* oraz z upraw gruntowych

Jak już wspomniano, badania fitochemiczne dotyczące kultur kolekcyjnych, a także wybranych biomas (mikropędy i korzenie) namnażanych w hodowlach ciągłych, w tym w bioreaktorach, realizowano zarówno w zakresie nielotnych związków terpenowych oraz polifenolowych (HPLC-DAD-ESI/MS), jak i olejku eterycznego (GC/MS i GC/FID).

W drugim z przedstawionych powyżej obszarów doświadczalnych, dotyczącym frakcji lotnych, kultury kolekcyjne *S. apiana* oraz rośliny gruntowe (rozdz. 3.1.8.2-3.1.8.3) poddano procedurom izolacyjnym, a następnie chromatograficznym analizom jakościowym i ilościowym (GC, rozdz. 3.2.3.1.2), w celu potwierdzenia (liście gatunku macierzystego) i scharakteryzowania (biomasy *in vitro*) zdolności wspomnianych matryc do akumulacji olejku eterycznego. Równoległe wspomnianym badaniom, w celach porównawczych, poddano również liście szalwii lekarskiej (*S. officinalis* L.) używane w lecznictwie oficynalnym jako podstawowe źródło frakcji lotnej, charakteryzującej się szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowych i przeciwzapalnych (Grdiša i in., 2015; European Medicines Agency, 2016). Ograniczenia w wykorzystaniu powyższego olejku w medycynie, w tym do użycia wewnętrznego, wynikają, jak powszechnie wiadomo, z obecności, w zespole lotnych terpenów, toksycznego tujonu (nawet 70%) (Craft i in., 2017). Stąd trwają poszukiwania surowca syntezującego olejek o podobnym działaniu, ale pozbawionego lub akumulującego niskie stężenia opisywanego monoterpenu. Jak już wspomniano, dane literaturowe wskazują na endemiczną szalwię białą jako obiecujące źródło frakcji lotnej, pozbawione tujonu, charakteryzujące się jednak bardzo ograniczoną dostępnością. Przeprowadzone chromatograficzne analizy porównawcze olejków z trzech matryc: liście szalwii lekarskiej i białej oraz mikropędów *S. apiana*, wyprowadzonych z drugiego z omawianych gatunków, pozwoliły na rozpatrywanie uzyskanej, po raz pierwszy, kultury *in vitro* w szerokim kontekście użytkowym oraz proponowanie wniosków o charakterze ogólnym.

Prezentowane badania fitochemiczne realizowano w trzech etapach, stanowiących następnie komplet procedur wykorzystywanych w fazie *downstream* procesu biotechnologicznego otrzymywania frakcji lotnej z mikropędów *S. apiana* w instalacjach o charakterze bioreaktorów (rozdz. 3.1.9.3). Pierwszy z nich dotyczył doboru warunków suszenia testowanych matryc roślinnych, uwzględniając ograniczoną trwałość związków terpenowych, drugi – izolacji olejku eterycznego z badanych próbek roślinnych, a ostatni – trzeci – obejmował jakościową oraz ilościową analizę chromatograficzną poszczególnych frakcji lotnych w zakresie mono- i seskwiterpenów.

2.3.2.1 Przygotowanie surowców roślinnych do badań fitochemicznych

W pierwszym etapie doświadczeń nad optymalizacją wspomnianych procedur fitochemicznych, skoncentrowano się, bazując na dostępnym piśmiennictwie, na doborze metody przygotowania biomas roślinnych do izolacji frakcji lotnych (rozdz. 3.2.1).

Dotychczas nie realizowano badań dotyczących wpływu suszenia na zawartość i skład chemiczny olejku eterycznego w szaławii białej, natomiast zbliżony skład chemiczny frakcji lotnych w całym rodzaju *Salvia* oraz istnienie podobnych struktur anatomicznych, związanych z biosyntezą mono- i seskwiterpenów (m. in. 8-komórkowe włoski gruczołowe typu *Labiatae*), umożliwiają wykorzystanie standardów postępowania stosowanych dla innych gatunków szaławii (Tibaldi i in., 2005; Sadowska i in., 2017; Boutebouhart i in., 2019; Jebri i in., 2023). Prace optymalizacyjne, w tym zakresie, opisane w piśmiennictwie, obejmują przede wszystkim wpływ na jakość olejku wyższych, stosowanych w przemyśle, temperatur suszenia surowca, tzn. przekraczających 40°C (Tibaldi i in., 2005; Mirjalili i in., 2019; Jebri i in., 2023). Eksperymenty opisujące wykorzystanie niższych wartości temperaturowych w obróbce pozbiorczej materiału roślinnego dotyczą procesów prowadzonych w cieniu i w przewiewie. Dotychczas wykazano, że poddawanie matryc roślinnych obróbce termicznej w temp. powyżej 40°C, w celu pozbycia się wody z surowców, prowadzi do spadku zawartości substancji aktywnych biologicznie w olejkach, ze szczególnym, negatywnym wpływem na zawartość monoterpenów (Hazrati i in., 2021). Wynika to ze sposobu magazynowania olejków eterycznych w rodzaju Lamiaceae we włoskach gruczołowych na powierzchni liści, zatem ryzyko ich odparowania z wodą podczas suszenia jest wysokie. Prowadzenie powyższego procesu w niższej temperaturze, szczególnie dla surowców o wysokim udziale monoterpenów we frakcji lotnej, zabezpiecza materiał roślinny przed nadmierną utratą i rozkładem składników terpenowych (Mokhtarikhah i in., 2020). Wykazano również negatywny wpływ procesu liofilizacji matryc roślinnych na ich skład w zakresie mono- i seskwiterpenów (Jesionek, Łuczkiwicz, i in., 2019). Powyższa metoda uznana powszechnie za ochronną względem większości wtórnych metabolitów (ElNaker i in., 2021) znacznie zubażała skład jakościowy oraz ilościowy frakcji lotnej w ziele oraz mikropędach *Ledum palustre* L. Wykazano, że zjawisko to dotyczyło zarówno związków mono- jak i seskwiterpenowych (Jesionek, Łuczkiwicz, i in., 2019).

Z uwagi na powyższe, zdecydowano się suszyć próbki roślinne w suszarce o wymuszonym obiegu powietrza, w 30°C, przez 24 h (rozdz. 3.2.2), a następnie poddać je procedurom izolacyjnym. Powyższy tok postępowania wykorzystano zarówno do eksperymentów na etapie typowania „superproducentów”, jak i przy realizacji procesów *downstream* w większej skali, dla kultur bioreaktorowych szaławii białej.

2.3.2.2 Wybór metody izolacji olejków eterycznych

Kolejny etap prac fitochemicznych obejmował wybór metody izolacji olejku eterycznego z badanych matryc roślinnych oraz ustalenie zawartości frakcji lotnych we wszystkich biomasach (liście szaławii lekarskiej i białej oraz kolekcyjne kultury *in vitro* tegoż gatunku) (rozdz. 3.2.1).

Klasyczną i jednocześnie zalecaną przez Farmakopeę Polską (Farmakopea Polska VII, 2016) techniką otrzymywania frakcji lotnej z *Salviae officinalis folium*, zarówno w kontekście preparatyki jak i analityki, jest hydrodestylacja w aparacie Clevengera. Zastosowanie powyższej procedury w prezentowanych badaniach wydaje się właściwe, biorąc pod uwagę testowanie surowca roślinnego o

cechach morfologicznych i anatomicznych (lokalizacja i budowa struktur wydzielniczych produkujących olejek eteryczny), zbliżonych do szaławii lekarskiej. Alternatywne, współczesne techniki bezrozpuszczalnikowej ekstrakcji, stosowane w badaniach nad lotnymi terpenami (mikroekstrakcja do fazy stałej – SPME oraz ekstrakcja CO₂ w stanie nadkrytycznym) jakkolwiek posiadają szereg zalet, to nie pozwalają na ocenę całkowitej zawartości frakcji lotnych w badanych próbkach roślinnych (Rassem i in., 2016). Jest to szczególnie istotne w przypadku roślinnych kultur *in vitro*, do oceny przydatności farmaceutycznej namnożonych biomas (Jiang i in., 2016; Rassem i in., 2016). Należy również dodać, że hydrodestylacja w aparacie Clevengera jest także szeroko stosowana w eksperymentach nad roślinnymi kulturami tkankowymi rodzaju *Salvia* przeznaczonymi do produkcji lotnych terpenów (Jain i in., 1991; Santos-Gomes i Fernandes-Ferreira, 2003; Avato i in., 2005; Bassolino i in., 2015).

Na bazie omawianej kwerendy literaturowej (Tibaldi i in., 2005; Miguel i in., 2011; Baj i in., 2013; Ali i in., 2015) oraz doświadczenia własnego Promotor (Jesionek, Łuczkiwicz, i in., 2019) wybrano więc hydrodestylację w aparacie Clevengera jako metodę izolacji olejków eterycznych z biomas szaławii białej, zarówno na etapie selekcji „superproducentów”, jak i podczas przebiegu procedur *downstream* w bioreaktorowych kulturach niniejszego gatunku.

W tym celu, suche biomas *in vitro* *S. apiana*, tzn. kolekcyjne kultury kalusów (media wzrostowe SH_{stand} i MS_{stand}), mikropędów (pożywka SH_B) oraz korzeni odciętych (podłoże SH_{IBA1,0}) i transformowanych TA1-3 i TL1-2 (medium SH₀) poddano hydrodestylacji w aparacie Clevengera, podobnie jak liście roślin gruntowych *S. apiana* oraz *S. officinalis*, zebrane w okresie kwitnienia w Ogrodzie Roślin Lecznicych przy Katedrze Farmakognozji GUMed i wysuszone w oparciu o metodę zastosowaną dla biomas *in vitro* szaławii białej (rozdz. 3.2.2). Procedura destylacyjna trwała 3h, licząc od momentu uzyskania pierwszej kropli kondensatu, a zastosowana proporcja surowca roślinnego oraz wody, wynosząca 1:20, była stała w przypadku każdej badanej próbki roślinnej (rozdz. 3.2.3.1.1).

W wyniku przeprowadzonych badań (Tab. 9), stwierdzono, że zdolnością do biosyntezy mierzalnych ilości olejku eterycznego, wśród kultur kolekcyjnych, charakteryzują się jedynie mikropędy omawianego gatunku. Zgodnie z oczekiwaniami, frakcje lotne występowały także w liściach rośliny gruntowej *S. apiana* i *S. officinalis*.

Przeprowadzona, w aparacie Clevengera, hydrodestylacja wysuszonych liści rośliny gruntowej *S. apiana* pozwoliła na otrzymanie jasnożółtego olejku eterycznego o charakterystycznym eukaliptusowym zapachu. Jego zawartość, w badanej matrycy roślinnej, wynosiła 4,32% i była to wartość wyższa od opisanych dotychczas w literaturze (0,6-3,8%; Krol i in., 2022). Obserwowana różnica może wynikać z dużej zmienności składu jakościowego oraz ilościowego połączeń terpenowych w obrębie badanego taksonu, co jest cechą typową dla omawianych roślin. Związane jest to m.in. z wpływem czynników edaficznych oraz etapu rozwoju zebranego surowca na jego metabolom (Giannouli i Kintzios, 2000). Niemniej tak wysoka zawartość frakcji lotnej świadczy o dużym potencjale powyższego taksonu jako surowca olejkowego.

Dla porównania, opisane dotychczas gatunki szalwii, charakteryzujące się najwyższymi stężeniami zespołu lotnych terpenów, w rodzaju *Salvia*, to: *S. officinalis* (1,2-3,7%) oraz *S. fruticosa* (0,25%-4,00%) (Jug-Dujaković i in., 2012; Grdiša i in., 2015; Cvetkovikj i in., 2015). Przeprowadzone, w prezentowanej pracy doktorskiej, badania zawartości olejku eterycznego w liściach szalwii lekarskiej (Tab. 9), pozyskanych z Ogrodu Roślin Leczniczych GUMed (2,35%), mieszczą się w zakresie stężeń podanych w wymienionych powyżej pozycjach literaturowych, aczkolwiek jest to ilość 1,8-krotnie niższa niż zbadana dla liści gruntowych *S. apiana* (Tab. 9). Stanowi to potwierdzenie danych literaturowych wskazujących na nawet 2,3-krotnie wyższą zawartość frakcji lotnej w szalwii białej w porównaniu do *S. officinalis* (Ali i in., 2015).

Przeprowadzona hydrodestylacja, w aparacie Clevengera, wysuszonej biomasy mikropędów *S. apiana* pozwoliła również na otrzymanie żółtego olejku eterycznego o charakterystycznym eukaliptusowym zapachu. Wskazuje to na zachowanie zdolności do biosyntezy frakcji lotnej przez ten gatunek w warunkach kultur pędów. Tym samym potwierdzono wcześniejsze obserwacje mikroskopowe omawianych tkanek, świadczące o wykształceniu w nich włosków wydzielniczych, zdolnych do akumulacji lotnych terpenów (rozdz. 2.2.1.2.3). Możliwość produkcji olejków eterycznych przez biomasy *in vitro* została opisana także dla innych taksonów tego rodzaju (Jain i in., 1991; Avato i in., 2005; Bassolino i in., 2015; Kozłowska i in., 2022).

Zawartość frakcji lotnej w mikropędach szalwii białej była 3,4-krotnie niższa niż w roślinie gruntowej, testowanej w ramach prowadzonych eksperymentów. Mimo tych ograniczeń, stężenie olejku eterycznego w biomacie *in vitro* mieści się w zakresie właściwym dla części nadziemnych tego gatunku, pozyskiwanych ze środowiska naturalnego (0,6-3,8%) (Krol i in., 2022). Można zatem uznać, że otrzymane kultury kolekcyjne posiadały, w porównaniu z pozostałymi tkankami, cechy „superproducentów” i jako takie zostały przeznaczone do dalszych prac biotechnologicznych mających na celu dalszą optymalizację warunków ich namnażania, w tym rozszerzenie doświadczeń na eksperymenty prowadzone w bioreaktorach oraz wykorzystanie strategii elicytacji do dalszej stymulacji biosyntezy lotnych terpenów.

Tab. 9. Zawartość olejku eterycznego w biomasach *in vitro* i surowcach gruntowych *S. apiana* (liście, korzeń) oraz *S. officinalis* (liście). Wartości przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.

Materiał roślinny	Pochodzenie	Zawartość olejku eterycznego [% v/m]
Mikropędy <i>S. apiana</i>	medium SH _B ; cykl wzrostowy 21 dni; Gi \approx 580%	1,27 \pm 0,10
Kalus SH <i>S. apiana</i>	medium SH _{stand} ; cykl wzrostowy 21 dni; Gi \approx 920%)	ND
Kalus MS <i>S. apiana</i>	medium MS _{stand} ; cykl wzrostowy 21 dni; Gi \approx 1020%)	ND
Korzeń odcięty <i>S. apiana</i>	medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 21 dni; Gi \approx 1070%	ND
Korzenie transformowane TL1 <i>S. apiana</i>	medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 1020%	ND
Korzenie transformowane TL2 <i>S. apiana</i>	medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 998%	ND
Korzenie transformowane TA1 <i>S. apiana</i>	medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 1002%	ND
Korzenie transformowane TA2 <i>S. apiana</i>	medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 926%	ND
Korzenie transformowane TA3 <i>S. apiana</i>	medium SH ₀ ; cykl wzrostowy 25 dni; Gi \approx 907%	ND
Liście <i>S. apiana</i> Jeps.	Surowiec gruntowy; zbiór latem 2018 r.; firma Deesis	4,32 \pm 0,07
Liście <i>S. officinalis</i> L.	Surowiec gruntowy, zbiór latem 2018 r. w Ogrodzie Roślin Leczniczych GUMed	2,35 \pm 0,11

ND – nie stwierdzono obecności olejku eterycznego

Biorąc pod uwagę wcześniejsze obserwacje mikroskopowe tkanki przyrannej *S. apiana*, kultywowanej na podłożu MS_{stand}, oraz dane literaturowe, wskazujące na organospecyficzność biosyntezy lotnych mono- i seskwiterpenów, brak w niej mierzalnych ilości olejku eterycznego wydaje się być konsekwencją parenchymatycznego charakteru uzyskanej biomasy. Co ciekawe, kalus SH, dla którego pod mikroskopem zaobserwowano sporadycznie wykształcone gruczoły olejkowe typu *Labiatae* (rozdz. 2.2.1.2.2), również nie produkował mierzalnej ilości frakcji lotnej. Wskazuje to na zbyt mały udział zróżnicowanej tkanki w biomasie kalusa, co nie pozwoliło na wyizolowanie olejku eterycznego metodą hydrodestylacji. Biorąc pod uwagę aspekt poznawczy powyższych doświadczeń, zasadne wydaje się w przyszłości zastosowanie również innych metod wyodrębniania lotnych terpenów, charakteryzujących się wysoką czułością i umożliwiających chociaż wstępnie, bardziej

precyzyjnie opisać profil metaboliczny otrzymanej tkanki przyrannej. Przykładowo, dla kalusa *S. dolomica* Codd., indukowanego z fragmentów liści i kultywowanego na podłożu MS, wzbogaconym regulatorem wzrostu 2,4-D, z wykorzystaniem techniki mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME), połączonej z chromatografią GC-MS, potwierdzono zdolność do biosyntezy lotnych terpenów, takich jak: α - i β -pinen oraz kamfen (Boix i in., 2013). Aczkolwiek sugerowane powyżej dodatkowe analizy kalusów *S. apiana* miałyby, jak już wspomniano, znaczenie poznawcze to nie byłyby istotne, z aplikacyjnego punktu widzenia, gdyż surowiec o tak małej zawartości olejku eterycznego nie mógłby być wykorzystany jako wartościowy system *in vitro* do jego produkcji.

W wyniku przeprowadzonej, w aparacie Clevengera, hydrodestylacji wysuszonych biomas korzeni odciętych oraz transgenicznych TL1-2 i TA1-3 szałwii białej, nie stwierdzono, w nich, zdolności do akumulacji lotnych terpenów (Tab. 9). Uzyskane rezultaty potwierdzają więc wcześniejsze prace z zakresu metabolomiki *S. apiana*, w których wykazano, że układy enzymatyczne do produkcji lotnych mono- i seskwiterpenów, obecne są jedynie w częściach nadziemnych omawianego gatunku (Hu i in., 2022; Lee i in., 2022). Dotychczas opisano w literaturze jedynie pojedyncze przypadki zdolności korzeni do biosyntezy frakcji lotnych i dotyczyły one takich gatunków jak: *S. milthiorizza* oraz *S. leriifolia* Benth. (Lou i in., 2014; Sarhadi i in., 2021). Wyizolowane, poprzez hydrodestylację w aparacie Clevengera, frakcje lotne z korzeni *S. leriifolia* charakteryzowały się wysokim udziałem diterpenoidów (>40%), w tym ferruginolu i abietatrienu (Sarhadi i in., 2021), stąd przeprowadzone w projekcie analizy fitochemiczne wszystkich kultur *in vitro* *S. apiana*, w tym korzeni, miały umocowanie w piśmiennictwie i nie były bezzasadne.

2.3.2.3 Porównawcza analiza jakościowa i ilościowa olejków eterycznych z biomas *S. apiana* i *S. officinalis* z wykorzystaniem chromatografii gazowej (GC-MS i GC-FID)

Otrzymane olejki eteryczne z mikropędów szałwii białej (kultura kolekcyjna, medium SH_B) oraz z liści roślin gruntowych *S. apiana* i *S. officinalis* przeznaczono do chromatograficznych badań jakościowych i ilościowych (GC/MS i GC/FID), celem określenia ich składu chemicznego. Analizy w powyższym zakresie wykonano we współpracy z prof. dr hab. inż. Bożeną Zabiegałą z Katedry Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej. Skład wraz z zawartością ilościową poszczególnych lotnych terpenów, pozyskanych z rośliny grunтовой oraz mikropędów *S. apiana*, podano w Tab. 10. W przypadku frakcji lotnej z liści *S. officinalis* ograniczono się jedynie do przedstawienia zawartości głównych metabolitów na Ryc. 18.

Olejek eteryczny, wyizolowany z liści *S. apiana*, charakteryzował się obecnością 43 metabolitów, przy czym największy udział w omawianym zespole miały związki monoterpenowe (94,99%), w tym: 1,8-cineol (72,74%), α -pinen (6,70%), β -pinen (5,55%), kamfora (1,11%), limonen (0,72%) i kamfen (0,39%) (Tab. 10). Wśród seskwiterpenów dominującymi połączeniami były: kariofilen (0,48%) i jego tlenek (0,17%). Prowadzone dotychczas analizy olejku eterycznego, wyodrębnionego z części nadziemnych szałwii białej, wskazują, że wśród związków występujących w omawianym surowcu w największej ilości można wymienić: 1,8-cineol (26,4-71,7%), kamforę (2,1-

21,7%), β -pinen (3,8-10,6%), α -pinen (5,1-10,1%), kamfen (0,4-5,5%), mircen (0,5-3,2%) oraz kariofilen (1,0-1,7%) (Borek i in., 2003, 2006; Takeoka i in., 2010; Ali i in., 2015). Wobec powyższego, skład frakcji lotnych, z matryc gruntowych *S. apiana*, otrzymanych w trakcie opisywanych prac fitochemicznych, odpowiadał danym literaturowym. Na szczególną uwagę zasługuje również brak w otrzymanym olejku eterycznym neurotoksycznego tujonu, w przeciwieństwie do frakcji lotnej pochodzącej z liści szalwii lekarskiej (31,8%) (Ryc. 18).

Olejek eteryczny, pochodzący z mikropędów szalwii białej, charakteryzował skład jakościowy, zbliżony do frakcji lotnej otrzymanej z rośliny macierzystej (37 związków; Tab. 10). Wśród monoterpenu, stanowiących 81,1% powyższej frakcji, dominowały: 1,8-cineol, α -pinen, β -pinen i kamfen, występujące również w testowanej, w ramach niniejszych eksperymentów, roślinie macierzystej. Różnice jakościowe dotyczyły jedynie związków występujących w niewielkich ilościach (<0,4%), m.in. w biomacie *in vitro* nie stwierdzono obecności α -terpineolu i *cis*-4-tujanolu. We frakcji lotnej, wyizolowanej z mikropędów wykazano również nieznacznie wyższe stężenie kamfory (1,63%) wobec liści rośliny gruntowej (1,11%). Analogiczne obserwacje odnotowano podczas kultywacji mikropędów innych gatunków z rodzaju *Salvia*: *S. fruticosa* (Arikat i in., 2004), *S. officinalis* (Santos-Gomes i in., 2003) i *S. rosmarinus* (Pistelli i in., 2013). Zaburzenia metabolizmu kamfory w mikropędach, prowadzące do wzrostu tego połączenia naturalnego w matrycach roślinnych, można tłumaczyć, w kulturach *in vitro*, brakiem wykształconych struktur korzeniowych i związanych z nimi organospecyficznymi dróg katabolizmu tego związku. Roślina gruntowa produkuje i gromadzi frakcję lotną w strukturach olejkowych znajdujących się na powierzchni liści, osiągając maksimum akumulacji produktu przy całkowicie rozwiniętych liściach. Spadek zawartości kamfory, w matrycach roślinnych, nasilający się w trakcie starzenia się liści, jest związany z jej przekształceniem – poprzez laktonizację – do związku rozpuszczalnego w wodzie, tj. 1,2-kamfolidu. W dalszej kolejności następuje konwersja tegoż do estru odpowiedniego hydroksykwasu [1-karboksymetylo-3-hydroksy-2,2,3-trimetylocyklopentan], który jest przemieszczany z liści do korzeni, a następnie wykorzystywany jako źródło węgla (Croteau i in., 1984, 1987; Funk i in., 1992; Santos-Gomes i Fernandes-Ferreira, 2003; Tholl, 2015).

Na Ryc. 18 porównano procentową zawartość głównych składników olejków eterycznych otrzymanych z przebadanych matryc roślinnych. Jak już wspomniano, frakcja lotna, uzyskana z mikropędów *S. apiana*, w przeważającej mierze odpowiadała składem tej w roślinie macierzystej, natomiast w olejku eterycznym, wyizolowanym z liści szalwii lekarskiej, 31,8% zespołu terpenów stanowią dwa izomery tujonu (Ryc. 18). Rodzaj oraz udział procentowy pozostałych składników omawianej frakcji lotnej układa się według następującej sekwencji: 1,8-cineol (12,73%), α -pinen (6,31%), kariofilen (4,89%), kamfen (2,63%), limonen (1,43%) oraz β -pinen (0,80%) i jest zbliżony do zespołu lotnych metabolitów w *S. apiana* (Król i in., 2022). Na podstawie wysokiej zawartości izomerów tujonu, obecnych w badanej matrycy roślinnej, można wnioskować, że szalwia lekarska, rosnąca w Ogrodzie Roślin Leczniczych GUMed, należy do chemotypu o dużej zawartości powyższego monoterpenu ($1,5\% \leq \alpha$ -tujon $\leq 27,1\%$ oraz $1,33\% \leq \beta$ -tujon $\leq 29,3\%$) (Craft i in., 2017). Jak już

wspomniano, wysoki udział tego metabolitu wtórnego w olejku eterycznym szałwii lekarskiej stanowi istotne ograniczenie w jej zastosowaniu terapeutycznym. Ze względu na neurotoksyczność tujonu istnieje zwiększone ryzyko wystąpienia skutków ubocznych podczas stosowania powyższego surowca (European Medicines Agency, 2012; Németh i Nguyen, 2020).

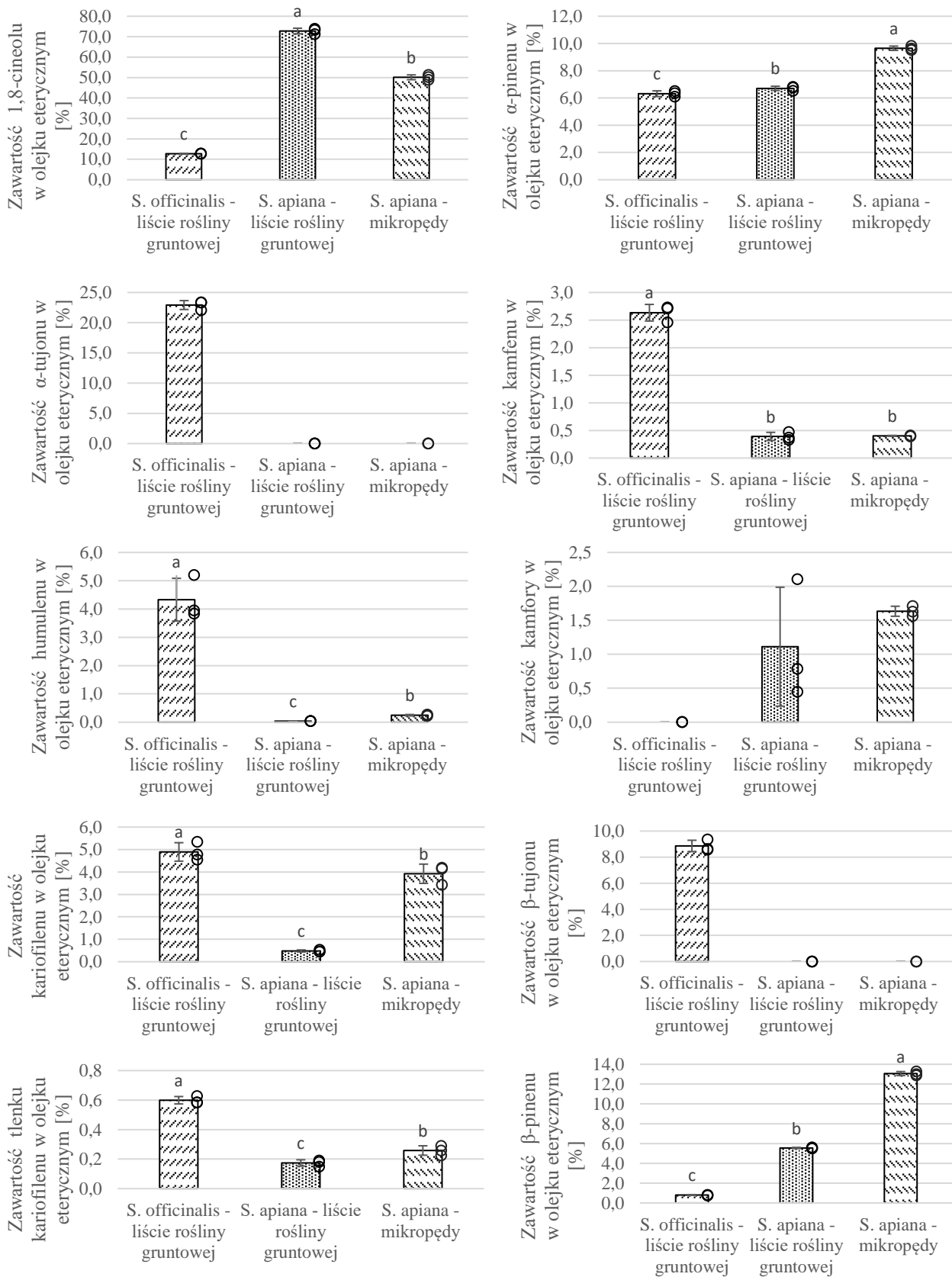
Z uwagi na powyższe, otrzymane mikropędy *S. apiana*, syntezujące 1,27% olejku eterycznego można wstępnie rozważyć jako alternatywne źródło frakcji lotnej do zastosowania w szeregu schorzeń, analogicznie jak olejek eteryczny *S. officinalis*, ale z większym marginesem bezpieczeństwa.

Podsumowując przeprowadzone prace fitochemiczne, w trakcie eksperymentów, wyznaczono procedurę suszenia matryc roślinnych *S. apiana* (suszarka z wymuszonym obiegiem powietrza, 24 h, 30°C) oraz wybrano metodę izolacji olejków eterycznych ze wspomnianych surowców (hydrodestylacja w aparacie Clevengera). Ponadto, określono potencjał metaboliczny biomas *in vitro* w zakresie produkcji zespołu lotnych metabolitów wtórnych (oznaczenia wolumetryczne), a także analiza chromatograficzna – GC-FID i GC-MS, przeznaczając ostatecznie mikropędy *S. apiana* do dalszych prac biotechnologicznych nad opracowaniem roślinnego systemu *in vitro* ze wskazaniem do produkcji olejku eterycznego, którego skład, jak wykazano, wydaje się bezpieczniejszy niż, wykorzystana powszechnie, w terapii oficynalnej, frakcja lotna z szałwii lekarskiej.

Tab. 10. Skład jakościowy i ilościowy olejku eterycznego, otrzymanego z mikropędów *S. apiana* (kultura kolekcyjna) oraz liści rośliny gruntowej.

Związek	Zawartość w olejku eterycznym [%]		
	RT [min.]	Roślina gruntowa	Mikropędy
α -pinen	5,701	6,701	9,649
Kamfen	5,945	0,394	0,402
β -pinen	6,408	5,550	13,062
β -mircen	6,523	2,191	1,890
Δ -3-karen	6,936	2,653	1,034
α -terpinen	7,037	ND	0,451
<i>p</i> -cymen	7,178	0,080	0,117
Limonen	7,255	0,715	0,613
1,8-cineol	7,384	72,744	50,125
<i>cis</i> -4-tujanol	7,555	0,334	ND
γ -terpinen	7,785	0,561	0,848
1-fenchol wz	8,344	0,236	0,294
Fenchol	8,882	0,038	0,022
Pinokarweol	9,356	0,082	0,132
<i>cis</i> -werbenol	9,412	0,023	0,288
Kamfora	9,481	1,112	1,634
Isoborneol	9,710	0,020	ND
1- α -terpinol	9,849	0,490	ND
terpinen-1-ol	10,063	0,595	0,223
Borneol	10,155	0,026	0,152
α -terpineol	10,294	0,361	ND
Citronellol	10,928	0,028	ND
Octan geranylu	13,742	0,058	0,124
γ -elemen	14,799	0,025	0,253
Kariofilen	16,644	0,479	3,921
Aristolon	15,001	0,103	3,200
β -guajen	15,112	0,025	0,461
α -humulen	15,228	0,035	0,246
γ -muurolen	15,598	0,040	0,245
Kadinan	16,038	0,182	1,031
β -bisabolen	16,087	0,099	0,260
Nerolidol-1	16,336	0,093	0,103
γ -selinen	16,593	0,034	0,243
4- <i>epi</i> -kubebol	16,709	0,087	0,165
Nerolidol-2	16,984	0,025	0,114
Kubedol	17,185	0,106	0,084
Tlenek kariofilenu	17,423	0,174	0,258
Cedrol	17,940	0,031	0,356
A- <i>epi</i> -kadinol + Humulen- 1,6-dien 3-ol	18,363	0,294	ND
β -selinenol	18,490	0,255	ND
α -kadinol	18,545	0,186	ND
α -bisabolol	18,886	0,498	2,132
Biformen	21,596	0,052	0,088
Abietatrien	24,273	ND	0,592
Ferruginol	27,557	0,087	1,914
SUMA		97,902	96,726
Monoterpeny-węglowodory		18,845	28,066
Monoterpeny utlenione		76,147	52,994
Seskwiterpeny-węglowodory		1,520	11,992
Seskwiterpeny utlenione		1,251	1,080

ND - nie stwierdzono obecności składnika olejku eterycznego



Ryc. 18. Porównanie składu jakościowego i ilościowego olejków eterycznych z mikropędów (medium SH_B) i liści roślin gruntowych *S. apiana* oraz *S. officinalis* (liście zebrane w Ogrodzie Roślin Leczniczych GUMed i wysuszone w 30°C przez 24h). Wartości przedstawione na rycinie stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.

2.4 Morfogeniczne kultury ciągłe *S. apiana*

Jak wspomniano we wstępie, zasadniczy cel badawczy projektu doktoranckiego obejmował otrzymanie systemów *in vitro* szaławii białej, mogących stanowić ciągłe źródło metabolitów wtórnych z grupy terpenów i polifenoli, o określonych własnościach terapeutycznych, potencjalnie aplikowalnych w leczeniu chorób cywilizacyjnych.

Zatem mając na względzie powyższe, w kontynuacji badań doświadczalnych opracowano warunki prowadzenia tzw. hodowli ciągłych wybranych morfogenicznych kultur szaławii białej, syntezujących polifenole (korzenie odcięte i transgeniczne) bądź lotne terpeny (kultura mikropędów). Zaplanowane eksperymenty realizowano zarówno w skali laboratoryjnej (kolby Erlenmeyera), jak i wielkolaboratoryjnej (bioreaktory), a poszczególne biomasy, rosnące w zmiennych warunkach, oceniano pod względem parametrów wzrostowych, charakteryzując również ich profile wzrostowe (rozd. 3.1.5). Dodatkowo, monitorowano zdolność wyselekcjonowanych tkanek do akumulacji wybranych klas związków terpenowych i polifenolowych. W pracach fitochemicznych, obejmujących badania skryningowe matryc roślinnych, pochodzących z wybranych etapów badań biotechnologicznych, posługiwano się procedurami analitycznymi wypracowanymi w toku eksperymentów, opisanymi w rozdz. 2.3.

W efekcie, opracowano, na poziomie *up-* i *downstream*, kompletne protokoły otrzymywania, w systemach *in vitro* *S. apiana*, wybranych metabolitów wtórnych bądź ich zespołów, z przeznaczeniem do szczegółowych badań w zakresie wyselekcjonowanych kierunków aktywności biologicznych, zaplanowanych w wyniku kwerendy literaturowej (Lu i Foo, 2002; Fu i in., 2013; Agatonovic-Kustrin i Morton, 2018; Kim i in., 2023; Mirza i in., 2023). W tym miejscu warto zaznaczyć, że ze względu na szeroki zakres prowadzonych eksperymentów, doświadczenia dotyczące stymulowania wtórnego metabolizmu w kulturach tkankowych, a także badania aktywności biologicznej syntezowanych połączeń naturalnych, przeprowadzono tylko na jednej, wybranej biomacie *S. apiana*, tj. na mikropędach, traktując je w tym względzie jako hodowlę modelową.

2.4.1 Kultura ciągła korzeni odciętych *S. apiana*: wzrost i profil metaboliczny

Wyprowadzoną, na wstępnym etapie eksperymentów biotechnologicznych, kulturę korzeni odciętych *S. apiana* (medium SH_{IBAL,0}), ze względu na znaczną juvenilność ($G_i \approx 1070\%$) oraz zachowaną zdolność do biosyntezy kwasu rozmarynowego (17,22 mg g⁻¹ DW – rozdz. 2.3.1.3), uznano za odpowiednią do realizacji doświadczeń, których nadrzędnym celem było otrzymanie roślinnego systemu *in vitro*, mogącego stanowić ciągłe źródło powyższego związku.

Na zaawansowanych etapach badań dotyczących optymalizacji procesu *upstream* w kulturach *in vitro*, modyfikacje składu pożywek doświadczalnych należą do podstawowych metod regulacji

zarówno pierwotnego, jak i wtórnego metabolizmu namnażanych biomas. Procedury, opisane w literaturze, obejmują zmiany jakościowe i ilościowe mediów wzrostowych w zakresie makro- i mikroelementów, źródeł węgla, a przede wszystkim regulatorów wzrostu (Hussain i in., 2022; Khanam i in., 2022). Ograniczenia czasowe projektu doktorskiego, spowodowały, że na opisywanym etapie doświadczeń postanowiono przetestować wybiórczo wpływ stężenia w pożywce, stosowanej w kulturach kolekcyjnych, auksyny, tj. kwasu indolilo-3-masłowego – IBA, na wzrost korzeni odciętych *S. apiana*. Modyfikując podłoże w zakresie zawartości IBA (0,0-5,0 mg L⁻¹ – rozdz. 3.1.9.1.2) zamierzano uzyskać maksymalną ilość biomasy z systemu *in vitro* podczas pojedynczego cyklu eksperymentalnego, co przełożyłoby się bezpośrednio na jego produktywność w odniesieniu do kwasu rozmarynowego. Należy zaznaczyć, że opisywany tok postępowania zalecany jest w wielu doniesieniach literaturowych (Jamwal i in., 2018, Espinosa-Leal i in., 2018, Hussain i in., 2022).

Prace eksperymentalne obejmowały także opracowanie profili wzrostowych korzeni odciętych *S. apiana*, namnażanych w różnym reżimie oświetleniowym (fotoperiod 16/8h, bądź kultura prowadzona w ciemności) oraz w pożywkach ze zmienną ilością auksyny (media SH_{IBA1,0} i SH_{IBA1,5}). Ustalenie, w cyklu wzrostowym, dynamiki przyrostu korzeni anatomicznych szałwii białej połączone ze skryningiem biomas w zakresie produkcji polifenoli.

Wymienione podejście metodyczne pozwoliło na realizację celu badawczego postawionego podczas prowadzenia eksperymentów biotechnologicznych, tj. opracowania wstępnych warunków do dalszej hodowli omawianych biomas w instalacjach wielkolaboratoryjnych, przy zastosowanej objętości roboczej urządzenia, wynoszącej 600 mL. Otrzymane kultury bioreaktorowe oceniano ze względu na osiągnięte parametry wzrostu i przeznaczono do jakościowej oraz ilościowej analizy fitochemicznej pod kątem zawartości związków polifenolowych (rozdz. 3.2.3.2).

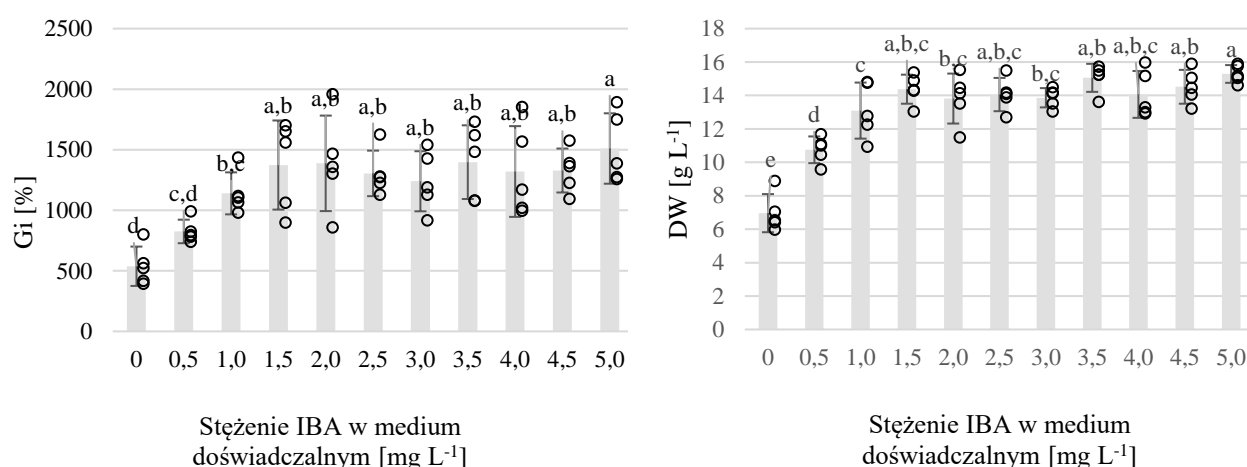
2.4.1.1 Optymalizacja warunków prowadzenia kultury ciągłej korzeni odciętych *S. apiana* w skali laboratoryjnej

2.4.1.1.1 Wpływ zawartości IBA w pożywce na parametry wzrostu kultur

Wstępną optymalizację wzrostu kolekcyjnych korzeni odciętych *S. apiana* (medium SH_{IBA1,0} – rozdz. 3.1.3) prowadzono, w warunkach kultur wytrząsanych, modyfikując zawartość IBA w poszczególnych pożywkach eksperymentalnych. W doświadczeniach, prowadzonych przy objętości roboczej wynoszącej 25 mL, zastosowano podłoże wzrostowe SH, suplementowane kwasem indolilo-3-masłowym w zakresie stężeń 0,0-5,0 mg L⁻¹, z różnicą pomiędzy poszczególnymi wariantami eksperymentalnymi wynoszącą 0,5 mg auksyny L⁻¹ (11 modyfikacji). Doświadczenie prowadzono przez 48 dni, w ciemności, na wytrząsarce rotacyjnej (rozdz. 3.1.4). *Inoculum* roślinne stanowiły kolekcyjne korzenie anatomiczne *S. apiana*, namnażane w podłożu SH_{IBA1,0} i zebrane w ostatnim, 21. dniu hodowli, które wykładano w ilości ok. 0,45 g do kolb Erlenmeyera zawierających media eksperymentalne.

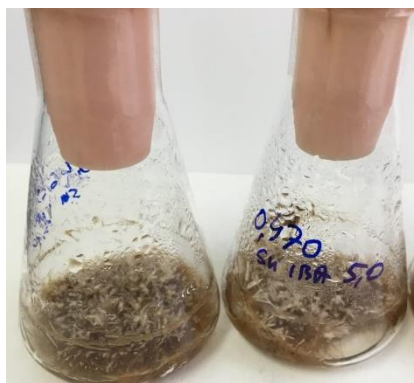
W wyniku przeprowadzonego cyklu badań stwierdzono, że w ostatnim dniu hodowli najwyższą osiąganą ilością suchej masy (DW = 14,3 g L⁻¹), a także najbardziej optymalnym współczynnikiem

przyrostu ($G_i = 1373,5\%$), przy jednoczesnej, zachowanej prawidłowej morfologii korzeni, charakteryzowała się biomasa inkubowana w podłożu SH o zawartości IBA wynoszącej $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Ryc. 19). W opisywanym przypadku cechy makroskopowe omawianych korzeni odpowiadały kulturze kolekcyjnej, charakteryzującej się obecnością licznych włósników o jasnobrązowej barwie, nie wykazujących tendencji do kalusowania, z zachowaną skłonnością do zawiązywania się w zwarte agregaty. Po zakończonym cyklu wzrostowym pożywka eksperymentalna pozostawała klarowna. Analogiczne obserwacje makroskopowe poczyniono dla wariantu doświadczalnego, w którym stężenie IBA w podłożu wynosiło $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, co odpowiadało warunkom hodowlanym w kulturze kolekcyjnej, przy czym w omawianym przypadku uzyskane parametry wzrostu korzeni *S. apiana* były nieznacznie niższe ($DW = 13,1 \text{ g L}^{-1}$; $G_i = 1139,8\%$ – Ryc. 19). W biomasach pochodzących z pożywek o zawartości auksyny niższej niż $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ oraz wyższej niż $3,5 \text{ mg L}^{-1}$, stwierdzono natomiast silną tendencję materiału roślinnego do kalusowania (Ryc. 20). Ze względu na powyższe, w dalszych badaniach stosowano dwa wybrane warianty medium doświadczalnego, tj. pożywkę SH, suplementowaną IBA w stężeniach $1,0$ lub $1,5 \text{ mg L}^{-1}$.



Ryc. 19. Porównanie parametrów wzrostowych [wartość suchej masy (DW) oraz współczynnik przyrostu (G_i)] kultury korzeni odciętych szałwii białej.

Doświadczenie prowadzono w pożywce SH, suplementowanej IBA w zakresie stężeń $0,0$ - $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, przez 48 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 5 prób eksperymentalnych \pm SD.



Ryc. 20. Kultura korzeni odciętych *S. apiana*, inkubowana w ciemności, w pożywce SH, suplementowanej IBA w stężeniu $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, w ostatnim, 48. dniu doświadczenia.

Przeprowadzone prace eksperymentalne wykazały także, że kultura korzeni odciętych *S. apiana* charakteryzuje się wysoką zmiennością w zakresie osiąganych parametrów wzrostu w obrębie jednego wariantu doświadczalnego. Średnie wartości DW i Gi dla matryc roślinnych pochodzących z tych samych, modyfikowanych pożywek (5 prób) obarczone były dużymi odchyleniami standardowymi, co świadczy o znacznej heterogenności kultury i stanowi wypadkową szeregu czynników egzogennej i endogennej (Malepszy, 2012). W oparciu o dane literaturowe to najprawdopodobniej ruch oscylacyjny wytrząsarki obrotowej, prowadzący do przemieszczania się agregatów korzeni wewnątrz kolb Erlenmeyera, generował siły tarcia. Naprężenia ścinające, działające na włókniki, oddziaływały w różnym stopniu na żywotność poszczególnych fragmentów całej biomasy. W efekcie, korzenie ulegały rozproszeniu i spontanicznej reagregacji, co wiązało się z nierównomierną dynamiką ich przyrostu.

Podsumowując, w przypadku kultury *in vitro* korzeni odciętych *S. apiana* zawartość auksyny IBA w medium wzrostowym wpływała istotnie na morfologię biomasy i osiągnięte przez nią parametry wzrostu. Stwierdzono, że optymalne stężenie badanego regulatora wzrostu w pożywce wynosi $1,0$ oraz $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Jednakże, charakterystyczna dla badanej tkanki roślinnej zdolność do agregacji powoduje, niezależnie od zawartości regulatora wzrostu w medium, wysokie odchylenia standardowe dla współczynników DW i Gi w obrębie jednego wariantu doświadczalnego.

2.4.1.1.2 Krzywe wzrostowe korzeni odciętych *S. apiana*

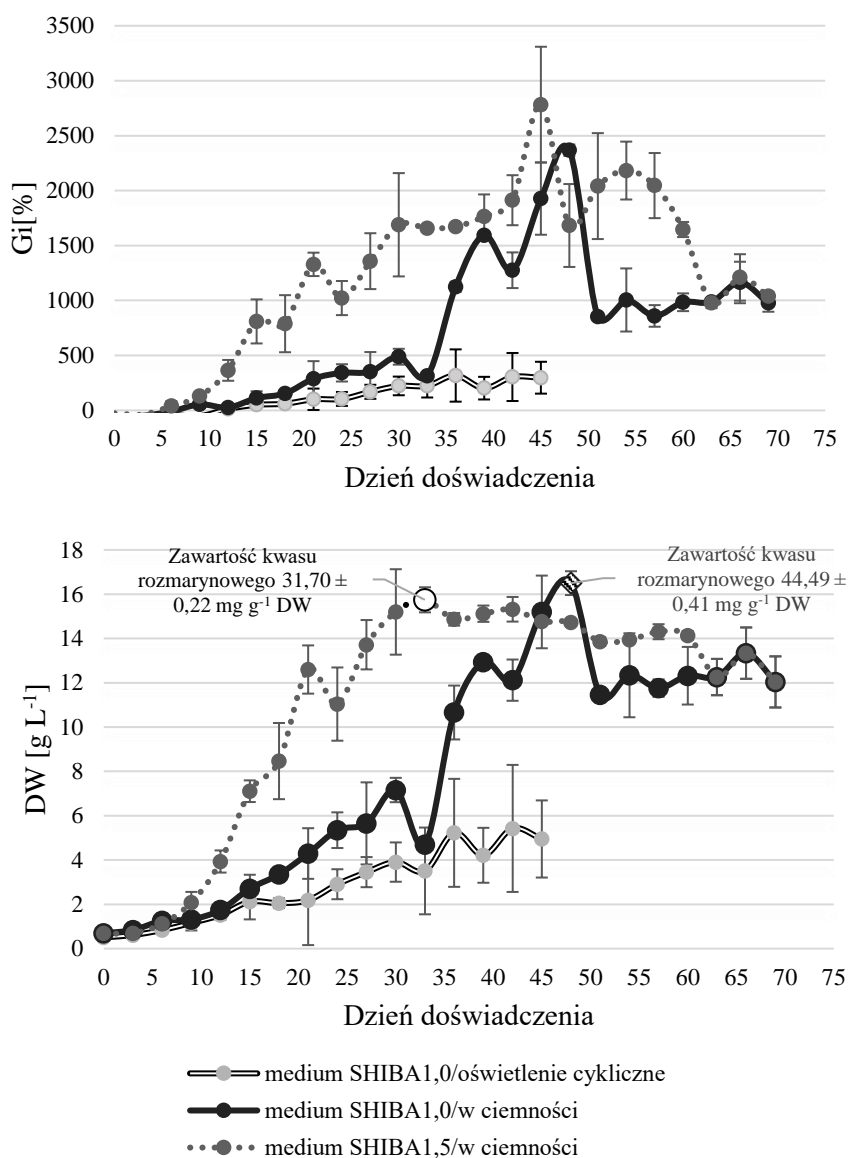
Profile wzrostowe omawianych korzeni odciętych, w warunkach kultury wytrząsanej, wykreślono na podstawie eksperymentów prowadzonych przy oświetleniu cyklicznym (16/8h) oraz w całkowitej ciemności, w mediach zmodyfikowanych w zakresie zawartości auksyny (pożywki SH_{IBA1,0} i SH_{IBA1,5} – ciemność, żywki SH_{IBA1,0} – oświetlenie cykliczne). Cykl doświadczalny obejmował nie krócej niż 45 dni i przebiegał według protokołu opisanego w rozdz. 3.1.9.1.3. Próbkę rosnących aktywnie korzeni zbierano co 3 dni, w trzech powtórzeniach i oznaczano dla nich parametry wzrostowe (Gi, DW). Dodatkowo, materiał roślinny pochodzący z dni, w których odnotowano

maksymalny przyrost korzeni (Ryc. 21), przeznaczono do analiz fitochemicznych, celem określenia w nim zawartości nietlotnych terpenów i polifenoli.

Eksperyment prowadzony w obecności lub przy braku światła (dwa warianty doświadczalne – rozdz. 3.1.9.1.3) pozwolił na ustalenie korzystnego, z uwagi na charakterystykę przyrostu, optymalnego reżimu oświetleniowego dla kultur korzeni odciętych szaławii białej (Ryc. 21). Korzenie anatomiczne, kultywowane w pożywce SH_{IBA1,0}, przy fotoperiodzie 16/8h, nie wykazywały istotnych negatywnych zmian makroskopowych, wskazujących na postępującą nekrozę (Ryc. 22), jednakże charakteryzowała je, w 45. dniowym cyklu, niewielka dynamika przyrostu. Profile wzrostowe, wykreślone na podstawie wartości Gi i DW, wykazały jedynie systematyczne przyrastanie korzeni, które odbywało się w wolnym tempie. Brak możliwości wyróżnienia na krzywej charakterystycznych dla kultur *in vitro* faz (opóźnienia, wzrostu wykładniczego, wzrostu liniowego, *plateau* oraz zamierania) wskazywał, że omawiany system korzeniowy *S. apiana*, należy do bardzo wolno przyrastających i tym samym charakteryzujących się niską wydajnością w zakresie ilości otrzymanej biomasy. W tym miejscu warto zaznaczyć, że wyznaczenie wszystkich faz w cyklu wzrostowym kultur, jest etapem poprzedzającym wprowadzenie tkanek roślinnych do instalacji wielkolaboratoryjnych i umożliwia zaprogramowanie procesu technologicznego, w tym dalszą sterowaną biosyntezę metabolitów wtórnych z zastosowaniem wybranych strategii biotechnologicznych. Dotychczas udowodniono, że w przeciwieństwie do metabolitów pierwotnych większość metabolitów wtórnych, do których należą połączenia o charakterze terpenów i polifenoli, jest syntezowana w biomasach roślinnych w fazie stacjonarnej wzrostu, gdy ustaje szybki wzrost tkankowy. W związku z tym zabiegi technologiczne stymulujące procesy powstawania tych związków prowadzi się głównie właśnie w powyższym okresie (Bourgaud i in., 2001). Jak już wspomniano, dla kultury korzeni odciętych *S. apiana*, w 45. dniowym cyklu eksperymentalnym, nie zauważono wyraźnie zarysowującego się *plateau* co może wskazywać, na przyszłe trudności w zlokalizowaniu przedziału czasowego, w trakcie którego należałoby przeprowadzać stosowne zabiegi biotechnologiczne, celem uzyskania podwyższonej produkcji wtórnych metabolitów. Z uwagi na powyższe oraz ogólnie słaby wzrost kultury (Gi = 297,7%; DW = 4,59 g L⁻¹ – Ryc. 21), uznano że obecność światła jest wyraźnie niekorzystna dla systemu wzrostowego korzeni anatomicznych szaławii białej i dalsze doświadczenia z udziałem omawianych kultur prowadzono w ciemności.

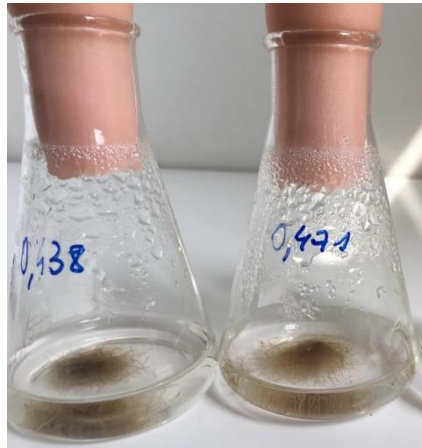
Krzywa wzrostowa, opracowana dla korzeni odciętych *S. apiana* namnażanych w ciemności, w podłożu SH_{IBA1,0}, również ma dość nietypowy przebieg. W opisywanym przypadku faza opóźnienia w kulturze trwa ok. 6 dni (Ryc. 21 oraz 23A), po czym omawiana biomasa podejmuje powolny wzrost nie mający charakteru wykładniczego (6-33 dzień eksperymentu; Ryc. 21 i 23B). W kolejnym okresie cyklu doświadczalnego (dni 33-48) mamy do czynienia z fazą wzrostu liniowego. W 48. dniu eksperymentu odnotowano, dla kultur korzeni anatomicznych namnażanych w pożywce SH_{IBA1,0}, najwyższe wartości Gi i DW, wynoszące, odpowiednio, 2367,85% oraz 16,5 g L⁻¹ (Ryc. 21). w tym czasie biomasa charakteryzowała się obecnością jasnobrązowych włóśników w peryferyjnych częściach

oraz występowaniem zwartych, rozrośniętych kępek korzeniowych, a pożywka w systemie *in vitro* zachowała klarowność (Ryc. 23C). W kolejnym okresie kultury (dni 48-69), podłoża przyjmowały stopniowo coraz ciemniejszą barwę, a korzenie w centrach sformowanych skupisk były śluzowate, co wskazywało na postępujące procesy nekrotyczne. Również wartości Gi i DW dla biomas stopniowo spadały ($Gi = 1039,1\%$; $DW = 12,0 \text{ g L}^{-1}$ – 69. dzień), wskazując, że badana kultura znalazła się w fazie zamierania, czyli końcowym etapie cyklu eksperymentalnego.

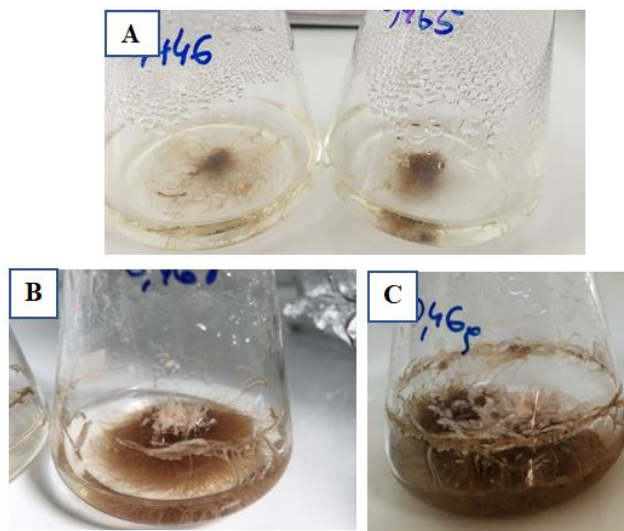


Ryc. 21. Profile wzrostowe wykreślone na podstawie współczynnika przyrostu (Gi) i wartości suchej masy (DW) dla kultury wytrząsanej korzeni odciętych *S. apiana*, w warunkach zaciemnienia oraz przy fotoperiodzie 16/8h (medium SHIBA1,0 i SHIBA1,5). Przedstawione wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.

Oznaczenia zawartości kwasu rozmarynowego: ○ - $31,70 \pm 0,22 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$; ◆ - $44,49 \pm 0,41 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$



Ryc. 22. Kultura korzeni odciętych *S. apiana*, inkubowanych przy oświetleniu cyklicznym (16/8h), w pożywce SH_{IBA1,0}, w ostatnim, 45. dniu doświadczenia.



Ryc. 23. Kultura korzeni odciętych *S. apiana*, inkubowanych w ciemności, w pożywce SH_{IBA1,0}, w 3. (A), 33. (B) oraz 48. (C) dniu doświadczenia.

Przedstawiony profil wzrostowy, wykreślony dla kultury wytrząsanej korzeni odciętych szalwii białej, inkubowanych w ciemności, w podłożu SH_{IBA1,5}, na podstawie wartości FW i Gi ma bardziej typowy, sigmoidalny przebieg (Ryc. 21). Charakteryzuje się znacznie krótszą fazą opóźnienia, po której następuje, od 3. dnia eksperymentu, wzrost wykładniczy, a następnie liniowy (dni 21.-33.). Maksimum przyrostu dla badanych tkanek obserwuje się w 45. dniu doświadczenia ($Gi = 2782,69\%$, $DW = 14,78 \text{ g L}^{-1}$ – Ryc. 21), jednakże, w niniejszym wariantcie hodowlanym, powyżej 40. dnia cyklu wzrostowego, w biomacie korzeni odnotowano nasilone zmiany nekrotyczne, manifestujące się jako ciemnobrązowe, śluzowate skupiska włósników w obrębie rdzenia kultur oraz obecność w nich drobnych kalusów

embriogenicznych. Morfologia opisywanych korzeni wskazuje więc na przejście biomas w fazę zamierania, mimo zachowanych ciągle wysokich wartości G_i (Ryc. 21), mogących świadczyć o trwaniu nieregularnego *plateau* będącego, jak już wspomniano, najważniejszym okresem w cyklu eksperymentalnym, mając na uwadze biosyntezę metabolitów wtórnych.

W trakcie namnażania korzeni odciętych *S. apiana* w ciemności, niezależnie od zawartości IBA w pożywkach, podobnie jak przy oświetleniu cyklicznym, nadal obserwowano utrzymujące się wysokie odchylenia standardowe dla wartości G_i i DW biomas obliczonych w tych samych dniach cyklu wzrostowego (3 próbki – Ryc. 21), co wskazuje na znaczny wpływ sił tnących w kolbach na przyrost i morfologię korzeni. Zjawisko to skłania do wdrożenia, do kultury korzeni odciętych *S. apiana*, bioreaktorów, których konstrukcja (mieszanie pneumatyczne – rozdz. 3.1.9.1.4.1) nie przyczynia się do powstawania silnych sił ścinających, minimalizując tym samym efekt związany z losowym rozrywaniem się skupisk biomas, redukując zmiany nekrotyczne w rdzeniach zwartych matryc roślinnych.

Jak już wspomniano, próbki roślinne charakteryzujące się największymi wartościami DW, pochodzące zarówno z wariantu doświadczalnego prowadzonego w medium $SH_{IBA1,0}$ (48. dzień eksperymentu; $DW = 16,5 \text{ g L}^{-1}$), jak i $SH_{IBA1,5}$ (33. dzień doświadczenia; $DW = 15,7 \text{ g L}^{-1}$), inkubowane w ciemności, przeznaczono również do badań fitochemicznych (rozdz. 3.2.3.2). Przeprowadzone analizy HPLC-DAD/ESI-MS wykazały, że testowane biomasy akumulowały wybiórczo, podobnie jak kultury kolekcyjne, jeden metabolit z grupy kwasów fenolowych, a mianowicie kwas rozmarynowy w ilościach, odpowiednio: $44,49 \pm 0,41$ oraz $31,70 \pm 0,22 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ (Ryc. 21). Należy również zauważyć, że były to wartości znacznie wyższe niż te zanotowane dla kultury kolekcyjnej ($17,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$). Z tego względu uznano za celowe kontynuowanie dalszych prac eksperymentalnych z udziałem omawianych tkanek, na poziomie instalacji bioreaktorowych, dążąc do otrzymania wysokowydajnego systemu *in vitro* w zakresie produkcji kwasu rozmarynowego.

Ze względu na opisaną powyżej charakterystykę niniejszych biomas korzeni odciętych szalwii białej, namnażanych w różnych warunkach hodowlanych, w pożywkach ze zmienną zawartością IBA oraz ich profilem metabolicznym, dalsze eksperymenty biotechnologiczne, w skali wielkolaboratoryjnej, zaplanowano prowadzić, w ciemności, w cyklu 48-dniowym, utrzymując również dwa warianty doświadczalne z wykorzystaniem pożywek SH zawierających 1,0 lub 1,5 mg L^{-1} IBA.

2.4.1.2 Kultury bioreaktorowe korzeni odciętych *S. apiana*

Ostatni etap badań prowadzonych nad kulturą ciągłą korzeni odciętych *S. apiana*, zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, stanowił próbę zaadaptowania wspomnianych biomas do wzrostu w skali wielkolaboratoryjnej, tj. w instalacjach o charakterze bioreaktorów.

Specyfika kultur organów roślinnych wymaga zastosowania do ich namnażania odpowiedniego rodzaju instalacji, która uwzględni właściwości fizjologiczne badanych tkanek, w tym w przypadku korzeni, ich podatność na stres mechaniczny czy tendencję do formowania zwartych matryc,

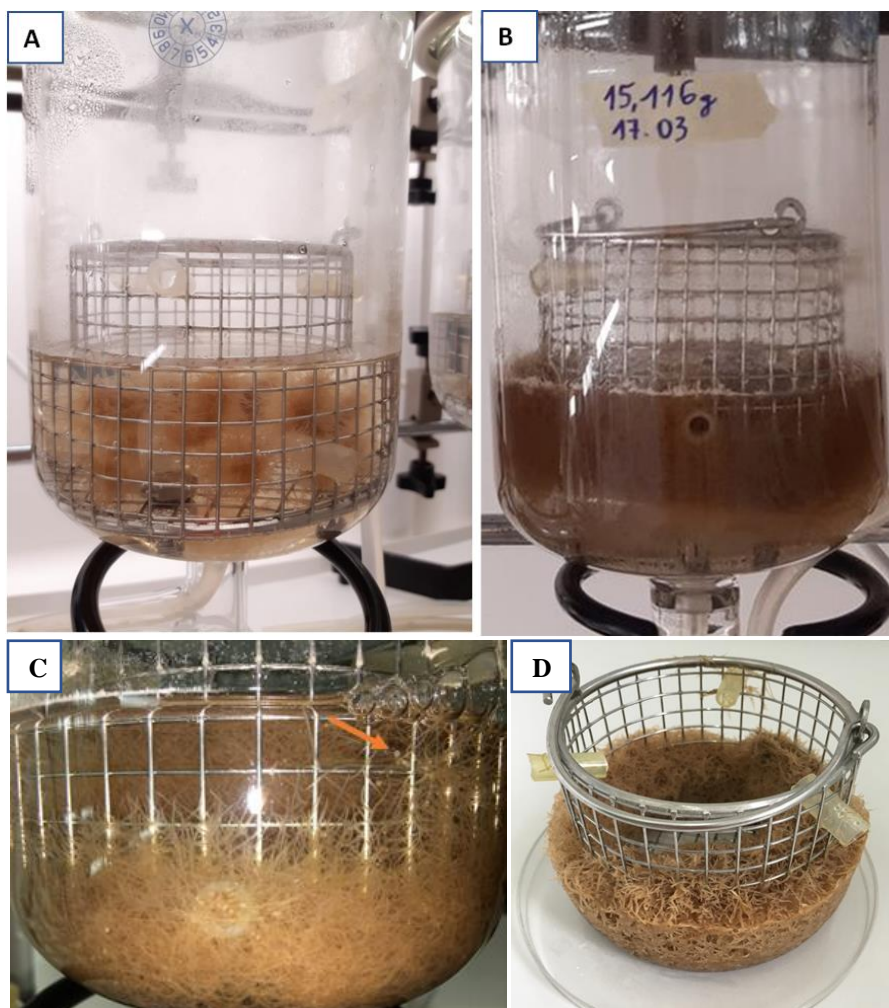
utrudniającą procesy wymiany gazowej oraz dostęp do medium odżywczego. Kwerenda literaturowa wskazuje na większą produktywność tego typu biomas, w bioreaktorach wyposażonych w delikatne systemy mieszania i napowietrzania (Georgiev i in., 2013). Warto nadmienić, że w porównaniu do kultur fotoautotroficznych, takich jak mikropędy, gdzie istotną rolę odgrywa konstrukcja instalacji, umożliwiająca penetrację światła, w przypadku korzeni inkubowanych w ciemności omawiany czynnik nie jest brany pod uwagę (Malepszy, 2012). Piśmiennictwo wskazuje, że w adaptacji powyższych tkanek roślinnych, w tym tych z rodzaju *Salvia*, do wzrostu w bioreaktorach korzystano zarówno z wykonywanych zespołowo urządzeń prototypowych (Taya i in., 1989; Kuźma i in., 2009; Yan i in., 2009) jak i komercyjnie dostępnych RITA[®] (Kentsop i in., 2021).

Zgodnie z podanymi powyżej kryteriami wyboru konstrukcji bioreaktora, w oparciu o dane literaturowe oraz doświadczenie własne Promotor (Jaremicz, Luczkiewicz, Kokotkiewicz i in., 2014; Szopa i in., 2017) zdecydowano się na namnażanie kultury *in vitro* korzeni odciętych *S. apiana* w prototypowej instalacji kolumnowo-zalewowej z systemem napowietrzająco-mieszającym o charakterze barbotażu. Skonstruowany, w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed, bioreaktor został również wyposażony w pojedynczy kosz immobilizujący korzenie, co pozwalało biomase roślinnej rosnąć na mechanicznym nośniku, zanurzonym w cyrkulującym, napowietrzonym medium odżywczym. Ponadto, biorąc pod uwagę silną tendencję korzeni odciętych szalwii białej do formowania zwartych matryc, utrudniającą prawidłowe natlenowanie i odżywienie tkanek roślinnych, w niniejszej pracy, jako drugą instalacją wielkolaboratoryjną, posłużono się bioreaktorem natryskowym z wewnętrznym stelażem, składającym się z dziewięciu niewielkich koszyczków immobilizujących (20 x 20 x 20 mm), co umożliwiło równomierne rozmieszczenie biomasy w całej objętości zbiornika hodowlanego i jej efektywne, okresowe zraszanie. Wykorzystana konstrukcja została zaprojektowana i wykonana na potrzeby niniejszego projektu doktorskiego. Szczegółowe schematy zastosowanych instalacji bioreaktorowych zostały przedstawione w rozdziale 3.1.9.1.4.1.

Biomasa wykorzystana w opisywanych doświadczeniach pochodziła z kolekcyjnej kultury korzeni odciętych *S. apiana*, namnażanej w pożywce SH_{IBA1,0} (rozd. 3.1.8.2.1). *Inoculum* roślinne, w ilości ok. 15,0 g, zbierano w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego. W obu typach bioreaktorów, do koszy immobilizujących, wprowadzano fragmenty korzeniowe o średnicy kępek matryc roślinnych nieprzekraczającej 1 cm (Ryc. 24A). Jak już wspomniano, w doświadczeniu zastosowano pożywkę SH zróżnicowaną, tak jak w eksperymentach prowadzonych w skali laboratoryjnej, pod kątem zawartości auksyny (2 warianty doświadczalne: SH_{IBA1,0} oraz SH_{IBA1,5}). Czas trwania kultury biomasy szalwii białej w bioreaktorze wyznaczono w oparciu o opracowane profile wzrostowe korzeni odciętych w kulturze wytrząsanej (rozd. 3.1.9.1.3) i wynosił on 48 dni dla bioreaktora natryskowego. Eksperyment prowadzono w ciemności, w temp. 24 ± 1°C. W przypadku instalacji kolumnowo-zalewowej, ze względu na pojawianie się od 30. dnia hodowli coraz większych ilości niewielkich

skupisk embriogenicznego kalusa (Ryc. 24C), doświadczenie skrócono do 40 dni, stosując wyżej podany reżim oświetleniowy i temperaturowy.

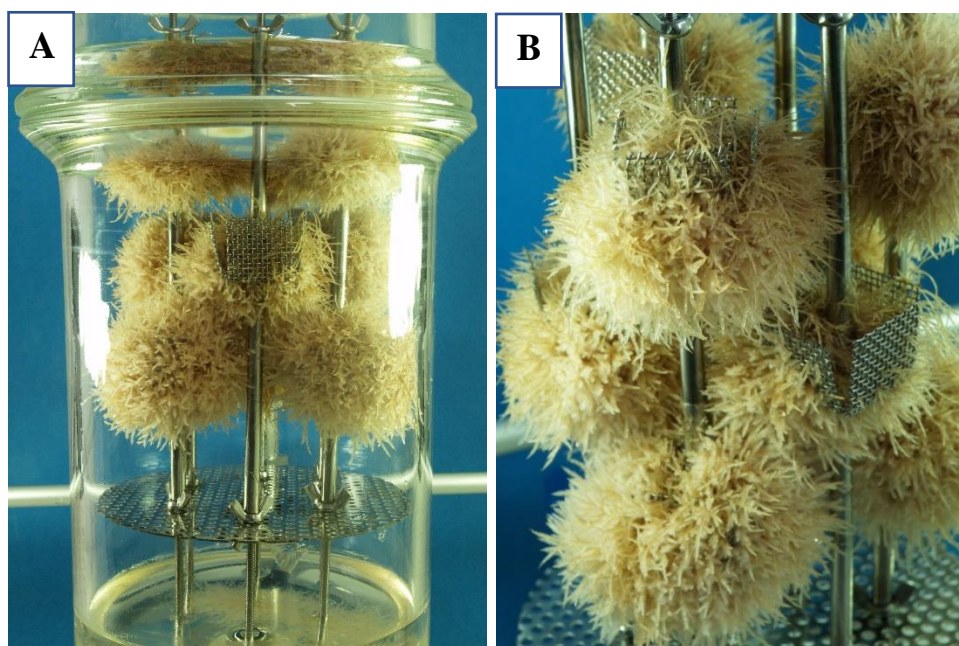
W wyniku przeprowadzonego, w bioreaktorze kolumnowo-zalewowym, eksperymentu uzyskano korzenie odcięte *S. apiana* o zbitej strukturze i jasnobrązowej barwie, zarówno w przypadku biomas kultywowanych w medium SH_{IBA1,0} (Ryc. 24A-D), jak i w drugiej z zastosowanych pożywek – SH_{IBA1,5}. Ciemnobrązowe matryce roślinne zlokalizowane w centralnej części kosza immobilizującego, narażone bezpośrednio na działanie barbotażu, były sztywne i zbite, przy czym powyższe negatywne cechy makroskopowe silniej manifestowały się w kulturach namnażanych w pożywce z niższym z zastosowanych stężeń IBA. Opisane rezultaty świadczą prawdopodobnie o postępujących, w testowanych biomasach, zmianach nekrotycznych, związanych ze stresem mechanicznym, wynikającym z silnego strumienia powietrza, generowanego w bioreaktorze przez bełkotkę. Jak już wspomniano, eksperyment zakończono w 40. dniu, ze względu na obecność w korzeniach odciętych *S. apiana* coraz większych ilości skupisk kalusa, zaburzającego organospecyficzny charakter kultury.



Ryc. 24. Kultura *in vitro* korzeni odciętych *S. apiana*, prowadzona w bioreaktorze kolumnowo-zalewowym (medium SH_{IBA1,0});

A – biomasa inokularna w 0. dniu doświadczenia; B – biomasa korzeni w 40. dniu cyklu wzrostowego; C – kalus widoczny w ostatnim dniu doświadczenia (czerwona strzałka); D – widok na koszyk immobilizujący (40. dzień doświadczenia).

W bioreaktorach natryskowych, w porównaniu do instalacji kolumnowo-zalewowej, przyrost materiału roślinnego w mniejszym stopniu wiązał się utratą charakterystycznych cech morfologicznych testowanych korzeni. Pomimo dłuższego, o 8 dni, cyklu eksperymentalnego, w niniejszym systemie większy udział w całej biomacie stanowiły jasnobrązowe włósniki, natomiast obecność śluzowatych, ciemnobrązowych rdzeni ograniczała się jedynie do niewielkich zagęszczeń o średnicy około jednego centymetra, znajdujących się w rozproszonych koszyczkach immobilizujących. W opisywanym przypadku nie stwierdzono również odtwarzania kalusa, a pożywka w ostatnim dniu doświadczenia pozostawała klarowna (Ryc. 25). Powyższe obserwacje wskazują, że prowadzenie wielkoskalowych kultur korzeni odciętych w bioreaktorze natryskowym, z nowatorskim stelażem immobilizującym, warunkującym przyrost tkanek w małych, rozproszonych skupiskach, umożliwia doprowadzanie do kultur pożywki rozpylonej w postaci mgły, wiążąc się z mniejszym stresem mechanicznym i skutkuje poprawą kondycji biomasy. Warto również zauważyć, że zastosowana konstrukcja wyeliminowała, w znacznej mierze, powstawanie sił ścinających i ułatwiła wzrastającym korzeniom dostęp do medium odżywczego i tlenu.

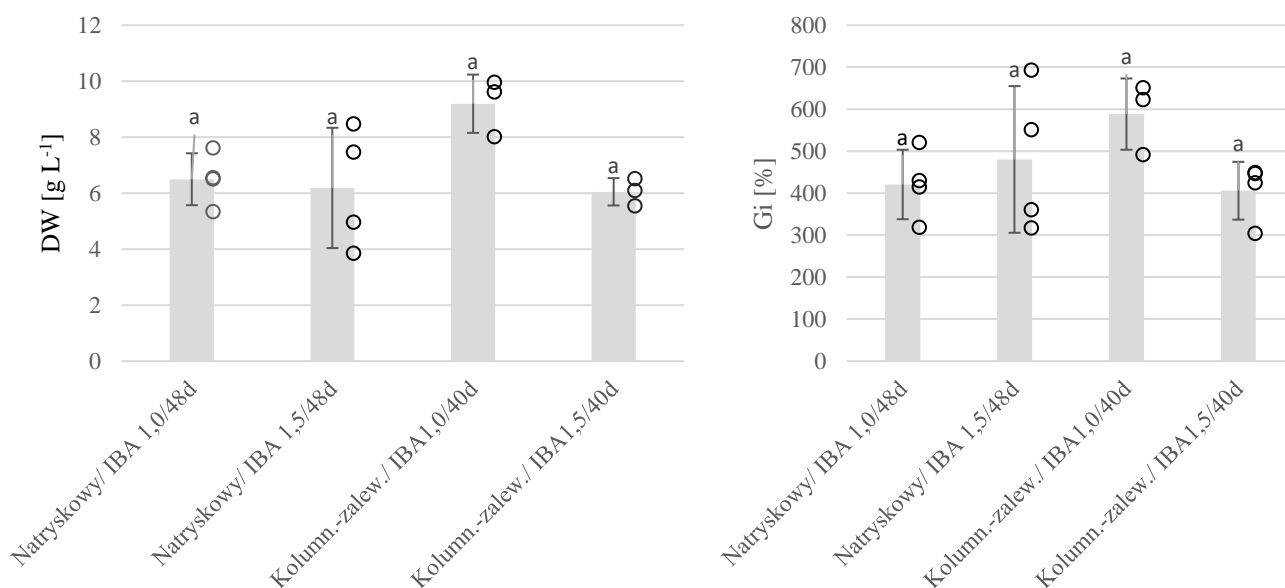


Ryc. 25. Kultura *in vitro* korzeni odciętych *S. apiana*, prowadzona w bioreaktorze natryskowym (medium SH_{IBA1,5}), w ostatnim, 48. dniu doświadczenia;

A – zbiornik bioreaktora – widok ogólny; B – widok na wewnętrzny stelaż z biomasa korzeni.

Niezależnie od stężenia auksyny IBA w pożywce, w wyniku przeprowadzonego doświadczenia, polegającego na kultywowaniu korzeni odciętych *S. apiana* w bioreaktorach o różnej konstrukcji, było

pogorszenie parametrów wzrostowych biomas (DW i Gi – Ryc. 26) w stosunku do organów podziemnych rosnących w warunkach laboratoryjnych (kolby Erlenmeyera – Ryc. 21).



Ryc. 26. Porównanie parametrów wzrostowych [wartość suchej masy (DW) oraz współczynnik przyrostu (Gi)] kultur korzeni odciętych szałwii białej namnażanych w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych.

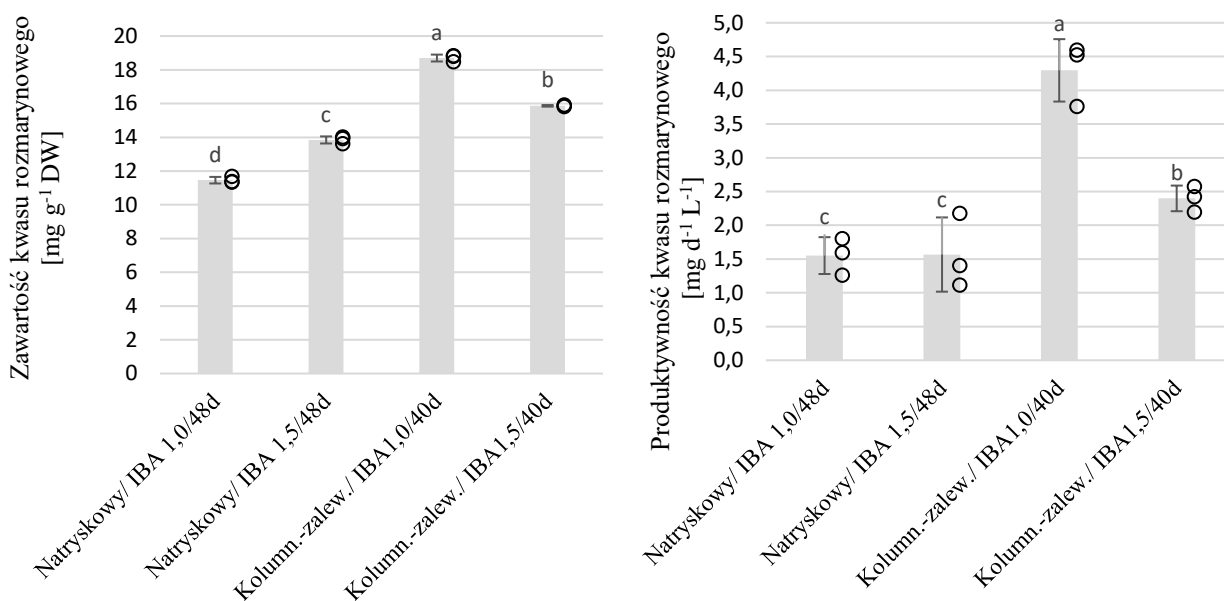
Doświadczenie prowadzono w ciemności, w pożywce SH, suplementowanej IBA w stężeniach: 1,0 i 1,5 mg L⁻¹, przez 40 (instalacje zalewowe) lub 48 dni (instalacje natryskowe). Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD. Oznaczenia osi poziomej: rodzaj bioreaktora/zawartość auksyny w medium SH/czas kultywacji w dniach.

Najwyższe wartości Gi i DW korzeni, zebranych po zakończonych cyklach wzrostu, odnotowano dla matryc roślinnych *S. apiana* kultywowanych, przez 40 dni w bioreaktorze kolumnowo-zalewowym, w medium eksperymentalnym, suplementowanym IBA, w stężeniu 1,0 mg L⁻¹. Wynosiły one, odpowiednio: 588,2% i 9,2 g L⁻¹ (Ryc. 26). Jak już wspomniano, parametry te były niestety wyraźnie niższe niż uzyskane w kulturze wytrząsanej, w 39. dniu doświadczenia. Gi i DW wynosiło wtedy, odpowiednio: 1592,7% oraz 12,9 g L⁻¹ (rozdz. 2.4.1.1.2). Nieco niższe wartości omawianych współczynników, obliczone dla korzeni rosnących w instalacji natryskowej mogą wynikać ze struktury samej kultury. Podczas gdy we wspomnianym bioreaktorze rzadko stwierdzano w biomasach obecność embriogenicznych skupisk kalusowych, to w urządzeniu kolumnowo-zalewowym tkanka przyranna, w ostatnich dniach eksperymentu, praktycznie przerastała korzenie. Należy zaznaczyć, że jest ona znacznie cięższa od delikatnych organów podziemnych, skąd może bezpośrednio wynikać większa masa całej kultury.

Analiza fitochemiczna otrzymanych biomas *S. apiana*, namnażanych w ciemności, w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych, wykazała że zachowały one zdolność do

wybiórczej biosyntezy kwasu rozmarynowego (Ryc. 27). Najwyższą zawartością oraz produktywnością omawianego metabolitu, wyrażoną jako ilość mg kwasu rozmarynowego produkowana w 1 L kultury przez 1 dzień, charakteryzował się materiał roślinny, pochodzący z bioreaktora kolumnowo-zalewowego (medium SH_{IBA1,0}), osiągając, odpowiednio: 18,7 mg g⁻¹ DW (40. dzień eksperymentu) i 4,3 mg L⁻¹ d⁻¹. Tym samym, zawartość kwasu rozmarynowego omawianej biomasy była na poziomie zbliżonym do kultury kolekcyjnej (17,2 mg g⁻¹ DW) i wyraźnie niższym niż w kulturze wytrząsanej (44,5 mg g⁻¹ DW).

W opisywanej serii doświadczeń zauważono również, że nie tylko sama konstrukcja bioreaktora, ale także zawartość IBA w pożywce wywierała bezpośredni wpływ na wtórny metabolizm tkankowy. Podczas gdy w medium z dodatkiem 1,0 mg L⁻¹ wspomnianej auksyny (instalacja kolumnowo-zalewowa) otrzymano w korzeniach 18,7 mg g⁻¹ DW kwasu rozmarynowego, to zastosowanie zwiększonego dodatku opisywanego fitohormonu (1,5 mg L⁻¹) warunkowało już tylko 15,9 mg g⁻¹ DW powyższego kwasu fenolowego, co przekładało się również na odpowiednio niższą produktywność systemu (Ryc. 27).



Ryc. 27. Zawartość i produktywność kwasu rozmarynowego w kulturach korzeni odciętych szalwii białej, namnażanych w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych.

Doświadczenie prowadzono w ciemności, w pożywce SH, suplementowanej IBA w stężeniach 1,0 i 1,5 mg L⁻¹, przez 40 (instalacje zalewowe) lub 48 dni (instalacje natryskowe). Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD. Oznaczenia osi poziomej: rodzaj bioreaktora/ zawartość auksyny w medium SH/czas kultywacji w dniach.

Warto nadmienić, że zaplanowane w doktoracie doświadczenia stanowią wstępne prace nad zwiększeniem skali kultur korzeni szalwii białej, a dalsza, realizowana w kolejnych projektach, optymalizacja takich parametrów technicznych jak: czas i częstość zraszania czy natężenie strumienia

powietrza w bełkotce, mogą istotnie poprawić uzyskane wyniki. Jak wynika z piśmiennictwa kultywacja nietransformowanych korzeni roślin z rodzaju *Salvia* w instalacjach bioreaktorowych jest przedmiotem niewielu prac eksperymentalnych (Marchev i in., 2014). Obiecujące wyniki osiągnięto w przypadku namnażania korzeni przybyszowych *S. miltiorrhiza* przy zastosowaniu urządzenia, wykorzystującego mechanizm mieszania i napowietrzania oparty na barbotażu, z przeznaczeniem do produkcji, w warunkach *in vitro*, diterpenoidów, w tym również tanszinonu 2A (Yan i in., 2009).

Podsumowując, kultywacja biomas korzeni odciętych *S. apiana*, w podłożach SH, suplementowanych IBA (1,0-1,5 mg L⁻¹), z zastosowaniem bioreaktorów wykorzystujących mechanizm mieszania i napowietrzania oparty na barbotażu oraz w instalacji natryskowej, wpłynęła znacząco na przyrost i morfologię badanych tkanek oraz zdolność do akumulacji kwasu rozmarynowego. Powyższe systemy *in vitro* charakteryzowały się, względem kultury kolekcyjnej korzeni odciętych, zasadniczo niższymi wartościami współczynników przyrostu. Najkorzystniejszym rozwiązaniem technologicznym, z uwagi na produktywność biomasy szałwii białej, okazał się bioreaktor kolumnowo-zalewowy, w którym korzenie anatomiczne badanego gatunku rosły przez 40 dni w medium SH_{IBA1,0}. W opisywanych warunkach testowane matryce roślinne osiągały zadowalające parametry wzrostowe (Gi = 588,2% i DW = 9,19 g L⁻¹), przy jednoczesnym zachowaniu zdolności do biosyntezy kwasu rozmarynowego na poziomie 18,7 mg g⁻¹ DW (produktywność 4,3 mg L⁻¹ d⁻¹). Zawartość powyższego wtórnego metabolitu, w opisywanym systemie, była jednak zbyt niska, by uznać go za wartościowe, alternatywne źródło niniejszego kwasu fenolowego wobec innych, opisanych w literaturze, kultur wielkolaboratoryjnych szałwii (D'Amelia i in., 2018).

2.4.2 Kultura ciągła korzeni transformowanych *S. apiana*: wzrost i profil metaboliczny

Wyprowadzone, na wcześniejszym etapie prac biotechnologicznych, kultury korzeni transgenicznych *S. apiana* (media SH₀), ze względu na znaczną żywotność ($G_i \approx 1000\%$) oraz zachowaną zdolność do biosyntezy kwasu rozmarynowego (9,83-15,32 mg g⁻¹ DW; rozdz. 2.3.1), uznano za odpowiednie do prowadzenia eksperymentów, których nadrzędnym celem badawczym było otrzymanie systemu *in vitro* szaławii białej, mogącego stanowić ciągłe źródło powyższego połączenia naturalnego.

Dotychczas, niniejszy aspekt badań, dotyczący genetycznych modyfikacji dróg wtórnego metabolizmu, z wykorzystaniem *A. rhizogenes*, w roślinnych komórkach *in vitro* szaławii, połączony z testowaniem efektu skali ich hodowli, dotyczył takich gatunków jak: *S. miltiorrhiza* Bunge (Wang i Wu, 2010), *S. officinalis* L. (Grzegorzczuk i Wysokińska, 2010), *S. sclarea* L. (Kuźma i in., 2009), *S. austriaca* Jacq. (Kuźma i in., 2017) oraz *S. corrugata* Vahl. (Kentsop i in., 2021). Przykładowo, w przytoczonej pracy nad *S. corrugata*, doświadczenia prowadzone w bioreaktorze okresowo-zalewowym RITA[®], o objętości roboczej 150 mL, pozwoliły opracować wysokowydajny system *in vitro* do biosyntezy dwóch diterpenoidów, pochodnych abietanu: ferruginolu oraz agastolu.

W pierwszym etapie prezentowanych badań biotechnologicznych, realizowanych w ramach niniejszego projektu doktorskiego, opracowano, w skali laboratoryjnej (25 mL), profile wzrostowe dla każdego z wyprowadzonych transformantów. Ustalenie, w cyklu wzrostowym, dynamiki przyrostu korzeni transgenicznych szaławii białej połączono z oceną wyników dotyczących profilu metabolicznego kultur kolekcyjnych poszczególnych linii klonalnych (rozdz. 2.3.1). Wybrany transformant został następnie zaadaptowany do wzrostu w skali wielkolaboratoryjnej (objętość robocza wynosząca 600 mL). Bioreaktory zastosowane w doświadczeniach wykorzystano wcześniej podczas kultury korzeni odciętych badanego gatunku (rozdz. 2.4.1.2), a we wszystkich eksperymentach posłużono się tym samym protokołem doświadczalnym, zmodyfikowanym jedynie w zakresie zastosowanych regulatorów wzrostu w pożywce (korzeń odcięty – medium SH_{IBA1,0} i SH_{IBA1,5} vs. transformant *S. apiana* - SH₀) i czasu zbioru, odpowiadającego fazie stacjonarnej profilu wzrostowego biomas w kulturze wytrząsanej. Pozwoliło to na porównanie uzyskanych wyników dotyczących produktywności między powyższymi systemami *in vitro* szaławii białej.

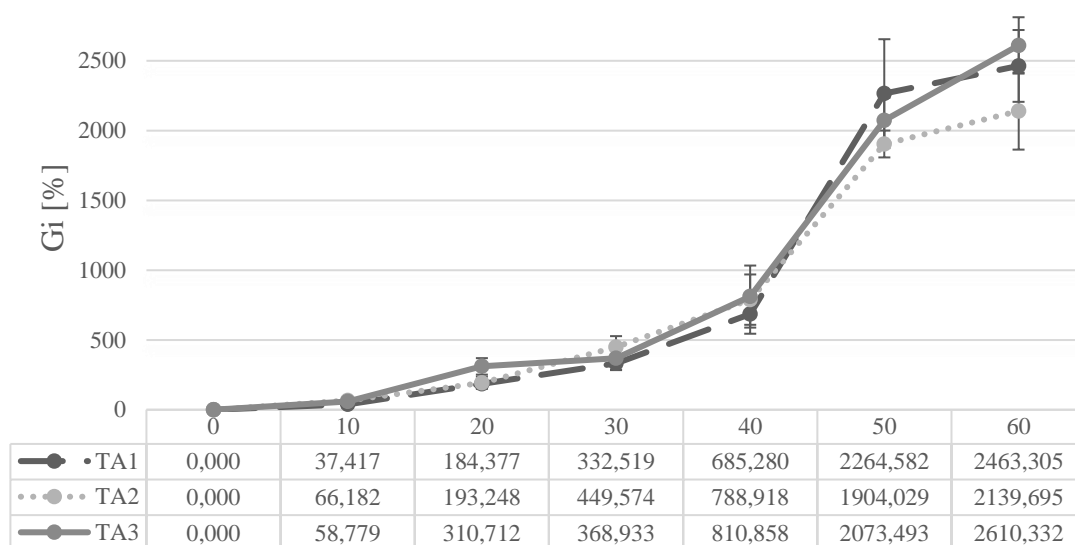
2.4.2.1 Optymalizacja warunków prowadzenia kultur ciągłych korzeni transformowanych *S. apiana* w skali laboratoryjnej

2.4.2.1.1 Profile wzrostowe kultur korzeni transformowanych *S. apiana* – selekcja wysokowydajnego klonu

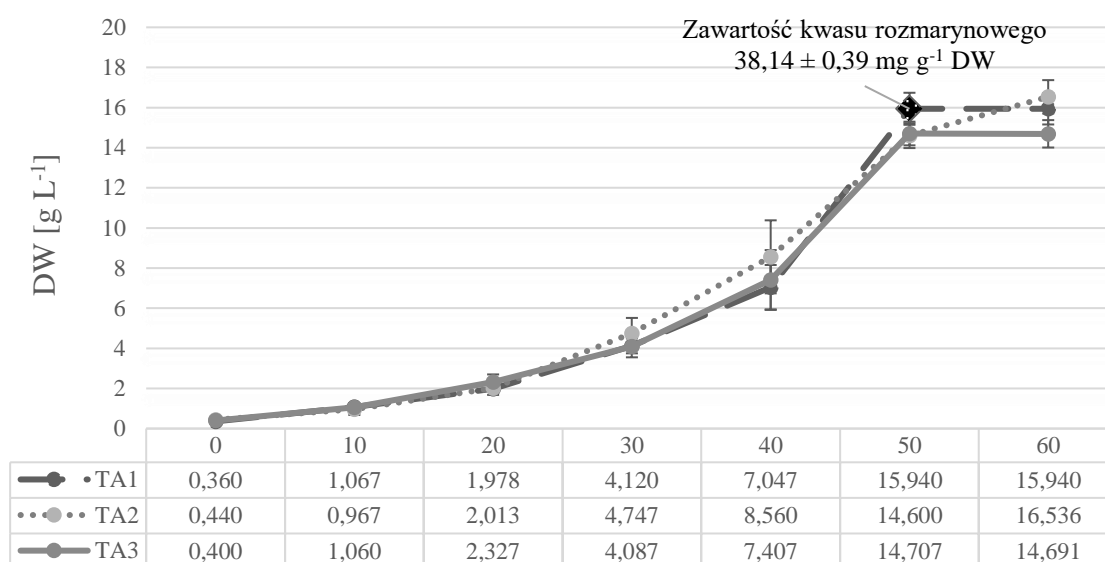
Na wstępnym etapie opisywanej, w niniejszym podrozdziale, serii eksperymentów, dla wszystkich otrzymanych linii korzeni transformowanych *S. apiana*, namnażanych w medium SH₀

(rozdz. 3.1.3), wyznaczono profile wzrostowe, w warunkach kultur wytrząsanych. Powyższe doświadczenie prowadzono przez 60 dni, w ciemności (rozdz. 3.1.9.2.2). Próbkę aktywnie rosnących biomas zbierano co 10 dni, w sześciu powtórzeniach. Wyniki prac eksperymentalnych przedstawiono na rycinach w formie wykresów obrazujących wartości suchej masy (DW) i współczynników przyrostu (Gi) osiągniętych przez kultury w poszczególnych dniach cykli wzrostowych (Ryc. 28-29). Analizę fitochemiczną biomas korzeniowych, z uwagi na zawartość nietlonych terpenów oraz polifenoli, przeprowadzono jedynie dla pojedynczego klonu TA1, charakteryzującego się znaczną juvenilnością przy jednoczesnym braku obecności tkanki przyrannej, przerastającej korzenie włóśnikowate. Próbkę aktywnie rosnących transformantów zebrano w 50. dniu doświadczenia, w fazie stacjonarnej, spodziewając się w tym czasie, jak wskazują dane literaturowe, najwyższej zawartości oznaczanych metabolitów wtórnych (Bourgaud i in., 2001; Malepszy, 2012). Wprawdzie namnażana biomasa charakteryzowała się wyższą wartością Gi, w ostatnim, 60. dniu doświadczenia, ale analiza makroskopowa wykazała w niej sporo tkanek objętych nekrozą.

Wykreślone, na podstawie posiadanych danych eksperymentalnych (wartości Gi i DW), profile wzrostowe korzeni transformowanych szałwii białej (TA1-3 i TL1-2), charakteryzował trend sigmoidalny, z wydłużonymi fazami: opóźnienia (1-10 dzień), wzrostu logarytmicznego (10-40 dni) i liniowego (40-50 dzień) oraz następującym po nich *plateau* (50-60 dni). Wszystkie linie klonalne szałwii białej, w ciągu 40 dni doświadczenia wolno przyrastały (Ryc. 28-29). Transformanty TA1-3 oraz TL1-2 cechowały się wyraźnie zbliżoną dynamiką przyrostu, a jedynie klon TL2, pochodzący z infekcji mikropędów *S. apiana* szczepem *A. rhizogenes* LBA9402 (rozdz. 2.2.2), w porównaniu z biomasą inicjalną, przyrastał znacznie szybciej, osiągając w dniu 40. współczynnik przyrostu (Gi) równy 1131,0% (Ryc. 29), co wiąże się z ponad 7-krotnym zwielokrotnieniem ilości suchej biomasy inokularnej. W tym samym czasie pozostałe transformanty (TA1-3 i TL1) charakteryzowały się o wiele niższymi wartościami Gi, w granicach od 600-800% – Ryc. 28-29). We wspomnianym okresie pożywka wzrostowa pozostawała klarowna, a wszystkie korzenie zawiązywały się w agregaty, z obecnymi, w częściach peryferyjnych, licznymi włóśnikami o jasnobrązowej barwie. Zmiany makroskopowe opisanych kultur, w trakcie cyklu doświadczalnego, zaprezentowano na przykładzie klonu TA1, w formie dokumentacji fotograficznej (Ryc. 30). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że w przypadku linii TL2 dostrzeżono również zawiązki kalusa w próbkach korzeni pochodzących z 20. i 30. dnia doświadczenia (Ryc. 31). Uzyskany w omawianym doświadczeniu powolny wzrost większości biomas klonalnych, w tym wydłużona faza opóźnienia, jest dość nietypowy dla kultur korzeni włóśnikowatych (Wysokińska, 2000a, 2000b; Wasilewska i Królicka, 2005). Przykładowo, krzywa wzrostu transformantu *S. austriaca*, pochodzącego z infekcji tkanek roślinnych szczepem *A. rhizogenes* A4, wykreślona na podstawie zmian ilości suchej masy w czasie, w opisywanej kulturze, wykazała zupełny brak fazy lag (Kuźma i in., 2017).



Dzień doświadczenia

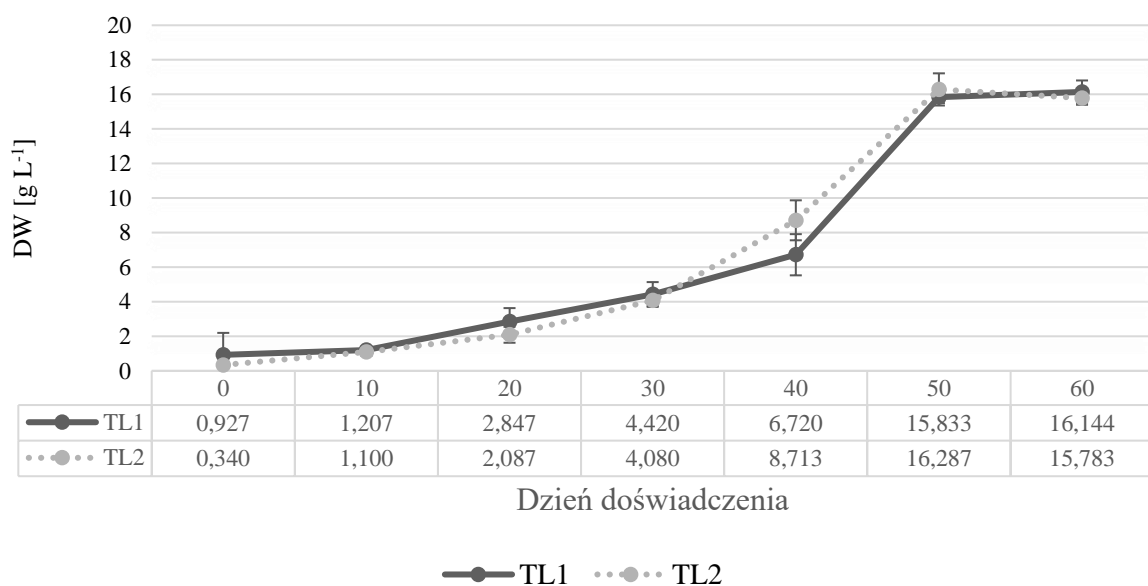
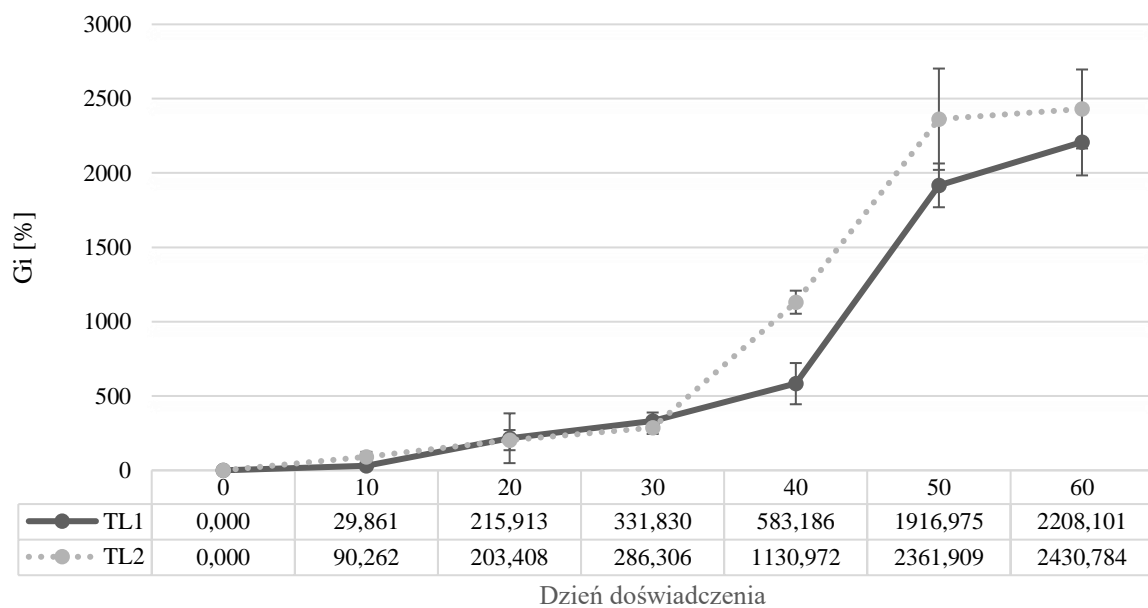


Dzień doświadczenia

• TA1 •• TA2 • TA3

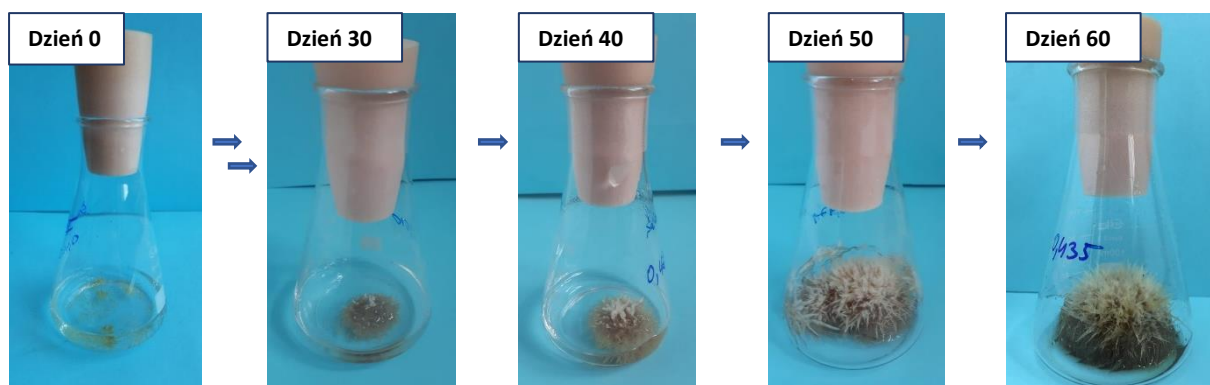
Ryc. 28. Profile wzrostowe kultur korzeni transformowanych *S. apiana* (linie TA1-3), namnażanych w medium SH₀, opracowane na podstawie obliczonych wartości współczynników przyrostu (Gi) i suchej masy (DW).

Podane wartości stanowią średnie arytmetyczne z 6 prób eksperymentalnych ± SD.

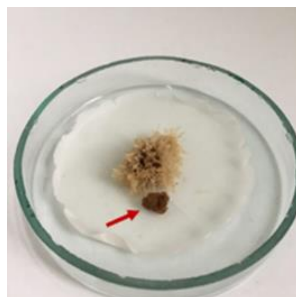


Ryc. 29. Profile wzrostowe kultur korzeni transformowanych *S. apiana* (linie TL1-2), namnażanych w medium SH₀, opracowane na podstawie obliczonych wartości współczynników przyrostu (Gi) i suchej masy (DW).

Podane wartości stanowią średnie arytmetyczne z 6 prób eksperymentalnych ± SD.



Ryc. 30. Korzenie transgeniczne TA1 *S. apiana* (medium SH₀). Zdjęcia przedstawiają biomasy korzeni transgenicznych, pochodzących z kolejnych dni 60-dniowego cyklu doświadczalnego.



Ryc. 29. Biomasa korzeni transgenicznych *S. apiana* (klon $\mathbb{I}2$) z widocznym kalusem (czerwona strzałka), w 30. dniu doświadczenia (medium SH₀).

Od 40. do 50. dnia eksperymentu wszystkie omawiane linie klonalne charakteryzował szybki, wykładniczy wzrost (Ryc. 28-29). W tym okresie pożywki wzrostowe przybrały stopniowo jasnobrązową barwę, zaś korzenie znajdujące się wewnątrz agregatów wykazywały pierwsze objawy nekrozy (ciemnobrązowe fragmenty biomas). Następnie, po 50. dniu kultury wzrósł znacznie udział, w matrycach roślinnych, zbitych oraz śluzowatych korzeni. Jasnobrązowe włósniki były nieliczne i występowały tylko w peryferyjnych częściach biomas (Ryc. 30).

Warto zaznaczyć, że korzenie transformowane szaławii białej, niezależnie od otrzymanego klonu, wykazywały mimo skłonności do agregacji, znacznie bardziej stabilny wzrost (niższe odchylenia standardowe między masą próbek roślinnych, pochodzących z tego samego dnia zbioru) niż odnotowany w przypadku kultury korzeni odciętych badanego gatunku (rozdz. 2.4.1.1). Na uwagę zasługuje również, w porównaniu do biomas nietransformowanych, obserwowany, dla organów transgenicznych, nieznacznie spowolniony cykl wzrostowy (rozdz. 2.4.1.1.2). Zjawisko to jest raczej nietypowe. Przyjmuje się, że komórki transgeniczne zwykle wyróżniają się większą, wobec tkanek nietransformowanych, dynamiką przyrostu (Wasilewska i Królicka, 2005). Dodatkowo, mimo długiego okresu inkubacji korzeni włósnikowatych w kolbach (60 dni – Ryc. 28-29) nie udało się zaobserwować

w badanej kulturze klasycznej fazy zamierania, kończącej cykl wzrostowy testowanych biomas. Dalsze próby przedłużania eksperymentu o kolejne 10 dni kończyły się zwykle zakażeniem matryc roślinnych.

Porównując cechy morfologiczne poszczególnych klonów korzeni transformowanych *S. apiana* (juwenilność oraz brak tkanki przyrannej), a także ich parametry wzrostu, do badań fitochemicznych wytypowano transformant TA1 (Gi 2264,6% oraz DW 15,94 g L⁻¹ – 60. dzień eksperymentu).

Jak już wspomniano, na wstępie niniejszego rozdziału, z uwagi na ograniczony czas trwania projektu doktoranckiego i czasochłonność prac laboratoryjnych, analizie, na zawartość nietlotnych terpenów oraz polifenoli, poddano jedynie korzenie transgeniczne zebrane w 50. dniu kultury (początek fazy stacjonarnej – Ryc. 28), gdy nie obserwowano jeszcze nasilonej nekrozy tkanek roślinnych. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że testowane korzenie (klon TA1), podobnie jak tożsama kultura kolekcyjna, syntezowały jedynie kwas rozmarynowy, a ilość oznaczonego w nich metabolitu ($38,14 \pm 0,39$ mg g⁻¹ DW) była 3 razy wyższa niż w przypadku wspomnianej tkanki wyjściowej (12,76 mg g⁻¹ DW).

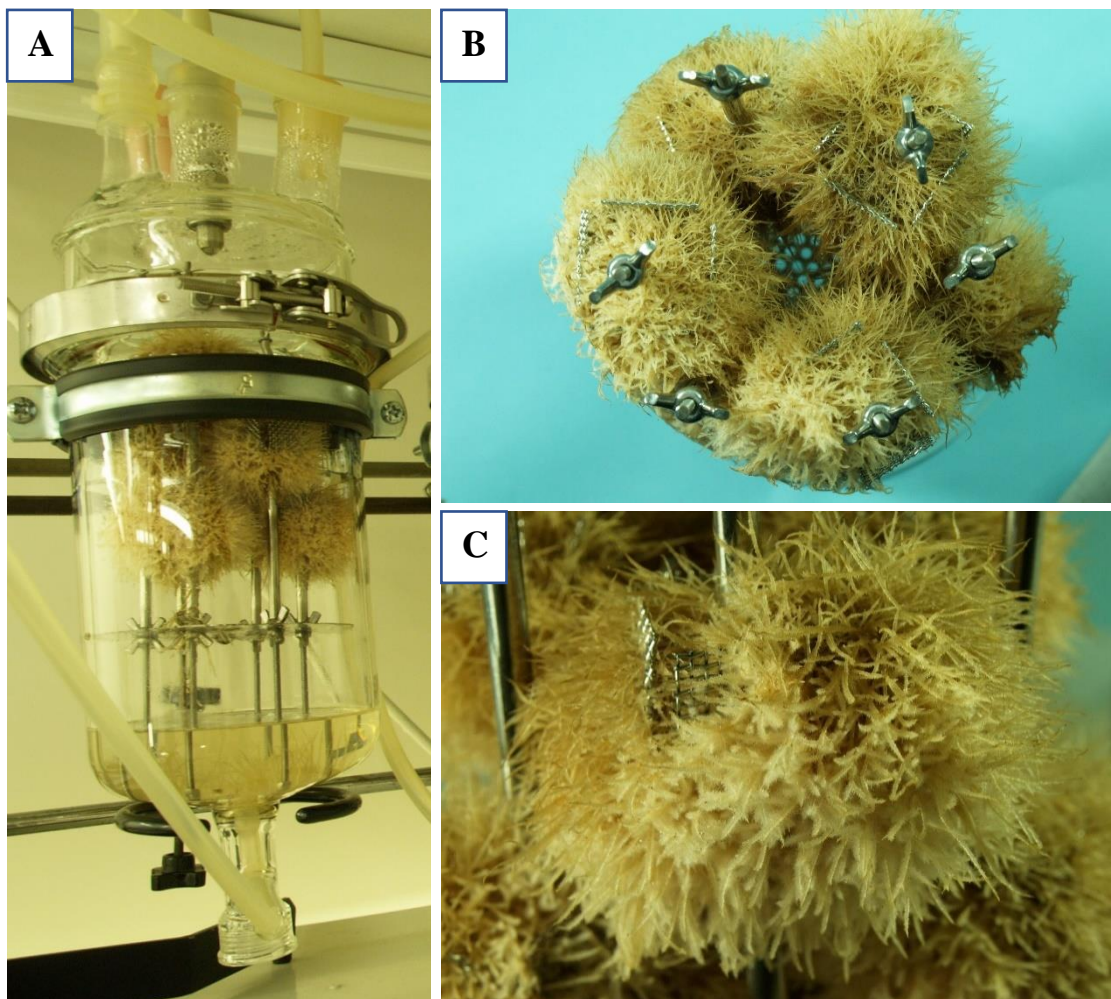
Podsumowując, przeprowadzony cykl doświadczeń, na poziomie kultur wytrząsanych, pozwolił na wyselekcjonowanie klonu TA1, stanowiącego najkorzystniejszy materiał roślinny do dalszych eksperymentów, ukierunkowanych na otrzymanie, w ramach kultur bioreaktorowych, systemu *in vitro* akumulującego znaczne ilości kwasu rozmarynowego. Wśród uzyskanych linii klonalnych charakteryzował się on zarówno zadowalającym przyrostem, jak i największym potencjałem produkcyjnym, w zakresie zawartości powyższego metabolitu, ocenionym wśród transformantów już na poziomie kultur kolekcyjnych i potwierdzonym w prezentowanym badaniu.

2.4.2.2 Korzenie transformowane *S. apiana* prowadzone w instalacjach wielkolaboratoryjnych

Ostatni etap badań prowadzonych nad kulturą ciągłą korzeni transgenicznych *S. apiana*, realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, stanowiła próba zaadaptowania transformantów TA1 do wzrostu w skali wielkolaboratoryjnej, tj. w instalacjach o charakterze bioreaktorów. Doświadczenia przeprowadzono w urządzeniach wykorzystanych uprzednio przy realizacji eksperymentów nad korzeniami odciętymi, tj. w prototypowych bioreaktorach natryskowych oraz kolumnowo-zalewowych z dyszą bełkotkową. Szczegółowe schematy powyższych instalacji przedstawiono w rozdz. 3.1.9.2.3.1.

Biomasa wykorzystana w doświadczeniu pochodziła z kolekcyjnej kultury korzeni transformowanych *S. apiana* (klon TA1), namnażanej w pożywce SH₀ (rozdz. 3.1.8.3.1). *Inoculum*, w ilości ok. 15,0 g, zbierano w ostatnim, 25. dniu cyklu wzrostowego. W obu typach bioreaktorów, do koszy immobilizujących, wprowadzano kępki korzeniowe o średnicy nieprzekraczającej 1 cm. W eksperymencie zastosowano pożywkę SH pozbawioną dodatku auksyny (SH₀). Korzenie włóśnikowate szaławii białej kultywowano, w fitotronie, w temp. 24±1°C, przez 60 dni, w ciemności.

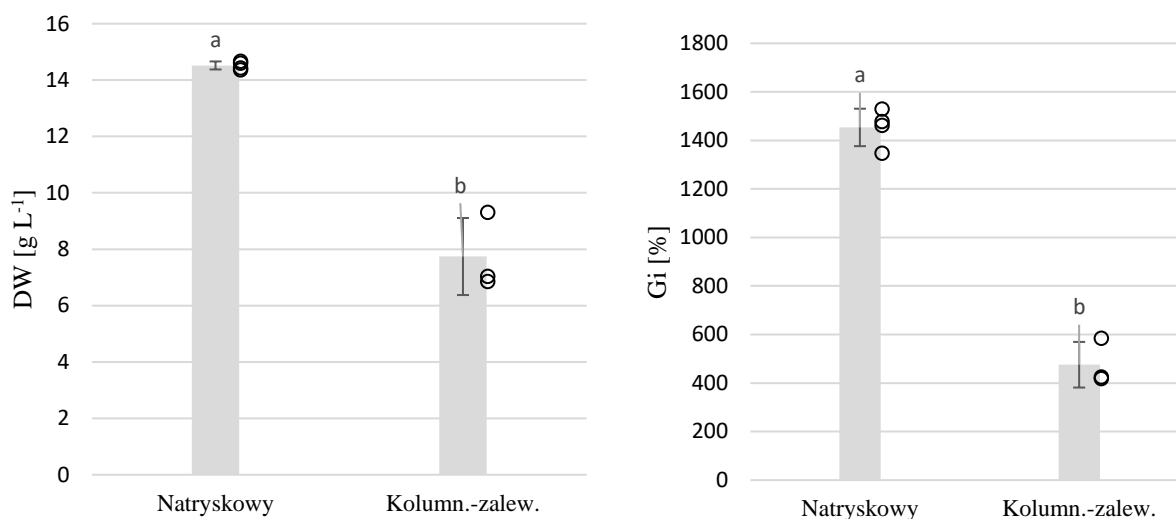
W wyniku przeprowadzonego doświadczenia, uzyskano biomasy korzeni transformowanych *S. apiana* o zbitej strukturze i jasnobrązowej barwie. Tkanki zlokalizowane w centralnej części kosza immobilizującego, w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych, w 60. dniu wzrostu, były w większości objęte procesami nekrotycznymi. W bioreaktorach natryskowych wspomniane zjawisko było bardziej ograniczone (Ryc. 32). Sztynne, ciemnobrązowe fragmenty biomas występowały tylko w niewielu koszyczkach immobilizujących. W opisywanym przypadku, nie obserwowano również odtwarzania kalusa, a pożywka, w ostatnim dniu eksperymentu, pozostawała klarowna. Problem nasilenia w czasie zmian nekrotycznych, w skupiskach matryc korzeni transgenicznych, obserwowano również podczas kultywacji w bioreaktorach *S. corrugata* (Kentsop i in., 2021).



Ryc. 32. Kultura *in vitro* korzeni transgenicznych *S. apiana* (klon TA1), prowadzona w bioreaktorze natryskowym (medium SH₀) w ostatnim, 60. dniu doświadczenia;
 A – bioreaktor; B – widok (od góry) na wewnętrzny steż z biomasą korzeni; C – koszyczek immobilizujący z biomasą klonu TA1.

Obliczone wartości współczynników przyrostu dla kultur korzeni transformowanych *S. apiana* rosnących w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych ($G_i = 475,5\%$; Ryc. 33), były znacznie niższe niż te osiągnięte w kulturze wytrząsanej ($G_i = 2463,3\%$ w 60. dniu; Ryc. 28). Uzyskane wyniki dowodzą więc, że zmiana warunków prowadzenia kultywacji, związana ze zwiększeniem skali hodowli i zastosowaniem mieszania pneumatycznego, wywarła negatywny wpływ na wzrost testowanych biomas. Znacznie lepsze wyniki w tym względzie uzyskano w bioreaktorach natryskowych ($G_i = 1453,4\%$), przy czym nadal pozostawały one niższe niż przy zastosowaniu, jako naczyń hodowlanych, kolb Erlenmeyera (1,7-krotny spadek wartości G_i – Ryc. 28 i 33). Mimo tak dużych różnic między omawianymi eksperymentami, dotyczących przyrostu świeżej masy i zawartości DW w bioreaktorach natryskowych ($14,9 \text{ g L}^{-1}$) pozostały one w stosunku do kultury wytrząsanej na zbliżonym poziomie

(15,9 g L⁻¹). Podobny efekt uzyskano podczas zwiększania skali kultury korzeni włośnikowatych *S. austriaca* (objętość robocza bioreaktora 4000 mL), gdzie osiągnięte przyrosty świeżej i suchej masy były, odpowiednio, 2- i 1,5-krotnie niższe niż dla kultur prowadzonych w mniejszej skali (Kuźma i in., 2017).

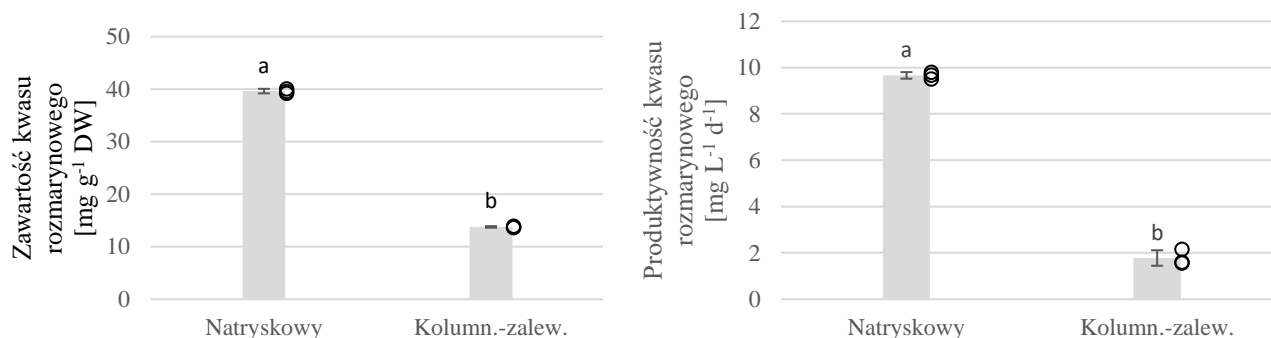


Ryc. 33. Porównanie parametrów wzrostowych (zawartość suchej masy – DW oraz współczynnik przyrostu – Gi) kultur korzeni transformowanych szałwii białej (klon TA1), prowadzonych w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych.

Materiał roślinny kultywowano w pożywce SH₀, przez 60 dni, w ciemności. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD.

Przeprowadzone analizy HPLC-DAD-ESI/MS biomas, zebranych z obydwu typów bioreaktorów (60. dzień), wykazały, że przeniesienie kultury korzeni transgenicznych *S. apiana* do instalacji wielkolaboratoryjnych nie spowodowało widocznych zmian jakościowych w obrębie badanej frakcji polifenolowej. Transformanty, kultywowane w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych, zachowały zdolność do wybiórczej akumulacji kwasu rozmarynowego, na poziomie, odpowiednio: 13,8 i 39,6 mg g⁻¹ DW (Ryc. 34). Choć namnażanie badanych biomas w obydwu typach bioreaktorów pozwoliło osiągnąć wyższe stężenia akumulowanego kwasu fenolowego niż w przypadku kultur kolecyjnych (12,8 mg g⁻¹ DW – rozdz. 2.3.1.3) to jedynie instalacja natryskowa umożliwiła uzyskanie zawartości omawianego metabolitu na poziomie nieco wyższym niż w korzeniach wytrząsanych (odpowiednio: 38,1 i 39,6 mg g⁻¹ DW; Ryc. 34). Spadek ilości syntezowanego kwasu rozmarynowego w kulturze prowadzonej w bioreaktorze kolumnowo-zalewowym był jednocześnie skorelowany z niskim przyrostem niniejszych biomas oraz ich znaczną tendencją do nekrozy. Zważywszy na ograniczoną ilość prac eksperymentalnych odnoszących się do wzrostu i produkcji kwasu rozmarynowego w kulturach korzeniowych różnych gatunków szałwii, prowadzonych w bioreaktorach, trudno jest wysnuć wnioski o charakterze ogólnym, dotyczące całego rodzaju *Salvia*.

Warto jednak nadmienić, że korzenie transformowane *S. officinalis*, kultywowane w bioreaktorze natryskowym, przy zastosowanej objętości roboczej wynoszącej 5000 mL, charakteryzowały się zawartością omawianego metabolitu na poziomie 34,7 mg g⁻¹ DW, czyli zbliżonym do efektów prac prezentowanych w niniejszym projekcie doktoranckim. W cytowanych w literaturze badaniach nie stwierdzono także zdolności biomasy szalwii lekarskiej do biosyntezy kwasu karnozowego i karnozolu (Grzegorzczuk i Wysokińska, 2010), tak jak w testowanych korzeniach *in vitro* szalwii białej (Ryc. 17 – rozdz. 2.3.1.3).



Ryc. 34. Zawartość i produktywność kwasu rozmarynowego w systemach *in vitro* korzeni transformowanych szalwii białej (klon TA1), prowadzonych w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych.

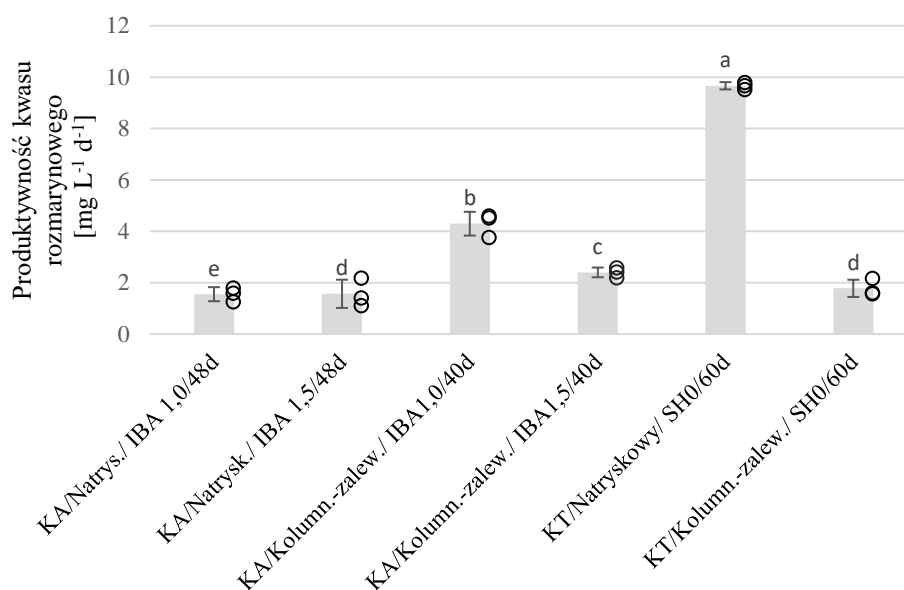
Doświadczenie prowadzono w ciemności w pożywce SH₀, przez 60 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD.

Podsumowując opisane w powyższych rozdziałach wyniki eksperymentów biotechnologicznych i fitochemicznych, dotyczących kultur ciągłych korzeni odciętych oraz transformowanych *S. apiana*, wykazano, że wszystkie wymienione biomasy są zdolne do wzrostu w testowanych instalacjach wielkolaboratoryjnych oraz produkują kwas rozmarynowy, w różnych stężeniach zależnych w znacznej mierze od typu bioreaktora (Ryc. 27 i 34-35).

Najbogatszym źródłem omawianego metabolitu okazały się korzenie transformowane TA1, namnażane w bioreaktorze natryskowym (39,6 mg g⁻¹ DW – Ryc. 34), przewyższając w tym względzie korzenie anatomiczne badanego gatunku (18,7 mg g⁻¹ DW – Ryc. 27), kultywowane w bioreaktorze kolumnowo-zalewowym. Stwierdzenie to dotyczy końcowej zawartości kwasu rozmarynowego w obydwu systemach. Jeżeli jednak porównujemy produktywność w testowanych instalacjach (odpowiednio: 9,7 i 4,3 mg L⁻¹ d⁻¹), to należy pamiętać, że wspomniane eksperymenty obejmowały inkubację korzeni transgenicznych i odciętych w różnym przedziale czasowym (odpowiednio: 60 i 40 dni – Ryc. 35). Niezgodność ta wynikała z różnej żywotności omawianych kultur i nie można było jej uniknąć, stąd uzyskane wyniki mają charakter szacunkowy i bardziej poprawne wydaje się porównywanie ostatecznej zawartości metabolitów tkankach pochodzących z poszczególnych systemów. Odnosząc się do wzrostu korzeni włósnikowatych (DW_{max} = 14,5 g L⁻¹ – Ryc. 33)

i anatomicznych ($DW_{max} = 9,2 \text{ g L}^{-1}$ – Ryc. 26), w obydwu typach bioreaktorów to uzyskanie korzystniejszych wyników dla organów włośnikowatych jest wypadkową zarówno ich transgenicznego charakteru jak i samej instalacji wielkolaboratoryjnej. Plagiotropizm organów transformowanych przyczynił się niewątpliwie do lepszego napowietżenia medium wzrostowego w systemie natryskowym i w efekcie intensywniejszego wzrostu biomas (Wysokińska, 2000a, 2000b; Wasilewska i Królicka, 2005).

Jak już wspomniano zawartość kwasu rozmarynowego w systemie *in vitro* korzeni włośnikowatych *S. apiana*, zrealizowanym w instalacji natryskowej, jest porównywalna do kultur korzeni transgenicznych innych gatunków z rodzaju *Salvia*, co wskazuje na określoną wartość użytkową prezentowanego osiągnięcia. Niemniej jednak należy pamiętać, że istotnym ograniczeniem wykorzystania kultur korzeni transgenicznych w celach terapeutycznych jest wytwarzanie przez nie związków podobnych do opin, które mogą być toksyczne dla komórek ssaków (Hussain i in., 2022). Koszty oczyszczania wyciągów z powyższych substancji sprawiają, że przy ocenie danej strategii należy uwzględnić nie tylko produktywność, ale i koszt jednostkowy otrzymania połączeń naturalnych za pomocą opracowanych systemów *in vitro*, stąd bezpieczniejsze oraz tańsze jest wykorzystanie wyizolowanych, z kultur tkankowych, pojedynczych metabolitów, a nie wieloskładnikowych wyciągów.



Ryc. 35. Porównanie produktywności kwasu rozmarynowego w obrębie wszystkich systemów *in vitro* korzeni *S. apiana*, prowadzonych w bioreaktorach: kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych.

Doświadczenie prowadzono w pożywce SH, pozbawionych regulatorów wzrostu lub suplementowanych IBA (1,0 – 1,5 mg L⁻¹), przez 40, 48 lub 60 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD. Oznaczenia osi poziomej: typ kultury (KA – korzenie anatomiczne; KT – klon TA1)/rodzaj bioreaktora/typ medium/czas kultywacji w dniach.

2.4.3 Kultury ciągle mikropędów *S. apiana* – wzrost, akumulacja lotnych terpenów oraz wybrane aspekty aktywności biologicznej

Wyrowadzone, na wcześniejszym etapie prac biotechnologicznych, kultury mikropędów *S. apiana* (medium SH_B), ze względu na znaczną żywotność ($G_i \approx 580\%$) oraz zachowaną zdolność do biosyntezy lotnych związków terpenowych (zawartość olejku eterycznego wynosząca 1,27%), uznano za odpowiednie do prowadzenia eksperymentów, których nadrzędnym celem badawczym było otrzymanie, na bazie szałwii białej, roślinnego systemu *in vitro*, mogącego stanowić ciągłe źródło powyższego zespołu połączeń naturalnych (rozd. 3.1.9.3).

Prace doświadczalne, prezentowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, obejmowały określenie wpływu typu systemu *in vitro* na przyrost omawianych biomas, a następnie opracowanie profili wzrostowych mikroroślinek rosnących aktywnie w kulturze wytrząsanej, a także wybranej, zoptymalizowanej hodowli bioreaktorowej. Scharakteryzowanie dynamiki przyrostu mikropędów szałwii białej w cyklu wzrostowym, pozwoliło na realizację celów badawczych stawianych podczas prowadzenia dalszych eksperymentów biotechnologicznych, tj. opracowanie wstępnych warunków hodowli biomas *S. apiana* w instalacjach wielkolaboratoryjnych, przy zastosowanej objętości roboczej bioreaktorów wynoszącej 200 i 500 mL, a także zaplanowanie właściwego czasu na dodatek do kultur elicytorów i substancji odżywczych warunkujących ewentualne zwiększanie poziomów frakcji olejkowej w tkankach.

Przeprowadzona na końcowym etapie prac biotechnologicznych seria eksperymentów dotycząca stymulacji biosyntezy lotnych terpenów w mikropędach *S. apiana*, została wykonana w wybranym typie bioreaktora o objętości roboczej wynoszącej 200 mL. W pracach doświadczalnych zastosowano stres środowiskowy w postaci elicytorów biotycznych (wyciąg drożdżowy, chitosan oraz ergosterol) oraz dodatkowo zabieg dokarmiania kultur *S. apiana* substancjami odżywczymi i witaminami, znajdującymi się w soku z liści pokrzywy zwyczajnej, który przygotowano w laboratorium bezpośrednio przed dodaniem do medium wzrostowego (rozd. 3.1.9.3.5).

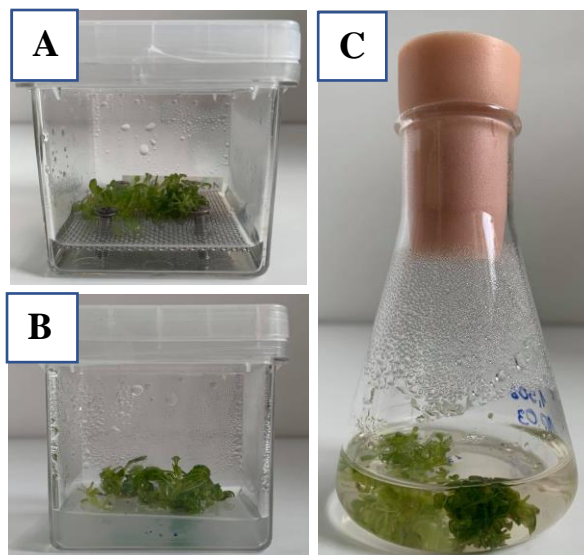
Zgodnie z założeniem projektu doktoranckiego finalne prace eksperymentalne związane były z oceną wybranych kierunków aktywności biologicznej olejków eterycznych uzyskanych z bioreaktorowych kultur *in vitro* *S. apiana* oraz z liści rośliny gruntowej, a także 1,8-cineolu będącego dominującym składnikiem frakcji lotnych obecnych w obydwu matrycach roślinnych. Powyższe badania dotyczyły zdolności omawianego monoterpenu oraz zawierających go olejków eterycznych do hamowania procesów patologicznych, towarzyszących wielu chorobom cywilizacyjnym (Furman i in., 2019; Huang i in., 2008; Alonso-Castro i in., 2023). Oceniono aktywność inhibicyjną wspomnianego zespołu lotnych terpenów względem acetylocholinoesterazy, tyrozynazy i hialuronidazy oraz jego działanie proapoptyczne względem limfocytów T u zdrowych ochotników.

2.4.3.1 Optymalizacja warunków prowadzenia kultur ciągłych mikropędów *S. apiana* w skali laboratoryjnej

2.4.3.1.1 Wpływ typu kultury na wzrost biomasy

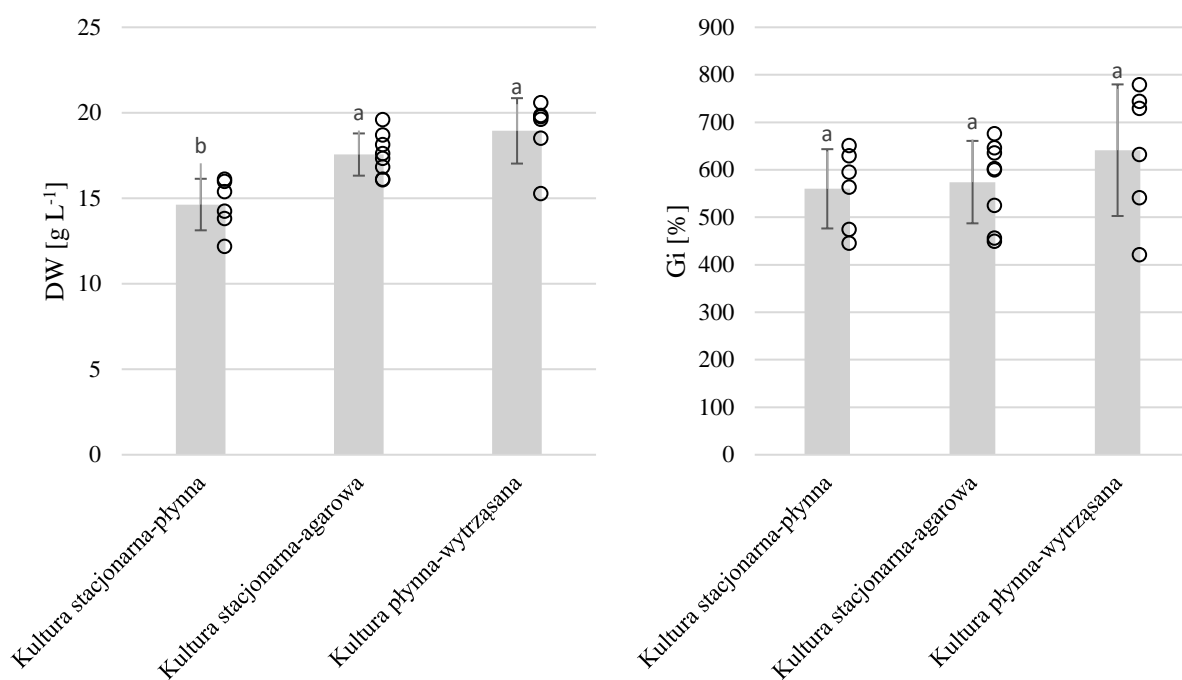
Na wstępnym etapie, opisywanej w niniejszym podrozdziale, serii eksperymentów, przedstawiono wpływ na parametry wzrostowe kultury mikropędów *S. apiana* takich czynników jak: dostęp tkanek do medium odżywczego oraz powietrza, stopień zestalenia pożywki czy ruch obrotowo-oscylacyjny wytrząsarki w hodowli płynnej. Mikrooślinki badanego gatunku namnażano, w prezentowanej serii doświadczalnej, w tym samym przedziale czasowym, na podłożu zestalonym agarem lub w pożywce płynnej – jako systemy stacjonarne bądź wytrząsane (rozdz. 3.1.9.3.2). Biomasa wykorzystaną w doświadczeniu stanowiły mikropędy kolekcyjne *S. apiana*, rosnące aktywnie na agarowej pożywce SH_B (rozdz. 3.1.3). *Inoculum* do zainicjowania eksperymentu, w ilości ok. 1,5 g, zebrano w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego. Do wybranych naczyń hodowlanych (kolby Erlenmeyera poj. 100 ml – kultura wytrząsana i pojemniki Magenta[®] – kultury: stacjonarne płynne i agarowe – Ryc. 36), wprowadzano każdorazowo ok. 4-5 kępek mikropędów badanego gatunku i kultywowano na/w pożywce SH_B. W przypadku kultury stacjonarnej płynnej, pojemniki Magenta[®] wyposażono w samodzielnie wykonane metalowe siatki immobilizujące, zlokalizowane ok. 1 cm nad ich dnem, umożliwiające jedynie częściowe zanurzenie biomasy w podłożu odżywczym. Powyższe doświadczenie prowadzono przez 21 dni, w warunkach standardowych (rozdz. 3.1.4). Szczegółowe schematy poszczególnych instalacji oraz opis przeprowadzonych procedur eksperymentalnych przedstawiono w rozdz. 3.1.9.3.2.

Stwierdzono, że pędy *in vitro* *S. apiana*, namnażane w różnych systemach hodowlanych (kultury stacjonarne-płynne i agarowe oraz wytrząsane), osiągnęły stosunkowo wysokie wartości współczynników przyrostu (Gi), bez względu na zastosowane warunki doświadczalne. Wynosiły one, odpowiednio, 559,9, 574,0 oraz 641,3% (Ryc. 37). Obserwacje makroskopowe rosnących aktywnie tkanek roślinnych nie wykazały między nimi różnic na poziomie cech morfologicznych, w przeciwieństwie do podanych powyżej zmiennych wartości w zakresie całkowitej masy pędów. Mikropędy, namnażane we wszystkich zastosowanych systemach wzrostowych, zachowały żywo zieloną barwę bez cech nekrozy oraz zaburzeń gospodarki wodnej w poszczególnych eksplantatach. Nie stwierdzono także w biomasach obecności rozrastającej się tkanki przyrannej. Uzyskane rezultaty wskazują na wysoką zdolność adaptacyjną wyprawdzonych mikropędów szalwii białej do wzrostu w zróżnicowanych warunkach *in vitro*.



Ryc. 36. Mikropędy *S. apiana* (medium SH_B), namnażane w różnych systemach *in vitro*: kultura – stacjonarna płynna (A) i agarowa (B) oraz płynna wytrząsana (C).

Zdjęcie wykonano w 3. dniu kultury tkanek, w warunkach standardowych.



Ryc. 37. Wzrost mikropędów *S. apiana* (SH_B), namnażanych w różnych systemach *in vitro*: kultura stacjonarna – płynna i agarowa oraz płynna wytrząsana (warunki standardowe).

Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 6 prób ± SD.

W pojemnikach Magenta[®], wyposażonych w siatki immobilizujące biomasy, otrzymano kultury charakteryzujące się najniższymi, w eksperymencie, parametrami wzrostu. Najprawdopodobniej, mimo ograniczonego „podtapiania” części mikropędów poprzez ich kultywację na wspomnianych platformach wykonanych z siatek, powyższy zabieg tylko częściowo pozwalał zmniejszyć stres związany z ciągłym

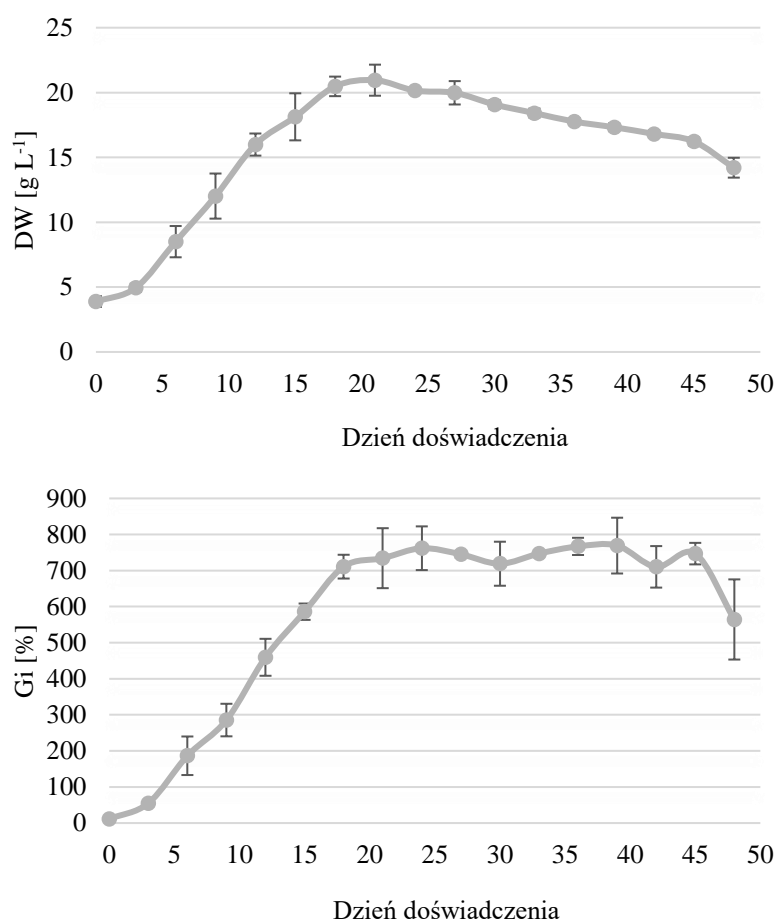
zanurzeniem dolnych fragmentów biomas i wynikający z tego upośledzony proces wymiany gazowej tkanek roślinnych. Zachęca to do namnażania mikropędów *S. apiana* w płynnych systemach okresowo-zalewowych lub natryskowych, co zredukowałoby bezpośredni czas zanurzania tkanek w medium i tym samym stan hipoksji. Należy dodać, że przy użyciu do hodowli tych samych plastikowych pojemników Magenta®, ale zawierających pożywkę agarową stwierdzono lepszy przyrost badanych pędów, co świadczy o korzystnym wpływie zestalonego medium na procesy wzrostowe kultury, w której całe mikrośliski znajdowały się w fazie gazowej.

Namnażanie pędów szałwii białej w kolbach Erlenmeyera (system płynny-wytrząsany) wykazało, że otrzymana kultura nie jest szczególnie wrażliwa na działanie sił ścinających. Dobra tolerancja stresu mechanicznego, wynikającego z ruchu obrotowo-oscyłacyjnego wytrząsarki, wydaje się być cechą indywidualną badanego gatunku, bowiem w podobnych warunkach hodowlanych stwierdzono zaburzony proces wzrostowy mikropędów szałwii lekarskiej. Przeciwnie do prezentowanego doświadczenia (Ryc. 37), znacznie lepsze efekty obserwowano, w pojemnikach Magenta®, podczas kultywacji, częściowo zanurzonych w płynnej pożywce MS, biomas *S. officinalis* (Grzegorzczak i Wysokińska, 2008).

Podsumowując, przeprowadzony eksperyment wykazał, że, z uwagi na metabolizm pierwotny, możliwe jest efektywne namnażanie mikropędów *S. apiana* w systemach *in vitro* zapewniających zróżnicowany dostęp powietrza i pożywki do tkanek. Najlepsze rezultaty, w postaci intensywnego przyrostu biomas, osiągnięto w warunkach kultur wytrząsanych, stwierdzając jednocześnie stosunkowo dużą odporność pędów szałwii białej na stres mechaniczny. Wykazano ponadto, że z uwagi na słabą adaptacją tkanek roślinnych do stanów częściowej hipoksji, korzystnym wydaje się okresowe doprowadzanie pożywek wzrostowych do omawianej kultury, co jest możliwe podczas zastosowania do kultywacji instalacji o charakterze bioreaktorów (rozpylanie mediów wzrostowych za pomocą generatora mgły lub okresowe zanurzenie w nich tkanek).

2.4.3.1.2 Profil wzrostowy mikropędów *S. apiana* w kulturze płynnej – wytrząsanej

Na kolejnym etapie, opisywanej w niniejszym podrozdziale serii eksperymentów, dla mikropędów *S. apiana*, namnażanych w medium SH_B (rozdz. 3.1.3), wyznaczono, w warunkach kultur wytrząsanych, profil wzrostowy. Powyższe doświadczenie prowadzono przez 48 dni, w warunkach standardowych (rozdz. 3.1.9.3.3). Próbki rosnących aktywnie biomas zbierano co 3 dni, w trzech powtórzeniach. Wyniki prac eksperymentalnych przedstawiono na rycinach w formie wykresów obrazujących wartości suchej masy (DW) i współczynników przyrostu (Gi) osiąganych przez kultury w poszczególnych dniach cyklu wzrostowego (Ryc. 38).

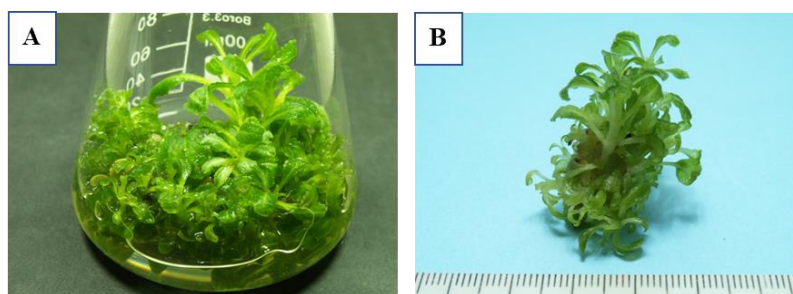


Ryc. 38. Profile wzrostowe wykreślone, na podstawie wartości współczynnika przyrostu (Gi) i suchej masy (DW), dla kultur wytrząsanych mikropędów *S. apiana* (medium SH_B) w 48-dniowym cyklu eksperymentalnym.

Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób \pm SD.

Określenie parametrów wzrostowych biomas szalwii białej (DW oraz Gi), podczas 48-dniowego cyklu eksperymentalnego, pozwoliło na precyzyjne określenie przedziałów czasowych, w których następowały poszczególne stadia rozwojowe badanych mikropędów, tj. krótka faza spoczynkowa (< 3 dni), wzrostu logarytmicznego (3-15 dni) i liniowego (15-18 dni), następnie wydłużona faza stacjonarna (18-25 dni) oraz zamieranie (> 25 dni). Ostatni z wymienionych okresów przyrostu był szczególnie widoczny na wykresie obrazującym zmiany wartości DW tkanek w czasie. Współczynniki Gi mikropędów w dniach od 20. do 39. pozostawały bez większych zmian, co wskazywałoby na przedłużające się *plateau*, niemniej jednak, począwszy od dnia 25., obserwowano wyraźne brązowienie tkanek roślinnych oraz nasilenie brunatnienia pożywki wzrostowej, co jest charakterystyczne dla fazy zamierania. Obserwowane zjawisko związane jest prawdopodobnie z postępującą wityfikacją tkanek w tym czasie, wiążącą się z większą zawartością wody w opisywanej kulturze. Najwyższy przyrost suchej masy testowanych mikropędów stwierdzono w 21. dniu ich

namnażania ($DW = 21,0 \text{ g L}^{-1}$; $Gi = 734,3\%$ – Ryc. 38). W tym czasie pędy szaławii białej charakteryzowały się intensywnie zieloną barwą i brakiem zmian nekrotycznych (Ryc. 39). W związku z powyższym, zbiór biomas otrzymanych w wyniku kultury mikropędów *S. apiana* w skali wielkolaboratoryjnej, na późniejszych etapach prac doświadczalnych, postanowiono prowadzić między 21. a 27. dniem cyklu wzrostowego, tj. w czasie kiedy obserwowano największą zawartość świeżej i suchej masy tkankowej w systemie. W kolejnych eksperymentach (rozdz. 2.4.3.2.1) dotyczących stymulacji produkcji lotnych terpenów w powyższych kulturach na drodze elicytacji, w oparciu o wyniki dotyczące charakteru przyrostu wytrząsanych mikropędów szaławii białej, poszczególne czynniki stresogenne postanowiono dodawać do pożywki na końcowym etapie fazy wzrostu liniowego (dzień 14.) lub w dniu 18., czyli na początku *plateau*. Tym samym elicytory suplementowano w dniach, w których zgodnie z danymi literaturowymi, dochodzi do najbardziej intensywnej biosyntezy związków naturalnych o charakterze metabolitów wtórnych (Narayani i Srivastava, 2017; Jha i Mohamed, 2022; Selwal i in., 2023).



Ryc. 39. Wytrząsana kultura mikropędów *S. apiana* (medium SH_B) w 21. dniu cyklu wzrostowego (faza stacjonarna) (Krol i in., 2023);

A – biomasa w kolbie Erlenmeyera; B – widok na pojedynczą kępkę mikropędów.

Podsumowując, przeprowadzony eksperyment wykazał, że badana biomasa, w warunkach hodowli płynnej-wytrząsanej, charakteryzuje się dosyć dynamicznym oraz intensywnym przyrostem, szczególnie w porównaniu do wyników innych eksperymentów *in vitro*, w których opisywano wzrost mikropędów gatunków z rodzaju *Salvia* (Grzegorzczuk i Wysokińska, 2008). Za najbardziej optymalne, z uwagi na osiągnięte wysokie parametry wzrostowe, wydaje się namnażanie uzyskanych tkanek w krótkim, 28. dniowym cyklu, zbierając materiał roślinny do badań fitochemicznych i biologicznych między 21. a 28. dniem trwania eksperymentu, tj. pod koniec fazy stacjonarnej.

2.4.3.2 Mikropędy *S. apiana* prowadzone w instalacjach wielkolaboratoryjnych

Ostatni etap badań biotechnologicznych nad kulturami ciągłymi mikropędów *S. apiana* dotyczył adaptacji wspomnianych biomas do wzrostu w bioreaktorach z uwzględnieniem wpływu konstrukcji powyższych urządzeń na żywotność tkanek, tempo ich przyrostu oraz poziomy akumulacji lotnych terpenów. Na danym etapie doświadczeń, podjęto również próbę wykorzystania wybranych strategii

biotechnologicznych takich jak: elicytacja oraz dokarmianie kultur substancjami odżywczymi, w celu zwiększenia zawartości olejku eterycznego w testowanym systemie *in vitro*.

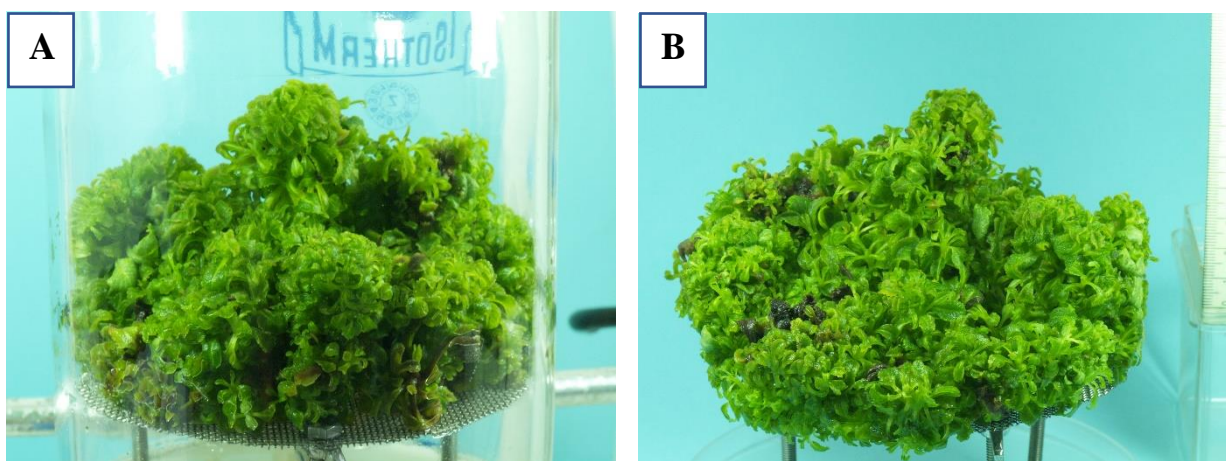
Bioreaktory znajdujące zastosowanie w kultywacji pędów *in vitro* to przede wszystkim instalacje okresowo-zalewowe oraz natryskowe (Malepszy, 2012). Zagadnienie to opisano szczegółowo w publikacji, będącej częścią prezentowanego manuskryptu (Krol i in., 2020). W licznych eksperymentach wykazano, że ich konstrukcja minimalizuje ryzyko powstawania sił ścinających w systemie i ułatwia penetrację światła oraz tlenu w głąb przyrastających biomas. Instalacje tego typu były z powodzeniem wykorzystane w pracach nad zwiększaniem skali hodowli mikropędów roślin z rodzaju *Salvia*, takich jak: *S. officinalis* L. (Grzegorzczak i Wysokińska, 2010), *S. viridis* L. (Grzegorzczak-Karolak i in., 2022) oraz *S. rosmarinus* Spenn. (Villegas-Sánchez i in., 2021). Należy jednak podkreślić, że w wymienionych eksperymentach skupiono się na otrzymaniu roślinnych systemów *in vitro* z przeznaczeniem do produkcji nietlotnych terpenów oraz polifenoli, natomiast nie podjęto do tej pory prób namnażania mikropędów szalwii w bioreaktorach, ukierunkowanych na akumulację olejków eterycznych.

Zgodnie z podanymi powyżej kryteriami wyboru instalacji wielkolaboratoryjnych do namnażania części nadziemnych roślin wyższych, w tym również szalwii, a także w oparciu o doświadczenie własne Promotor (Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2005; Szopa i in., 2017, 2019; Kokotkiewicz i in., 2021) zdecydowano się na kultywację mikropędów *S. apiana* w prototypowym urządzeniu natryskowym. Skonstruowany, w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed, bioreaktor został wyposażony w pojedynczą siatkę immobilizującą pędy, co pozwalało biomasom roślinnym rosnąć w fazie gazowej, na mechanicznym nośniku, przy jednoczesnym efektywnym, okresowym jej zraszaniu pożywką (Szopa i in., 2017). Kolejnymi rodzajami instalacji wykorzystywanych do kultywacji testowanych mikropędów były komercyjne systemy okresowo-zalewowe RITA[®] i PLANTFORM[®]. W tym wypadku medium eksperymentalne wpompowywano cyklicznie do zbiorników hodowlanych jedynie na określony czas, po którym było ono z powrotem zawracane do dodatkowych rezerwuarów, znajdujących się pod koszami immobilizującymi eksplantaty. W efekcie, w 90-minutowym cyklu doświadczalnym, biomasy szalwii białej pozostawały jedynie przez 5 min. w kontakcie z pożywką wzrostową. Szczegółowe schematy instalacji bioreaktorowych przedstawiono w rozdz. 3.1.9.3.4.1 na Ryc. 61.

Biomasy wykorzystywane w opisywanych eksperymentach pochodziły z kolekcyjnej kultury mikropędów *S. apiana*, namnażanej na pożywce SH_B (rozdz. 3.1.8.2.4). *Inoculum* roślinne, w ilości ok. 21,4 g (objętość robocza instalacji – 500 mL: bioreaktor PLANTFORM[®] oraz system natryskowy) lub 8,5 g (objętość robocza – 200 mL: bioreaktor RITA[®]), zbierano w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego powyższej hodowli i przeznaczono do kultywacji we wszystkich bioreaktorach. Czas trwania inkubacji biomas szalwii białej w wymienionych urządzeniach wyznaczono w oparciu o opracowany profil wzrostowy mikropędów badanego gatunku, namnażanych w kulturze wytrząsanej (rozdz. 3.1.9.1.3). W zaplanowanych eksperymentach, rosła aktywnie, w warunkach standardowych, matryce roślinne

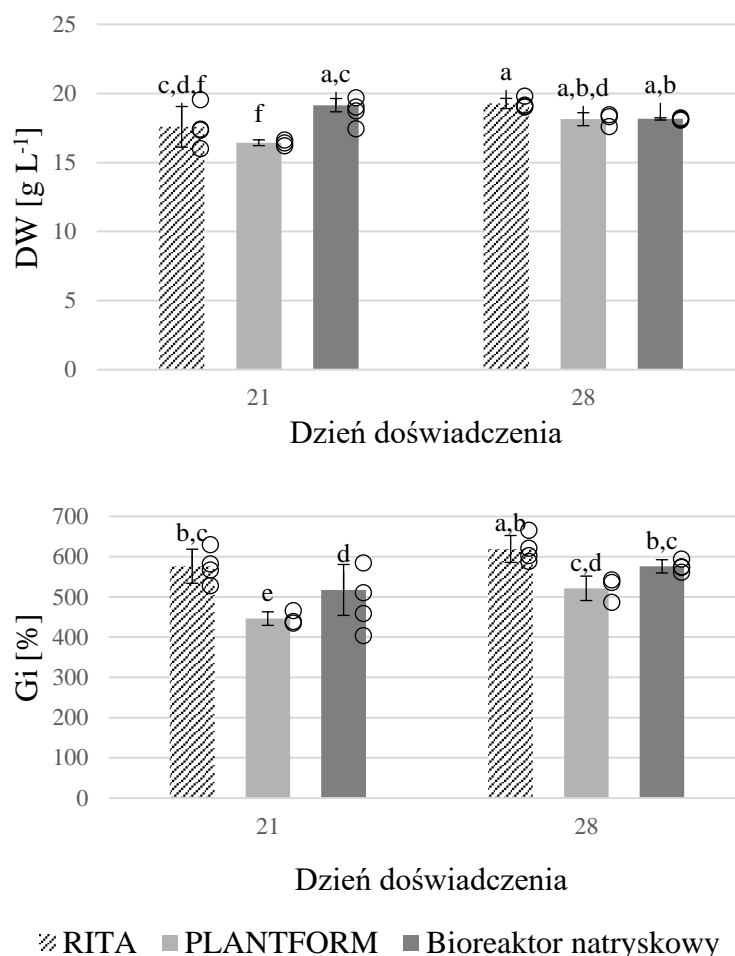
zbierano jedynie w dwóch dniach cyklu wzrostowego (dzień 21 i 28), co wiązało się z ograniczoną liczbą bioreaktorów w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed. Dopiero po finalnym doborze instalacji służącej do prowadzenia dalszych doświadczeń biotechnologicznych, schemat pobierania próbek roślinnych z kultur o charakterze okresowym, rozszerzano o kolejne dni (7, 14, 35 i 42), co pozwoliło na wyznaczenie profilu wzrostowego mikropędów *S. apiana*, namnażanych w skali wielkolaboratoryjnej. Wspomniane biomasy po zakończonym okresie inkubacji zbierano, wyznaczano dla nich parametry wzrostu, a następnie przeznaczano do badań fitochemicznych w celu określenia stężenia oraz składu jakościowego i ilościowego syntezowanych w nich frakcji lotnych (rozdz. 3.2.3.1).

W wyniku eksperymentu, przeprowadzonego w prototypowym bioreaktorze natryskowym (objętość robocza wynosząca 500 mL), uzyskano mikropędy *S. apiana* o morfologii zbliżonej do biomas rosnących w mniejszej skali, tj. w pojemnikach Magenta® oraz kolbach Erlenmeyera (rozdz. 2.4.3.1.1). Stwierdzenie to dotyczy zarówno mikropędów kultywowanych przez okres 21 dni, jak i namnażanych o tydzień dłużej (28 dni – Ryc. 40). Charakteryzowały się one dużą żywotnością, brakiem cech wskazujących na wiotryfikację oraz żywozieloną barwą. Obliczone parametry wzrostowe tkanek roślinnych rosnących w bioreaktorach natryskowych wykazały, że dalsze zwiększanie skali hodowli mikropędów szalwii białej, w oparciu o ten rodzaj instalacji wielkolaboratoryjnych, tylko nieznacznie, w porównaniu z odpowiednią kulturą wytrząsaną ($G_i = 641,2\%$ – Ryc. 37), przyczyniło się do spadku wartości współczynników przyrostu testowanych pędów ($G_i = 517,3\%$ – dzień 21 i $G_i = 575,9\%$ – dzień 28; Ryc. 41). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że inkubacja matryc roślinnych w bioreaktorze natryskowym, przez okres 28 dni, pozwoliła osiągnąć, w jednym eksperymencie, największą ilość biomas szalwii białej w instalacjach o objętości roboczej wynoszącej 500 mL.



Ryc. 40. Kultura mikropędów *S. apiana*, pochodząca z prototypowego bioreaktora natryskowego, w 28. dniu doświadczenia (Krol i in., 2023);

A – widok na pojemnik hodowlany z mikropędami, z boku, B – zebrana biomasa, immobilizowana na stalowej siatce.

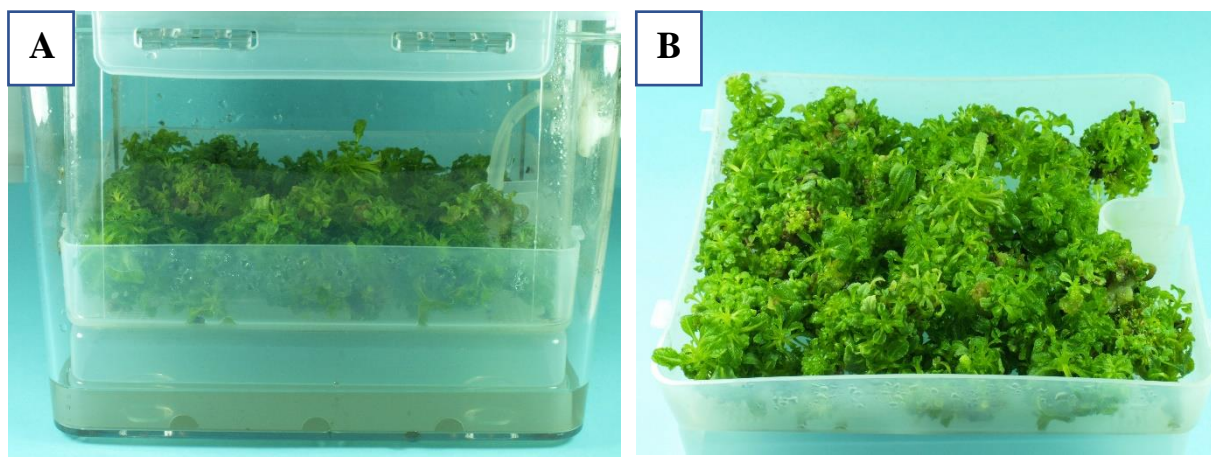


Ryc. 41. Porównanie wartości parametrów wzrostowych [sucha masa (DW) oraz współczynnik przyrostu (Gi)] kultur mikropędów szałwii białej, prowadzonych w instalacjach RITA[®], PLANTFORM[®] oraz w prototypowym bioreaktorze natryskowym.

Doświadczenie prowadzono w pożywce SH_B, w warunkach standardowych, przez 21 lub 28 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD.

Kultywacja mikropędów *S. apiana* w bioreaktorze okresowo-zalewowym PLANTFORM[®] również umożliwiła otrzymanie juwenilnej biomasy, bez nasilonej nekrozy oraz obecności liści potwornych (Ryc. 42). W tym przypadku obserwowano jednak niższe wartości parametrów wzrostowych kultury, w porównaniu z obliczonymi dla pędów namnażanych w instalacji natryskowej. Wynosiły one, dla biomas kultywowanych przez 21 i 28 dni, odpowiednio: 446,0 i 521,3% (Ryc. 41), niemniej jednak, należy pamiętać, że wartości współczynników przyrostu, dla pędów rosnących jako kultury *in vitro*, oscylujące wokół 500% są zadowalające (Zimmerman, 1988) i świadczą o właściwym doborze warunków hodowli wielkoskalowych mikropędów szałwii białej oraz uzasadniają, w aspekcie ekonomicznym, dalsze prace z wykorzystaniem bioreaktora PLANTFORM[®]. Warto również w tym miejscu zaznaczyć, że omawiany system *in vitro* jest tani i łatwo dostępny oraz istnieje możliwość

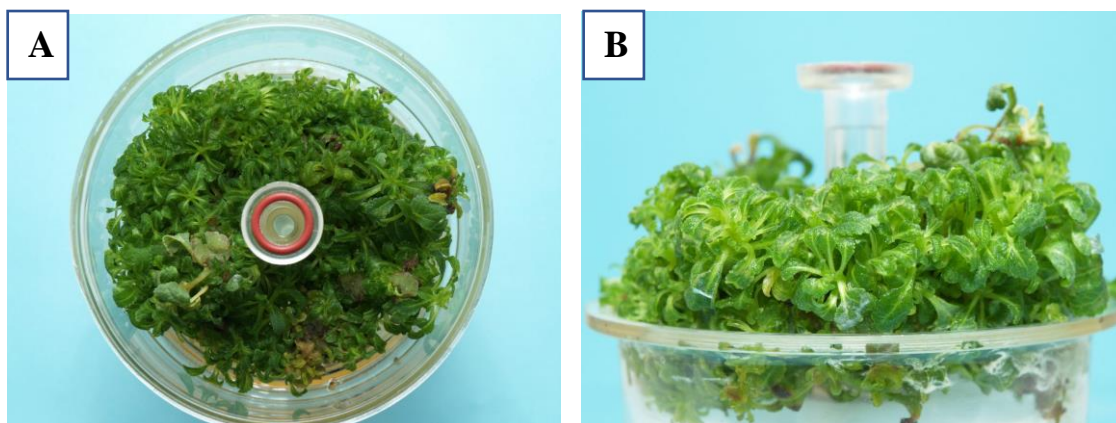
szeregowego łączenia tego typu urządzeń, uzyskując w efekcie wydajność właściwą skali półtechnicznej i technicznej (Krol i in., 2020; Grzegorzczak-Karolak i in., 2022).



Ryc. 42. Kultura mikropędów *S. apiana*, pochodząca z bioreaktora PLANTFORM[®], w 28. dniu doświadczenia (Krol i in., 2023);

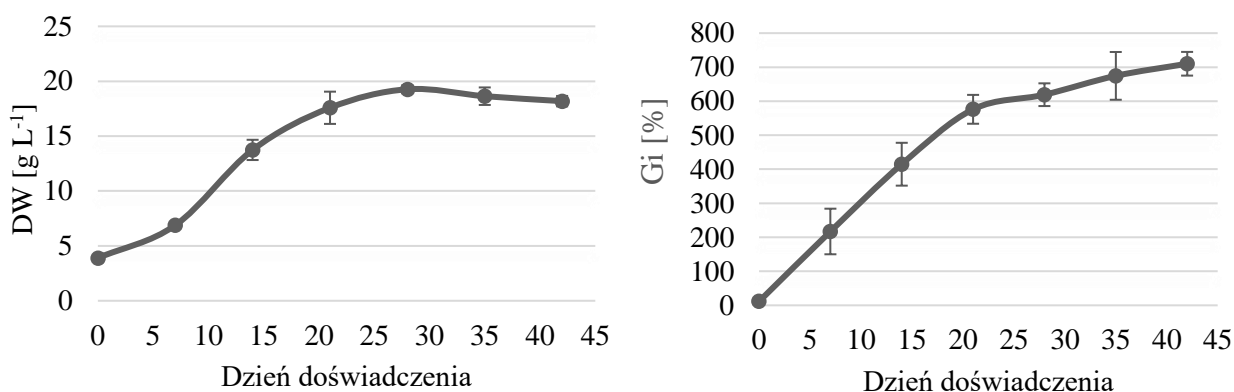
A – widok na pojemnik hodowlany z mikropędami, z boku, B – zebrana biomasa w koszu immobilizującym.

Drugi z zastosowanych bioreaktorów, w którym wykorzystano mechanizm okresowo-zlewowy, tj. instalacja RITA[®], pracował z mniejszą objętością roboczą (200 mL) niż poprzednio omawiane urządzenia. W tym przypadku charakterystyka morfologiczna uzyskanych biomas była również w dużym stopniu odzwierciedleniem cech botanicznych rośliny macierzystej. Mikropędy, zebrane zarówno w 21. jak i 28. dniu kultury, we wspomnianych instalacjach, były jasnozielone, żywotne oraz pozbawione cech nekrozy. Sporadycznie w biomasach obserwowano kalus embriogeniczny, tworzący się u podstaw eksplantatów (Ryc. 43). Pożywka przez cały okres trwania eksperymentu pozostawała klarowna. Najwyższą wartość współczynnika przyrostu tkanek osiągnięto przy kultury mikropędów *S. apiana* przez 28 dni i wynosiła ona 619,1% (Ryc. 44). Tym samym, wykorzystując omawiany bioreaktor udało się uzyskać ilość testowanych biomas niemal na poziomie skali laboratoryjnej ($G_i = 641,2\%$ – kultura wytrząsa). Wydaje się więc, że poszczególne elementy konstrukcyjne bioreaktora RITA[®], a w szczególności związane z dostarczeniem pożywki i napowietrzeniem kultury nie zaburzają podstawowych procesów życiowych zachodzących w namnażanych pędach, takich jak: wymiana gazowa, pobieranie substancji odżywczych z medium wzrostowego czy usuwanie zbędnych produktów metabolizmu. Z tego względu powyższe instalacje wybrano do kontynuacji badań biotechnologicznych nad kulturami pędów *S. apiana*.



Ryc. 43. Kultura mikropędów *S. apiana*, pochodząca z bioreaktora RITA[®], w 28. dniu doświadczenia (Krol i in., 2023); widok na pojemnik hodowlany z mikropędami, z góry (A) oraz z boku (B).

Rozszerzenie doświadczeń w bioreaktorze RITA[®], w zakresie częstszego zbierania biomas, w wydłużonym cyklu eksperymentalnym (7., 14., 35. i 42. dzień), pozwoliło określić kompletny profil wzrostowy testowanej kultury w skali wielkolaboratoryjnej (Ryc. 44). Mikropędy *S. apiana*, inkubowane w powyższej instalacji, charakteryzowały się nieco odmienną dynamiką wzrostu w stosunku do kultury wytrząsanej (rozdz. 2.4.3.1.2). W profilu wzrostowym niniejszej biomas nie zaobserwowano wyraźnie zaznaczonej fazy opóźnienia, co wskazuje na szybką adaptację komórek roślinnych do nowych warunków środowiskowych. Do 21. dnia omawianego eksperymentu mikropędy przyrastały liniowo, po czym, aż do 35. dnia ich kultywacji, obserwowano na wykresie utrzymującą się fazę stacjonarną. Największą ilość suchej biomas otrzymano przy zbiorze tkanek w 28. dniu hodowli ($DW = 19,3 \text{ g L}^{-1}$; $Gi = 619,1\%$ – Ryc. 44), co odbiega od wyników uzyskanych w kulturze wytrząsanej ($DW_{\max} = 21,0 \text{ g L}^{-1}$; $Gi = 734,3\%$ – dzień 21. – Ryc. 38). Tym samym, przedłużone rezultaty dowodzą, że zastosowanie bioreaktora RITA[®], w opisywanej serii eksperymentów, spowodowało przesunięcie, w cyklu wzrostowym mikropędów *S. apiana*, początku fazy stacjonarnej o ok. 7 dni. Po 35 dniu kultywacji omawianych pędów obserwowano zaś w tkankach nasilone zmiany nekrotyczne, towarzyszące wchodzeniu hodowli w okres zamierania.

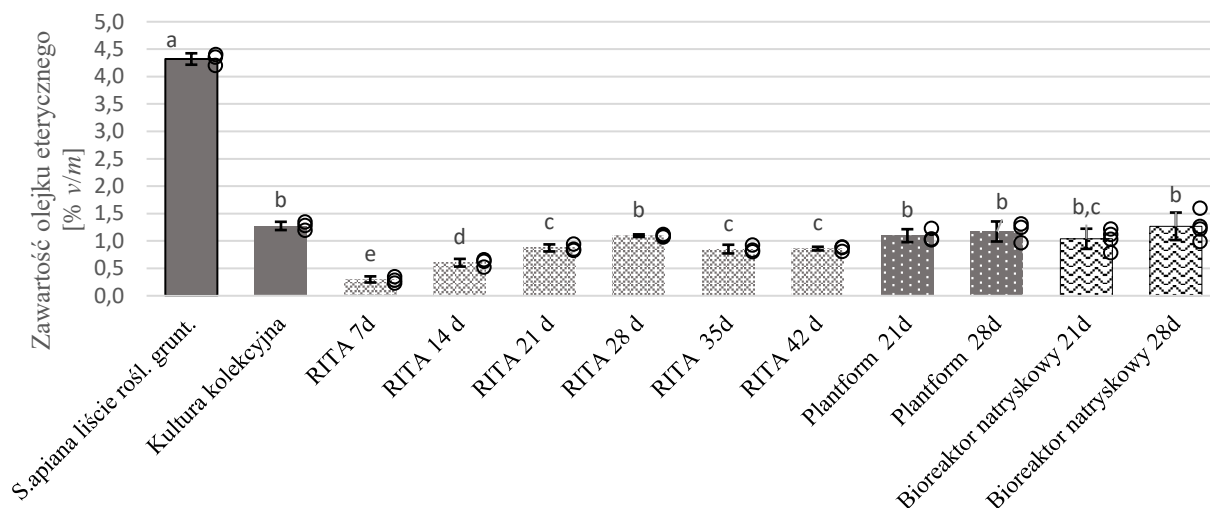


Ryc. 44. Profile wzrostowe mikropędów *S. apiana* wykreślone na podstawie wartości współczynników przyrostu (Gi) i suchej masy (DW), dla kultur namnażanych w instalacjach RITA[®], w pożywce SH_B, przez 42 dni.

Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

Hydrodestylacja w aparacie Clevengera (rozdz. 3.2.3.1) biomasz szałwii białej, otrzymanych na opisywanym etapie doświadczeń wykazała, że pędy, namnażane w instalacjach wielkolaboratoryjnych, charakteryzują się zawartością olejku eterycznego (1,27% – bioreaktor natryskowy, 28 dzień kultywacji) na poziomie odpowiadającym kulturze kolekcyjnej (1,27% – Ryc. 45) lub nieznacznie niższym (PLANTFORM[®] 28 dni – 1,17%; PLANTFORM[®] 21 dni – 1,10% i RITA[®] 28 dni – 1,10%). Jedynie w przypadku bioreaktorów RITA[®], podczas krótszej inkubacji kultur niż 21 dni lub dłuższej niż 28 dni obserwowano niższą zawartość olejku eterycznego w tkankach, co może wiązać się ze specyfiką zmian w obrębie pierwotnego i wtórnego metabolizmu komórek roślinnych w trakcie trwania cyklu wzrostowego oraz udziałem procesów katabolicznych w końcowych etapach eksperymentu (Ryc. 44).

Analizując skład chemiczny frakcji lotnych wyizolowanych z mikropędów *S. apiana*, rosnących w różnych instalacjach wielkolaboratoryjnych, można zauważyć, że był on jedynie nieco zmieniony, w stosunku do kultury kolekcyjnej, pod względem jakościowym i charakteryzował się również niewielkimi różnicami ilościowymi w zakresie poszczególnych metabolitów terpenowych (Tab. 11). W wyizolowanych olejkach eterycznych dominowały, analogicznie jak w biomasach kolekcyjnych, monoterpene utlenione (33,96-58,55%), w tym 1,8-cineol (30,42-55,05%), kamfora (1,41-2,26%) oraz α -terpineol (0,09-0,14%), a także monoterpene o charakterze węglowodorów, takie jak: α -pinen (9,19-12,47%), β -pinen (11,34-19,90%) oraz β -mircen (1,73-2,16%). Frakcje seskwiterpenowe oznaczono natomiast, w namnożonych matrycach, w stężeniach zbliżonych (węglowodory – 9,49-14,30% oraz ich tlenowe pochodne – 0,53-1,57%) do tych zbadanych w próbkach olejków eterycznych wyizolowanych z biomasz pozyskanych w mniejszej skali (odpowiednio – 11,99 i 1,08%) (Tab. 11). Dominującymi związkami w tej grupie były: kariofilen (3,06-5,56%), aristolen (2,27-3,50%) oraz β -bisabolol (1,65-2,34%).



Ryc. 45. Zawartość olejku eterycznego w matrycach roślinnych *S. apiana* (liście rośliny gruntowej, kultura kolekcyjna *in vitro* oraz pędy namnażane w instalacjach RITA[®], PLANTFORM[®], a także w prototypowym bioreaktorze natryskowym; medium SH_B; warunki standardowe), zebranych po różnym czasie kultury (7-42 dni).

Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

Przeprowadzone analizy chromatograficzne (GC/FID i GC/MS) wykazały również, że po inkubacji mikropędów szalwii białej w bioreaktorach RITA[®] można było otrzymać kulturę syntezującą frakcję lotną, charakteryzującą się niższym poziomem monoterpenoidów (71,46-78,28%), zarówno względem kultury kolekcyjnej (81,06%), jak i biomas namnożonych w pozostałych instalacjach (83,58-85,83%). Obserwowane różnice ilościowe wynikały przede wszystkim z obniżonej zawartości w tkankach, hodowanych w bioreaktorach RITA[®], głównego metabolitu badanego zespołu, tj. 1,8-cineolu (Ryc. 46). Olejki te charakteryzowały się jednocześnie wyższą, względem pozostałych testowanych frakcji lotnych, zawartością seskwiterpenów, przy czym przeważały w nich związki węglowodorowe (12,07-14,30%), a w mniejszej ilości ich tlenowe pochodne (1,01-1,57%). W składzie olejków eterycznych, pozyskanych z biomas kultywowanych w bioreaktorach RITA[®], obecny był również limonen, w ilości ok. od 2 do 3-krotnie wyższej niż w pozostałych badanych próbkach. Stanowi on aktywny biologicznie monoterpen badanego gatunku o udokumentowanym działaniu przeciwzapalnym (Anandakumar i in., 2021). Warto w tym miejscu dodać, iż wymogiem ISO 9909 wobec dostępnego na rynku olejku eterycznego *S. officinalis* jest zawartość w surowcu limonenu na poziomie 0,5-3,0% (Jažo i in., 2023), natomiast zgodnie z monografią farmakopealną *Salviae lavandulifoliae aetheroleum* (Ph. Eur.) olejek eteryczny pozyskany z części nadziemnych szalwii hiszpańskiej powinien zawierać powyższy metabolit terpenowy w zakresie 2,0-6,5%.

W drugim z zastosowanych systemów okresowo-zalewowych otrzymano mikropędy charakteryzujące się bardzo zbliżonym profilem metabolicznym w stosunku do kultury kolekcyjnej (Tab. 11). Porównanie zawartości głównych składników frakcji lotnych, pozyskanych z biomas *S.*

apiana, kultywowanych w bioreaktorze PLANTFORM[®], ze związkami obecnymi w stacjonarnych mikropędach testowanego gatunku, wykazało jakościowe oraz ilościowe podobieństwo między obydwoma surowcami, a istniejące różnice nie były zazwyczaj istotne pod względem statystycznym (Ryc. 46). Warto zwrócić uwagę na obecność w oleju eterycznym, pozyskanym z omawianej instalacji wielkolaboratoryjnej, nieco wyższych, względem pozostałych systemów *in vitro*, ilości kamfory (2,00-2,26%). Jest to związek o właściwościach przeciwzapalnych i przeciwbólowych, powszechnie stosowany w leczeniu (Chen i in., 2013). Zgodnie z monografią farmakopealną *Salviae lavandulifoliae aetheroleum* (*Ph. Eur.*) frakcja lotna, wyizolowana z części nadziemnych tego gatunku, powinna zawierać powyższy metabolit terpenowy w ilości 11,0-36,0%, natomiast spełniający wymagania ISO 9909 olejek eteryczny *S. officinalis* charakteryzuje się obecnością omawianego monoterpenu na poziomie 4,5-24,5% (Jażo i in., 2023). Tym samym uzyskany, w prezentowanym doświadczeniu, system *in vitro* *S. apiana* pozwolił otrzymać mikropędy, syntezujące zespół lotnych terpenów o niższych, względem opisanych wymagań, zawartościach kamfory (1,41-2,26%).

Analizując skład frakcji lotnej wyizolowanej z mikropędów *S. apiana*, namnożonych w prototypowej instalacji natryskowej, podobnie jak w biomasach otrzymanych z bioreaktora PLANTFORM[®], wyraźnie zwraca uwagę wysokie podobieństwo profilu metabolicznego omawianych lotnych terpenów wobec zespołu związków wyizolowanych z biomasy kolekccyjnej (Tab. 11 oraz Ryc. 46). W materiale roślinnym pozyskanym z bioreaktorów natryskowych nie zidentyfikowano natomiast połączeń rozpoznanych wcześniej w kulturach stacjonarnych *S. apiana*, takich jak: nerolidol i kubebol, należących do alkoholi seskwiterpenoidowych. Powyższe związki występowały jednak, w surowcu kolekcyjnym, w ilościach nieprzekraczających 0,2%, zatem omawiane różnice nie mają znaczenia aplikacyjnego.

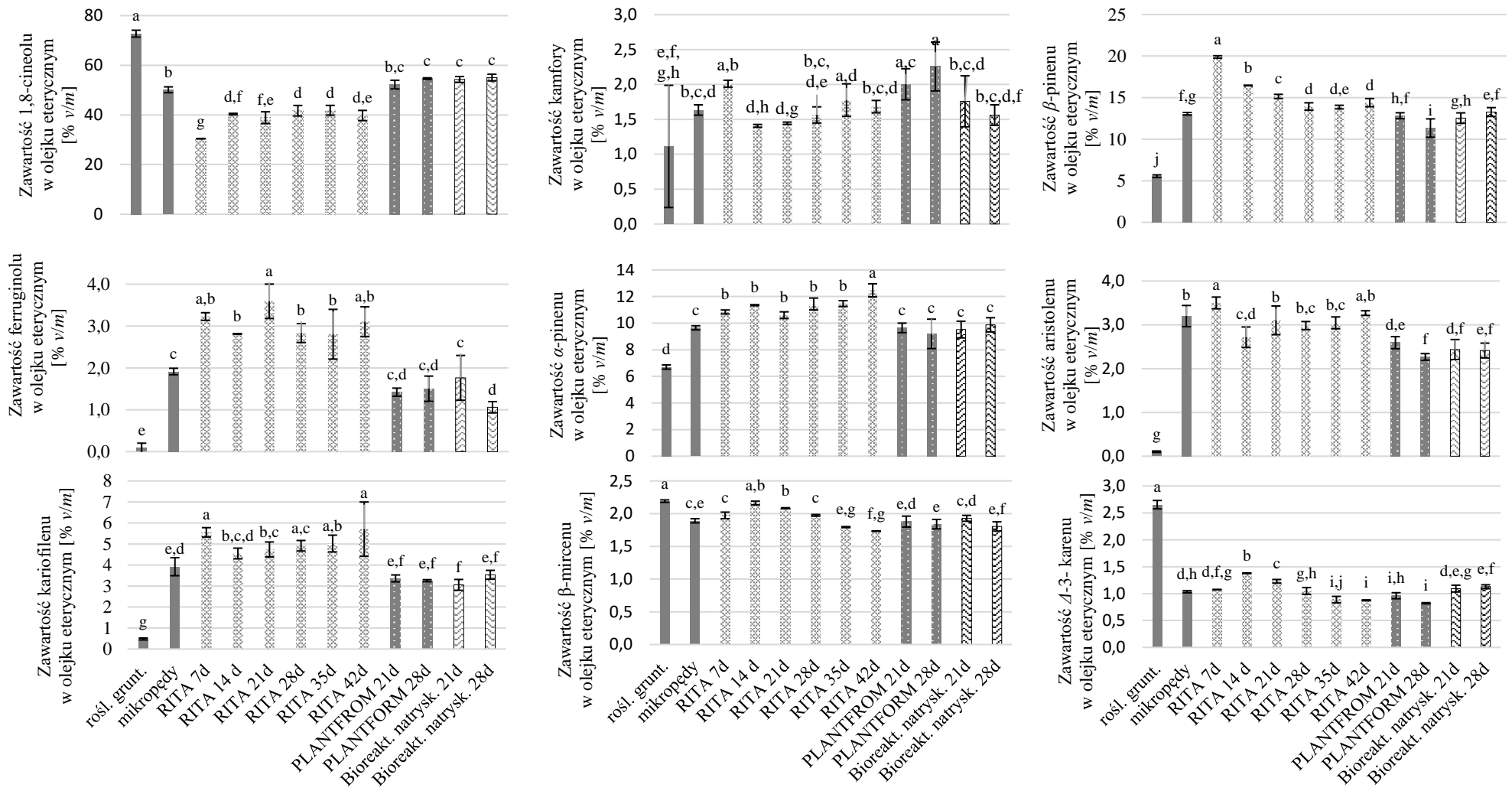
Tab. 11. Skład jakościowy i ilościowy olejków eterycznych otrzymanych z biomas *S. apiana*, namnażanych w różnych systemach *in vitro* (analiza GC-FID i GC-MS).

Związek	RT [min.]	Zawartość w olejku eterycznym [%]										
		Mikropędy <i>S. apiana</i> – kultura kolekcyjna	Bioreaktor RITA®						Bioreaktor PLANTFORM®		Bioreaktor natryskowy	
			7 dni	14 dni	21 dni	28 dni	35 dni	42 dni	21 dni	28 dni	21 dni	28 dni
<i>α</i> -pinen	5,701	9,649	10,840	11,349	10,599	10,439	11,470	12,468	9,644	9,194	9,517	9,873
Kamfen	5,945	0,402	0,502	0,475	0,474	0,509	0,558	0,580	0,392	0,420	0,355	0,338
<i>β</i> -pinen	6,408	13,062	19,897	16,465	15,147	13,935	13,864	14,400	12,825	11,342	12,541	13,270
<i>β</i> -mircen	6,523	1,890	1,973	2,162	2,083	1,974	1,794	1,733	1,878	1,839	1,928	1,804
<i>Δ</i> -3-karen	6,936	1,034	1,074	1,378	1,229	1,050	0,889	0,876	0,961	0,821	1,093	1,128
<i>α</i> -terpinen	7,037	0,451	0,411	0,459	0,462	0,474	0,452	0,460	0,385	0,436	0,404	0,355
<i>p</i> -cyment	7,178	0,117	0,243	0,290	0,259	0,284	0,314	0,291	0,102	0,044	0,121	0,075
Limonen	7,255	0,613	1,742	1,664	1,419	1,321	1,279	1,344	0,584	0,161	0,507	0,394
1,8-cineol	7,384	50,125	30,417	40,325	38,886	41,695	41,861	39,757	52,212	54,642	54,293	55,047
<i>γ</i> -terpinen	7,785	0,848	0,826	0,838	0,884	0,895	0,831	0,846	0,665	0,772	0,636	0,656
1-fenchol wz	8,344	0,294	0,335	0,301	0,310	0,304	0,314	0,309	0,261	0,299	0,260	0,245
Fenchol	8,882	0,022	ND	ND	ND	ND	0,025	ND	0,355	0,062	ND	ND
Pinokarweol	9,356	0,132	0,342	0,119	0,101	0,150	0,164	0,252	0,169	0,209	0,152	0,118
<i>cis</i> -werbenol	9,412	0,288	0,137	0,225	0,186	0,185	0,229	0,246	0,380	0,164	0,197	0,249
Kamfora	9,481	1,634	2,011	1,407	1,444	1,563	1,776	1,682	2,003	2,258	1,759	1,561
Izoborneol	9,710	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,052
terpinen-1-ol	10,063	0,223	0,270	0,254	0,225	0,205	0,183	0,207	0,380	0,390	0,310	0,277
Borneol	10,155	0,152	0,274	0,287	0,275	0,297	0,302	0,297	0,389	0,348	0,388	0,236
<i>α</i> -terpineol	10,294	ND	ND	0,131	0,148	0,104	0,091	0,081	0,223	0,098	0,141	0,057
Citronelol	10,928	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,009	ND	ND	ND
Octan geranylu	13,742	0,124	0,170	0,150	0,177	0,191	0,196	0,208	0,092	0,083	0,118	0,093
<i>γ</i> -elemen	14,799	0,253	0,091	0,125	0,132	0,108	0,101	0,113	0,234	0,044	0,169	0,205
Kariofilen	16,644	3,921	5,557	4,550	4,741	4,920	5,024	5,707	3,364	3,255	3,056	3,536
Aristolien	15,001	3,200	3,500	2,717	3,103	2,982	3,045	3,268	2,592	2,268	2,436	2,413
<i>β</i> -guajen	15,112	0,461	0,522	0,425	0,467	0,456	0,452	0,474	0,385	0,347	0,362	0,319
<i>α</i> -humulen	15,228	0,246	0,361	0,331	0,032	0,313	0,348	0,378	0,211	0,260	0,210	0,247
<i>γ</i> -muurolen	15,598	0,245	0,245	0,363	0,417	0,396	0,419	0,519	0,305	0,401	0,317	0,284
Kadnan	16,038	1,031	1,141	1,013	1,195	1,156	1,141	1,275	0,890	0,978	0,924	0,775
<i>β</i> -bisabolen	16,087	0,260	0,277	0,240	0,216	0,228	0,210	0,221	0,213	0,095	0,203	0,354
Nerolidol-1	16,336	0,103	ND	ND	0,051	0,071	0,069	0,089	0,083	0,050	ND	ND
<i>γ</i> -selinen	16,593	0,243	0,269	0,244	0,278	0,271	0,269	0,265	0,209	0,195	0,223	0,214
4- <i>epi</i> -kubebol	16,709	0,165	0,198	0,200	0,240	0,256	0,267	0,273	0,114	0,104	0,136	0,106
Nerolidol-2	16,984	0,114	ND	0,105	0,110	0,102	0,108	0,115	0,059	0,068	ND	ND
Kubebol	17,185	0,084	0,164	0,108	0,129	0,102	0,097	0,084	0,076	0,045	ND	ND
Tlenek kariofilenu	17,423	0,258	0,496	0,474	0,600	0,734	0,796	0,918	0,206	0,319	0,240	0,165

Tab. 11. Skład jakościowy i ilościowy olejków eterycznych otrzymanych z biomas *S. apiana*, namnażanych w różnych systemach *in vitro* (analiza GC-FID i GC-MS).

Związek	RT [min.]	Zawartość w oleju eterycznym [%]										
		Mikropędy <i>S. apiana</i> – kultura kolekcyjna	Bioreaktor RITA®						Bioreaktor PLANTFORM®		Bioreaktor natryskowy	
			7 dni	14 dni	21 dni	28 dni	35 dni	42 dni	21 dni	28 dni	21 dni	28 dni
Cedrol	17,940	0,356	0,277	0,126	0,0131	0,086	0,074	0,088	0,323	0,086	0,207	0,260
α -bisabolol	18,886	2,132	2,337	2,066	2,282	2,255	2,123	2,061	1,794	1,645	1,917	1,939
Biformen	21,596	0,088	0,168	0,114	0,126	0,104	0,114	0,103	0,065	0,148	0,151	0,086
Abietatrien	24,273	0,592	1,144	0,820	0,964	0,905	0,920	0,992	0,485	0,578	0,642	0,355
Ferruginol	27,557	1,914	3,225	2,813	3,592	2,832	2,805	3,103	1,420	1,503	1,763	1,060
SUMA		96,726	91,436	95,113	92,996	93,852	94,974	96,083	96,937	95,971	97,676	98,146
Monoterpeny- węglowodory		28,066	37,508	35,080	32,556	30,881	31,451	32,998	27,436	25,029	27,102	27,893
Monoterpeny utlenione		52,994	33,956	43,199	41,752	44,694	45,141	43,039	56,473	58,553	57,618	57,935
Seskwiterpeny- węglowodory		11,992	14,300	12,074	12,863	13,085	13,132	14,281	10,197	9,488	9,817	10,286
Seskwiterpeny utlenione		1,080	1,135	1,013	1,143	1,351	1,411	1,567	0,861	0,672	0,583	0,531

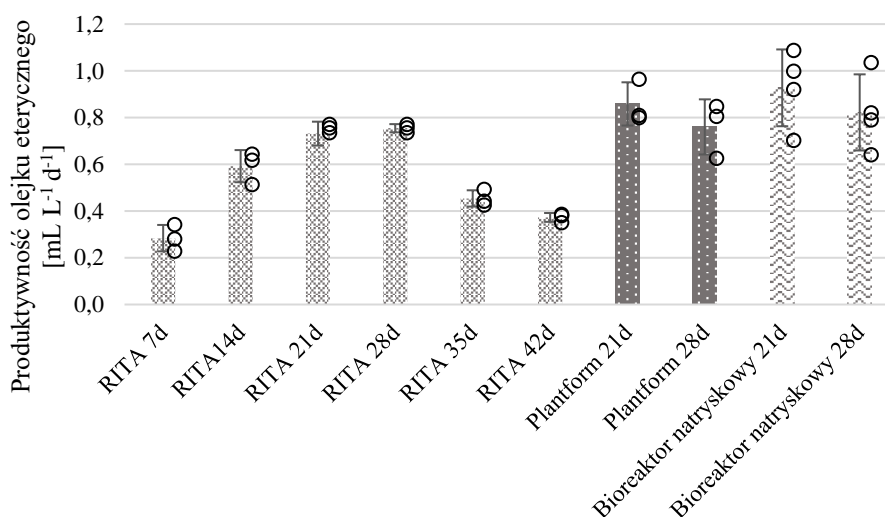
ND – nie wykryto obecności



Ryc. 46. Procentowa zawartość wybranych terpenoidów w olejkach eterycznych, wyizolowanych z liści rośliny gruntowej oraz biomas *S. apiana* (mikropędy namnażane w instalacjach: RITA®, PLANTFORM® oraz w prototypowym bioreaktorze natryskowym; medium SH_B; warunki standardowe), zebranych po różnym czasie kultury (7-42 dni). Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

Mimo opisywanych różnic w profilach metabolicznych otrzymanych biomas bioreaktorowych, przeprowadzone analizy fitochemiczne wykazały, że przeniesienie mikropędów *S. apiana* do instalacji wielkolaboratoryjnych nie spowodowało istotnych, z aplikacyjnego punktu widzenia, zmian w obrębie całkowitej zawartości olejku eterycznego w testowanych tkankach, a otrzymane frakcje lotne odpowiadają danym literaturowym dotyczącym profilu metabolicznego rośliny macierzystej (Krol i in., 2022). Warto w tym miejscu nadmienić, że bez względu na zastosowany system *in vitro*, mikropędy szałwii białej, podobnie jak *S. apiana* pozyskana ze środowiska naturalnego, nie biosyntezywały toksycznego tujonu, występującego w szałwii lekarskiej.

Wszystkie systemy *in vitro*, przy czasie 21-28 dniowej kultury, charakteryzowały się wysoką, przekraczającą $0,7 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, produktywnością frakcji lotnych (Ryc. 47). Najwyższą wartość, w tym zakresie, uzyskano z wykorzystaniem bioreaktora natryskowego, w 21-dniowym cyklu eksperymentalnym i wynosiła ona $0,93 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Niemniej jednak, w dalszych doświadczeniach biotechnologicznych, ukierunkowanych na stymulację biosyntezy olejku eterycznego w mikropędach *S. apiana* w skali wielkolaboratoryjnej (rozdz. 2.4.3.2.1), posłużono się komercyjnymi, łatwiej dostępnymi bioreaktorami RITA®. Pozwalały one nie tylko osiągnąć dość wysoką produktywność systemu roślinnego w zakresie olejku eterycznego ($0,73\text{-}0,75 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), ale poprzez ich szeregowe łączenie możliwe było również jednoczesne testowanie zróżnicowanych wariantów doświadczalnych, w ilości powtórzeń spełniających wymagania metodologiczne (analiza statystyczna).



Ryc. 47. Produktywność olejku eterycznego w systemach *in vitro* *S. apiana* (mikropędy namnażane w instalacjach: RITA®, PLANTFORM® oraz w prototypowym bioreaktorze natryskowym; medium SH_B; warunki standardowe), zebranych po różnym czasie kultury (7-42 dni).

Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

Podsumowując, w ramach niniejszej pracy doktorskiej, opracowano system *in vitro* odpowiedni do prowadzenia kultur ciągłych pędów *S. apiana* w skali wielkolaboratoryjnej. Mikropędy badanego gatunku wykazały dużą zdolność adaptacji do różnych warunków eksperymentalnych i charakteryzowała je znaczna odporność na stres mechaniczny, oraz w mniejszym stopniu na okresową hipoksję (ciągłe zanurzenie). Powyższe obserwacje wynikają najprawdopodobniej ze specyficznych cech gatunkowych badanej rośliny (Grzegorzczak i Wysokińska, 2008; Malepszy, 2012; Krol i in., 2020). Uzyskane kultury wielkoskalowe zachowały zdolność do biosyntezy olejku eterycznego, charakterystycznego dla rośliny macierzystej, jednakże osiągnięte poziomy akumulacji wymienionych zespołów połączeń naturalnych były w większości przypadków niższe w porównaniu z kulturą kolekcyjną (niskoskalową). Najkorzystniejszym systemem do namnażania wysokoproduktywnej biomasy pędów szałwii białej okazał się prototypowy bioreaktor natryskowy. Przy zastosowanym, czasie kultywacji od 21 do 28 dni, umożliwiał on otrzymanie w pożywce SH_B biomas *S. apiana* o zawartości frakcji lotnej na poziomie 1,04-1,27% i produktywności 0,82-0,93 mL L⁻¹ d⁻¹. Tym samym można uznać, że zraszanie omawianych kultur szałwii białej pożywką wzrostową stanowiło najbardziej optymalny wariant hodowlany (brak hipoksji). Ze względu na dostępność w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed jedynie czterech urządzeń tego typu, w eksperymentach z zakresu elicytacji i dokarmiania mikropędów badanego gatunku substancjami odżywczymi wykorzystano komercyjnie dostępne instalacje RITA[®] (15 bioreaktorów w Katedrze), nie pozwalające wprawdzie na uzyskanie tak dobrych wyników (tempo przyrostu, produktywność) nie mniej umożliwiające, jak już wspomniano, prowadzenie doświadczeń w odpowiedniej liczbie powtórzeń niezbędnych do przeprowadzenia analiz porównawczych. To kompromisowe rozwiązanie nadawało się do obserwowania ewentualnego trendu zmian w kulturach, w zakresie wybranych parametrów, pod wpływem zastosowanych modyfikacji.

2.4.3.2.1 Zabiegi biotechnologiczne stosowane w celu zwiększenia akumulacji lotnych terpenów w kulturze mikropędów *S. apiana*

Zwiększenie zawartości aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych, w warunkach kultur *in vitro*, można osiągnąć przez ogólnie rozumianą modyfikację genomu roślinnego metodami z zakresu inżynierii genetycznej bądź wykorzystując bardziej tradycyjne, niegenetyczne strategie, takie jak: dobór odpowiednich linii komórkowych (tzw. „superproducentów”), optymalizację warunków hodowlanych, stosowanie zabiegów retrobiosyntetycznych (suplementacja pożywki prekursorami biosyntezy związków lub złożonymi substancjami odżywczymi). Efektywną metodą stymulacji biosyntezy połączeń naturalnych jest także elicytacja (Bourgauđ i in., 2001; Malepszy, 2012; Isah i in., 2018). Ostatnia z wymienionych strategii zakłada wprowadzenie do systemu *in vitro* czynników stresowych, wskutek czego, w elicytowanych komórkach, dochodzi do stymulacji wybranych szlaków wtórnego metabolizmu, prowadzących do powstania fitoaleksyn uczestniczących w reakcjach obrony rośliny (Szpitter i Królicka, 2005; Ramirez-Estrada i in., 2016; Halder i in., 2019). Suplementacja pożywek wzrostowych mieszaninami substancji o charakterze odżywczym należy, poza elicytacją, do jednych z częściej stosowanych zabiegów mających na celu ingerencję w pierwotny oraz wtórny metabolizm namnażanej biomasy. Spośród wykorzystywanych, w pracach biotechnologicznych, kompleksowych źródeł aminokwasów, węglowodanów, witamin oraz fitohormonów można wymienić: hydrolizat kazeiny, wodę kokosową oraz rzadziej stosowane proszki – pomidorowy i bananowy (Smetanska, 2008; Hamdeni i in., 2022).

Doniesienia literaturowe wskazują na wysoką wartość elicytacji jako strategii stymulowania biosyntezy, w szczególności połączeń terpenowych (Shi i in., 2007; Wu i Shi, 2008; Zhao i in., 2010; Kai i in., 2012) oraz polifenolowych (Attaran Dowom i in., 2022). Stosowano ją z sukcesem w kulturach korzeni włósnikowatych *S. miltiorrhiza*. W eksperymentach wykorzystano zarówno elicytory pochodzenia biotycznego (wyciąg drożdżowy i chitosan) (Shi i in., 2007; Wu i Shi, 2008; Zhao i in., 2010; Kai i in., 2012) jak i abiotycznego (jasmonian metylu oraz jony: Co^{2+} , Ag^{+} i Cd^{2+}) (Zhao i in., 2010; Kai i in., 2012). We wskazanych pracach badawczych wykazano, że wyciąg drożdżowy i niektóre jony metali ciężkich stymulują biosyntezę diterpenoidów, w tym tanszinonów, natomiast jasmonian metylu – kwasów fenolowych, bez wywierania większego wpływu na produkcję diterpenów (Dreger i in., 2010). Dobrą odpowiedź tkankową, w postaci wyraźnej poprawy parametrów wzrostowych testowanych korzeni transformowanych *S. miltiorrhiza*, a także zwiększenie zawartości w biomacie roślinnej tanszinonów, uzyskano również poprzez zastosowanie łączonej strategii dokarmiania kultur sorbitolem oraz ich elicytacji wyciągiem drożdżowym (Wu i Shi, 2008).

W świetle powyższego, w doświadczeniach opisanych w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej, zaplanowano serię eksperymentów mających na celu stymulację metabolizmu wtórnego mikropędów *S. apiana*, z wykorzystaniem procedur biotechnologicznych z zakresu elicytacji oraz dodatku do pożywek wzrostowych wybranych substancji odżywczych. Ze względu na ograniczenia

czasowe projektu doktoranckiego, skoncentrowano się na określeniu wpływu powyższych strategii biotechnologicznych na zawartość oraz skład olejku eterycznego w testowanych tkankach, nie przeprowadzono natomiast badań dotyczących frakcji polifenolowych wraz z nietłymi diterpenami, a także nie wykorzystano do realizacji określonych celów strategii retrobiosyntetycznych (dodatek do medium prekursorów biosyntezy substancji lotnych). Warto w tym miejscu nadmienić, że dotychczas nie prowadzono w kulturach *in vitro* roślin z rodzaju *Salvia* doświadczeń nad wykorzystaniem stresu środowiskowego, w celu podwyższenia poziomów akumulacji olejków eterycznych, zatem zaplanowane eksperymenty miały charakter nowatorski. Skuteczność powyższej metody została natomiast potwierdzona dla szałwii lekarskiej rosnącej w warunkach środowiska naturalnego (Vosoughi i in., 2018) oraz *S. abrotanoides* Karel. i *S. yangii* B.T. Drew., uprawianych w szklarni (Khodadadi i in., 2022). Badano również wpływ omawianej strategii na produkcję lotnych monoterpenuoidów w kulturach *in vitro* biomas gatunków z rodziny Lamiaceae (Chang i in., 1998; Deschamps i Simon, 2006; Chakraborty i Chattopadhyay, 2008; Calgaro i in., 2023). Ponadto, prace doświadczalne realizowane w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed, wskazują również na wysoką skuteczność elicytacji w stymulacji produkcji frakcji lotnej w mikropędach *Ledum palustre* L. (rodzina *Ericaceae*) (Jesionek i in., 2018).

Z uwagi na prowadzone wcześniej badania w obrębie rodzaju *Salvia* (Shi i in., 2007; Wu i Shi, 2008; Zhao i in., 2010; Kai i in., 2012), a także doświadczenie własne Promotor (Jesionek i in., 2018), w omawianej serii eksperymentów wykorzystano elicytory biotyczne: wyciąg drożdżowy w stężeniu – 50 i 100 mg L⁻¹, ergosterol – 3,97 mg L⁻¹ (10 μM) oraz chitosan – 200 mg L⁻¹. Wspomniane substancje dodawano do medium doświadczalnego w 14. lub 18. dniu kultywacji mikropędów, tj. odpowiednio podczas fazy wzrostu wykładniczego kultury oraz na początku *plateau* (rozdz. 2.4.3.1.2). Wybór odpowiedniego momentu na wprowadzenie, do systemu *in vitro*, substancji stresogennych podyktowany był danymi literaturowymi, wskazującymi na końcowy okres fazy wzrostu liniowego, a także początkowe dni fazy stacjonarnej, jako czas umożliwiający optymalne wykorzystanie elicytorów w procesach metabolizmu wtórnego. Wykazano, że ustają wówczas szybkie podziały komórkowe, a biosynteza większości związków biologicznie aktywnych ulega intensyfikacji (Szpitter i Królicka, 2005; Isah i in., 2018). Całkowity czas kultywacji mikropędów szałwii białej wynosił 21 dni, zatem ekspozycja tkanek na powyższe związki stresogenne trwała 3 lub 7 dni. Zastosowane, w ramach prezentowanych badań własnych, ilości poszczególnych elicytorów mieszczą się w zakresie stężeń niniejszych związków powszechnie wykorzystanych w pracach biotechnologicznych dotyczących roślin wyższych (Szpitter i Królicka, 2005; Ramirez-Estrada i in., 2016; Halder i in., 2019). Wprowadzenie do pożywki chitosanu oraz ergosterolu, ze względu na ich zdolności w zakresie stymulacji przyrostu tkanek roślinnych, można rozpatrywać także częściowo jako zabieg retrobiosyntetyczny. Niemniej jednak, dodatek powyższych elicytorów już pod koniec fazy intensywnego wzrostu kultury, powinien raczej przyczynić się do nasilenia biosyntezy metabolitów wtórnych w ramach odpowiedzi tkankowej na stres środowiskowy.

Jako zespół substancji odżywczych, do serii prezentowanych eksperymentów, do doświadczeń wykorzystano dodatek do medium doświadczalnego soku z liści pokrzywy zwyczajnej (*Urticae folium*, *Urtica dioica* L., *Urticaceae*) (rozdz. 3.1.9.3.5), którego stężenie w pożywce wynosiło 2,5% (v/v). Jak wskazują liczne publikacje naukowe, stanowi on źródło wybranych aminokwasów oraz witamin (m.in. C, B₂, B₅, K), zdolnych do stymulacji wzrostu biomas roślinnych (Nygaard Sorensen i Thorup-Kristensen, 2011; Garmendia i in., 2018; Semwal i in., 2023). Powyższy fakt obserwowano w przypadku roślin uprawnych zasilanych nawozami organicznymi opartymi na wyciągach z pokrzywy zwyczajnej (Nygaard Sorensen i Thorup-Kristensen, 2011; Garmendia i in., 2018; Maričić i in., 2021). Przygotowany, według opisanej w rozdz. 3.1.9.3.5 metody, sok wprowadzano do medium eksperymentalnego w 0. dniu doświadczenia, w celu stymulacji przyrostu biomasy już w trakcie trwania intensywnych podziałów komórkowych, a następnie ewentualnego, nieswoistego wykorzystania jego składników do budowy połączeń o charakterze mono- i seskwiterpenów (Hamdeni i in., 2022). Dotychczas, w kulturach *in vitro*, nie stosowano suplementacji podłoża wzrostowego sokiem z liści pokrzywy, zatem prezentowane podejście miało charakter nowatorski.

W doświadczeniach z zakresu elicytacji testowano także wpływ na profil metaboliczny olejku z mikropędów *S. apiana* rozpuszczalników, użytych do przygotowania roztworów pomocniczych czynników stresowych, dodanych do medium wzrostowego (próba dodatnia: ergosterol – 96% etanol, chitosan – roztwór wodny HCl o pH 5,0). W przypadku wyciągu drożdżowego, do serii eksperymentów nie włączono kontroli dodatniej – H₂O, ze względu na niewielką objętość wprowadzanego do pożywki wodnego roztworu tegoż elicytora – 1,0 mL). Do analiz porównawczych wykorzystano natomiast, podobnie jak w przypadku wyżej opisanych doświadczeń, wariant eksperymentalny obejmujący kultywację mikropędów szalwii białej w podstawowej pożywce wzrostowej SH_B (próba zerowa). Efekty powyższych prac badawczych oceniano zarówno w zakresie osiągniętych parametrów wzrostowych mikropędów szalwii białej, jak i produktywności biomas dotyczących całej frakcji lotnej oraz oczekiwanych zmian jakościowych, a także ilościowych poszczególnych mono- i seskwiterpenów.

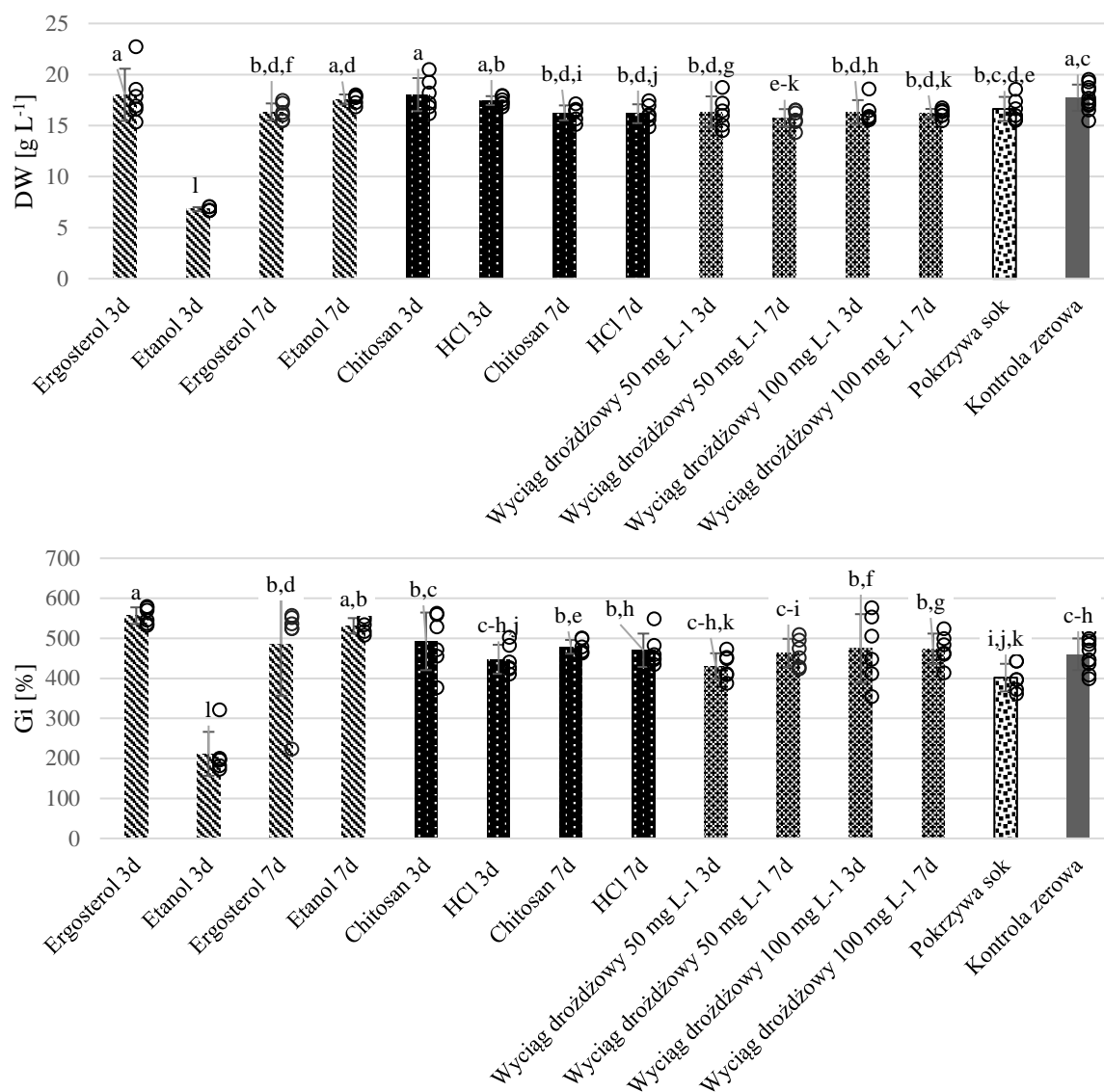
Dotychczas przeprowadzone badania wykazały, że w przeważającej mierze mikropędy roślin olejkowych zachowują, w warunkach *in vitro*, zdolność do biosyntezy związków lotnych z grupy terpenów, aczkolwiek w porównaniu z materiałem roślinnym pozyskanym ze środowiska naturalnego ich zawartość znacznie spada (Jesionek i in., 2017; Krol i in., 2020). Z powyższego powodu, niemożliwe było przeprowadzenie opisywanej serii eksperymentów w kolbach Erlenmeyera, które powszechnie używa się do prowadzenia kultur płynnych. Ilość biomasy z pojedynczego naczynia hodowlanego byłaby bowiem zbyt mała, by dostarczyć mierzalnej ilości olejku eterycznego. Przeprowadzone, w ramach badań prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, doświadczenia nad zwiększaniem skali hodowli mikropędów *S. apiana* (rozdz. 2.4.3.2) wykazały, że kultywacja wspomnianych biomas roślinnych w instalacjach RITA[®] (obj. robocza 200 mL) umożliwia dostarczenie wystarczającej ilości surowca do przeprowadzenia wiarygodnych analiz fitochemicznych z wykorzystaniem wybranych metod (min. 6,0 g suchego materiału roślinnego, przypadającego na jedną

hydrodestylację w aparacie Clevengera - rozdz. 3.2.3.1.1). W efekcie, serię eksperymentów z zakresu elicytacji oraz wpływu dodatku substancji odżywczych na wzrost eksplantatów i produkcję olejku eterycznego w testowanych biomasach wykonano w bioreaktorach RITA[®] (rozdz. 3.1.9.3.5).

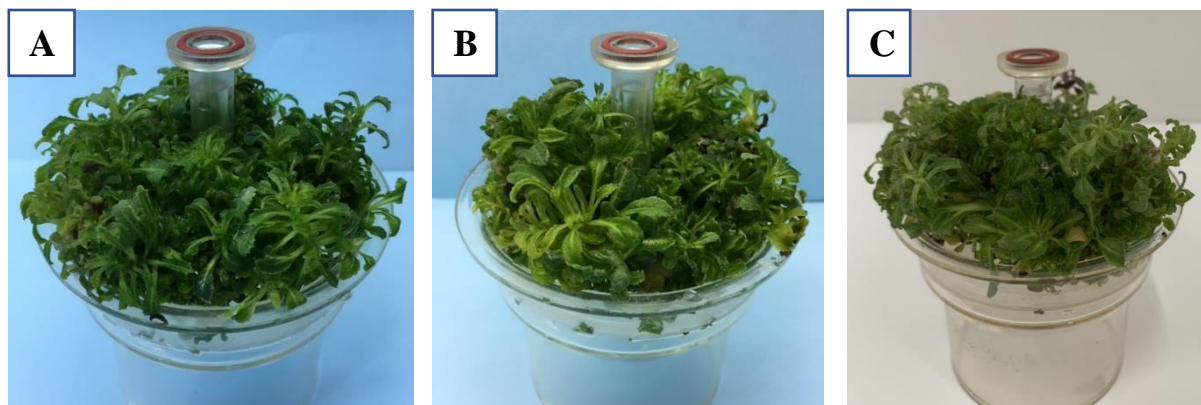
W doświadczeniach zastosowano płynne podłoże wzrostowe SH_B, modyfikowane, w 14. lub 18. dniu hodowli, poprzez dodatek wybranych elicytorów: wyciągu drożdżowego (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolu (10 μM = 3,97 mg L⁻¹) oraz chitosanu (200 mg L⁻¹). Jak już wspomniano, przetestowano także suplementację pożywki sokiem z liści pokrzywy zwyczajnej (2,5% (v/v); dodatek w 0. dniu doświadczenia). Eksperyment prowadzono przez 21 dni, w warunkach standardowych (rozdz. 3.1.4). Próbie odniesienia dla uzyskanych wyników stanowiły biomasy namnażane w pożywce SH_B, modyfikowanej, w 14. lub 18. dniu doświadczenia, poprzez dodatek rozpuszczalników wykorzystanych do przygotowania roztworów pomocniczych testowanej substancji stresogennych, zgodnie z procedurą opisaną w rozdz. 3.1.9.3.5 (kontrola pozytywna), a także materiał roślinny inkubowany w podstawowej pożywce SH_B (kontrola zerowa). Otrzymane biomasy zbierano, wyznaczano dla nich parametry wzrostowe, a następnie poddano badaniom fitochemicznym z uwagi na obecność frakcji lotnej (rozdz. 3.2.3.1).

Wpływ elicytacji ergosterolem na wzrost mikropędów *S. apiana* oraz akumulację lotnych terpenów w biomasach roślinnych

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że ergosterol, w zastosowanym stężeniu, stymulował wzrost mikropędów *S. apiana* (Ryc. 48). Najwyższy przyrost biomasy zaobserwowano przy dodatku powyższego elicytora w 18. dniu cyklu eksperymentalnego (Gi = 556,6%; DW = 18,0 g L⁻¹). W porównaniu do próby zerowej (Gi = 460,1%; DW = 17,7 g L⁻¹) uzyskano zatem dla tkanek ok. 1,2-krotne zwiększenie współczynnika przyrostu. Wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji materiału roślinnego na testowany elicytor, obserwowano spadek wartości Gi, jednakże nadal pozostawał on na wyższym poziomie niż w przypadku mikropędów rosnących w niemodyfikowanym podłożu SH_B. Ponadto, cechy makroskopowe kultury, takie jak udział zmian nekrotycznych w biomacie oraz barwa eksplantatów, były w tym wypadku porównywalne z próbą zerową (Ryc. 49A-C). Wstępnie można domniemać, że wprowadzony do pożywki ergosterol został najprawdopodobniej wykorzystany przez mikropędy szalwii białej do „budowy” biomasy, stąd stwierdzono jej lepszy przyrost. Przeprowadzone dotąd nieliczne eksperymenty *in vitro*, dotyczące elicytacji ergosterolem komórek roślinnych, wykazujących zdolność do akumulacji lotnych terpenów, nie wykazały aby związek ten, testowany w szerokim zakresie stężeń (0-1000 nM), przyczyniał się do zmiany tempa przyrostu biomas lub wpływał istotnie na kondycję fizjologiczną eksplantatów (Tugizimana i in., 2012, 2014; Jesionek i in., 2018).



Ryc. 48. Porównanie parametrów wzrostowych: wartości suchej masy (DW) oraz współczynnika przyrostu (Gi) mikropędów *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μM) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz suplementowanych sokiem z liści *U. dioica* (2,5%). Eksperymenty prowadzono w bioreaktorach RITA[®] (warunki standardowe) przez 21 dni. Płynną pożywkę wzrostową SH_B modyfikowano poprzez dodatek elicytorów, bądź ich rozpuszczalników (kontrola dodatnia), na 3 (3d) lub 7 dni (7d) przed zbiorem. Kontrolę zerową stanowiła biomasa namnażana w podstawowej pożywce SH_B przez 21 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 6 prób eksperymentalnych ± SD.



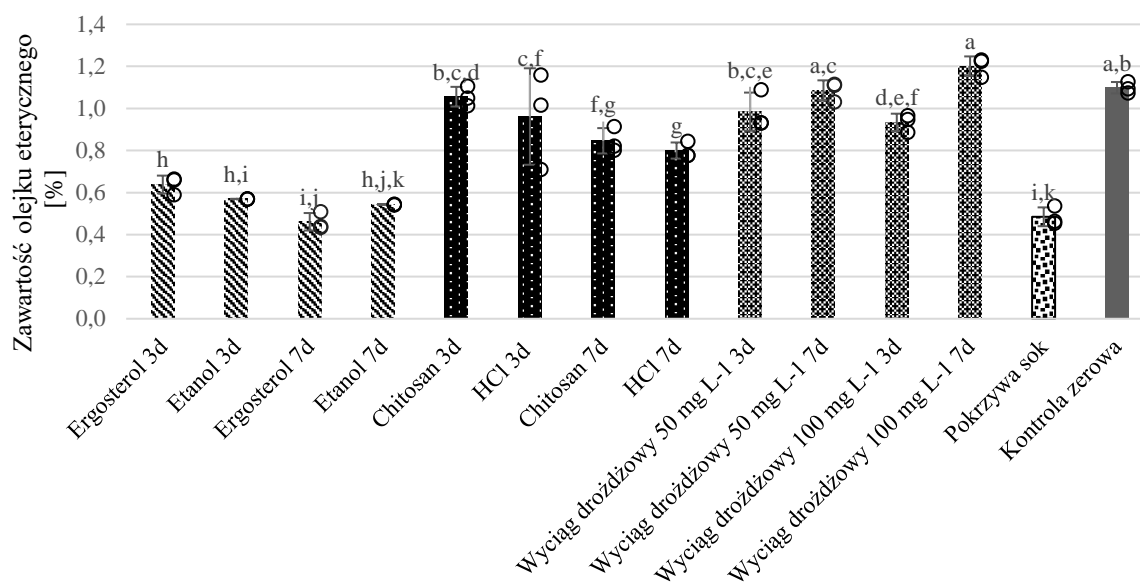
Ryc. 49. Kultura pędów *S. apiana*, rosnąca w bioreaktorze RITA[®] w ostatnim, 21. dniu doświadczenia (medium SH_B);

A – elicytowana ergosterolem, dodawanym w stężeniu 10 μM , w 14. dniu doświadczenia; B – kontrola pozytywna, pochodząca z wariantu elicytacji mikropędów ergosterolem, w 14. dniu doświadczenia (dodatek etanolu); C – próba zerowa.

W opisywanym doświadczeniu nie stwierdzono, aby dodatek, w 18. dniu eksperymentu, do kultury mikropędów szałwii białej, rozpuszczalnika stosowanego w roztworze pomocniczym ergosterolu (alkohol etylowy – kontrola pozytywna), wpłynął negatywnie na przyrost testowanych biomas ($G_i = 531,3\%$; $DW = 17,6 \text{ g L}^{-1}$). Wzrost tkanek obniżył się natomiast istotnie po dodatku etanolu do medium na 3 dni przed ich zbiorem ($G_i = 211,4\%$; $DW = 6,8 \text{ g L}^{-1}$). Zaistniałe w obydwu przypadkach rozbieżności są trudne do wytłumaczenia ze względu na brak tak negatywnego wpływu omawianego rozpuszczalnika na przyrost mikropędów po zastosowaniu go w kulturze wraz z ergosterolem, jak również w wersji bez elicytora przez dłuższy czas (tzn. 7 dni kultury). W celu pełnego wyjaśnienia opisywanego zjawiska i potwierdzenia szkodliwego wpływu alkoholu etylowego na przyrost testowanych tkanek, wskazane byłoby powtórzenie niniejszego wariantu doświadczenia, a także rozszerzenie przeprowadzonego eksperymentu poprzez zastosowanie innego rozpuszczalnika dla użytego elicytora.

Rezultaty analiz fitochemicznych (hydrodestylacja w aparacie Clevengera – rozdz. 3.2.3.1.1) otrzymanych biomas *in vitro* szałwii białej (Ryc. 50), wskazują, że ergosterol przyczynił się do zahamowania, w testowanych kulturach, biosyntezy olejku eterycznego. Zjawisko to obserwowano zarówno po zastosowaniu w eksperymencie elicytora jak i samego rozpuszczalnika i było ono zauważalne podczas krótszej (3 dni) oraz dłuższej (7 dni) inkubacji mikropędów *S. apiana* z ergosterolem oraz etanolem. Najwyższe stężenie frakcji lotnej w tkankach stwierdzono przy dodatku omawianego czynnika stresogennego do kultury na 3 dni przed końcem cyklu wzrostowego (0,64%) i była to zawartość olejku ok. połowę niższa względem kontroli zerowej (1,10%). Odmienne rezultaty zaobserwowano w czasie badań nad kulturami pędów *L. palustre*, wykazującymi zdolność do akumulacji lotnych terpenów. W tym wypadku suplementacja pożywki ergosterolem skutecznie stymulowała biosyntezę powyższych metabolitów naturalnych (Jesionek i in., 2018).

Na uwagę zasługuje również negatywny wpływ rozpuszczalnika, stosowanego w roztworze pomocniczym ergosterolu (etanol), na zdolność biomasy *in vitro* szałwii białej do akumulacji olejku eterycznego (0,54-0,57%), co sugeruje, że dalsze, uzupełniające prace eksperymentalne należałoby prowadzić w oparciu o inny nośnik elicytora. Omawiana obserwacja jest o tyle zaskakująca, że alkohol etylowy, w warunkach kultur *in vitro*, może również indywidualnie działać jako elicytor (El Jaber-Vazdekis i in., 2008; Venugopalan i Srivastava, 2015; Gai i in., 2019). Przykładowo, w kulturze korzeni transgenicznych *Isatis tinctoria* L. suplementacja pożywki wzrostowej etanolem nasilała w biomasach akumulację alkaloidów oraz flawonoidów (Gai i in., 2019). Z kolei w korzeniach włośnikowatych *Atropa baetica* Willk. obserwowano synergistyczne działanie etanolu i kwasu acetylosalicylowego (0,1-1,0 mM), prowadzące do stymulacji biosyntezy, w materiale roślinnym, skopolaminy (El Jaber-Vazdekis i in., 2008). W prezentowanym doświadczeniu dotyczącym mikropędów szałwii białej, do bioreaktora RITA[®] wprowadzano objętość etanolu równą 1 mL. W efekcie jego stężenie w medium wzrostowym wynosiło 5 mL L⁻¹. Niestety, w przytoczonych danych literaturowych brak informacji nt. ilości alkoholu etylowego dodawanego do podłoża, co uniemożliwia porównanie rezultatów badań własnych z powyższymi eksperymentami. Należy jednak zaznaczyć, że w testach dotyczących kultur *in vitro* *S. apiana* powielono metodykę doświadczenia zastosowaną uprzednio z sukcesem, w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed, celem stymulacji produkcji olejku eterycznego w mikropędach *Ledum palustre* L.. Nie stwierdzono wówczas istotnego zahamowania biosyntezy lotnych terpenów w biomasach bagna zwyczajnego pod wpływem suplementacji medium wzrostowego samym etanolem (Jesionek i in., 2018). Wobec powyższego, reakcja kultury *in vitro* mikropędów szałwii białej na powyższy rozpuszczalnik wydaje się być specyficzna dla badanego gatunku.



Ryc. 50. Porównanie zawartości olejku eterycznego w mikropędach *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μM) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz suplementowanych sokiem z liści *U. dioica* (2,5%). Eksperymenty prowadzono w bioreaktorach RITA[®] (warunki standardowe) przez 21 dni.

Płynną pożywkę wzrostową SH_B modyfikowano poprzez dodatek elicytorów, bądź ich rozpuszczalników (kontrola dodatnia), na 3 (3d) lub 7 dni (7d) przed zbiorem. Kontrolę zerową stanowiła biomasa namnażana w podstawowej pożywce SH_B przez 21 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób eksperymentalnych ± SD.

Przeprowadzone analizy chromatograficzne GC-FID i GC-MS olejków eterycznych, pozyskanych z elicytowanych ergosterolem biomas *S. apiana*, wskazały, że dominującymi metabolitami badanego zespołu połączeń naturalnych były, podobnie jak w roślinie macierzystej i kulturze kolekcyjnej (rozdz. 2.3.2.3), monoterpeny utlenione (30,71-40,45%) i monoterpeny o charakterze węglowodorów (29,27-32,16%), natomiast seskwiterpeny – podstawowe (16,83-25,13%) oraz występujące w formie utlenionej (3,96-4,91%) – stanowiły mniejszą część otrzymanej frakcji lotnej (Tab. 12). Wpływ powyższego czynnika stresogennego na kompozycję omawianej grupy związków zaznaczył się w szczególności w grupie monoterpenoidów. W niniejszym przypadku stwierdzono, w testowanych tkankach, wyraźny spadek zawartości 1,8-cineolu (35,5-37,4%) w porównaniu z próbą zerową (52,1%), przy czym był on większy po dodatku elicytora do kultur mikropędów na 7 dni przed ich zbiorem (35,5%) (Ryc. 51). Ergosterol przyczynił się także, bez względu na czas jego kontaktu z biomasami *S. apiana*, do podwyższenia w nich zawartości kariofilenu i α-bisabolenu, natomiast nie wpłynął na procentowy udział pinenów oraz Δ-3-karenu w zespole połączeń monoterpenowych. Różnice w składzie olejku eterycznego, względem próby zerowej, obserwowano także w kontroli pozytywnej (Ryc. 51), co może wskazywać, że nie tylko ergosterol, ale również służący do jego

rozpuszczania etanol, był odpowiedzialny za omawiane zmiany w profilu metabolicznym uzyskanych frakcji lotnych.

Podsumowując, wprowadzany do pożywki ergosterol nie spełnił, w opisywanym doświadczeniu, roli klasycznego elicytora. Został on raczej wykorzystany nieswoicie przez mikropędy szaławii białej do „budowy” masy tkankowej, zaś obniżenie zawartości olejku eterycznego w materiale roślinnym, po jego dodatku do kultury, jest trudne do wyjaśnienia na obecnym etapie badań. Wobec powyższego wskazane jest poszerzenie serii dalszych eksperymentów obejmujące suplementację biomas *S. apiana* niniejszym czynnikiem stresogennym, we wszystkich fazach wzrostu kultury, w tym również stadiach początkowych oraz posłużenie się innym rozpuszczalnikiem dla ergosterolu, np. dimetylosulfotlenkiem (DMSO).

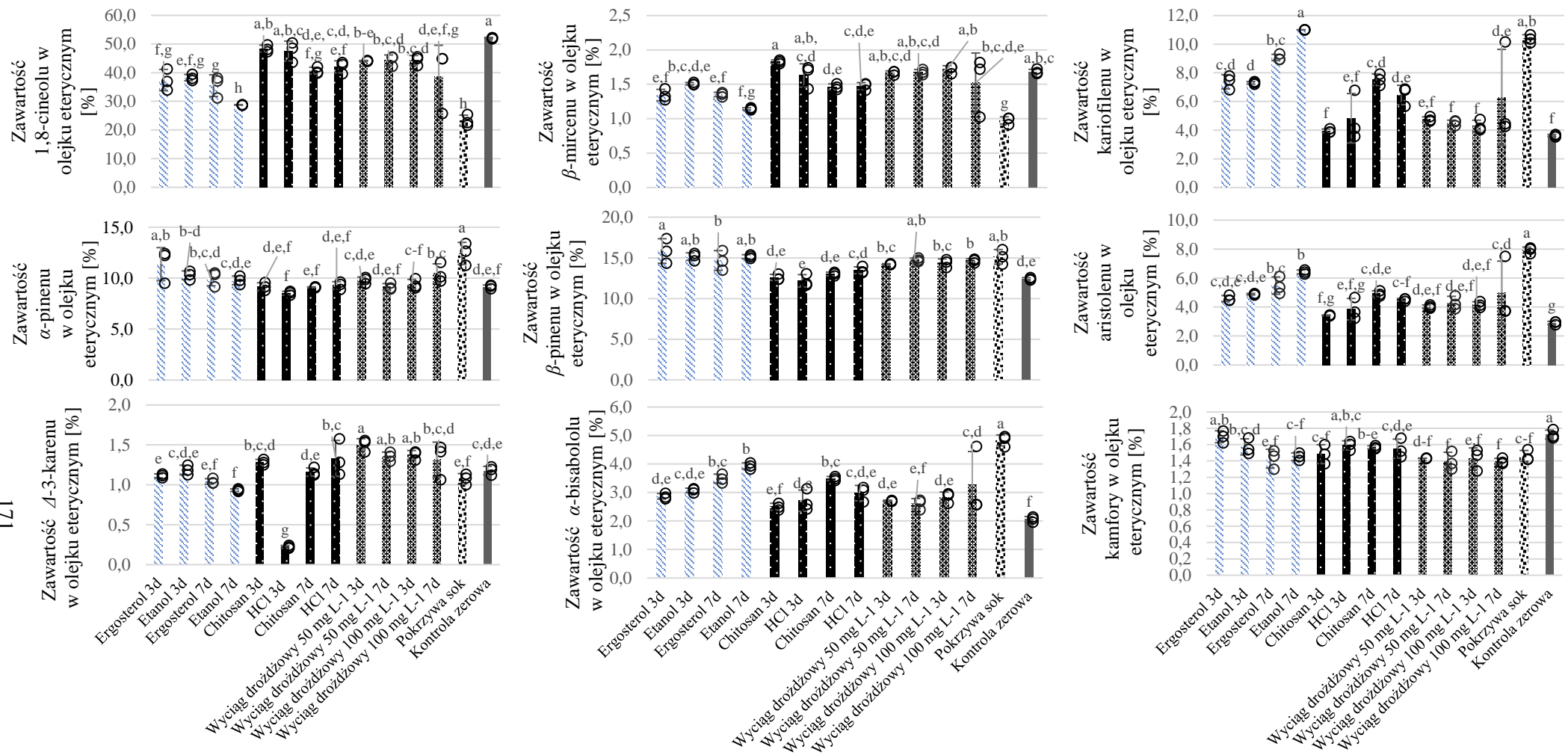
Tab. 12. Skład jakościowy i ilościowy olejku eterycznego otrzymanego z mikropędów *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μM) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz poddanych zabiegowi dokarmiania sokiem z liści pokrzywy zwyczajnej (2,5%).

Związek	RT [min]	Kontrola	Ergosterol		Ergosterol		Chitosan		Chitosan		Ekstrakt	Ekstrakt	Ekstrakt	Ekstrakt	Sok
		zerowa RITA 21 dni	10 μM 3 dni	Etanol 3 dni	10 μM 7 dni	Etanol 7 dni	200 mg L ⁻¹ 3 dni	HCl 3 dni	200 mg L ⁻¹ 7 dni	HCl 7 dni	drożdżowy 50 mg L ⁻¹ 3 dni	drożdżowy 50 mg L ⁻¹ 7 dni	drożdżowy 100 mg L ⁻¹ 3 dni	drożdżowy 100 mg L ⁻¹ 7 dni	z liści pokrzywy 2,5%
3-tujen	5,589	0,403	0,397	0,345	0,402	0,438	0,379	0,396	0,424	0,402	0,425	0,391	0,418	0,372	0,333
α-pinen	5,701	9,152	10,006	9,781	11,374	10,281	9,102	9,286	9,164	8,519	9,798	9,150	9,400	10,454	12,424
Kamfen	5,945	0,332	0,366	0,364	0,504	0,380	0,334	0,341	0,314	0,307	0,322	0,303	0,350	0,333	0,434
β-felandren	6,107	0,408	0,513	0,533	0,513	0,491	0,503	0,487	0,448	0,440	0,566	0,597	ND	0,544	0,564
β-pinen	6,408	12,413	14,673	15,150	15,837	15,152	13,018	13,473	12,590	12,171	14,216	14,756	14,361	14,641	15,122
β-mircen	6,523	1,683	1,352	1,144	1,344	1,508	1,464	1,474	1,827	1,628	1,667	1,678	1,716	1,522	0,976
α-felandren	6,864	0,150	0,115	0,087	0,110	0,125	0,124	0,126	0,159	0,144	0,159	0,146	0,165	0,140	0,086
Δ-3-karen	6,936	1,178	1,042	0,933	1,112	1,185	1,159	1,330	1,282	0,224	1,500	1,353	1,374	1,315	1,073
α-terpinen	7,037	0,239	0,224	0,202	0,201	0,251	0,234	0,247	0,260	0,248	0,269	0,271	0,270	0,244	0,177
Limonen	7,255	0,217	0,196	0,163	0,175	0,220	0,178	0,150	0,248	0,213	0,075	0,096	0,128	0,117	0,101
1,8-cineol	7,384	52,065	35,471	28,759	37,410	38,265	40,711	42,023	48,396	47,548	44,124	44,320	44,354	38,521	23,238
γ-terpinen	7,785	0,683	0,597	0,572	0,589	0,630	0,627	0,639	0,725	0,669	0,687	0,686	0,709	0,636	0,408
β-cis-terpineol	8,344	0,169	0,123	0,109	0,131	0,127	0,148	0,137	0,162	0,169	0,148	0,164	0,155	0,127	0,082
Kamfora	9,481	1,723	1,427	1,452	1,697	1,572	1,567	1,551	1,483	1,591	1,433	1,396	1,427	1,396	1,461
Terpinen-4-ol	10,063	0,306	0,164	0,131	0,145	0,180	0,183	0,212	0,254	0,235	0,218	0,204	0,218	0,249	0,080
α-terpineol	10,294	0,371	0,294	0,255	0,290	0,310	0,317	0,296	0,388	0,343	0,346	0,329	0,370	0,317	0,204
γ-elemen	14,799	0,144	0,505	0,697	0,342	0,355	0,416	0,381	0,211	0,242	0,376	0,473	0,415	0,559	0,982
Kariofilen	16,644	3,625	9,070	11,007	7,373	7,303	7,522	6,455	3,955	4,831	4,762	4,519	4,304	6,287	10,373
Aristolen	15,001	2,905	5,479	6,420	4,587	4,887	4,924	4,506	3,426	3,850	4,030	4,285	4,157	4,987	7,929
β-guajen	15,112	0,387	0,747	1,001	0,635	0,694	0,677	0,619	0,310	0,511	0,511	0,577	0,535	0,660	1,079
α-humulen	15,228	0,345	0,774	1,013	0,623	0,678	0,682	0,593	0,382	0,454	0,452	0,455	0,428	0,576	0,927
α-muurolen	15,598	0,534	1,034	1,299	0,825	0,964	0,919	0,830	0,629	0,712	0,705	0,724	0,691	0,829	1,226

Tab. 12. Skład jakościowy i ilościowy olejku eterycznego otrzymanego z mikropędów *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μM) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz poddanych zabiegowi dokarmiania sokiem z liści pokrzywy zwyczajnej (2,5%).

Związek	RT [min]	Kontrola	Ergosterol	Etanol	Ergosterol	Etanol	Chitosan	Chitosan	Chitosan	Chitosan	Ekstrakt	Ekstrakt	Ekstrakt	Ekstrakt	Sok
		zerowa	10 μM	3 dni	10 μM	7 dni	200	HCl	200	HCl	drożdżowy	drożdżowy	drożdżowy	drożdżowy	z liści
		RITA	3 dni	3 dni	7 dni	mg L ⁻¹	3 dni	mg L ⁻¹	7 dni	mg L ⁻¹	3 dni	7 dni	3 dni	7 dni	2,5%
		21 dni													
Kadinen	16,038	0,123	0,255	0,284	0,113	0,189	0,211	0,211	0,146	0,159	0,219	0,228	0,238	0,292	0,465
Eudesmen	16,056	0,111	0,210	0,246	0,175	0,194	0,183	0,164	0,129	0,148	0,145	0,150	0,169	0,163	0,241
β-bisabolen	16,087	0,698	2,517	2,871	1,969	2,226	2,296	1,883	1,353	0,771	1,526	1,700	1,770	1,901	2,994
γ-selinen	16,593	0,136	0,217	0,290	0,183	0,220	0,226	0,187	0,151	0,169	0,153	0,152	0,143	0,171	0,240
4- <i>epi</i> -kubebol	16,709	0,134	0,184	0,245	0,167	0,178	0,194	0,157	0,149	0,166	0,140	0,120	0,122	0,159	0,220
Kubebol	17,185	0,156	0,245	0,238	0,246	0,192	0,224	0,173	0,184	0,189	0,160	0,146	0,159	0,183	0,252
Tlenek kariofilenu	17,423	0,464	0,750	0,494	0,661	0,674	0,590	0,465	0,467	0,559	0,279	0,191	0,225	0,353	0,609
α-bisabolol	18,886	2,060	3,486	3,931	2,867	3,073	3,492	2,978	2,501	2,713	2,713	2,606	2,833	3,260	4,827
Ferruginol	27,557	1,302	1,546	2,179	2,322	2,185	2,223	2,225	2,247	2,189	2,553	2,720	2,763	2,219	1,878
SUMA		94,616	93,979	92,195	94,922	95,127	94,827	93,995	94,364	92,506	94,676	94,885	94,368	92,525	91,005
Monoterpeny- węglowodory		26,858	29,481	29,274	32,161	30,661	27,122	27,949	27,441	24,965	29,684	29,426	28,892	30,316	31,698
Monoterpeny utlenione		54,634	37,479	30,706	39,673	40,454	42,926	44,219	50,683	49,878	46,268	46,413	46,524	40,609	25,065
Seskwiterpeny- węglowodory		9,008	20,808	25,128	16,825	17,710	18,056	15,829	10,692	11,847	12,879	13,263	12,850	16,427	26,456
Seskwiterpeny utlenione		2,814	4,665	4,908	3,941	4,117	4,500	3,773	3,301	3,627	3,292	3,064	3,339	3,955	5,908

ND – nie wykryto obecności



Ryc. 51. Zawartość głównych składników olejku eterycznego w mikropędach *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μ M) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz suplementowanymi sokiem z liści *U. dioica* (2,5%). Eksperymenty prowadzono w bioreaktorach RITA[®] (warunki standardowe) przez 21 dni. Płynną pożywkę wzrostową SH_B modyfikowano poprzez dodatek elicytorów, bądź ich rozpuszczalników (kontrola dodatnia), na 3 (3d) lub 7 dni (7d) przed zbiorem. Kontrolę zerową stanowiła biomasa namnażana w podstawowej pożywce SH_B przez 21 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób eksperymentalnych \pm SD.

Wpływ elicytacji chitosanem na wzrost mikropędów *S. apiana* oraz akumulację lotnych terpenów w biomasach roślinnych

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów, stwierdzono że suplementacja medium odżywczego SH_B chitosanem, w stężeniu 200 mg L⁻¹, nie wywarła istotnego statystycznie wpływu na wzrost mikropędów szałwii białej (Ryc. 48), co dotyczyło obydwu czasów ekspozycji tkanek na czynnik stresogenny (Gi = 492,3% – 3 dni oraz 478,7% – 7 dni). Nie zaobserwowano także negatywnego oddziaływania wodnego roztworu HCl na przyrost testowanej biomasy w kontroli pozytywnej, co świadczy o właściwym doborze rozpuszczalnika do przygotowania roztworu pomocniczego chitosanu. Zarówno elicytor, jak i jego nośnik, nie wpłynęły również na zmiany w morfologii mikropędów szałwii białej. Nie stwierdzono też w kulturze nasilonych zmian nekrotycznych, przerastania biomasy kalusem oraz witrifikacji materiału roślinnego (Ryc. 52). Chitosan, stosowany, w stężeniu 200 mg L⁻¹, jako elicytor dla mikropędów *Mentha × piperita* L., również pozwalał uzyskać biomasę o morfologii zbliżonej do kultury referencyjnej, jednak w opisywanym przypadku obserwowano jednoczesne obniżenie zawartości świeżej masy tkankowej (odpowiednio – 0,021 oraz 0,008 g) (Calgaro i in., 2023). Podobny, negatywny wpływ na przyrost komórek w zawieszynie *Zataria multiflora* Boiss. (Lamiaceae) dotyczył dodatku do pożywki chitosanu już w stężeniu 40 mg L⁻¹ (Bavi i in., 2022).



Ryc. 52. Kultura mikropędów *S. apiana*, rosnąca w bioreaktorze RITA[®] w ostatnim, 21. dniu doświadczenia (medium SH_B), elicytowana chitosanem, dodawanym w stężeniu 200 mg L⁻¹, w 18. dniu eksperymentu.

W przeciwieństwie do suplementacji medium wzrostowego ergosterolem, chitosan nie spowodował w mikropędach *S. apiana* wyraźnych zmian w zakresie akumulacji olejku eterycznego. Wprowadzenie powyższego elicytora do pożywki przyczyniło się tylko w niewielkim stopniu do spadku w tkankach zawartości frakcji lotnej (0,85-1,06%) w porównaniu z kontrolą zerową (1,10%) (Ryc. 50). Uwagę zwraca natomiast zauważalnie niższe, o ok. 30%, stężenie olejku eterycznego w mikropędach,

obserwowane po krótszym okresie ekspozycji eksplantatów roślinnych na chitosan. Uzyskane wyniki wskazują zatem, że korzystniejsze, z uwagi na produkcję lotnych terpenów, jest wprowadzenie testowanego elicytora, do systemu *in vitro*, na początku stacjonarnej fazy wzrostu mikropędów, aniżeli w trakcie trwania intensywnych podziałów komórkowych poprzedzających *plateau*.

Przeprowadzony eksperyment wykazał także, że mikropędy, kultywowane w pożywce wzrostowej jedynie z dodatkiem rozpuszczalnika (roztwór HCl – próba pozytywna), charakteryzowały się zblizoną, do próby zerowej, zawartością olejku eterycznego. Obserwowane zjawisko sugeruje, że zmiana stężenia frakcji lotnej w biomasach *in vitro* *S. apiana* związana była z obecnością chitosanu, nie zaś z towarzyszącym mu rozpuszczalnikiem. Powyższe rezultaty wskazują również, że suplementacja testowanej kultury omawianą substancją stresogenną, w porównaniu z ergosterolem, wydaje się korzystniejsza z aplikacyjnego punktu widzenia, umożliwi bowiem uzyskanie biomasy o podobnym, do tkanek kolekcyjnych, tempie przyrostu charakteryzującej się jednak wyższym poziomem akumulowanej frakcji lotnej niż to miało miejsce w mikropędach elicytowanych sterolem. W tym miejscu należy zaznaczyć, że w świetle dostępnej literatury, wpływ chitosanu na tkanki *S. apiana* znacznie odbiega od obserwowanego wcześniej w materiale roślinnym *in vitro*, elicytowanym omawianym polisacharydem, gdzie oznaczano w biomasach wielokrotnie większe zawartości lotnych terpenów w porównaniu z próbami kontrolnymi (Chang i in., 1998; Rahman i in., 2003; Lockwood i in., 2007). Przykładowo, produkcja mentolu w kulturze zawieszinowej *M. piperita* została zwiększona 40-krotnie właśnie poprzez suplementację pożywki 200 mg L⁻¹ chitosanu (Chang i in., 1998).

Przechodząc do wyników oceny fitochemicznej zespołu lotnych terpenów, wyizolowanych z elicytowanych chitosanem biomas szałwii białej, stwierdzono, że dodatek omawianej substancji do kultury w niewielkim stopniu przyczynił się do zmiany wzajemnego stosunku ilościowego poszczególnych, głównych terpenów w olejku (Tab. 12). Grupą dominującą w niniejszej frakcji, okazały się monotereny w formie utlenionych węglowodorów (42,93-50,68%), zaś seskwiterpeny były obecne w kulturze w ilościach znacznie niższych (węglowodory – 10,69-18,06%, formy utlenione – 3,30-4,50%). Dodatkowo, profil metaboliczny lotnych terpenów pochodzących z mikropędów *S. apiana*, kultywowanych jako kontrola pozytywna (pożywka z wodnym roztworem HCl) również nie odbiegał od uzyskanego dla biomasy namnażanej w podstawowym medium SH_B (kontrola 0).

Analogicznie jak podczas elicytacji kultur szałwii białej ergosterolem, również chitosan spowodował zahamowanie akumulacji 1,8-cineolu w testowanych tkankach roślinnych, któremu towarzyszył wzrost w mikropędach zawartości kariofilenu oraz aristolenu (Tab. 12 i Ryc. 51). Powyższe obserwacje stoją w sprzeczności z rezultatami wcześniejszych doświadczeń prowadzonych na uprawach hydroponicznych *Ocimum basilicum* L. Wykazano wówczas, że możliwa jest stymulacja biosyntezy 1,8-cineolu w roślinie poprzez suplementację podłoża chitosanem w stężeniu 0,1 mM (Deschamps i Simon, 2006). Również w warunkach kultur *in vitro*, w przypadku kalusa *Artemisia dracuncululus* L. dodatek powyższej substancji (25-150 mg L⁻¹) do medium wzrostowego wyraźnie

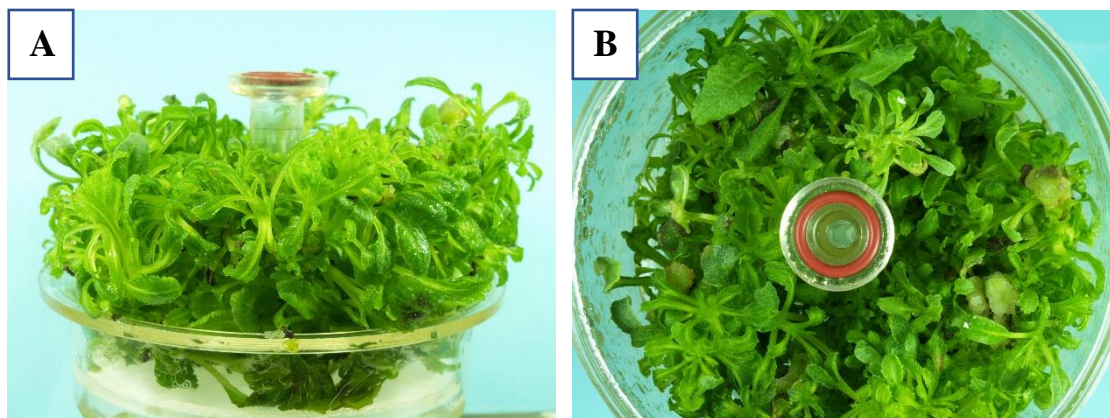
wpływał na proporcje poszczególnych grup mono- i seskwiterpenów we frakcji lotnej (Coskun i Taslidere, 2022).

Podsumowując, opisane w niniejszej pracy eksperymenty wskazały na ograniczoną możliwość modyfikowania poziomu akumulacji olejku eterycznego w mikropędach *S. apiana* poprzez dodatek do pożywki wzrostowej chitosanu, w stężeniu 200 mg L⁻¹. W efekcie, pomimo interesujących wyników, na obecnym etapie badań, nie można zaproponować wysokowydajnego, pod względem produkcji frakcji lotnej systemu *in vitro* szałwii białej. Dobra tolerancja omawianych biomas na powyższy elicytor skłania natomiast do dalszego testowania wyższych jego stężeń w medium eksperymentalnym na bazie opracowanego modelu doświadczalnego.

Wpływ elicytacji wyciągiem drożdżowym na wzrost mikropędów *S. apiana* oraz akumulację lotnych terpenów w biomasach roślinnych

Jak już wspomniano, ostatni z zastosowanych elicytorów, tj. wyciąg drożdżowy testowano w kulturze eksperymentalnej szałwii białej, nie tylko modyfikując czas kontaktu czynnika stresogennego z mikropędami *S. apiana* w cyklu wzrostowym, ale uwzględniono także jego różne stężenia w medium odżywczym (50 i 100 mg L⁻¹).

Omawiany wyciąg nieznacznie hamował przyrost biomasy szałwii białej (Ryc. 48). Najwyższą wartość współczynnika przyrostu ($G_i = 474,7\%$) stwierdzono dla eksplantatów kultywowanych w pożywce SH_B suplementowanej powyższym ekstraktem, w stężeniu 100 mg L⁻¹, dodawanym w 18. dniu eksperymentu. Ponadto, podobnie jak w przypadku pozostałych, testowanych substancji stresogennych, nie obserwowano, aby ekstrakt drożdżowy (3- oraz 7-dniowy kontakt z biomasą) oddziaływał negatywnie na morfologię mikropędów szałwii białej. Charakteryzowały się one znaczną juwenilnością, brakiem cech wskazujących na wiotryfikację i nekrozę oraz żywozieloną barwą (Ryc. 53). Warto w tym miejscu zauważyć, że utrzymanie wartości parametrów wzrostowych kultur poddanych elicytacji wyciągiem drożdżowym, w stężeniu 500 mg L⁻¹, na poziomie zbliżonym do tkanek referencyjnych, stwierdzono także w doświadczeniach nad mikropędami *Thymus lotocephalus* G. Lopez & R. Morales, namnażanymi w kolbach Erlenmeyera (objętość robocza 80 mL) (Gonçalves i in., 2019). W przytoczonym badaniu obserwowano wpływ powyższego ekstraktu na stopień rozkrzewiania pędów *in vitro*, natomiast parametry wzrostowe testowanych kultur nie obniżyły się znacząco (101,1 mg DW) względem próby kontrolnej (187,0 mg DW).



Ryc. 53. Kultura pędów *S. apiana*, rosnąca w bioreaktorze RITA[®] w ostatnim, 21. dniu doświadczenia (medium SH_B), elicytowana ekstraktem drożdżowym, dodanym w stężeniu 100 mg L⁻¹, w 14. dniu cyklu wzrostowego; A – biomasa – widok z boku; B – biomasa – widok z góry.

Dodatek do medium wzrostowego wyciągu drożdżowego, w wyższym z testowanych stężeń (100 mg L⁻¹), na 7 dni przez zbiorem tkanek, tj. bezpośrednio przed osiągnięciem przez mikropędy *S. apiana* fazy stacjonarnej (14. dzień kultury), podwyższył w nich, względem próby zerowej (1,10%), o ok. 9%, poziom akumulowanej frakcji lotnej (1,20%) (Ryc. 50). W tym miejscu należy jednak podkreślić, że wzbogacenie pożywki we wspomniany ekstrakt dodawany, w ilości 100 mg L⁻¹, pod koniec fazy wzrostu liniowego jako jedyna z zaproponowanych w projekcie strategii warunkowała wybiórcze podwyższenie zawartości olejku eterycznego w mikropędach *S. apiana*. Ponadto, wysokie parametry wzrostu ($G_i > 430\%$) oraz zachowana żywotność tkanek szałwii białej, podczas zastosowanej procedury, zachęcają do bardziej szczegółowego testowania tego elicytora z wykorzystaniem jego wyższych stężeń. Warto w tym miejscu wspomnieć, że grzyby z gatunku *Sacharomyces cerevisiae* wykazywały aktywność elicytorową w wielu roślinnych systemach *in vitro* (Szpitter i Królicka, 2005). Przykładowo, ekstrakt drożdżowy stosowany w stężeniu 500 mg L⁻¹, w kulturze mikropędów *Thymus lotocephalus*, stymulował biosyntezę polifenoli, pozwalając uzyskać, względem kontroli, nawet 1,6-krotny wzrost zawartości kwasu rozmarynowego (Gonçalves i in., 2019). Obiecujące rezultaty przyniosła też procedura elicytacji zawiesiny *M. piperita* powyższym wyciągiem, skutkująca dobrym przyrostem biomasy oraz wzrostem w niej zawartości mentolu (Chakraborty i Chattopadhyay, 2008).

Przeprowadzone analizy chromatograficzne GC-FID/MS olejków eterycznych, pozyskanych z, elicytowanych wyciągiem drożdżowym, biomas *S. apiana*, wykazały, że różnice w składzie frakcji lotnych pomiędzy kulturą referencyjną a tkankami dokarmianymi wymienionym wyżej składnikiem miały charakter wyłącznie ilościowy. W wariancie doświadczalnym, pozwalającym stymulować akumulację lotnych terpenów w mikropędach szałwii białej (Ryc. 50), tj. przy zastosowaniu wyciągu drożdżowego, dodanego do pożywki w stężeniu 100 mg L⁻¹, w 14. dniu cyklu wzrostowego, obserwowano w kulturze wzrostu poziom biosyntezy kariofilenu oraz β -pinenu (odpowiednio, o ok. 1,7- oraz 1,2-razy), przy jednoczesnym spadku o ok. 30% zawartości 1,8-cineolu (Ryc. 49). Biorąc pod

uwagę korzystne parametry wzrostowe testowanych biomas, podwyższony w nich, względem próby kontrolnej, poziom akumulacji olejku eterycznego, a także zachowany profil metaboliczny frakcji lotnych terpenów, należy uznać wyciąg drożdżowy za elicytor o wymiernej wartości aplikacyjnej, mogący podnieść, po przeprowadzeniu dalszych, szczegółowych badań optymalizacyjnych, produktywność otrzymanego w toku projektu doktoranckiego, mikropędowego systemu *in vitro* szałwii białej, w zakresie lotnych połączeń terpenowych.

Wpływ suplementacji pożywki sokiem z liści pokrzywy zwyczajnej na wzrost mikropędów *S. apiana* oraz akumulację lotnych terpenów w biomasach roślinnych

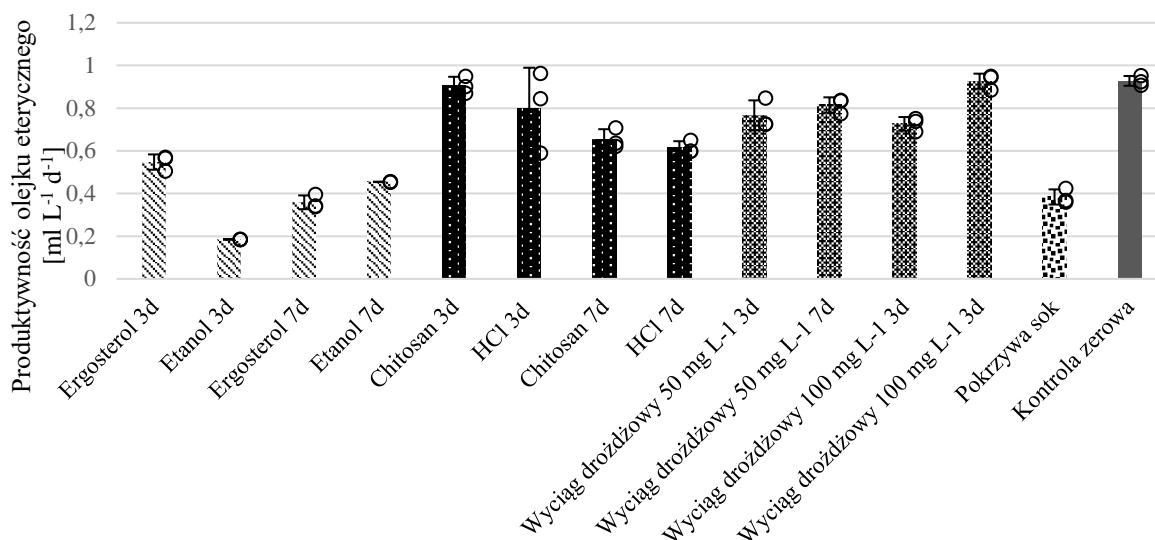
W ostatnim z przeprowadzonych wariantów eksperymentalnych, zbadano wpływ dodatku do pożywki soku z liści *Urtica dioica* (2,5%) na wzrost mikropędów szałwii białej oraz ich zdolność do biosyntezy lotnych terpenów. Na podstawie porównania uzyskanych wyników ($DW = 16,6 \text{ g L}^{-1}$) z próbą zerową ($DW = 17,3 \text{ g L}^{-1}$) można uznać, że zastosowana procedura nie wpłynęła istotnie na przyrost testowanej kultury (Ryc. 48). Pędy otrzymane w opisywanym doświadczeniu charakteryzowały się jednak większym udziałem martwych liści w biomasie (Ryc. 54). Powyższym zmianom makroskopowym kultury *in vitro*, towarzyszyła również istotnie obniżona, względem próby kontrolnej (1,10%), zawartość frakcji lotnej w tkankach roślinnych (0,48%) (Ryc. 50). Na tej podstawie można wnioskować, że dodatek do pożywki soku z pokrzywy, w stosowanym stężeniu, wpłynął negatywnie zarówno na metabolizm pierwotny jak i wtórny mikropędów *S. apiana*. Aby uniknąć wystąpienia opisanych procesów nekrotycznych, zasadne wydaje się w przyszłości obniżenie, w medium eksperymentalnym, stężenia zastosowanego soku do wartości pozwalających zachować prawidłowy wzrost oraz morfologię testowanych pędów i w nowych warunkach umożliwić dokonanie oceny wpływu zmienionych procedur na produkcję olejku eterycznego w biomasach.



Ryc. 54. Kultura mikropędów *S. apiana*, rosnąca w bioreaktorze RITA[®] w ostatnim, 21. dniu doświadczenia, w medium SH_B z dodatkiem soku z liści pokrzywy zwyczajnej (stężenie 2,5% w pożywce).

Zabieg suplementacji podłoża wzrostowego sokiem z liści pokrzywy zwyczajnej wywarł również istotny wpływ na proporcje głównych grup terpenoidów we frakcji lotnej akumulowanej w mikropędach szałwii białej (Tab. 12). Połączenia o charakterze seskwiterpenów występowały w olejku eterycznym w relatywnie dużych stężeniach (węglowodory – 26,46%, metabolity zawierające tlen – 5,91%), czemu towarzyszyła znacznie niższa, względem kultury referencyjnej, zawartość monoterenów utlenionych (25,07%). Ponadto, w zespole terpenów obserwowano ok. 2,2-krotny spadek, względem próby zerowej, zawartości głównego monoterenoidu – 1,8-cineolu (Ryc. 51). Opisowanemu zjawisku towarzyszyło znaczne podwyższenie udziału we frakcji lotnej: α -pinenu, kariofilenu, aristolenu oraz α -bisabolenu (odpowiednio: 1,3-, 2,9-, 2,7- oraz 2,3-razy). Tym samym, jak już wspomniano, uzyskano wyniki o pewnym znaczeniu poznawczym. Aczkolwiek w obecnej postaci nie mają one znaczenia aplikacyjnego, to zachęcają do kontynuacji badań w rozszerzonym zakresie.

W rezultacie przeprowadzonych doświadczeń z zakresu elicytacji i suplementacji kultur *S. apiana* substancjami odżywczymi, mikropędy badanego gatunku, dokarmiane chitosanem oraz wyciągiem drożdżowym, osiągnęły korzystną produktywność frakcji lotnej, przekraczającą $0,7 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Ryc. 55). Najwyższą wartość w tym zakresie ($0,93 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) uzyskano dla biomas namnożonych w medium z ekstraktem drożdżowym, dodanym w 14. dniu eksperymentu, w stężeniu 100 mg L^{-1} . Warto w tym miejscu nadmienić, że w przypadku procedur elicytacji wykorzystujących chitosan oraz ekstrakt drożdżowy, mimo niekiedy obniżonej, względem próby kontrolnej, zawartości olejku eterycznego w tkankach, dzięki utrzymaniu Gi mikropędów na poziomie powyżej 500%, opracowanie finalnie systemu *in vitro* szałwii białej, jako źródła wartościowej frakcji lotnej, na bazie wybranego z powyższych strategii schematu doświadczalnego, może być rozpatrywane jako ekonomicznie uzasadnione. Należy również podkreślić, że skład jakościowy olejków, wyizolowanych z elicytowanych mikropędów *S. apiana*, odpowiadał charakterystyce metabolicznej rośliny gruntowej (Krol i in., 2022). Tym samym wartość terapeutyczna otrzymanego w niniejszej serii doświadczeń zespołu lotnych terpenów oraz ich przydatność do celów leczniczych, jest porównywalna z olejkiem pozyskanym z surowca rosnącego w środowisku naturalnym.



Ryc. 55. Porównanie produktywności olejku eterycznego w mikropędach *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μM) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz suplementowanych sokiem z liści *U. dioica* (2,5%). Eksperymenty prowadzono w bioreaktorach RITA[®] (warunki standardowe) przez 21 dni.

Płynną pożywkę wzrostową SH_B modyfikowano poprzez dodatek elicytorów, bądź ich rozpuszczalników (kontrola dodatnia), na 3 (3d) lub 7 dni (7d) przed zbiorem. Kontrolę zerową stanowiła biomasa namnażana w podstawowej pożywce SH_B przez 21 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób eksperymentalnych ± SD.

Uzyskane rezultaty wskazują, że zastosowane czynniki stresogenne, w badanych zakresach stężeń i przedziałach czasowych (okres kultury biomasy z elicytorami), nie przyczyniły się istotnie do obniżenia żywotności mikropędów szałwii białej, a w przypadku ergosterolu warunkowały nawet ich intensywniejszy przyrost. Najlepszy spośród zastosowanych modeli doświadczalnych obejmował wykorzystanie wyciągu drożdżowego, w stężeniu 100 mg L⁻¹, wprowadzanego do pożywki na 3 dni przed końcem 21-dniowego cyklu wzrostowego, co pozwoliło na uzyskanie wyższego o ok. 10%, względem kontroli, stężenia olejku eterycznego w testowanej matrycy roślinnej. Zmiany jakościowe i ilościowe w składzie zespołu lotnych terpenów syntezowanych przez elicytowane mikropędy dotyczyły głównie monoterpenoidów, a przede wszystkim obniżenia zawartości podstawowego składnika frakcji lotnej, tj. 1,8-cineolu. Bardzo zróżnicowana odpowiedź tkanek *S. apiana* na obecność w pożywce poszczególnych elicytorów może wskazywać na złożony charakter mechanizmów obronnych w testowanym gatunku roślinnym, prawdopodobnie obejmujących biosyntezę konkretnych terpenów jako specyficznych fitoaleksyn, a nie całego zespołu połączeń lotnych. W doniesieniach literaturowych nie znaleziono dotychczas informacji wyjaśniających obserwowane zjawisko stąd bardziej szczegółowe dane będzie można uzyskać dopiero po przeprowadzeniu zaawansowanych badań również na poziomie molekularnym.

Podsumowując przeprowadzone prace biotechnologiczne, w wyniku przeprowadzonej serii eksperymentów, udało się otrzymać trzy systemy *in vitro* szałwii białej zdolne do produkcji kwasu rozmarynowego (korzenie odcięte oraz transformowane) oraz olejku eterycznego (mikropędy) badanego gatunku.

Zgodnie z danymi literaturowymi, powyższe metabolity wtórne oraz ich zespoły wykazują właściwości prozdrowotne w przebiegu chorób cywilizacyjnych, zarówno w odniesieniu do działania terapeutycznego jak i profilaktycznego. W przypadku kwasu rozmarynowego związane jest to przede wszystkim z jego wysoką aktywnością przeciwutleniającą oraz przeciwzapalną, potwierdzoną w badaniach *in vitro* i *in vivo* (Alagawany i in., 2017; Noor i in., 2022). Zainteresowanie wykorzystaniem w medycynie powyższego związku zwiększa się wraz z poszerzaniem wiedzy na temat jego właściwości prozdrowotnych, jak również wraz z głębszym zrozumieniem wzajemnego powiązania między stresem oksydacyjnym, stanem zapalnym i rozwojem szeregu stanów patologicznych, obejmujących również te charakterystyczne dla chorób autoimmunologicznych i neurodegradacyjnych (Alagawany i in., 2017; Noor i in., 2022). Obecnie zauważalny jest także ponowny wzrost zainteresowania kwasem rozmarynowym w odniesieniu do różnych metod jego pozyskiwania, w tym tych z wykorzystaniem kultur *in vitro* roślin wyższych (Bulgakov i in., 2012; Nadeem i in., 2019b; Trócsányi i in., 2020; Noor i in., 2022). Otrzymane systemy *S. apiana*, pozwalające biosyntezywać powyższy związek, wpisują się zatem w szerszy nurt prac badawczych dotyczących poszukiwania opłacalnych i wydajnych metod pozyskiwania omawianego metabolitu wtórnego. Warto w tym miejscu nadmienić, że kwas rozmarynowy budzi zainteresowanie nie tylko ze względu na jego aktywność terapeutyczną oraz profilaktyczną w chorobach o podłożu oksydacyjno-zapalnym, ale znajduje też zastosowanie w przemyśle kosmetycznym oraz spożywczym (Bulgakov i in., 2012; Noor i in., 2022).

Dane literaturowe wskazują, że olejki eteryczne *Salvia* ssp. mogą być brane pod uwagę jako potencjalna, korzystna perspektywa terapeutyczna w prewencji oraz leczeniu chorób cywilizacyjnych, ze względu na ich właściwości przeciwnowotworowe, hipolipidemiczne, przeciwzapalne, przeciwutleniające, hipoglikemiczne oraz poprawiające funkcje poznawcze (Kamatou i in., 2008; Grdiša i in., 2015; Lopresti, 2017). Aktywność biologiczna powyższych frakcji lotnych jest efektem zarówno działania poszczególnych składników tego zespołu połączeń naturalnych, jak i ich współdziałania synergistycznego, przy czym składniki takie jak tujon, wyróżniające się toksycznym działaniem na ośrodkowy układ nerwowy, stanowią znaczne ograniczenie we wdrożeniu bezpiecznej terapii z udziałem charakterystycznych dla rodzaju *Salvia* lotnych mono- i seskwiterpenów (Savelev i in., 2003; European Medicines Agency, 2012; Németh i Nguyen, 2020). Otrzymany, w niniejszej pracy doktorskiej, system *in vitro* *S. apiana* do produkcji olejku eterycznego, pozbawionego neurotoksycznego tujonu, stanowi więc alternatywne, stałe źródło zespołu lotnych terpenów, charakterystycznych dla endemicznego gatunku szałwii białej.

2.4.3.3 Badanie wybranych kierunków aktywności biologicznej frakcji lotnych z liści roślin gruntowych oraz mikropędów *S. apiana*

Jak już wspomniano we wstępie, realizacja zasadniczego celu projektu doktorskiego obejmowała również badania biologiczne frakcji olejkowych z liści *S. apiana*, pochodzących ze środowiska naturalnego, a także z mikropędów tego gatunku otrzymanych metodami biotechnologicznymi. Dotyczyły one zdolności lotnych terpenów do hamowania procesów patologicznych, towarzyszących schorzeniom neurodegeneracyjnym oraz autoimmunologicznym. Zakres powyższych prac obejmował testy enzymatyczne, tj. określenie aktywności inhibicyjnej badanych olejków eterycznych względem acetylocholinoesterazy, tyrozynazy oraz hialuronidazy (działania wykorzystywane w terapii chorób neurodegeneracyjnych oraz zaburzeń powiązanych z procesami starzeniowymi), a także ocenę ich wpływu na limfocyty T (zdolność do supresji układu immunologicznego).

Wybór powyższych kierunków badań podyktowany był zarówno wynikami dotychczasowych prac eksperymentalnych dotyczących potencjału terapeutycznego metabolitów wtórnych występujących w rodzaju *Salvia* (Lu i Foo, 2002; Fu i in., 2013; Agatonovic-Kustrin i Morton, 2018; Kim i in., 2023; Mirza i in., 2023), jak i bieżącymi priorytetami oraz wyzwaniem w opiece zdrowotnej (WHO, 2014, 2017). Podane powyżej grupy schorzeń cywilizacyjnych o charakterze przewlekłym oraz złożonej etiologii są w przypadku szeregu konkretnych jednostek chorobowych trudne, a nawet niemożliwe do wyleczenia, a skuteczność terapeutyczna dostępnych leków jest bardzo ograniczona (Wang i in., 2015; Kopp, 2019; Yiannopoulou i Papageorgiou, 2020). Jednocześnie ciągle rosnący wskaźnik zachorowalności na choroby neurodegeneracyjne i autoimmunologiczne, pociągający za sobą ogromne obciążenie finansowe systemu opieki medycznej, sprawia, że wiele zespołów naukowych prowadzi badania nad profilaktyką oraz leczeniem wspomnianych schorzeń (Kim i in., 2023; Śledzik i in., 2023). Część potencjalnych terapeutyków obejmuje produkty roślinne o szerokim spektrum aktywności biologicznej, takim jak: działanie przeciwzapalne, immunomodulujące, antyoksydacyjne oraz neuroprotektoryjne (Cooper i in., 2009; Wang i in., 2015; Cao i in., 2020; Ahmed i in., 2022; Moudgil i Venkatesha, 2022). Wśród nich wyróżnia się polifenole oraz terpenoidy, występujące również w rodzaju *Salvia* (Lu i Foo, 2002; Fu i in., 2013; Mecocci i in., 2014; Anastasiou i Buchbauer, 2017; Agatonovic-Kustrin i Morton, 2018; Agatonovic-Kustrin i in., 2019; Barão Paixão i de Carvalho, 2021).

Jak już wspomniano w rozdz. 2.3, szalwia biała łączy w sobie wysoki potencjał biosyntetyczny, w zakresie produkcji zarówno klasy związków polifenolowych (flawonoidy, kwasy fenolowe), jak i terpenowych (lotne mono- i seskwiterpeny oraz nielotne di-, tri- i C23-terpenoidy) (Krol i in., 2022). Jednakże, jak pokazały zaprezentowane w niniejszej dysertacji prace biotechnologiczne oraz fitochemiczne, otrzymane z powyższego gatunku systemy *in vitro* (mikropędy oraz korzenie odcięte i transgeniczne) charakteryzują się, w zależności od stopnia zróżnicowania morfogenicznego,

zmiennym składem chemicznym w zakresie powyższych zespołów metabolitów wtórnych (rozdz. 2.4.1-2.4.3). Ze względu na duże koszty doświadczeń biologicznych oraz ograniczone ramy czasowe trwania projektu doktoranckiego, przeprowadzenie eksperymentów, w tym zakresie, dla każdego typu kultury ciągłej *S. apiana* oraz wszystkich grup związków naturalnych występujących w testowanych matrycach roślinnych byłoby niemożliwe. Zatem, uwzględniając dane literaturowe dotyczące *S. apiana* (Krol i in., 2022), a także profil metaboliczny otrzymanych biomas (rozdz. 2.4.1-2.4.3), do prac eksperymentalnych wytypowano mikropędy *S. apiana*, zdolne, w opracowanych warunkach, do ciągłej produkcji lotnych mono- i seskwiterpenów. W powyższych testach badano olejki eteryczne wyizolowane z wybranych matryc roślinnych *in vitro*, jak również z referencyjnych próbek roślin gruntowych. Do niektórych doświadczeń, włączono także substancję wzorcową, stanowiącą dominujący składnik wszystkich frakcji lotnych, tj. 1,8-cineol.

2.4.3.3.1 Badanie *in vitro* aktywności inhibicyjnej wybranych frakcji lotnych z *S. apiana* (mikropędy oraz liście rośliny gruntowej) wobec acetylocholinoesterazy, tyrozynazy oraz hialuronidazy

Dane literaturowe wskazują, że poprawa funkcji kognitywnych, uzyskana poprzez włączenie do diety substancji roślinnych, stanowiących źródło charakterystycznych dla rodzaju *Salvia* terpenów oraz polifenoli, wynika przede wszystkim z ich zdolności do hamowania przewodnictwa cholinergicznego, a także szeroko pojętej aktywności neuroprotektynowej niniejszych połączeń (Singhal i in., 2012; Lopresti, 2017; Saroya i Singh, 2018; Rashed i in., 2021; Kim i in., 2023; Mirza i in., 2023). Standardową metodą różnicowania potencjału terapeutycznego wspomnianych metabolitów wtórnych, w tym zakresie, są testy *in vitro* dotyczące zdolności inhibicyjnej omawianych połączeń naturalnych wobec acetylocholinoesterazy oraz butyrylocholinoesterazy. Wynika to z charakteru procesu neurodegeneracyjnego, obserwowanego w chorobie Alzheimera, gdzie dochodzi do określonych zmian neurochemicznych, a inhibitory AChE są jak dotąd najważniejszą grupą związków stosowanych w leczeniu zaburzeń czynności poznawczych (Singhal i in., 2012; Yiannopoulou i Papageorgiou, 2020). W testach laboratoryjnych, jako substancje referencyjne wykorzystuje się najczęściej związki stosowane powszechnie w podstawowej farmakoterapii powyższego schorzenia, takie jak donepezil lub galantamina (Ellman i in., 1961; Y. Sharma i in., 2020; Gharehbagh i in., 2023). Wśród roślin z rodzaju *Salvia*, których, otrzymane z części nadziemnych, frakcje lotne hamują AChE, znajdują się między innymi: *S. rosmarinus* Spenn. (Orhan i in., 2008; Ben Jemia i in., 2015; Farhat i in., 2017; Cutillas i in., 2018; Leporini i in., 2020), *S. officinalis* L. (El Euch i in., 2019; Tundis i in., 2020), *S. lavandulifolia* Vahl. (Savelev i in., 2003; Perry i in., 2002), *S. sclarea* L. (Phrompittayarat i in., 2015), *S. libanotica* Boiss. & Gaill. (El Basset i in., 2020), *S. multicaulis* Vahl (Akdeniz i in., 2021) oraz *S. tomentosa* Mill. (Marchev i in., 2015). Badania kliniczne z udziałem ludzi potwierdziły, w pewnym zakresie, efekty biologiczne zaobserwowane w testach *in vitro* dotyczących olejków eterycznych pozyskanych z wyżej wymienionych surowców (Perry i in., 2003; Mot i in., 2022; Alonso-Castro i in., 2023). W przypadku

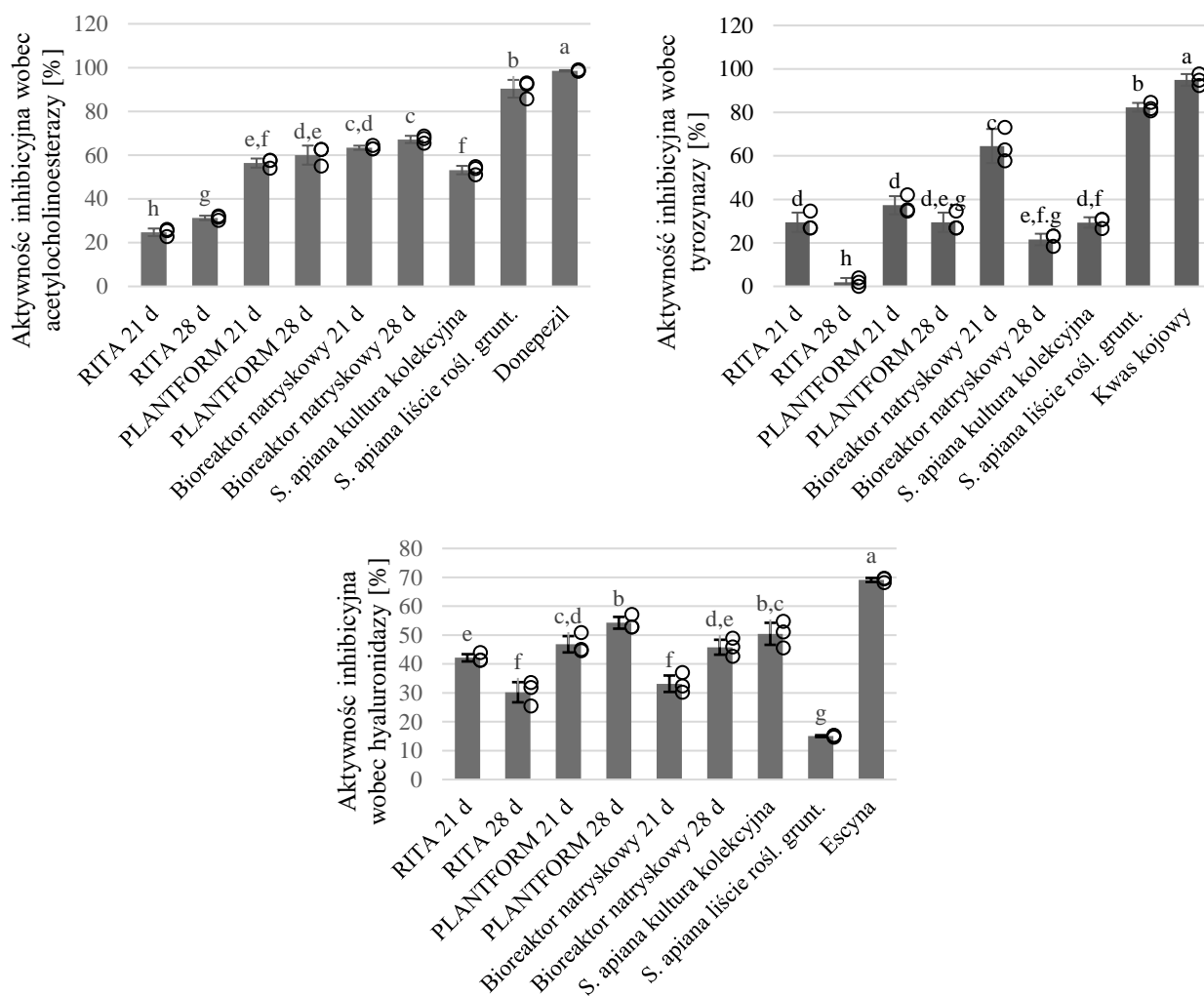
szałwii białej przeprowadzono jedynie doświadczenia z zakresu inhibicji AChE dla ekstraktów etanolowych, metanolowych i octanowych wspomnianej rośliny. Wykazano, że w zależności od rozpuszczalnika ekstrakcyjnego poszczególne wyciągi sporządzone z 7-26 mg liści *S. apiana* miały działanie hamujące acetylocholinesterazę, porównywalne z dzienną dawką donepezylu (10 mg/dzień) (Agatonovic-Kustrin i in., 2023). Uzyskane wyniki zachęciły tym samym do kontynuowania badań w tym zakresie. W przeciwieństwie do zrealizowanego projektu, w cyklu prac zaplanowanych w prezentowanej dysertacji, wybrano model celowany, dotyczący już tylko jednej klasy metabolitów wtórnych, występujących w surowcu tj. lotnych połączeń terpenowych.

Warto w tym miejscu zaznaczyć, że choroby cywilizacyjne, w tym demencja typu alzheimerskiego, mają przebieg chroniczno-zapalny, z włączeniem nasilonego stresu oksydacyjnego i zaburzoną, niefizjologicznym procesem starzeniowym (Obulesu i Rao, 2011; Mecocci i in., 2014; Zhou i in., 2016; Long i Holtzman, 2019). Z tego względu, w niniejszym projekcie, włączono również testy dotyczące inhibicji, przez badane substancje lotne, hialuronidazy oraz tyrozynazy. Hialuronidazy odgrywają istotną funkcję w procesie rozkładu kwasu hialuronowego, głównego składnika macierzy zewnątrzkomórkowej, co przyczynia się do stymulowania procesów angiogenezy i metastazy (reakcje zapalne), natomiast tyrozynaza może odgrywać istotną rolę w procesie nowotworzenia oraz w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona (Gębalski i in., 2022). Wzrost aktywności obydwu enzymów obserwuje się także w niektórych stanach patologicznych, charakterystycznych dla schorzeń cywilizacyjnych (Wyss-Coray, 2016; Hou i in., 2019; Gębalski i in., 2022). Dane literaturowe wskazują, że olejki eteryczne występujące w rodzaju *Salvia* wykazują zdolność do inhibicji tyrozynazy (Aumeeruddy-Elalfi i in., 2016), natomiast nie badano dotychczas wpływu lotnych terpenów, charakterystycznych dla rodzaju *Salvia* na aktywność hialuronidazy. Do tej pory podjęto się jedynie testowania zdolności wyciągów metanolowych *S. ekimiana* Celep & Doğan, *S. rosmarinus* oraz *S. officinalis*, zawierających szeroki zespół polarnych oraz lipofilnych metabolitów roślinnych, do inhibicji omawianego enzymu. W rezultacie przeprowadzonych analiz, opisywaną aktywność powiązano z obecnością w ekstraktach kwasu rozmarynowego (Ippoushi i in., 2000; Karatoprak i in., 2022).

W ramach projektu doktoranckiego wykonano eksperymenty z zakresu aktywności inhibicyjnej olejków eterycznych, występujących w opisywanych matrycach roślinnych *S. apiana*, względem: acetylocholinoesterazy (AChE) [metoda spektrofotometryczna Ellmana (Ellman i in., 1961)], hialuronidazy (Hyal) [zmodyfikowana procedura opisana przez Di Ferrante (Di Ferrante, 1956) i Studzińską-Srokę (Studzińska-Sroka i in., 2018)] oraz tyrozynazy (Tyr) [metoda spektrofotometryczna, z wykorzystaniem zmodyfikowanego komercyjnie, dostępnego zestawu MAK257 (Gębalski i in., 2023)]. W doświadczeniach testowano frakcje lotne *S. apiana* (0,45 mg mL⁻¹), wyizolowane z liści rośliny gruntowej oraz z mikropędów (kolekcyjna kultura szałwii białej; medium SH_B). Do eksperymentów włączono także olejki eteryczne, otrzymane z biomas mikropędów kultywowanych w pożywce SH_B, przez 21 oraz 28 dni, w prototypowym bioreaktorze natryskowym,

RITA[®] oraz PLANTFORM[®] (rozdz. 3.1.9.3.4.1). Kontrolę pozytywną stanowiły: donepezil (inhibitor AChE – 1,00 mg mL⁻¹), kwas kojowy (inhibitor Tyr – 1,00 mg mL⁻¹) oraz escyna (inhibitor Hyal – 0,45 mg mL⁻¹) (Gębalski i in., 2022). Szczegóły dotyczące przebiegu powyższych doświadczeń opisano w rozdz. 3.3.1. Należy w tym miejscu nadmienić, że ze względu na ograniczenia finansowe oraz czasowe trwania projektu doktorskiego, zaplanowane badania biologiczne miały raczej charakter wstępnych analiz skryningowych (pomiar inhibicji enzymatycznej dla wybranych stężeń olejków eterycznych) aniżeli precyzyjnych testów ilościowych (wyznaczenie wartości IC₅₀ - ang. *half-maximal inhibitory concentration*).

Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń wykazały, że ze wszystkich testowanych olejków eterycznych najsilniejszy efekt anty-AChE wykazała frakcja lotna wyizolowana z liści rośliny gruntowej *S. apiana* (90,3% inhibicji – Ryc. 56). Próbkę, pochodzącą z kultur namnażanych w bioreaktorach, były mniej aktywne wobec AChE (24,7-67,2% inhibicji). Dla porównania, aktywność inhibicyjna donepezilu, wobec wspomnianego enzymu, przy stężeniu 1,00 mg mL⁻¹, wynosiła 98,5%. Wśród próbek olejków eterycznych, wyizolowanych z biomas kultywowanych w instalacjach wielkolaboratoryjnych, najsilniejszą zdolność do hamowania AChE zaobserwowano dla frakcji lotnej otrzymanej z mikropędów szalwii białej, rosnących w prototypowym bioreaktorze natryskowym, przez okres 4 tygodni. Opisane rezultaty wskazują, że kultywacja mikropędów *S. apiana*, w warunkach *in vitro*, pozwala otrzymać wartościowy materiał roślinny będący źródłem lotnych terpenów o potencjalnej aktywności anty-AChE, nie dorównującej jednak, w tym względzie, roślinie macierzystej. Jednocześnie zwracają uwagę wyraźnie zaznaczone różnice w hamowaniu anty-AChE przez poszczególne olejki eteryczne, namnażane w zmiennych warunkach doświadczalnych, mimo że wykazywały się one brakiem istotnych różnic jakościowych oraz ilościowych w zakresie poszczególnych metabolitów wtórnych (rozdz. 2.4.3.2). Na obecnym etapie badań wstępnych trudno wyjaśnić obserwowane zjawiska. Za część efektów może odpowiadać działanie synergistyczne oraz antagonistyczne poszczególnych mono- i seskwiterpenów (Savelev i in., 2003).



Ryc. 56. Aktywność inhibicyjna olejków eterycznych, otrzymanych z wybranych biomas *S. apiana*, wobec AChE, Tyr i Hyal. Wszystkie próbki frakcji lotnych oraz escynę badano w stężeniu 0,45 mg mL⁻¹, natomiast donepezil i kwasu kojowy testowano w stężeniu 1,00 mg mL⁻¹. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób eksperymentalnych ± SD.

W przypadku inhibicji dotyczącej Tyr zaobserwowano również znacznie wyższą aktywność frakcji lotnej pozyskanej z rośliny gruntowej *S. apiana* (82,4%) niż w grupie pozostałych testowanych olejków eterycznych pochodzących z kultur *in vitro* (2,3-64,5% – Ryc. 56). Ponadto, wszystkie oceniane zespoły terpenów nie dorównały także, w zakresie testowanej aktywności, substancji wzorcowej (95,0%). Obserwowane zjawisko zastanawia, gdyż olejki eteryczne pozyskane z 19 gatunków roślin leczniczych, w tym: *S. officinalis* oraz *S. rosmarinus*, charakteryzowały się zbliżonym działaniem inhibicyjnym wobec Tyr, utrzymując się jednocześnie na niższym poziomie (Aumeeruddy-Elalfi i in., 2016).

W przypadku aktywności inhibicyjnej wobec hialuronidazy zaobserwowano znacznie wyższe, statystycznie istotne, działanie olejków otrzymanych metodami biotechnologicznymi (30,2-54,3%)

względem frakcji lotnej pozyskanej z liści rośliny gruntowej (15,0% – Ryc. 56). Zespół ocenianych terpenów, najsilniej hamujących powyższy enzym (54,3%) wyizolowano z mikropędów szałwii białej kultywowanych w bioreaktorze PLANTFORM[®], przez 4 tygodnie. Dla porównania, escyna w tym samym stężeniu wykazała zdolność do inhibicji Hyal na wyższym poziomie – 69,1%. Ze względu na brak w literaturze informacji na temat hamowania Hyal przez olejki eteryczne występujące w rodzaju *Salvia*, omawiane doświadczenie oraz jego rezultaty stanowią jeden z elementów innowacyjnych niniejszej rozprawy doktorskiej. Dotychczasowe badania *in vitro* nad potencjałem różnych gatunków szałwii do opóźniania procesów starzeniowych, z wykorzystaniem powyższego testu enzymatycznego, dotyczyły jedynie wyciągów metanolowych z matryc roślinnych (Khare i in., 2021; Karatoprak i in., 2022).

Podsumowując, w toku przeprowadzonych badań stwierdzono, że frakcje lotne *S. apiana*, te pochodzące z rośliny gruntowej oraz z mikropędów otrzymanych metodami biotechnologicznymi, mogą stanowić źródło aktywnych biologicznie mono- i seskwiterpenów o potencjalnym działaniu przeciwstarzeniowym i poprawiającym funkcje poznawcze w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. Uzyskane wstępne wyniki, dotyczące działania omawianych związków roślinnych są obiecujące i mogą stanowić podstawę dalszych, rozszerzonych eksperymentów, obejmujących, między innymi, bardziej precyzyjne wyznaczenie dawki olejków wywołującej odpowiedź biologiczną (IC₅₀) oraz ocenę działania synergistycznego lub antagonistycznego poszczególnych składników testowanych zespołów połączeń naturalnych. Niewątpliwie należałoby również w przyszłości wyjaśnić przyczynę, niekiedy skrajnie odmiennych wyników, dotyczących aktywności frakcji lotnych otrzymanych z biomas *in vitro*, różniących się tylko nieznacznie składem jakościowym i ilościowym poszczególnych terpenów, a rosnących w odmiennych warunkach (zmienny typ bioreaktora).

2.4.3.3.2 Badanie aktywności proapoptotycznej 1,8-cineolu oraz frakcji lotnych, wyizolowanych z liści rośliny gruntowej i mikropędów *S. apiana* względem kultur ludzkich limfocytów T

Komórki CD4+ i CD8+ stanowią subpopulację limfocytów T, których znaczenie w patogenezie chorób autoimmunologicznych nie zostało całkowicie rozpoznane, jednakże ich nasilonej proliferacji towarzyszy wzrost produkcji cytokin, takich jak: TNF- α i TNF- γ , co w rezultacie prowadzi do zainicjowania miejscowego stanu zapalnego oraz uszkodzenia tkanek (Laidlaw i in., 2016; Frers i in., 2020). Wskazuje to na istotną rolę powyższych komórek krwi w utrzymaniu równowagi między stanem aktywacji i supresji w układzie immunologicznym i może być kluczem do immunoterapii wielu chorób z autoagresji. Dotychczasowe terapie, powodujące zredukowanie liczby i aktywności limfocytów T, w tym zastosowanie leków immunosupresyjnych, pozwalają poprawić stan pacjentów i osiągnąć czasową remisję choroby (Cooper i in., 2009; Reyes i in., 2022).

W grupie związków pochodzenia roślinnego zidentyfikowano szereg metabolitów wtórnych o działaniu immunomodulującym, antyproliferacyjnym i cytotoksycznym. Wśród nich terpenoidy wykazały, w testach *in vitro* i *in vivo*, znaczną zdolność do supresji szlaków sygnalizacyjnych układu odpornościowego (Huang i in., 2008; Amirghofran, 2010; Yang i Dou, 2010). Dotychczasowe badania na surowcach z rodzaju *Salvia*, mające na celu określenie wpływu, charakterystycznych dla powyższych roślin, związków na zdolność do proliferacji i stymulacji apoptozy ludzkich limfocytów T, zostały przeprowadzone jedynie dla gatunku *S. mirzayanii* Rech. f. & Esfand i dotyczyły aktywności wyciągu metanolowego z części nadziemnych rośliny (Amirghofran i in., 2010). Dalsze, pogłębione testy biologiczne poszczególnych frakcji otrzymanych z powyższego ekstraktu wykazały, że za powyższy efekt wobec omawianych komórek krwi obwodowej odpowiedzialny jest seskwiterpen – teuklatriol (Ziaei i in., 2011).

Zdolność do nasilenia apoptozy oraz zahamowania proliferacji szczurzych limfocytów T została także stwierdzona dla tanszinonu 2A – diterpenoidu, charakterystycznego dla *S. miltiorrhiza* Bunge (Yu i in., 2014). Pragnąc wpisać się w omawiany kontekst badawczy, w niniejszej dysertacji podjęto się zbadania wpływu olejków eterycznych z różnych biomas *S. apiana* (liście rośliny gruntowej, a także mikropędy kolekcyjne) oraz 1,8-cineolu na pobrane od osób zdrowych obwodowe limfocyty T – CD4+ lub CD8+. Wybór testowanych matryc roślinnych podyktowany był zarówno wynikami dotyczącymi aktywności farmakologicznej głównego składnika frakcji lotnej *S. apiana* – 1,8-cineolu (Brown i in., 2017; Galan i in., 2020; Cai i in., 2021), jak i rezultatami wyżej przytoczonych badań nad potencjałem terapeutycznym terpenów występujących w rodzaju *Salvia* (Amirghofran, 2010; Amirghofran i in., 2010; Ziaei i in., 2011; Yu i in., 2014; Anastasiou i Buchbauer, 2017). Dodatkowo, zaplanowane eksperymenty wpisały się w obszar badań, realizowanych w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed, dotyczących poszukiwania związków pochodzenia roślinnego o szeroko rozumianej aktywności antyartretycznej (Kokotkiewicz i in., 2013; Jesionek, Kokotkiewicz, i in., 2019; Ciesielska-Figlon i in., 2023).

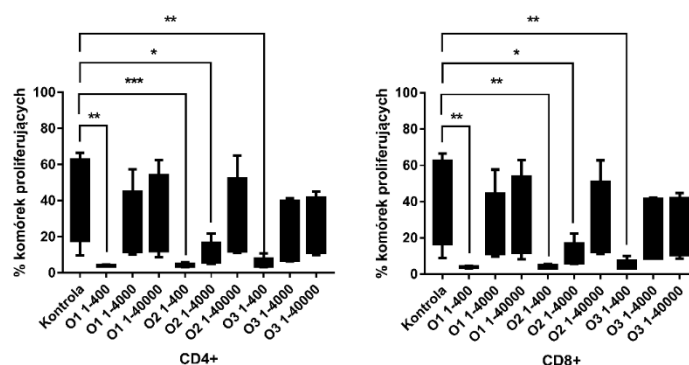
W ramach prezentowanego projektu doktoranckiego serię eksperymentów przeprowadzono na limfocytach T pobranych od osób zdrowych. Mogą one stanowić podstawę do dalszych, bardziej zaawansowanych testów, w tym do określenia działania immunosupresyjnego olejków eterycznych, otrzymanych z biomas *S. apiana*, wobec komórek CD4⁺ oraz CD8⁺, pobranych od pacjentów chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) oraz wyznaczanie ich aktywności proapoptycznej względem synowocytów fibroblastycznych obecnych w przebiegu wspomnianych schorzeń.

W prezentowanych doświadczeniach biologicznych limfocyty T wyizolowano z krwi obwodowej osób zdrowych (n = 5), z zastosowaniem procedury opisanej szczegółowo w rozdz. 3.3.2. Następnie, otrzymane komórki inkubowano przez okres 72 i 120 h, z olejkami eterycznymi, pochodzącymi z materiału gruntowego (liście) oraz z kultur *in vitro* *S. apiana* (mikropędy rosnące na medium SH_B), a także z dominującym składnikiem powyższych frakcji lotnych, tj. 1,8-cineolem (rozcieńczenia 1/400, 1/4000 i 1/40000). Po tym czasie, analizowano cytometrycznie dynamikę namnażania wyizolowanych, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Proliferację populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ oceniano z użyciem barwnika VPD 450. Apoptozę powyższych komórek określano natomiast na podstawie ich zdolności wiązania aneksyny V oraz 7-AAD, różnicując je, w toku analiz cytometrycznych, na komórki żywe, wyznakowane AnnV(-)7AAD(-), wczesnoapoptotyczne AnnV(+)7AAD(-), późnoapoptotyczne AnnV(+)7AAD(+) oraz nekrotyczne AnnV(-)7AAD(+).

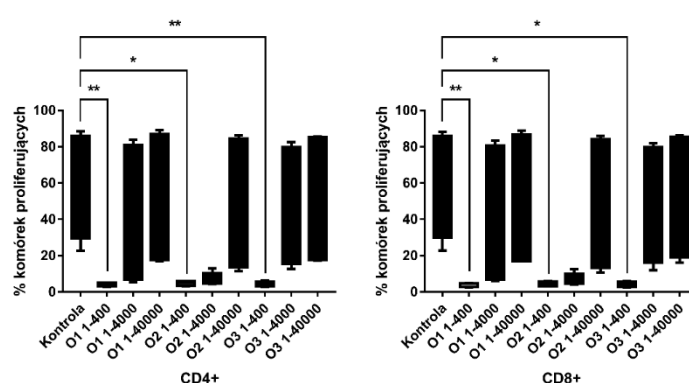
W wyniku przeprowadzonego doświadczenia stwierdzono zmiany dynamiki proliferacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, poddanych stymulacji olejkami eterycznymi, wyizolowanymi zarówno z mikropędów, jak i liści rośliny gruntowej, a także 1,8-cineolem (Ryc. 57). Wszystkie badane substancje, w najwyższym testowanym stężeniu (rozcieńczenie 1/400), po 72 h inkubacji z materiałem biologicznym, niemal całkowicie hamowały namnażanie się komórek CD4⁺ (mediana, odpowiednio – 4,22, 4,00 oraz 4,190% w stosunku do kontroli – 27,07%) i CD8⁺ (mediany: 3,95, 3,83 oraz 4,02%; kontrola – 27,07%). Zahamowanie proliferacji limfocytów T odnotowano również po 120h od rozpoczęcia ich inkubacji z testowanymi lotnymi terpenami. Jednocześnie, porównując uzyskane wyniki do kontroli zerowej, tak silnego wpływu frakcji olejkowych z matryc *S. apiana* na testowane limfocyty nie zaobserwowano przy rozcieńczeniach grupy badanych metabolitów, równych 1/4000 oraz 1/40000. Wyjątek stanowi olejek eteryczny, wyizolowany z mikropędów *S. apiana*, testowany w rozcieńczeniu 1/4000, przy stymulacji którym odsetek proliferujących komórek CD4⁺ i CD8⁺ był znamienne niższy niż w przypadku kontroli. Generalnie, wraz ze zmniejszeniem stężenia frakcji lotnej w kulturze, wzrastał odsetek komórek proliferujących (efekt zależny od dawki). Wpływ monoterpenów na hamowanie proliferacji mysich limfocytów T wykazano także dla metanolowych ekstraktów z części nadziemnych *Thymus vulgaris* L., *T. daenensis* Čelak. oraz *Zataria multiflora* Boiss. (rodzina Lamiaceae). W przytoczonym eksperymencie wykazano, że aktywnym połączeniem naturalnym, obecnym w testowanych wyciągach, jest tymol (Amirghofran i in., 2011), którego jednak brak w szaławii białej.

W trakcie przeprowadzonych analiz cytometrycznych stwierdzono także, że inkubacja obydwu próbek olejku eterycznego *S. apiana* oraz 1,8-cineolu z limfocytami T, w najwyższym testowanym stężeniu, nasilała ich apoptozę, jednocześnie prowadząc do spadku, względem kontroli, udziału w kulturze komórek żywych i wczesnoapoptycznych oraz zwiększając ułamek komórek późnoapoptycznych i martwych (Ryc. 58). Wspomniany efekt był najsilniejszy przy najwyższym stężeniu lotnych terpenów zastosowanych w systemie eksperymentalnym (rozcieńczenie 1/400). Wówczas mediana żywych limfocytów T wynosiła, po 72 h, odpowiednio: 1,29, 0,64 oraz 54,31%, podczas gdy w przypadku kontroli była ona znacznie wyższa (62,61%). Jak już wspomniano, udział limfocytów wczesnoapoptycznych w kulturze również się obniżył (mediana, odpowiednio: 3,57, 2,03 oraz 17,14% w stosunku do kontroli – 25,08%), natomiast wzrósł odsetek komórek późnoapoptycznych (mediany: 91,37, 96,20 oraz 25,52% wobec kontroli 14,62%) oraz nekrotycznych (mediany: 2,66, 1,40 oraz 0,54% vs. kontrola 0,37%). Powyższe efekty biologiczne, przy rozcieńczeniach zastosowanych olejków oraz 1,8-cineolu równych 1/4000 oraz 1/40000, były znacznie mniej zaznaczone, tj. nasilenie procesów nekrotycznych w badanej populacji limfocytów T było na poziomie zbliżonym do kontroli (Ryc. 58). Otrzymane wyniki wskazują na silne działanie cytotoksyczne wysokich stężeń frakcji lotnych *S. apiana*, pochodzących z kultur *in vitro* i rośliny gruntowej, także po 120 h od ich kontaktu. Tym samym, można wnioskować, że olejek eteryczny z badanych matryc szaławii białej przynajmniej częściowo może przyczyniać się do obserwowanego efektu przeciwzapalnego i immunodulującego, opisanego w literaturze dotyczącej tradycyjnego wykorzystania tego surowca (Krol i in., 2022). Zjawisko stymulowania apoptozy ludzkich limfocytów T z krwi obwodowej stwierdzono także dla wyciągu metanolowego z *S. mirzayanii*. W eksperymencie, na podstawie analiz cytometrycznych, w obecności powyższego ekstraktu, wykazano, zależny od dawki, wzrost odsetka komórek nekrotycznych w testowanej populacji (Amirghofran i in., 2010).

72 godziny



120 godzin



Ryc. 57. Wykresy obrazujące procent proliferacji, w warunkach *in vitro*, limfocytów T: CD4+ oraz CD8+, pochodzących od osób zdrowych (n = 5), w obecności różnych stężeń olejków eterycznych (rozcieńczenia etanolem w stosunku 1/400, 1/4000 oraz 1/40000), wyizolowanych z liści rośliny gruntowej (O1), mikropędów (O2), oraz 1,8-cineolu (O3).

Eksperymenty obejmują pomiar cytometryczny po 72 i 120 h od stymulacji komórek olejkami i monoterpenem. Na wykresie ramki przedstawiają 25-75% badanych limfocytów T, natomiast wąsy – wartości minimalne i maksymalne udziału procentowego powyższych komórek krwi w populacji.

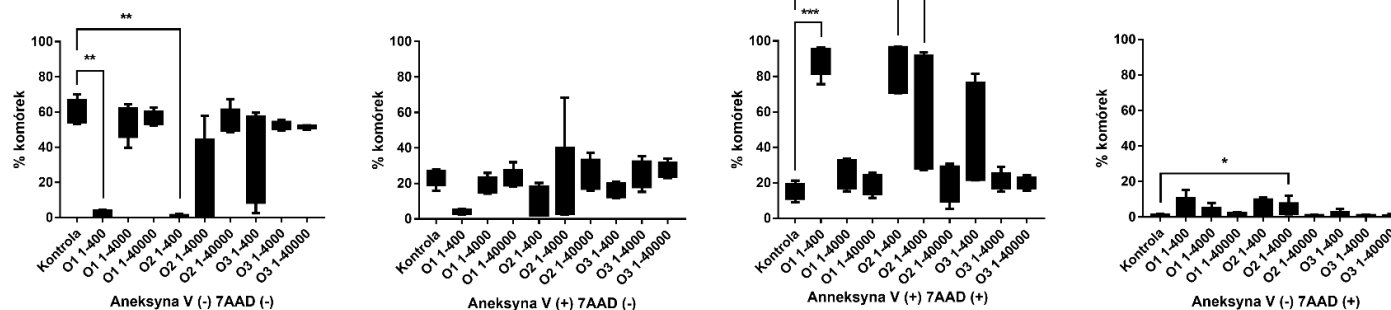
Podobnym profilem aktywności biologicznej, w porównaniu do olejków eterycznych z badanych matryc *S. apiana*, charakteryzował się dominujący składnik powyższych frakcji lotnych, tj. 1,8-cineol (Ryc. 57 i 58). Warto w tym miejscu zauważyć, że powyższy monoterpenoid, mimo wykazanych, w prezentowanych badaniach, właściwości cytotoksycznych wobec komórek krwi, jest zarejestrowany w niektórych państwach europejskich jako lek o działaniu przeciwzapalnym i sekretolitycznym (Soledum® forte, kapsułki). Preparat jest przyjmowany doustnie, zgodnie z dawkowaniem 3 x 200 mg/dzień (Juergens i in., 2020). Dostępne informacje dotyczące bezpieczeństwa stosowania 1,8-cineolu (Brown i in., 2017; Galan i in., 2020; Juergens i in., 2020; Cai i in., 2021), głównego składnika olejku eterycznego *S. apiana*, oraz tradycyjne wykorzystanie niniejszego surowca pozwalają wstępnie rozważać omawianą frakcję lotną jako źródło związków o

potencjale terapeutycznym do stosowania doustnego. Niemniej, przeprowadzone badania mają charakter podstawowy i nie obejmują tak istotnych aspektów jak metabolizm obecnych w zespole lotnych terpenów oraz ich profilu farmakokinetycznego. Z tego względu trudno jednoznacznie wskazać drogi podania preparatów opracowanych na bazie olejków eterycznych występujących w szalwii białej.

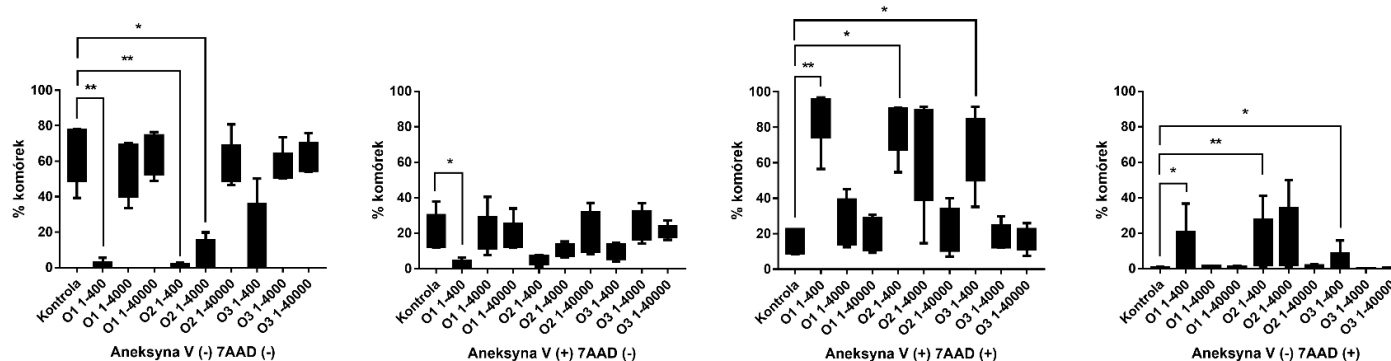
Podsumowując przeprowadzone doświadczenia, uzyskane wyniki wskazują na immunosupresyjne działanie 1,8-cineolu oraz frakcji lotnych z *S. apiana*, zarówno pozyskanych z liści rośliny gruntowej, jak i pędów *in vitro*. Wszystkie testowane populacje limfocytów T okazały się wrażliwe na działanie zastosowanych zespołów metabolitów wtórnych, a wywierany efekt był również zależny od dawki i utrzymywał się w czasie hodowli zarówno 72-, jak i 120-godzinnej. Mimo udokumentowanego zastosowania w lecznictwie tradycyjnym liści *S. apiana*, zwraca uwagę silny efekt cytotoksyczny olejków uzyskanych z surowców wobec limfocytów T, skłaniając tym samym do przeprowadzenia pogłębionych badań toksykologicznych, umożliwiających ocenę bezpieczeństwa powyższego surowca przed ewentualnym jego wprowadzeniem do powszechnego wykorzystania.

Przeprowadzone badania biologiczne wskazują na możliwość zastosowania olejku eterycznego z liści *S. apiana* oraz pozyskiwanego z mikropędów badanego gatunku metodami biotechnologicznymi, w profilaktyce i terapii pomocniczej stanów chorobowych przebiegających z nasilonym odczynem zapalnym, charakterystycznym również dla wielu chorób cywilizacyjnych. Wykorzystane testy wykazały potencjał immunosupresyjny oraz inhibicyjny omawianych frakcji lotnych względem acetylocholinesterazy, tyrozynazy i hialuronidazy. Wstępna analiza biologiczna przyczyniła się także do lepszego poznania zależności pomiędzy składem chemicznym omawianego surowca, a jego aktywnością *in vivo*. Otrzymane metodami biotechnologicznymi zespoły związków wpisują się w koncepcję fitoterapeutyków wielocelowych, charakteryzujących się szerokim spektrum działania w obrębie poszczególnych jednostek chorobowych (schorzenia neurodegeneracyjne oraz autoimmunologiczne).

72 godziny



120 godzin



Ryc. 58. Wykresy obrazujące odsetek limfocytów T (osoby zdrowe; n = 5) ulegających apoptozie, w warunkach *in vitro*, w obecności różnych stężeń olejków eterycznych, wyizolowanych z liści rośliny grunтовой (O1) oraz mikropędów (O2) *S. apiana*, a także 1,8-cineolu (O3) (rozcieńczenia etanolem w stosunku: 1/400, 1/4000 i 1/40000).

Eksperymenty obejmują pomiar cytometryczny po 72 i 120 h od stymulacji badanych komórek krwi powyższymi substancjami. Apoptozę limfocytów T określano na podstawie ich zdolności do wiązania aneksyny V oraz 7-AAD. Na wykresie ramki przedstawiają 25-75% badanych limfocytów T, natomiast wąsy – wartości minimalne i maksymalne udziału procentowego powyższych komórek krwi w populacji.

3 CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1 Materiały i metodyka badań biotechnologicznych

3.1.1 Materiał roślinny wykorzystywany do badań biotechnologicznych

W badaniach biotechnologicznych, podjętych w ramach niniejszego projektu doktoranckiego, wykorzystano z materiału nasiennego *Salvia apiana* Jepson, zakupionego, w 2018 roku, w firmie Strictly Medicinal® (Oregon, USA). Tożsamość gatunku potwierdzono korzystając z biomasy inicjalnej *in vitro* otrzymanej po skiełkowaniu sterylnych nasion (rozdz. 3.1.8.1). Identyfikacja badanego taksonu obejmowała izolację roślinnego DNA (Genomic Mini AX Plant kit A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), amplifikację regionów ITS1 oraz ITS2 jądrowego rDNA (Sun i in., 1994), genu *matK* (Soltis i Soltis, 1998; Molvray i in., 2000) i DNA chloroplastowego *trnL – trnF* (Taberlet i in., 1991), a następnie oczyszczenie produktów PCR (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), ich zsekwencjonowanie (Macrogen, Amsterdam, Holandia) oraz badanie porównawcze sekwencji otrzymanych z biblioteką genów GenBank: PopSet nos. 952001774 dla ITS, 952001670 dla *trnL-trnF* oraz 952001670 dla *matK*. Określenie tożsamości gatunkowej zostało przeprowadzone we współpracy z Katedrą Genetyki Ewolucyjnej i Biosystematyki Uniwersytetu Gdańskiego.

3.1.2 Technika badań

Wykonywanie wszystkich czynności, wymagających warunków aseptycznych, związanych z prowadzeniem doświadczeń biotechnologicznych, odbywało się w łoży z cyrkulacyjnym nawiewem jałowego powietrza (JOUAN MSC12 – Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Przed rozpoczęciem pracy komorę laminarną naświetlano promieniowaniem UV typu C, w dwóch cyklach, po 15 min. Do wyjaławiania narzędzi metalowych oraz szklanych szalek Petriego, wyłożonych bibułą (Whatman No 3, Maidstone, Wielka Brytania) używano sterylizacji suchym, gorącym powietrzem (180°C; 2 h; komora cieplna KBC 100/250, PREMEDI, Marki, Polska). W trakcie pracy w łoży korzystano również z elektrycznej wyżarzarki, umożliwiającej bieżące wyjaławianie pęset i skalpeli za pomocą promieniowania podczerwonego (*Infrared heat sterilizer*, Inotech, Szwajcaria). Naczynia hodowlane, w tym bioreaktory, za wyjątkiem szalek Petriego z tworzywa sztucznego, sterylizowanych fabrycznie, podłoża wzrostowe oraz roztwory termostabilnych substancji wielkocząsteczkowych, wykorzystywane w czasie eksperymentów biotechnologicznych, wyjaławiano parą wodną pod ciśnieniem (20 min, 121°C, nadciśnienie 0,1 MPa; autoklaw – typ ASVE, Spółdzielnia Pracy Mechaników, Polska). Roztwory substancji termolabilnych sączono wyjaławiająco (średnica porów 0,22 µm, Chemland, Stargard Szczeciński, Polska).

W badaniach biotechnologicznych biomasy *in vitro* ważono za pomocą wagi precyzyjnej (dokładność odczytu 1,0 mg; model E2000D, Sartorius, Gottingen, Niemcy). Materiał roślinny, w zależności od dalszego przeznaczenia, liofilizowano (LYOVAC GT 2, Finn-Aqua Santasolo-Sohlberg, Tuusula, Finlandia) lub suszono za pomocą suszarki laboratoryjnej posiadającej wymuszony obieg powietrza (24 h, 30°C; typ 15-16463, Binder, Niemcy).

3.1.3 Odczynniki i podłoża doświadczalne

Media wzrostowe, stosowane w doświadczeniach biotechnologicznych, przygotowywano z wykorzystaniem soli mineralnych, sacharozy, witamin, regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin oraz innych substancji o jakości odpowiedniej do prowadzenia roślinnych kultur *in vitro* (*suitable for plant cell culture*, Sigma-Aldrich, St. Luis, USA). W toku prac eksperymentalnych korzystano z pożywek Schenka i Hildebrandt'a (SH; Schenk i Hildebrandt, 1972) oraz Murashige'a i Skoog'a (MS; Murashige i Skoog, 1962). Poszczególne eksperymenty prowadzono w oparciu o podstawowy skład wyżej wymienionych mediów (Tab. 13) oraz, dodatkowo, posługiwano się zmodyfikowanym podłożem MS, wzbogaconym o 73 mg L⁻¹ jednowodnego siarczanu adeniny (C₅H₅N₅·½H₂SO₄·1H₂O; ML). Wartość pH pożywek ustalano na poziomie 5,6 (pH-metr model 654, Metrohm, Szwajcaria) przed autoklawowaniem, a w przypadku podłoży stacjonarnych – również przed dodaniem agaru (0,7% *m/v* agaru; Sigma-Aldrich, St. Luis, USA).

Tab. 13. Podstawowy skład pożywki wzrostowej Murashige'a i Skooga (MS) oraz Schenka-Hildebrandta (SH), wykorzystanych w trakcie realizacji eksperymentów biotechnologicznych (Murashige i Skoog, 1962; Schenk i Hildebrandt, 1972).

Składniki	Stężenie w podłożach [mg L ⁻¹]	
	Murashige'a i Skooga (MS)	Schenka-Hildebrandta (SH)
Sole mineralne		
KNO₃	1900,0	2500,0
NH₄NO₃	1650,0	500,0
MgSO₄ x 7H₂O	-	400,0
NaH₂PO₄	-	300,0
CaCl₂ bezw.	329,4	-
CaCl₂ x 2H₂O	-	200,0
KH₂PO₄	170,0	-
MgSO₄	180,7	-
MnSO₄ x H₂O	16,9	73,65
ZnSO₄ x 7H₂O	10,59	1,0
H₃BO₄	6,2	5,0
KI	0,83	1,0
CoCl₂ x 6H₂O	0,025	0,1
CuSO₄ x 5H₂O	0,025	0,2
Na₂MoO₄ x 2H₂O	0,25	0,1
FeSO₄ x 7H₂O	27,85	15,0
Na₂EDTA	37,25	20,0
Witaminy		
Tiamina (wit. B₁)	0,1	5,0
Ryboflawina (wit. B₂)	-	0,5
Kwas nikotynowy (wit. B₃; PP)	0,5	5,0
Pirydoksyna (Witamina B₆)	0,1	-
Aminokwasy		
Glicyna	3,0	-
Węglowodany		
Inozytol	100,0	500,0
Sacharoza	30000,0	30000,0
Agar (podłoża stacjonarne)	7000,0	6000,0

Roztwory substancji termolabilnych, tj. karbenicylinę (sól dwusodowa; Carl Roth, Niemcy) i cefotaksym (cefotaksym sodowy; Duchefa Biochemie, Holandia), wprowadzano do uprzednio wyjałowionych przez autoklawowanie mediów wzrostowych, po ich wstępnym ostudzeniu do temp. 50-60°C. Podstawowe składniki pożywek ważono za pomocą wagi o dokładności odczytu 1,0 mg (model E2000D, Sartorius, Gottingen, Niemcy), natomiast regulatory wzrostu na sprzęcie o wyższym stopniu dokładności, tzn. 0,01 mg (model Quintix 125D, Sartorius, Gottingen, Niemcy). Rozpuszczalnikiem stosowanym w przygotowywanych mediach była woda ultraczysta, otrzymywana przy użyciu systemu Synergy UV (Millipore, Francja). Roztwory regulatorów wzrostu oraz witamin przechowywano w chłodziarko-zamrażarce (typ DP 28 SA, ARDO, Włochy), w temp. $5\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Do przygotowywania pożywek używano pipet automatycznych o zmiennej objętości 0,1-10,0 mL (Eppendorf Research, EPA plus, Niemcy) wraz z dopasowanymi polipropylenowymi, jednorazowymi tipsami; wykorzystywano również narzędzia szklane, m.in. bagietki, zlewki o różnej objętości i cylindry miarowe. Płynne media wzrostowe, po uprzednim autoklawowaniu, przechowywano w butelkach szklanych o obj. 500 mL (Simax, Czechy), a podłoża zestalone agarem w szklanych słoiczkach typu *baby food jar* z nakrętkami polipropylenowymi (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA).

3.1.4 Warunki prowadzenia kultywacji

Kultywację biomas *in vitro* szalwii białej w fitotronie prowadzono w identycznych warunkach temperaturowych ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$) oraz oświetleniowych (fotoperiod 17/24 h, natężenie światła jarzeniowego $88\pm 8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; lampy fluorescencyjne Philips-Flora-TLD 35W/33, Philips, Francja), nazywanych dalej „warunkami standardowymi”.

Kultury stacjonarne namnażano w szklanych słoiczkach typu *baby food jar*, w których przechowywano uprzednio przygotowane pożywki (ok. 30 mL). Biomasy rosnące w podłożach płynnych namnażano w kolbach Erlenmeyera o poj. 50-250 mL (ChemLand Boro 3.3, Polska), zamykanych korkami z pianki silikonowej (Carl-Roth, Karlsruhe, Niemcy), zawierających odpowiednio po ok. 45,0 i 90,0 mL roztworów wzrostowych. Kultury płynne inkubowano na wytrząsarce orbitalnej (120 obr./min; INNOVA 2300, Brunswick Scientific, Enfield, USA; $\varnothing 25,4 \text{ mm}$).

Kiełkowanie materiału nasiennego *S. apiana* oraz kultury korzeni niniejszego gatunku prowadzono w warunkach standardowych z tą różnicą, że naczynia hodowlane wraz z materiałem biologicznym utrzymywano przy całkowitym zaciemnieniu.

3.1.5 Ocena przyrostu otrzymanych biomas *in vitro* *S. apiana*

Namnożone biomasy oddzielano mechanicznie od podłoża (kultury zestalone agarom) lub odsączało je od medium doświadczalnego na szklanych lejkach (kultury płynne) wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA), a następnie ważono na wadze z dokładnością do 1,0 mg. Ilość otrzymanej świeżej masy przeliczano na 1 L pożywki eksperymentalnej, a następnie, dla kultury, wyznaczano współczynnik przyrostu, zgodnie z następującym równaniem:

$$Gi = \frac{FW_x - FW_0}{FW_0} \times 100 [\%]$$

gdzie: G_i – współczynnik przyrostu [%]; FW_x – świeża masa próbki roślinnej, otrzymana w X dniu doświadczenia; FW_0 – masa *inoculum* [g]

Zawartość suchej masy tkankowej (DW) wyznaczano po wysuszeniu kultur (rozdz. 3.2.2), w przeliczeniu na 1 L pożywki.

3.1.6 Ocena makroskopowa otrzymanych biomas *in vitro* *S. apiana*

Otrzymane, na różnych etapach doświadczeń biotechnologicznych, biomasy szalwii białej oceniano makroskopowo, kontrolując: barwę, konsystencję i zdolność do dyferencjacji. W przypadku kultur pędów monitorowano ilość powstających primordiów, liści potwornych, a także długość i zagęszczenie mikropędów. Korzenie oceniano natomiast pod kątem ilości i długości powstających nowych organów oraz tendencji do nekrozy ich części peryferyjnych i macierzy.

3.1.7 Ocena mikroskopowa otrzymanych biomas *in vitro* *S. apiana*

Do zbadania cech anatomicznych namnożonego materiału roślinnego (biomasy o różnym stopniu morfogenezy, tj. kalus, mikropędy oraz korzenie, a także liście rośliny gruntowej *S. apiana*) wykorzystano mikroskop optyczny (powiększenie 10- i 40-krotne, PZO, Nr 32673, Polska). Preparaty mikroskopowe przygotowywano z wysuszonego, sproszkowanego surowca lub niewielkich, rozdrobnionych fragmentów, wyciętych żyłką, a następnie prześwietlenie ich wodzianem chloralu ($CCl_3CH(OH)_2$; Sigma-Aldrich, St. Luis, USA).

3.1.8 Wyprowadzenie kultur *in vitro* *S. apiana*

3.1.8.1 Sterylizacja i kiełkowanie nasion

Oczyszczony mechanicznie materiał nasienny (ok. 90 nasion) poddano dwutygodniowej stratyfikacji, w ciemności, w temp. $5 \pm 2^\circ C$. Pierwszy etap sterylizacji obejmował wstępne oczyszczenie nasion poprzez ich wytrząsanie, przez 10 min., w wodzie ultraczystej z dodatkiem kropli środka powierzchniowo-czynnego („Ludwik”, INCO, Polska). Następnie opłukano je z resztek detergentu i przeniesiono do łoża laminarnej. Umyty materiał inokularny rozdzielono do sześciu jałowych probówek typu Eppendorf o poj. 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Niemcy) i odtłuszczono za pomocą 70°

alkoholu etylowego ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$; 3 min.). Po usunięciu etanolu, nasiona zalano 5,25%, wodnym roztworem NaOCl (CHLORAXid 5,25%, PPH CERKAMED, Polska) i podzielono na trzy grupy po dwie próbówki, różniące się czasem ekspozycji materiału roślinnego na środek wyjaławiający (odpowiednio: 5, 8 i 10 min.). Po właściwej sterylizacji nasiona płukano 4-krotnie jałową wodą ultraczystą (1 x 5 min. oraz 3 x 15 min.) i przeniesiono na płytki Petriego z tworzywa sztucznego, wyłożone bibułą filtracyjną typu 3h (Filtrack, Niemcy) nasączoną niewielką ilością sterylnej wody wodociągowej. Po uszczelnieniu folią Parafilm M (Pechiney Plastic, USA) szalki umieszczono w fitotronie ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) celem inkubacji materiału roślinnego, bez dostępu światła.

W kolejnych dniach obserwowano zdolność i dynamikę kiełkowania nasion. Dodatkowo, wizualnie kontrolowano sterylność uzyskanych siewek oraz pozostałych eksplantatów pierwotnych.

3.1.8.2 Wyprowadzenie kultur *in vitro* *S. apiana* o różnym stopniu cytodyferencjacji

Pojedynczą siewkę, powstałą po 8 dniach od sterylizacji, przeniesiono na podłoże MS (rozd. 3.1.3), pozbawione dodatku regulatorów wzrostu (MS_0), na okres 7 dni. Następnie, otrzymany eksplantat inicjalny podzielono na 3 części z przeznaczeniem do wyprowadzenia poszczególnych typów kultur. Wyodrębniony system korzeniowy przeniesiono do pożywki płynnej SH (rozd. 3.1.3), suplementowanej $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ kwasu indolilo-3-masłowego (IBA, $\text{SH}_{\text{IBA}1,0}$), fragmenty hipokotylowe – na zestalone agar medium MS (rozd. 3.1.3) z dodatkiem $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ kinetyny oraz $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D; MS_{stand}), a liścienie – na stacjonarne podłoże SH, zawierające $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ N^6 -(2-izopentenylo)-adeniny (2iP) oraz $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ tidiazuronu (TDZ; SH_p).

Fragmenty korzonka, kultywowano, przez okres ok. 90 dni (3 pasaże), w wyżej opisanej pożywce płynnej, na wytrząsarce orbitalnej, w warunkach standardowych (rozd. 3.1.4) oraz przy całkowitym zaciemnieniu. W tym czasie obserwowano dynamikę przyrostu biomasy i jej cechy makroskopowe (rozd. 3.1.6).

Fragmenty hipokotylowe pasażowano przez okres ok. 40 dni (2 pasaże), na podłożu stacjonarnym MS_{stand} . Po tym czasie otrzymaną biomasę podzielono na 2 porcje i równolegle kultywowano na wcześniej stosowanym medium wzrostowym oraz, dodatkowo, na pożywce SH, suplementowanej $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D i $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ kwasu indolilo-3-octowego (IAA; SH_{stand}). Powstałe tkanki przyranne oceniano makroskopowo, dostosowując terminy kolejnych pasażów do, wizualnie obserwowanego, okresu przejścia kultury w początkową fazę zamierania.

Część szczytową siewki kultywowano na podłożu stacjonarnym SH_p , w warunkach standardowych, przez okres ok. 80 dni (3 pasaże). Powstałe biomasy przenoszono na nowe, tożsame medium wzrostowe, przy nasilających się zmianach nekrotycznych tkanek, świadczących o przechodzeniu kultury w etap zamierania. Dalsze namnażanie inicjalnych primordiów pędowych prowadzono równolegle na trzech pożywkach: MS (rozd. 3.1.3), suplementowanej $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP, 1 mg L^{-1} 6-benzyloaminopuryną (BAP), $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ kwasem naftylo-1-octowym (NAA) oraz $73,0 \text{ mg L}^{-1}$ jednowodnego siarczanu adeniny (medium ML); SH, wzbogaconej $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ i 2 mg L^{-1} 2iP

(podłoże SH_P) oraz SH, z dodatkiem 0,22 mg L⁻¹ TDZ i 2,0 mg L⁻¹ BAP (medium SH_B). W toku wzrostu obserwowano dynamikę przyrostu mikropędów i cechy makroskopowe otrzymanych biomas.

Siewki, pochodzące z nasion skielkowanych w 10., 13. i 37. dniu doświadczenia, przeniesiono na podłoże MS₀ i pozostawiono, na powyższej pożywce, na okres 7-10 dni. Wizualnie kontrolowano dynamikę ich wzrostu. Po tym czasie, zaniechano dalszych prac na wspomnianych eksplantatach pierwotnych z uwagi na ich zamieranie.

3.1.8.2.1 Otrzymanie kolekcyjnej kultury korzeni odciętych

Kultywację korzeni odciętych kontynuowano w podłożu płynnym (SH_{IBA1,0}), na wytrząsarce orbitalnej, w warunkach standardowych oraz przy całkowitym zaciemnieniu. Okres wzrostu tkanek pozostawał stały i wynosił ok. 3 tygodnie. W trakcie pasaży fragmenty korzeni, które się intensywnie rozgałęziały, dzielono na drobne, ok. 1 cm wycinki i umieszczano w świeżej pożywce płynnej SH_{IBA1,0}, o składzie podanym powyżej (50-90 mL). Kontrolowano również ich żywotność, liczbę nowych rozgałęzień oraz zmieniającą się barwę mediów wzrostowych. Przeprowadzono również badania mikroskopowe otrzymanych biomas (rozdz. 3.1.7). Ilość naczyń hodowlanych, zainokulowanych otrzymanymi w ten sposób kulturami w trakcie dalszych pasaży, dostosowywano do zakresu prowadzonych prac badawczych, umożliwiając jednoczesne zachowanie biomas kolekcyjnych w systemie ciągłym oraz wykonanie eksperymentów fitochemicznych (rozdz. 3.1.8.4) oraz biotechnologicznych (rozdz. 3.1.9.1).

3.1.8.2.2 Otrzymanie kolekcyjnych kultur kalusowych

Dalsze pasaże dwóch kultur kalusa, na stacjonarnych podłożach MS_{stand} oraz SH_{stand}, prowadzono w odstępach 21-dniowych, obserwując ich wzrost w słoiczkach typu *baby food jars*, umieszczonych, w fitotronie, na półkach hodowlanych, w warunkach standardowych (rozdz. 3.1.4). W trakcie 3-tygodniowego okresu wzrostu, poddawano ocenie tempo przyrastania kalusów, ich barwę, konsystencję oraz ewentualne tendencje do cytodyferencjacji lub zamierania. Przeprowadzono również badania mikroskopowe otrzymanych biomas (rozdz. 3.1.7). Liczba naczyń hodowlanych w pojedynczym pasażu pozostawała w ścisłym związku z zakresem równolegle prowadzonych badań biotechnologicznych i fitochemicznych (rozdz. 3.1.8.4), przy jednoczesnym uwzględnieniu konieczności zachowania kultury kolekcyjnej.

3.1.8.2.3 Wyprowadzenie kultur zawieszinowych

Kalus pasażowany na podłożach MS_{stand} poddano adaptacji do wzrostu w kulturze płynnej prowadzonej w kolbach Erlenmeyera (poj. 50 mL). W tym celu biomasę inokularną (ok. 0,5 g), pochodzącą z ostatniego, 21. dnia pasaży, przeniesiono do pożywki płynnej MS_{stand} (10-40 mL). Kalus rozpraszano mechanicznie, stosując w tym celu pęsety oraz szklane pistle. Dalsze namnażanie powstałej zawiesiny prowadzono przez ok. miesiąc, w tygodniowych odstępach czasu. W czasie pasaży, do zawiesiny komórkowej wprowadzano dodatkową porcję świeżej pożywki, w ilości równej pierwotnej

objętości hodowli. Kolby uszczelniano korkami ze spienionego silikonu i inkubowano na wytrząsarce orbitalnej. Ocenie poddawano: tempo przyrastania zawiesiny, skłonność do tworzenia agregatów wielokomórkowych, konsystencję biomasy oraz ewentualne tendencje do cytodyferencjacji lub zamierania.

3.1.8.2.4 Otrzymanie kolekcyjnej kultury mikropędów

Wyboru pożywki, optymalnej do otrzymania stabilnej, kolekcyjnej kultury mikropędów *S. apiana* dokonano oceniając: dynamikę namnażania biomas, na określonych mediach hodowlanych (rozdz. 3.1.8.2), tendencję powstających primordiów pędowych do rozkrzewiania się oraz zbieżność cech morfologicznych opisywanej kultury *in vitro* z częściami nadziemnymi rośliny gruntowej. Określano także tendencję biomas do tworzenia liści potwornych, stopień witryfikacji pędów oraz zmiany zabarwienia pożywek wzrostowych.

Dalszą kultywację mikropędów, w 21-dniowych cyklach eksperymentalnych, ograniczono do jednego, optymalnego medium wzrostowego – podłoża stacjonarnego SH_B (rozdz. 3.1.8.2). Do przenoszenia na świeżą pożywkę, jako *inoculum*, każdorazowo wykorzystywano po 5 kępek mikropędów szałwii białej (ok. 2,0 g), rosnących aktywnie na powyższym medium. Kultywację biomas prowadzono w fitotronie, w warunkach standardowych (rozdz. 3.1.4). Ilość naczyń hodowlanych, w trakcie każdego pasażu, dostosowywano do zakresu zaplanowanych prac badawczych, umożliwiając równoległą kultywację mikropędów, stanowiących biomasę kolekcyjną, przy jednoczesnym wykonaniu zaawansowanych eksperymentów biotechnologicznych (rozdz. 3.1.9.3) oraz fitochemicznych (rozdz. 3.1.8.4). Przeprowadzono również analizy mikroskopowe otrzymanych tkanek.

3.1.8.3 Wyprowadzenie kultur korzeni transformowanych

Hodowle korzeni transformowanych *S. apiana* wyprowadzono z eksplantatów mikropędowych, otrzymanych, na pożywce SH_B, w toku wcześniejszych prac eksperymentalnych (rozdz. 3.1.8.2.4), na drodze wektorowej transformacji genetycznej, z wykorzystaniem bakterii glebowych *Agrobacterium rhizogenes*. Opisywane prace prowadzono we współpracy z prof. dr hab. inż. Aleksandrą Królicką z Katedry Biotechnologii, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Próba wyprowadzenia kultur korzeni transformowanych została podjęta z wykorzystaniem agropinowych szczepów *A. rhizogenes*: A4, 15834 oraz LBA 9402 (kultury stacjonarne). Indukcję korzeni włósnikowatych przeprowadzono metodą nanoszenia powierzchniowego bakterii na tkanki roślinne, w warunkach jałowych, pod lożą laminarną. Szczepy drobnoustrojów przenoszono za pomocą sterylnej igły iniekcyjnej (1,2 x 40 mm, BECTON DICKINSON, Polska) na skaryfikowane fragmenty blaszek liściowych oraz zgrubiałe części łodyg. Do transformacji wybierano jedynie zdrowe, żywozielone tkanki. Tak przygotowany materiał roślinny umieszczono na pożywce stacjonarnej SH (rozdz. 3.1.3) bez dodatku regulatorów wzrostu (SH₀). Dwudniową kokultywację biomas *S. apiana* z bakteriami transformującymi *A. rhizogenes* prowadzono w temp. 24±1°C, w ciemności. W kolejnym

etapie, eksplantaty inkubowano (4 pasaże, trwające po ok. 7 dni) w szklanych naczyniach, na pożywce SH₀ wzbogaconej antybiotykami – cefotaksymem 500 mg L⁻¹ (cefotaksym sodowy; Duchefa Biochemie, Holandia) i karbenicyliną 500 mg L⁻¹ (sól dwusodowa; Carl Roth, Niemcy). W trakcie inkubacji obserwowano pojawiające się, na blaszkach liściowych oraz fragmentach łodyg, primordia korzeniowe; oceniano ich barwę, długość oraz tendencję do nekrozy.

Po ok. 4 tygodniach od zainfekowania materiału roślinnego, z biomas inicjalnych wyizolowano pięć pojedynczych korzeni o długości ok. 1 cm: trzy otrzymane ze szczepu bakterii A4 (TA1-TA3) oraz dwa ze szczepu LBA 9402 (TL1-TL2). Oddzielone fragmenty korzeniowe przeniesiono do płynnego podłoża SH₀, suplementowanego antybiotykami i inkubowano je na wytrząsarce orbitalnej (rozd. 3.1.4), przy całkowitym zaciemnieniu. Kolejnych sześć pasaży prowadzono przez okres ok. 90 dni w powyższym medium, oceniając zdolności regeneracyjne powstałej biomasy *in vitro* oraz monitorując pożywkę pod kątem ewentualnego mętnienia (obecność bakterii).

3.1.8.3.1 Otrzymanie kolekcyjnych kultur korzeni transformowanych

Dalsze pasaże jałowych korzeni transformowanych prowadzono w pożywkach płynnych SH₀ bez dodatku antybiotyków, na wytrząsarce orbitalnej, w ciemności (rozd. 3.1.4). Czas kultury biomasy pozostawał stały i wynosił ok. 3,5 tygodnia. W trakcie przenoszenia korzeni do nowych mediów wzrostowych dzielono je, za pomocą pęset, na mniejsze fragmenty (średnica kępek korzeniowych ok. 1 cm) i umieszczano w płynnej pożywce SH₀ o obj. 50-90 mL. Kontrolowano żywotność kultur, liczbę nowych rozgałęzień korzeniowych oraz barwę i stopień zmętnienia pożywek wzrostowych. Liczbę naczyń hodowlanych, w trakcie każdego pasażu, dostosowywano do zakresu prowadzonych prac badawczych, umożliwiając równoległą kultywację biomas kolekcyjnych, w systemie ciągłym, oraz wykonywanie eksperymentów fitochemicznych (rozd. 3.1.8.4) i biotechnologicznych (rozd. 3.1.9.2).

3.1.8.3.2 Potwierdzenie transgenicznego charakteru korzeni

Transgeniczny charakter uzyskanych biomas potwierdzono wykorzystując metodę PCR. Do badań przeznaczono materiał roślinny pochodzący z kultur ciągłych korzeni transformowanych (rozd. 3.1.8.3.1), pozyskany w ostatnim dniu cyklu wzrostowego (klony TA1 i TL1). Negatywną próbę kontrolną stanowiły korzenie odcięte *S. apiana*, kultywowane w pożywce SH_{IBA1,0}. Jako pozytywną kontrolę użyto materiał genetyczny pobrany z zastosowanych przy transformacji bakterii *A. rhizogenes* A4 i LBA 9402. W pracach wykorzystano primery komplementarne do genów *rolB* i *rolC*. Przy potwierdzeniu skutecznego usunięcia bakterii transformujących *A. rhizogenes* z badanych kultur korzeni włośnikowatych zastosowano primer *virG*. W eksperymencie korzystano z termocyklera UNO II (Biometra GmbH, Göttingen, Niemcy). Mieszaninę reakcyjną do amplifikacji *rolB*, *rolC* i *virG*, wykorzystaną w analizach PCR, przedstawiono poniżej:

- | | |
|--|-------------------|
| - Polimeraza DNA Taq (Fermentas, Burlington, Kanada) | 0,2 µL (1 U) |
| - Startery B1 i B2 lub C1 i C2 lub G1 i G2 | po 5,0 µL (20 pM) |

- Matryca DNA	20,0 ng
- Mieszanina dNTP (Fermentas, Burlington, Kanada)	0,2 μ L
- MgCl ₂ (25 mM, Fermentas, Burlington, Kanada)	2,0 μ L
- Bufor do polimerazy z NH ₄ SO ₄ (Fermentas, Burlington, Kanada)	2,5 μ L
- Woda (MQ)	do 25,0 μ L

Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji amplifikacji zestawiono poniżej:

rolC (ProOligo, Lismore, Australia) starter C1 – 5' CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC 3'

rolC (ProOligo, Lismore, Australia) starter C2 – 5' TGC TTC AGA TTA TGG GTA CA 3'

rolB (ProOligo, Lismore, Australia) starter B1 – 5' GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT 3'

rolB (ProOligo, Lismore, Australia) starter B2 – 5' GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC 3'

virG (ProOligo, Lismore, Australia) starter G1 – 5' ACT GAA TAT CAG GCA ACG CC 3'

virG (ProOligo, Lismore, Australia) starter G2 – 5' GCG TCA AAG AAA TAG CCA GC 3'

Amplifikacja PCR obejmowała wstępną denaturację białka w materiale roślinnym, po której następowała, przebiegająca w temp. 65°C, właściwa denaturacja matrycowego DNA w obecności nadmiaru primerów. Po jej zakończeniu następowała elongacja powielanego materiału genetycznego, której towarzyszył wzrost temperatury mieszaniny reakcyjnej do 72°C. Utrzymując tę temperaturę przeprowadzono etap końcowej elongacji, po której mieszaninę chłodzono w 0,5°C. Każdy cykl, składający się z denaturacji, przyłączania i syntezy, powtarzano wielokrotnie (do 35 razy).

Roślinne DNA rozdzielano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym (1%; Sigma-Aldrich, USA), w 0,5 % buforze TRIS-boranowym (TBE; aparat Mupid-exU Advance, Tokio, Japonia), wybarwiając DNA bromkiem etydyny. Następnie żel wypłukano w wodzie redestylowanej i poddano analizie na transiluminatorze ($\lambda=320$ nm; PITI-UV-320; Pacific Image Electronics, Tajpej, Taiwan).

3.1.8.4 Wzrost oraz profil metaboliczny kultur kolekcyjnych (mikropędy oraz korzenie odcięte i transformowane)

Materiał roślinny, pochodzący z wszystkich kultur kolekcyjnych szalwii białej (rozdz. 3.1.8.2-3.1.8.3), oceniono pod względem parametrów wzrostowych (FW, Gi, DW) oraz poddano go analizom w zakresie produkcji, przez powyższe biomasy, związków polifenolowych i terpenowych. Eksperymenty fitochemiczne prowadzono dwutorowo: określano zdolność poszczególnych matryc roślinnych do akumulacji olejku eterycznego (rozdz. 3.2.3.1) oraz nietlotnych terpenów i polifenoli (rozdz. 3.2.3.2).

Badane biomasy, przeznaczone do analiz w zakresie frakcji lotnych, oddzielano mechanicznie od podłoża (kultury zestalone agarem) lub odsączano je od mediów doświadczalnych (kultury płynne) na szklanych lejkach wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA). W dalszej kolejności tkanki ważono, celem obliczenia FW i Gi (rozdz. 3.1.5). Po wysuszeniu (24h, 30°C) w suszarce laboratoryjnej, posiadającej wymuszony obieg powietrza (typ 15-16463, Binder, Niemcy), oznaczano wartości DW

otrzymanych biomas (rozdz. 3.1.5) i przeznaczono je do prac chromatograficznych (GC/FID i MS – rozdz. 3.2.3.1).

Wymienione kultury skierowano również do analiz w zakresie nielotnych związków terpenowych oraz polifenolowych. W tym celu materiał roślinny oddzielano mechanicznie od pożywek (kultury stacjonarne) lub odsączano od podłoży wzrostowych (hodowle płynne) na szklanych lejkach wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA). Tak przygotowane biomasy ważono i określano ich parametry wzrostowe (FW, Gi; rozdz. 3.1.5), a następnie liofilizowano (48h, -80°C – LYOVAC GT 2, Finn-Aqua Santasolo-Sohlberg, Tuusula, Finlandia). Wysuszony materiał roślinny ważono, celem wyznaczenia DW (rozdz. 3.1.5), a następnie przeznaczono do analiz fitochemicznych (HPLC-DAD-ESI/MS) w zakresie nielotnych terpenów i polifenoli (rozdz. 3.2.3.2).

3.1.9 Morfogeniczne kultury ciągłe *S. apiana*: wzrost oraz profil metaboliczny

3.1.9.1 Kultury ciągłe korzeni odciętych *S. apiana*

3.1.9.1.1 Materiał roślinny przeznaczony do badań

Materiał do badań biotechnologicznych, prowadzonych zarówno w skali laboratoryjnej (obj. robocza 25 mL) jak i bioreaktorowej (obj. robocza 600 mL), stanowiła kultura kolekcyjna korzeni odciętych *S. apiana* (medium SH_{IBA1,0}), otrzymana w toku wcześniejszych prac eksperymentalnych (rozdz. 3.1.8.2.1). Bezpośrednim *inoculum* były kęпки korzeni anatomicznych o średnicy nieprzekraczającej 1 cm, pobrane ostatniego, 21. dnia cyklu wzrostowego, a stosunek ich masy do objętości pożywki pozostawał stały, bez względu na zastosowaną skalę kultury i wynosił 1:40 (*m/v*).

3.1.9.1.2 Wpływ zawartości IBA w pożywce na wzrost biomasy korzeni odciętych w hodowlach wytrząsanych

Hodowlę kolekcyjną korzeni odciętych szałwii białej przeznaczono, w warunkach kultur wytrząsanych, do badań mających na celu określenie wpływu stężenia auksyny IBA w medium eksperymentalnym na metabolizm pierwotny badanej tkanki. W związku z powyższym, materiał korzeniowy, pochodzący z powyższej kultury, zebrany w ostatnim, 21. dniu pasażu, przeniesiono do kolb Erlenmeyera o poj. 100 ml (ok. 0,45 g tkanek/kolbkę; 55 naczyń) i kultywowano w płynnym medium wzrostowym SH (25 mL/kolbkę), z dodatkiem IBA, w zakresie stężeń 0,0-5,0 mg L⁻¹, z różnicą, pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczalnymi, wynoszącą 0,5 mg auksyny L⁻¹ (11 modyfikacji).

Zainokulowane korzenie szałwii białej namnażano, na wytrząsarce rotacyjnej (rozdz. 3.1.4), przy całkowitym zaciemnieniu, aż do zakończenia cyklu hodowlanego, tj. przez 48 dni. Otrzymany, w wyniku powyższego eksperymentu, materiał roślinny oceniono makroskopowo pod względem morfologicznym (rozdz. 3.1.6), a następnie odsączano od podłoży wzrostowych na szklanych lejkach

wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA). W dalszej kolejności biomasy ważono celem określenia ich parametrów wzrostowych (FW, Gi; rozdz. 3.1.5), a następnie je zliofilizowano (rozdz. 3.2.2), aby wyznaczyć odpowiednie wartości DW (rozdz. 3.1.5). Każdy wariant eksperymentalny powtórzono pięciokrotnie, a wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SD.

3.1.9.1.3 Krzywa wzrostowa korzeni odciętych namnażanych w hodowlach wytrząsanych

Dla kultury kolekcyjnej korzeni odciętych *S. apiana*, rosnącej w pożywce SH_{IBA1,0}, wyznaczono profile wzrostowe. *Inoculum* eksperymentalne pozyskano w ostatnim, 21. dniu pasażu powyższej biomasy. Materiał roślinny przeniesiono do kolb Erlenmeyera o poj. 100 mL (ok. 0,45 g tkanek/kolbkę; ogółem 71 naczyń wzrostowych/ kulturę) i namnażano w płynnym medium wzrostowym SH (25 ml/kolbkę), wzbogaconym w IBA, w stężeniu 1,0 lub 1,5 mg L⁻¹ (odpowiednio, SH_{IBA1,0} i SH_{IBA1,5}). Hodowlę prowadzono w ciemności, na wytrząsarce rotacyjnej (rozdz. 3.1.4). Dodatkowo, dla korzeni odciętych inkubowanych w medium wzrostowym SH_{IBA1,0}, wyznaczono cykl wzrostowy kultury rosnącej przy oświetleniu cyklicznym (warunki standardowe, wytrząsarka rotacyjna – rozdz. 3.1.4).

W tym czasie, co trzeci dzień dokonywano zbioru biomas, pochodzących z 3 losowo wybranych naczyń hodowlanych, rozpoczynając w dniu 0. aż do 69. dnia doświadczenia dla wariantu eksperymentalnego prowadzonego w ciemności oraz w dniu 0. aż do 45. dnia w warunkach oświetlenia standardowego. Biomasy korzeniowe odsączano od podłoża wzrostowych na szklanych lejkach wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA). Tak przygotowane matryce roślinne zważono i określono ich parametry wzrostowe (FW, Gi; rozdz. 3.1.5), a następnie poddano je liofilizacji (rozdz. 3.2.2), celem wyznaczenia wartości DW (rozdz. 3.1.5). Profile wzrostowe omawianych kultur wykreślono na podstawie zmian ilości suchej (DW) masy oraz wartości współczynnika przyrostu (Gi) w czasie trwania eksperymentu. Wyniki DW i Gi stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.

Suche próbki korzeni anatomicznych *S. apiana*, zebrane w 48. dniu doświadczenia (medium SH_{IBA1,0}) oraz 33. dniu (pożywka SH_{IBA1,5}), przeznaczono do badań fitochemicznych w zakresie obecności, w poszczególnych biomasach, nietlotnych terpenów i polifenoli (rozdz. 3.2.3.2.2).

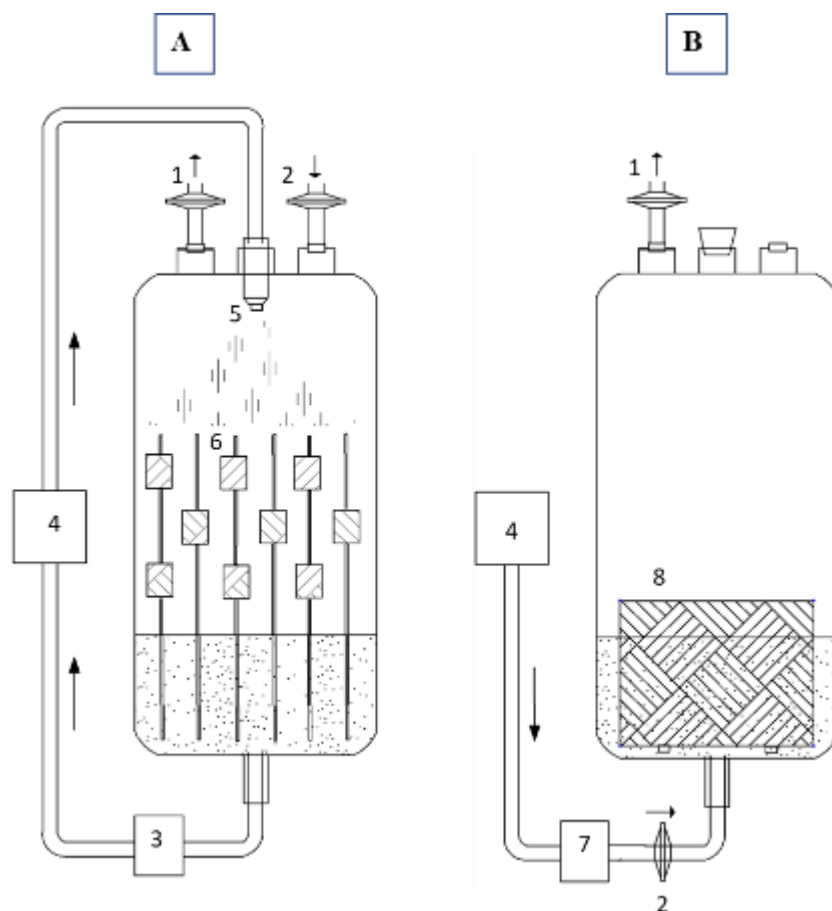
3.1.9.1.4 Kultury bioreaktorowe

Zgodnie z planem badawczym, korzenie odcięte badanego gatunku kultywowano w dwóch instalacjach wielkolaboratoryjnych: prototypowym bioreaktorze natryskowym oraz kolumnowo-zalewowym z dyszą bełkotkową. Oba systemy pracowały z objętością roboczą równą 600 mL.

3.1.9.1.4.1 Konstrukcja bioreaktorów

Zarówno w bioreaktorze natryskowym jak i kolumnowo-zalewowym (Ryc. 59) wykorzystywano ten sam zbiornik hodowlany (wymiary: wys. 220 mm, śr. zewn. 130 mm, poj. 2 L, KGW ISO-Therm, Karlsruhe, Niemcy), wyposażony, dodatkowo, w szklaną pokrywę z trzema portami ze szlifem (wys. 125 mm, ϕ_{zew} 130 mm, szlif 29-32; KGW ISO-Therm, Karlsruhe, Niemcy). Na styku

obu części umieszczono uszczelkę silikonową (\varnothing 120 mm, gr. 3 mm, DN-120; Schott, Mainz, Niemcy), a całość zabezpieczono stalową, nierdzewną klamrą (KGW ISO-Therm, Karlsruhe, Niemcy).



Ryc. 59. Schemat zastosowanych w doświadczeniach instalacji wielkoskalowych, do kultury korzeni odciętych i transformowanych: (A) bioreaktor natryskowy; (B) bioreaktor kolumnowo-zalewowy;

1 – filtr wyjąłwiający PTFE, wylot powietrza; 2 – filtr wyjąłwiający PTFE, wlot powietrza; 3 – filtr propylenowy; 4 – pompa; 5 – dysza zraszająca; 6 – koszyczki z siatki wykonanej ze stali nierdzewnej, odpowiadające za zawieszenie korzeni; 7 – płuczka wodna; 8 – kosz immobilizujący.

W przypadku systemu kolumnowo-zalewowego, wewnątrz zbiornika hodowlanego, zamknięto kosz wykonany z siatki ze stali nierdzewnej (wys. 80 mm, \varnothing 100 mm, \varnothing oczek siatki 8 mm; Schott, Mainz, Niemcy). W dolnej części szklanego naczynia, poniżej kosza immobilizującego, wprowadzono dyszę barbotażu. Strumień powietrza, doprowadzany przez bełkotkę, generowano w sposób ciągły za pomocą pompki membranowej (przepływ $0,3 \text{ L min}^{-1}$, model IPX ACO-9602, Hailea, Chiny). Przechodził on przez płuczkę (wys. 150 mm, \varnothing 80 mm, poj. 500 mL – Schott, Mainz, Niemcy) wypełnioną wodą ultraczystą. Jałowość doprowadzanego strumienia powietrza zapewniały filtry wyjąłwiający PTFE (\varnothing 50 mm, wielkość porów $0,2 \mu\text{m}$, Millipore Corporation, USA).

Wewnątrz bioreaktora natryskowego umieszczono metalowy stelaż ze stali nierdzewnej, zaprojektowany i wykonany w ramach prezentowanego projektu doktoranckiego. Składał się on

z sześciu pionowych osi, osadzonych na perforowanej podstawie. Na każdej z osi umieszczono jeden lub dwa koszycki immobilizujące (wymiary: 20 x 20 x 20 mm). System natryskowy umożliwił okresowe doprowadzenie pożywki do biomasy, obejmujące 5. minutowy kontakt medium wzrostowego z materiałem roślinnym w cyklu 90. minutowym. Dysza natryskowa, umieszczona w centralnej części szklanej pokrywy, rozpylała medium hodowlane z wydajnością 100 mL min⁻¹ (pompka Masterflex peristaltic, typ 7551-00, Cole Palmer, USA). W analogicznym reżimie czasowym, z przesunięciem ok. 30 min., doprowadzano do kultury strumień jałowego powietrza (filtry wyjąławiające PTFE, φ 50 mm, wielkość porów 0,2 μm, Millipore Corporation, USA).

Do połączenia poszczególnych elementów bioreaktorów, wykorzystano węże silikonowe, dopuszczone do zastosowania w roślinnych kulturach *in vitro* (φ_{wew} 6 mm; gr. ścianki 1,5 mm; VWR International, Radnor, USA).

3.1.9.1.4.2 Protokół namnażania korzeni odciętych w bioreaktorach

Inoculum korzeni anatomicznych pozyskano z kultury kolekcyjnej badanej biomasy, namnażanej w pożywce SH_{IBA1,0} (rozd. 3.1.8.2.1), zebranej w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego. W obu typach bioreaktorów, do koszy immobilizujących, wprowadzano fragmenty korzeniowe o sumarycznej masie ok. 15,0 g/bioreaktor i średnicy kępek matryc roślinnych nieprzekraczającej 1 cm, a następnie całość zalewano pożywką SH zróżnicowaną pod kątem zawartości auksyny – IBA (2 warianty doświadczalne – 1,0 (SH_{IBA1,0}) oraz 1,5 mg L⁻¹ (SH_{IBA1,5}). Kultuwację prowadzono przez 48 dni (instalacja natryskowa) lub 40 dni (urządzenie kolumnowo-zalewowe), w ciemności, w temp 24 ± 1°C.

Po zakończeniu cyklu hodowlanego, biomasy korzeniowe oceniano makroskopowo pod względem morfologicznym (rozd. 3.1.6), a następnie odsączano je od podłoża wzrostowych na szklanych lejkach wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA). Materiał roślinny zważono i określano jego parametry wzrostowe (FW, Gi; rozdz. 3.1.5), a następnie poddawano go liofilizacji (rozd. 3.2.2), celem wyznaczenia wartości DW (rozd. 3.1.5). Wyniki DW i Gi stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

Wysuszone próbki roślinne przeznaczono do badań fitochemicznych z uwagi na obecność nielotnych terpenów i polifenoli (rozd. 3.2.4.2).

3.1.9.2 Kultury ciągłe korzeni transformowanych *S. apiana*

3.1.9.2.1 Materiał roślinny do badań

Materiał do badań biotechnologicznych, prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, w skali laboratoryjnej (objętość robocza 25 mL), stanowiły kultury kolekcyjne korzeni transformowanych *S. apiana*, otrzymane w wyniku infekcji materiału roślinnego (biomasy mikropędowe) wybranymi szczepami *Agrobacterium rhizogenes*: A4 i LBA9402 – TA1-3 i TL1-2, co opisano szczegółowo w rozdz. 3.1.8.3. Eksperymenty *in vitro*, realizowane przy zastosowaniu instalacji bioreaktorowych

(objętość robocza 600 mL), obejmowały wybrany klon TA1. Każdorazowo, *inoculum* stanowiły kępkę korzeni o średnicy nieprzekraczającej 1 cm, przy jego stałym stosunku do objętości pożywki wynoszącym, bez względu na zastosowaną skalę kultury, 1:40 (*m/v*).

3.1.9.2.2 Krzywa wzrostowa korzeni transgenicznych

Dla wszystkich otrzymanych, w toku projektu doktoranckiego, klonów korzeni transformowanych *S. apiana*, na poziomie kultur wytrząsanych, wyznaczono profile wzrostowe. *Inoculum* pozyskiwano każdorazowo z kolekcyjnych linii korzeniowych TA1-3 i TL1-2, rosnących w pożywce SH₀, w ostatnim, 24. dniu pasażu. Materiał roślinny przenoszono do kolb Erlenmeyera o poj. 100 mL (ok. 0,45 g/kolbkę; 71 naczyń w eksperymencie) i kultywowano w płynnym medium wzrostowym SH₀ (25 mL/kolbkę). Doświadczenie prowadzono w fitotronie, w ciemności, na wytrząsarce rotacyjnej (rozdz. 3.1.4).

W tym czasie, co trzeci dzień cyklu wzrostowego prowadzono zbiór biomas, pochodzących z 3 losowo wybranych naczyń hodowlanych, rozpoczynając w dniu 0. aż do 60. dnia eksperymentu. Oceniano cechy makroskopowe korzeni i, po odsączeniu od podłoża wzrostowego, na szklanych lejkach wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA), ważono, celem wyznaczenia FW i Gi. Po liofilizacji (rozdz. 3.2.2), w biomasach wyznaczono DW. Na podstawie obliczonych parametrów wzrostu, dla testowanych tkanek, wykreślono profile wzrostowe, obrazujące dynamikę przyrostu hodowli w cyklu doświadczalnym. Wyniki DW i Gi stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD.

Suche próbki biomas klonu TA1, zebrane w 50. dniu eksperymentu, przeznaczono do badań fitochemicznych z uwagi na obecność nietlotnych terpenów i polifenoli (rozdz. 3.2.3.2.2).

3.1.9.2.3 Kultury prowadzone w skali wielkolaboratoryjnej

Zgodnie z planem badawczym, wyselekcjonowaną linię korzeni włósnikowatych TA1 kultywowano w dwóch instalacjach wielkolaboratoryjnych (prototypowy bioreaktor natryskowy oraz kolumnowo-zalewowy z dyszą bełkotkową), wykorzystanych uprzednio na potrzeby doświadczeń nad korzeniami odciętymi *S. apiana* (rozdz. 3.1.9.1.4). W obu systemach objętość robocza wynosiła 600 mL.

3.1.9.2.3.1 Konstrukcja bioreaktorów

Bioreaktory, zastosowane w niniejszym doświadczeniu, jak już wspomniano, wykorzystano uprzednio do prac nad kulturami korzeni odciętych *S. apiana*, a ich konstrukcję opisano szczegółowo w rozdz. 3.1.9.1.4.1.

3.1.9.2.3.2 Protokół namnażania korzeni transformowanych w bioreaktorach

Inoculum korzeni włósnikowatych pozyskano z kultur kolekcyjnych klonu TA1, namnożonych w pożywce SH₀, i zebranych w ostatnim, 24. dniu ich cyklu wzrostowego. W obu typach bioreaktorów, do koszy immobilizujących, wprowadzano fragmenty korzeniowe o sumarycznej masie ok. 15,0 g/bioreaktor i średnicy pojedynczych matryc roślinnych nieprzekraczającej 1 cm, a następnie

całość zalewano pożywką SH₀ (600 mL). Doświadczenie prowadzono przez 60 dni, w ciemności, w temp. 24±1°C (rozdz. 3.1.4).

Po zakończeniu cyklu hodowlanego, biomasy korzeniowe oceniano makroskopowo pod względem morfologicznym, a następnie odsączano je od podłoża wzrostowych na szklanych lejkach wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA). Materiał roślinny zważono i określano jego parametry wzrostowe (FW, Gi; rozdz. 3.1.5), a następnie poddano go liofilizacji (rozdz. 3.2.2), celem wyznaczenia wartości DW (rozdz. 3.1.5). Wyniki DW i Gi stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

Wysuszone próbki przeznaczono do badań fitochemicznych z uwagi na obecność nietlotnych terpenów i polifenoli (rozdz. 3.2.4.2).

3.1.9.3 Kultury ciągle mikropędów *S. apiana*

3.1.9.3.1 Materiał roślinny do badań

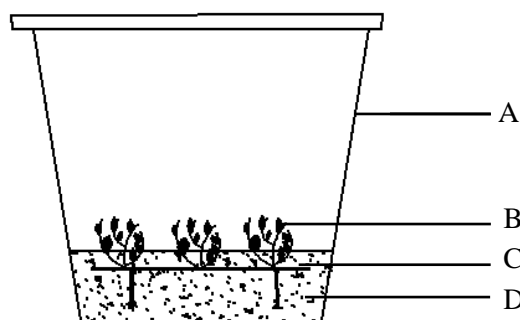
Mikropędy, pochodzące z kultury kolekcyjnej (rozdz. 3.1.8.2.4), zaadaptowano do wzrostu w różnych systemach *in vitro*, w skali laboratoryjnej (pojemniki Magenta[®] o poj. 250 mL – obj. robocza 35 mL; Ryc. 60 oraz kolby Erlenmeyera o poj. 100 mL – obj. robocza 35 mL), jak i w warunkach hodowli wielkoskalowych (bioreaktory: RITA[®], PLANTFORM[®] oraz natryskowy; obj. robocza, odpowiednio: 200, 500 i 500 mL). W doświadczeniach wykorzystano pożywkę SH_B, zoptymalizowaną na wcześniejszych etapach prac badawczych (rozdz. 3.1.8.2.4). Stosunek *inoculum* roślinnego do medium wzrostowego był stały we wszystkich eksperymentach i wynosił 1:23,5 (*m/v*).

3.1.9.3.2 Wpływ rodzaju systemu hodowlanego w skali laboratoryjnej na wzrost mikropędów *S. apiana*

Konstrukcja naczyń hodowlanych

Mikropędy, pochodzące z kultury kolekcyjnej (rozdz. 3.1.8.2.4), kultywowano, w skali laboratoryjnej, w różnych systemach *in vitro* (obj. robocza 35 mL):

- Kultura stacjonarna płynna – pojemniki Magenta[®] (Ryc. 60; poj. 250 mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, US-MO), w których umieszczono metalowe stojaki złożone z platform wykonanych z siatek ze stali nierdzewnej (oczka 1x1 mm) oraz nóżek (dł. 1 cm, φ 3 mm). Objętość pożywki SH_B (35 mL) oraz wysokość siatki immobilizującej umożliwiały tylko częściowe zanurzenie mikropędów w medium (ok. 3 mm), bez zagrożenia tkanek hipoksją. Pojemniki uszczelniono folią Parafilm M (Sigma-Aldrich, USA).



Ryc. 60. Pojemnik Magenta[®], zainokulowany mikropędami *S. apiana*; A – obudowa naczynia hodowlanego z poliwęglanu; B – mikropędy szaławii białej; C – siatka immobilizująca ze stali nierdzewnej; D – eksperymentalne medium wzrostowe (SH_B).

- Kultura stacjonarna agarowa – pojemniki Magenta[®], uzupełnione pożywką zestaloną agarem (35 mL; SH_B), uszczelnione folią Parafilm M (Sigma-Aldrich, USA).
- Kultura wytrząsana – szklane kolby Erlenmeyera o poj. 100 mL, uzupełnione płynnym medium wzrostowym (35 mL; SH_B), uszczelnione korkiem silikonowym.

Dobór warunków prowadzenia kultury mikropędów

Inoculum tkankowe do doświadczenia pozyskano z kolekcyjnych kultur mikropędów szaławii białej, rosnących na pożywce SH_B i zebranych w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego. Odważony materiał roślinny przeniesiono do naczyń hodowlanych (kolby Erlenmeyera – 6 sztuk oraz pojemniki Magenta[®] uzupełnione pożywką stacjonarną - 8 sztuk lub medium płynnym – 6 sztuk). Objętości podłoży eksperymentalnych SH_B oraz masy inokularne, zastosowane w niniejszym doświadczeniu, były stałe we wszystkich wariantach prac laboratoryjnych i wynosiły, odpowiednio, 35 mL i 1,5 g mikropędów/pojemnik (4 kępki).

Kultury pędów inkubowano w warunkach standardowych (rozd. 3.1.4), na regałach hodowlanych bądź na wytrząsarce orbitalnej (kolby Erlenmeyera) przez okres 21 dni.

Po zakończeniu cyklu hodowlanego, mikropędy oceniano makroskopowo pod względem morfologicznym (rozd. 3.1.6), a następnie odsączano od podłoża wzrostowego na szklanych lejkach wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA). Materiał roślinny ważono i określano jego parametry wzrostowe (FW, Gi; rozdz. 3.1.5), a następnie suszono w temp. 30°C przez 24 h (rozd. 3.2.2), celem wyznaczenia wartości DW (rozd. 3.1.5). Wyniki DW i Gi stanowią średnie arytmetyczne z min. 6 prób ± SD.

3.1.9.3.3 Profil wzrostowy oraz charakterystyka metaboliczna kultury wytrząsanej *S. apiana*

Mikropędy, pochodzące z kultury kolekcyjnej (rozd. 3.1.8.2.4), zebrane w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego, przeniesiono do kolb Erlenmeyera (poj. 100 mL; 51 naczyń w eksperymencie; 1,5g *inoculum*/kolbkę) i kultywowano w płynnym medium wzrostowym SH_B (35 mL/kolbkę). Kolby

zainokulowane pędami zamykano korkami z pianki silikonowej i inkubowano na wytrząsarce orbitalnej, w warunkach standardowych (rozdz. 3.1.4).

W tym czasie, co trzeci dzień cyklu wzrostowego prowadzono zbiór biomas, pochodzących z 3 losowo zebranych naczyń hodowlanych, rozpoczynając w 0. dniu aż do 48. dnia doświadczenia. Oceniano ich cechy makroskopowe (rozdz. 3.1.6) oraz, po odsączeniu od podłoża wzrostowych na szklanych lejkach wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA), ważono, celem wyznaczenia FW i Gi. Po wysuszeniu, w suszarce o wymuszonym obiegu powietrza (30°C, 24h), wyznaczono DW badanych biomas. Na podstawie obliczonych parametrów wzrostu, dla testowanych tkanek, wykreślono profile wzrostowe, obrazujące dynamikę przyrostu hodowli w cyklu doświadczalnym. Wyniki DW i Gi stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.

3.1.9.3.4 Kultury prowadzone w bioreaktorach – wzrost oraz profil metaboliczny

Zgodnie z planem badawczym, mikropędy badanego gatunku kultywowano w trzech instalacjach wielkolaboratoryjnych, zróżnicowanych ze względu na sposób doprowadzania medium wzrostowego do zbiornika hodowlanego: dwa systemy okresowo-zalewowe – RITA® (obj. robocza 200 mL) i PLANTFORM® (obj. robocza 500 mL) oraz jeden prototypowy – natryskowy (obj. robocza 500 mL).

3.1.9.3.4.1 Wpływ typu bioreaktora na wzrost oraz profil metaboliczny mikropędów *S. apiana*

Mikropędy kultywowano w trzech bioreaktorach: komercyjnie dostępnych systemach okresowo-zalewowych RITA® (objętość robocza 200 mL; Vitropic, St. Mathieu de Treviers, Francja) i PLANTFORM® (objętość robocza 500 mL; PLANTFORM® AB, Szwecja & TC propagation Ltd., Irlandia) oraz prototypowym bioreaktorze natryskowym, skonstruowanym w Katedrze u Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych GUMed (objętość robocza 500 mL).

Konstrukcja bioreaktorów

Wielkolaboratoryjne kultury mikropędów szalwii białej prowadzono z bioreaktorach o różnej konstrukcji (Ryc. 61):

- Bioreaktor RITA® – Ryc. 61A.

Jest to pneumatycznie zasilany system okresowo-zalewowy o obj. roboczej, wynoszącej 200 mL. Zbiornik hodowlany, wraz z pozostałymi elementami konstrukcyjnymi bioreaktora, wykonano z tworzyw sztucznych. Do wnętrza naczynia hodowlanego, o wymiarach 90 x 120 x 140 mm, wtłaczano strumień gazu. Był on generowany przez pompę membranową (przepływ 0,3 L min⁻¹, model IPX ACO-9602, Hailea, Chiny), przechodził przez filtr wyjaławiający (średnicy porów 0,2 μ m; Cole Parmer, Vernon Hills, US-IL), naczynie wzrostowe bioreaktora i kolejny, wyjściowy filtr wyjaławiający (nr 7; średnicy porów 0,2 μ m, Cole Parmer, Vernon Hills, US-IL). W wyniku wprowadzenia powietrza do dolnej części (dzwonu) naczynia, poziom pożywki eksperymentalnej podnosił się do wysokości zapewniającej zanurzenie w cieczy

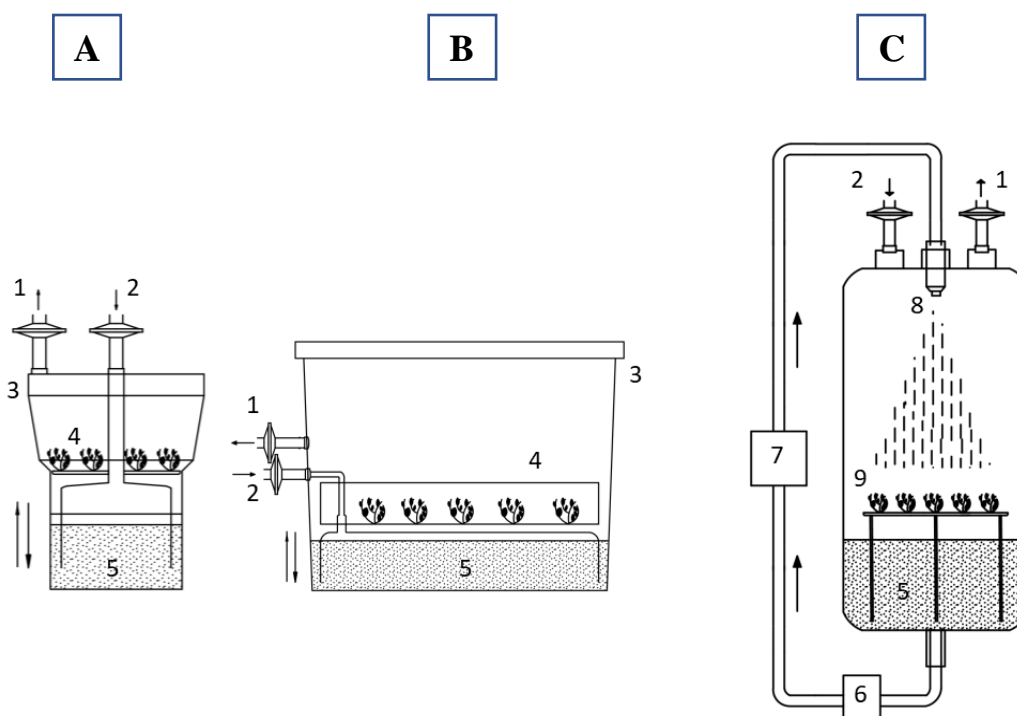
koszyka z mikropędami. Budowa systemu RITA® zapewniała możliwość regulacji czasu kontaktu medium wzrostowego z biomasą szaławii białej poprzez odpowiednie ustawienie pracy pompki. W przypadku mikropędów *S. apiana* częstotliwość zanurzenia biomasy roślinnej w pożywce wynosiła 5 min. w 90 minutowym cyklu.

- Bioreaktor PLANTFORM® – Ryc. 61B

Jest to pneumatycznie zasilany system okresowo-zalewowy o obj. roboczej, wynoszącej 500 mL. Konstrukcja urządzenia umożliwiła wtłaczanie powietrza przez port w bocznej ścianie naczynia hodowlanego (wymiary 180 x 150 x 150 mm). Strumień gazu, generowany przez pompę membranową (przepływ 0,3 L min⁻¹, model IPX ACO-9602, Hailea, Chiny), przechodził przez filtr wyjaławiający (średnicy porów 0,2 μm; Cole Parmer, Vernon Hills, US-IL), naczynie wzrostowe bioreaktora i kolejny wyjściowy filtr wyjaławiający (nr 7; 0,2 μm, Cole Parmer, Vernon Hills, US-IL). W wyniku wtłaczania powietrza do dolnej części (dzwonu) naczynia, poziom pożywki eksperymentalnej podnosił się do wysokości zapewniającej zanurzenie w cieczy koszyka z mikropędami.

- Prototypowy bioreaktor natryskowy – Ryc. 61C

W skład powyższego systemu, o obj. roboczej wynoszącej 500 mL, wchodził cylindryczny szklany zbiornik hodowlany (wysokość 22 cm, średnica zewnętrzna 13 cm; KGW ISO-Therm, Karlsruhe, Niemcy). Szklaną pokrywę urządzenia wyposażono w cztery porty ze szlifem (wys. 12,5 cm, śr. zew. 13 cm, szlif: 29-32; KGW ISO-Therm, Karlsruhe, Niemcy). Obie części bioreaktora uszczelniono uszczelką silikonową (śr. 120 mm, gr. 3 mm, DN-120; Schott, Mainz, Niemcy) i całość łączono za pomocą stalowej, nierdzewnej klamry. Materiał roślinny umieszczono na stalowym stojaku z platformą wykonaną z siatki nierdzewnej (wielkość oczek: 8 mm), uniemożliwiając tym samym opadanie mikropędów na dno bioreaktora. Do połączenia poszczególnych elementów bioreaktora natryskowego wykorzystano węże silikonowe ($\phi_{\text{wewn.}}$ 6 mm, grubość ścianki 1,5 mm, VWR International, Radnor, USA; Szopa i in., 2017; Krol i in., 2023).



Ryc. 61. Schemat zastosowanych w doświadczeniach instalacji wielkoskalowych (Krol i in., 2023): (A) RITA®; (B) PLANTFORM®; (C) prototypowy bioreaktor natryskowy;

1 – filtr wyjąławiający PTFE, wylot powietrza; 2 – filtr wyjąławiający PTFE, wlot powietrza; 3 – obudowa naczynia hodowlanego z poliwęglanu; 4 – siatka z tworzywa sztucznego, odpowiadająca za immobilizację mikropełdów; 5 – eksperymentalne medium wzrostowe (SH_B); 6 – filtr propylenowy; 7 – pompa perystaltyczna; 8 – dysza zraszająca; 9 – siatka ze stali nierdzewnej, odpowiadająca za immobilizację mikropełdów.

Konstrukcje bioreaktorów umożliwiały cykliczne doprowadzenie płynnych pożywek SH_B do biomasy wg schematu: 5. min. kontakt medium z mikropełdami, w 90. min. cyklu eksperymentalnym. W instalacjach RITA® oraz PLANTFORM® wskaźnik napowietrzania kultury wynosił 0,5 L min⁻¹ (pompka model IPX ACO-9602, Hailea, Chiny), natomiast w systemie natryskowym medium wzrostowe rozpylano z wydajnością 100 mL min⁻¹ (pompa Masterflex peristaltic, Cole Palmer).

Warunki prowadzenia kultur bioreaktorowych

Mikropełdy, pochodzące z kultury kolekcyjnej (rozd. 3.1.8.2.4), zebrane w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego, przeniesiono do zbiorników hodowlanych takich jak: RITA® (7 instalacji; ok. 8,5g *inoculum*/pojemnik), PLANTFORM® (3 instalacje; ok. 21,4g materiału roślinnego/pojemnik) oraz bioreaktor natryskowy (4 instalacje; ok. 21,4g *inoculum*/pojemnik). Zainokulowane w poszczególnych instalacjach mikropełdy namnażano, w pożywce SH_B, w warunkach standardowych (obserwacje makroskopowe – rozdz. 3.1.4). Powyższe doświadczenie powtarzano 2-krotnie, w dwóch reżimach czasowych, kultywując tkanki: 21 i 28 dni.

Po zakończeniu okresu hodowlanego, oceniano cechy morfologiczne otrzymanych mikropełdów (rozd. 3.1.6) i, po odsączeniu od podłoża wzrostowego, na szklanych lejkach wyłożonych bibułą

filtracyjną (Whatman nr 1, USA), ważono je, celem wyznaczenia FW i Gi. Po wysuszeniu w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza (30°C, 24h), obliczono DW tkanek. Wyniki parametrów wzrostu stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

W wysuszonych biomasach określano zawartość olejku eterycznego (rozdz. 3.2.3.1), a izolowane frakcje lotne poddawano jakościowej oraz ilościowej analizie chromatograficznej – GC/MS i GC/FID (rozdz.3.2.3).

3.1.9.3.4.2 Kultury prowadzone w bioreaktorach RITA® – profil wzrostowy

W doświadczeniu wykorzystano bioreaktor z tworzywa sztucznego RITA® (objętość robocza 200 mL; Vitropic, St. Mathieu de Treviers, Francja), który stanowi odmianę zasilanego pneumatycznie systemu okresowo-zalewowego.

Konstrukcja bioreaktora

Bioreaktor RITA® – pneumatycznie zasilany system okresowo-zalewowy o obj. roboczej wynoszącej 200 mL. Szczegółową konstrukcję powyższej instalacji przedstawiono w rozdz. 3.1.9.3.4.1.

Protokół prowadzenia kultur mikropędów w bioreaktorze RITA®

Mikropędy, pochodzące z kultury kolekcyjnej (rozdz. 3.1.8.2.4), zebrane w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego, przeniesiono do zbiornika hodowlanego bioreaktora RITA® (7 instalacji; ok. 8,5g *inoculum*/pojemnik) i kultywowano w płynnym medium wzrostowym SH_B (200 mL/pojemnik), w warunkach standardowych (rozdz. 3.1.4). Powyższe doświadczenie powtarzano 6-krotnie, różnicując czas trwania kultywacji: 7, 14, 21, 28, 35 i 42 dni.

Po zakończeniu okresu hodowlanego, oceniano cechy morfologiczne mikropędów (badania makroskopowe – rozdz. 3.1.6) i, po odsączeniu od podłoża wzrostowego na szklanych lejkach, wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA), ważono, celem wyznaczenia FW i Gi. Po wysuszeniu w suszarce o wymuszonym obiegu powietrza (30°C, 24h), wyznaczono DW dla poszczególnych tkanek. Na podstawie obliczonych parametrów wzrostu, dla testowanych biomas, wykreślono profile wzrostowe, obrazujące dynamikę przyrostu hodowli w 42-dniowym cyklu doświadczalnym. Wyniki DW i Gi stanowią średnie arytmetyczne z 6 prób ± SD.

Wysuszone biomasy były w dalszej kolejności oceniane pod kątem zawartości olejku eterycznego, otrzymanego techniką hydrodestylacji (rozdz. 3.2.3.1). Ponadto wyizolowane frakcje lotne poddawano analizie jakościowej oraz ilościowej przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem mas i z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC/MS i GC/FID; rozdz.3.2.3).

3.1.9.3.5 Wpływ strategii dokarmiania i elicytacji na wzrost biomas oraz produkcję olejku eterycznego w kulturach bioreaktorowych mikropędów *S. apiana*

W projekcie doktorskim przeprowadzono serię prac doświadczalnych, w których przetestowano wpływ dokarmiania mikropędów szalwii białej substancjami odżywczymi oraz elicytacji na poziomy syntezowanych przez nie lotnych terpenów. Oceniano zarówno wpływ wymienionych zabiegów na metabolizm pierwotny, jak i wtórny powyższej kultury. Mikropędy namnażano w komercyjnie

dostępnym bioreaktorze okresowo-zalewowym RITA[®] (objętość robocza 200 mL; Vitropic, St. Mathieu de Treviers, Francja).

Konstrukcja bioreaktora

Prace eksperymentalne prowadzono w bioreaktorze RITA[®], pneumatycznie zasilanym systemie okresowo-zalewowym o obj. roboczej wynoszącej 200 mL. Szczegółową konstrukcję powyższej instalacji przedstawiono w rozdz. 3.1.9.3.4.1.

Przygotowanie roztworów pomocniczych elicytorów i mieszaniny substancji odżywczych

Elicytory i substancje odżywcze, stosowane w projekcie oraz sposób ich przygotowania do prac doświadczalnych przedstawiono poniżej:

- Chitosan (Sigma-Aldrich, USA) – wodny roztwór pomocniczy elicytora (10,0 mg mL⁻¹) otrzymano poprzez rozpuszczenie substancji na gorąco w 5% 1M HCl (POCH, Polska) i doprowadzenie pH mieszaniny do wartości 5,0 za pomocą 1M NaOH (EMSURE, ACS, Reag. Ph. Eur., Sigma-Aldrich, USA). Uzyskany roztwór autoklawowano (rozdz. 3.1.3) i wprowadzano do bioreaktora RITA[®], w objętości 4 mL, osiągając końcowe stężenie chitosanu, w medium doświadczalnym, wynoszące 200 mg L⁻¹ (Jesionek i in., 2018). Próbę kontrolną stanowił sam rozpuszczalnik o pH 5 bez dodatku elicytora.
- Ergosterol (Sigma-Aldrich, USA) – etanolewy roztwór pomocniczy elicytora (2,0 mM) otrzymano poprzez rozpuszczenie ergosterolu na gorąco w etanolu (95% v/v; Polmos, Siedlce, Polska). Następnie wyjałowiano go poprzez sączenie sterylizujące (średnica porów 0,22 µm; rozdz. 3.1.2) i wprowadzano do bioreaktora RITA w objętości 1 mL, uzyskując końcowe stężenie substancji w pożywce, wynoszące 10 µM. Próbę kontrolną stanowił sterylizowany etanol (95% v/v; sączenie wyjaławiające).
- Wyciąg drożdżowy (Sigma-Aldrich, USA) – wodne roztwory pomocnicze elicytora (10,0 oraz 20,0 mg mL⁻¹) otrzymano poprzez rozpuszczeniu sproszkowanego wyciągu drożdżowego w wodzie ultraczystej i wysterylizowanie powstałych mieszanin w autoklawie (rozdz. 3.1.3). Przygotowane roztwory wprowadzano do systemu RITA[®], w objętości 1,0 mL, w zależności od wariantu doświadczalnego, uzyskując końcowe stężenie wyciągu drożdżowego w pożywce, wynoszące 50,0 i 100,0 mg L⁻¹. W związku z niewielką objętością dodawanego roztworu elicytora wobec objętości całej pożywki, kontrolę stanowiły kultury szalwii białej w bioreaktorze RITA[®], do których nie wprowadzano żadnych dodatkowych substancji.
- Sok z liści świeżej pokrzywy (*Urticae folium*, *Urtica dioica* L., *Urticaceae*) – sok uzyskano w wyciskarce wolnoobrotowej (Philips, Amsterdam, Holandia; 50 g soku z 1 kg surowca; 24,09 µg suchego wyciągu w 1,0 mL). Zbiór pokrzywy przeprowadzono

w maju 2021 r. z okazów niekwitających, w Ogrodzie Roślin Leczniczych GUMed. Medium doświadczalne przygotowano poprzez dodatek do niego powyższego soku (25 mL/1000 mL), przed doprowadzeniem pH pożywki do wartości 5,6 i autoklawowaniem (rozdz. 3.1.3), uzyskując końcowe stężenie substancji odżywczych w podłożu równe 2,5%.

Warunki prowadzenia kultur bioreaktorowych

Mikropędy, pochodzące z kultury kolekcyjnej (rozdz. 3.1.8.2.4), zebrane w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego, przeniesiono do bioreaktora RITA[®] (ok. 8,5 g *inoculum*/pojemnik). W ramach każdego wariantu eksperymentalnego inokulowano min. 6 bioreaktorów RITA[®]. Zastosowanym, podstawowym medium wzrostowym była pożywka SH_B. Elicytory dodawano do podłoża na okres 3 i 7 dni, tj. w 14. lub 18. dniu eksperymentu. Mieszaniną substancji odżywczych uzupełniano podłoże wzrostowe w zerowym dniu doświadczenia.

Po zakończeniu kultury, tj. w 21. dniu eksperymentu, biomasy zbierano i, po odsączeniu od podłoża wzrostowego, na szklanych lejkach wyłożonych bibułą filtracyjną (Whatman nr 1, USA), wyznaczono dla nich wartości FW i Gi. Oceniono także cechy morfologiczne materiału roślinnego (rozdz. 3.1.6). Po wysuszeniu w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza (30°C, 24h), obliczono DW wspomnianych kultur. Wartości DW i Gi stanowią średnie arytmetyczne z min. 6 powtórzeń ± SD.

Próbki, po wysuszeniu, przeznaczono do badań fitochemicznych. Matryce roślinne oceniano pod kątem zawartości olejku eterycznego, który następnie poddawano jakościowej oraz ilościowej analizie GC/MS i GC/FID.

3.2 Materiały i metodyka badań fitochemicznych

Badania fitochemiczne, wchodzące w skład projektu doktorskiego, obejmowały opracowanie warunków suszenia, a następnie metod ekstrakcji biomasz szałwii białej, pochodzących z poszczególnych etapów doświadczeń biotechnologicznych oraz z rośliny gruntowej (liście i korzenie), włączonej do prac eksperymentalnych głównie jako materiał referencyjny, celem otrzymania wyciągów zawierających zespoły metabolitów wtórnych z grupy mono- i seskwiterpenów (olejki eteryczne) oraz nietlonych terpenów (di- i triterpenoidy) i połączeń polifenolowych (kwasy fenolowe oraz flawonoidy). Odpowiednie ekstrakty oraz destylaty poddano jakościowej oraz ilościowej analizie chromatograficznej umożliwiającej wyznaczenie profili metabolicznych kultur *in vitro* *S. apiana* oraz rośliny gruntowej w zakresie podanych powyżej połączeń naturalnych. Zoptymalizowane, w toku prac badawczych, warunki chromatografowania (GC/MS i GC/FID dla olejków eterycznych i HPLC-DAD-ESI/MS dla nietlonych terpenów i polifenoli) posłużyły następnie do analiz skryningowych wszystkich biomasz *in vitro*, uzyskanych na poszczególnych etapach doświadczeń, celem określenia skuteczności procedur biotechnologicznych, umożliwiających uzyskanie roślinnych systemów *in vitro* z przeznaczeniem do produkcji wybranych aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych.

3.2.1 Materiał roślinny

Jako materiał do badań posłużyły:

- Suszone liście rośliny grunтовой *Salvia apiana* Jepson – importowane z USA, zakupione w firmie Deesis (Warszawa, Polska). Zgodnie z informacją producenta, zbiór surowca przeprowadzono latem 2019 r. Próbkę materiału roślinnego zdeponowano w Ogrodzie Roślin Leczniczych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod numerem no. 21761 i przeznaczono do analiz GC/MS i GC/FID (olejki eteryczne) oraz HPLC-DAD-ESI/MS (niełotne terpeny i polifenole)
- Świeży korzeń rośliny grunтовой *S. apiana*, zakupiony w firmie Ogrody Ziółowe (Bielany Wrocławskie, Polska). Zgodnie z informacją producenta, zbiór surowca przeprowadzono w kwietniu 2021 r. Posłużył on, po wysuszeniu, do analiz HPLC-DAD-ESI/MS na obecność niełotnych terpenów i polifenoli
- Kultury kolekcyjne *in vitro* *S. apiana*: mikropędy (medium SH_B), korzenie odcięte (pożywka SH_{IBA1,0}), korzenie transgeniczne – klon TA1-3, TL1-2 (podłoże wzrostowe SH₀), dwie hodowle kalusa (media MS_{stand}, SH_{stand}). Powyższe biomasy przeznaczono do analiz chromatograficznych: GC/MS i GC/FID (olejki eteryczne) i HPLC-DAD-ESI/MS (niełotne terpeny i polifenole)
- Kultury ciągłe *in vitro* *S. apiana*:
 - ✓ mikropędy (medium SH_B) – analiza GC/MS i GC/FID olejków eterycznych
 - ✓ korzenie odcięte (pożywka SH_{IBA1,0} i SH_{IBA1,5}) – analiza HPLC-DAD-ESI/MS niełotnych terpenów i polifenoli
 - ✓ korzenie transgeniczne TA1 (medium SH₀) – analiza HPLC-DAD-ESI/MS niełotnych terpenów i polifenoli
- Liście *Salvia officinalis* L. – zebrane, w fazie kwitnienia, latem 2019 roku, w Ogrodzie Roślin Leczniczych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (no. kat. 4637, Polska) – porównawcze analizy GC/MS i GC/FID zespołu substancji lotnych.

3.2.2 Przygotowanie surowców roślinnych do badań – suszenie

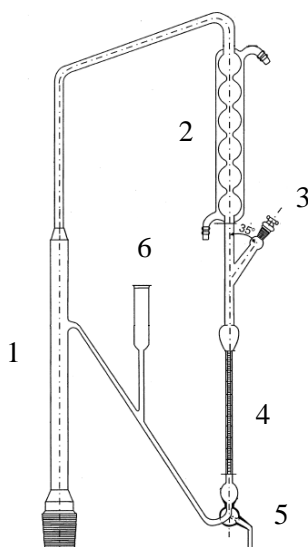
Materiał roślinny (liście i korzeń rośliny grunтовой oraz kultury *in vitro* szałwii białej o różnym statusie morfogenicznym – rozdz. 3.2.1), w zależności od dalszego przeznaczenia, liofilizowano (48 h, temp. -80°C – liofilizator LYOVAC GT 2, Finn-Aqua Santasolo-Sohlberg, Tuusula, Finlandia), celem analizy polifenoli oraz niełotnych terpenów, lub suszono (24 h, temp. 30°C – suszarka laboratoryjna o wymuszonym obiegu powietrza, typ 15-16463, Binder, Niemcy), a następnie badano z uwagi na zawartość frakcji lotnych.

3.2.3 Analiza fitochemiczna wybranych metabolitów wtórnych i ich zespołów w matrycach roślinnych z upraw gruntowych i kultur *in vitro*

3.2.3.1 Analiza związków lotnych

3.2.3.1.1 Otrzymywanie olejków eterycznych

Olejki eteryczne z badanych matryc roślinnych szałwii białej oraz szałwii lekarskiej otrzymano metodą hydrodestylacji w aparacie Clevengera (Ryc. 62.; Farmakopea Polska VIII, 2008). Zgodnie z monografią farmakopealną *Salviae officinalis folium* (Farmakopea Polska X, 2014), do destylacji wykorzystano 20,0 g nierozdrobnionych liści szałwii lekarskiej. W przypadku pozostałych próbek ilość używanego do analiz materiału roślinnego modyfikowano. Dla nierozdrobnionych liści rośliny gruntowej *S. apiana* masa surowca wynosiła 10,0 g, natomiast dla mikropędów, korzeni odciętych i transformowanych, a także dla kalusów szałwii białej, hydrodestylacji poddano nie mniej niż 6,0 g poszczególnych nierozdrobnionych biomas. Objętość wody, wprowadzana każdorazowo do aparatu Clevengera, wynosiła 400 mL, zaś proces destylacji trwał 3 h.



Ryc. 62. Schemat aparatu Clevengera stosowanego do oznaczania zawartości olejku eterycznego (Farmakopea Polska VII, 2007): 1 – kolumna destylacyjna, 2 – chłodnica, 3 – układ odpowietrzający, składający się z korka z nacięciem i otworu w rurce, 4 – rurka kalibrowana, 5 - zawór trójdrożny, 6 – rurka przepływowa.

Zebrane frakcje lotne suszono przez 24 h nad bezwodnym siarczanem (VI) sodu – Na₂SO₄ (Sigma-Aldrich, USA). W przypadku próbek pochodzących z kultur ciągłych mikropędów (rozdz. 3.2.1), olejki eteryczne, po zakończonych procedurach hydrodestylacji, dodatkowo rozcieńczono 0,5 mL ksylenu (Sigma-Aldrich, USA). Zawartość frakcji lotnych w matrycach roślinnych przedstawiono jako średnią arytmetyczną z co najmniej trzech hydrodestylacji ± SD. Otrzymane olejki

eteryczne przechowywano w chłodziarce (typ DP 28 SA, ARDO, Włochy), w temp. $5\pm 2^{\circ}\text{C}$, z przeznaczeniem do dalszych analiz chromatograficznych (GC/MS i GC/FID) oraz biologicznych.

3.2.3.1.2 Analiza chromatograficzna GC/MS i GC/FID

Aparatura

Do analiz składu jakościowego oraz ilościowego otrzymanych frakcji lotnych, z poszczególnych matryc szałwii białej oraz szałwii lekarskiej, wykorzystano chromatograf gazowy (typ 7890A, Agilent, USA) wyposażony w detektory: MS (typ MSD 5977, Agilent Techno., USA) i FID (typ 5977A, Agilent Techno., USA). Badania chromatograficzne wykonano we współpracy z prof. dr hab. inż. Bożeną Zabiegałą z Katedry Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej.

Procedury analityczne

Przed analizą chromatograficzną olejki eteryczne (10 μL) rozcieńczano acetonem (Merck, Niemcy) w stosunku 1:80 (v/v).

W analizach GC/MS, przygotowane próbki frakcji lotnych nastrzykiwano, za pomocą iniektora typu split/splitless (model 7693, Agilent, USA), na kolumnę kapilarną (typ DB-5MS, 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm , współczynnik podziału 1:10; Agilent Techno., USA). Objętość nastrzyku wynosiła 1 μL . Temperaturę dozownika ustawiono na 250°C . Przepływ gazu nośnego (hel) wynosił 1,1 mL min^{-1} . W trakcie analizy temperatura pieca wzrastała z 50 do 280°C , z szybkością $7^{\circ}\text{C min}^{-1}$ i utrzymywano ją na tym poziomie przez dalsze 20 min.

Analizy GC/FID przeprowadzono przy użyciu kolumny kapilarnej (typ DB-5 30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm , Agilent Techno., USA), a parametry analityczne takie jak: objętość nastrzyku oraz temp. dozownika były takie same jak dla GC/MS (odpowiednio: 1 μL i 250°C). Przepływ gazu nośnego (hel) wynosił 1,5 mL min^{-1} . W trakcie analizy temperatura pieca wzrastała z 50 do 280°C , z szybkością $7^{\circ}\text{C min}^{-1}$ i utrzymywano ją na tym poziomie przez dalsze 20 min.

Uzyskane dane, tj. czasy retencji i widma, porównano z biblioteką NIST 11.0.

3.2.3.2 Analiza związków polifenolowych oraz nielotnych terpenów

3.2.3.2.1 Ekstrakcja frakcji polifenolowych i terpenowych z badanych matryc roślinnych

Zliofilizowane i rozdrobnione w mrożdzieru próbki roślinne (fragmenty < 1 mm), przeznaczone do analiz HPLC-DAD-ESI/MS (rozd. 3.2.1), dokładnie odważono (5,0 g) i poddano wyczerpującej ekstrakcji metanolem, w temp. pokojowej, z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego (3 \times 200 mL MeOH cz.d.a, POCH, Gliwice, Polska: 3 \times 2h i 1 \times 12h, 200 obr. min^{-1} – mieszadło IKA Werke RT-5, Staufen im Breisgau, Niemcy). Po uprzednim przesączeniu przez bibułę filtracyjną (Whatman nr 1, USA), połączone wyciągi odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem (temp. łaźni wodnej 30°C , wyparka rotacyjna Rotavapor R-300, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Szwajcaria) do objętości ok. 50 mL i przeniesiono ilościowo do szklanych kolb miarowych (100 mL). Próbki korzeni, pochodzące z wybranych dni w profilach wzrostowych, przygotowano w analogiczny sposób, z tą różnicą, że

naważka wynosiła 1,0 g (obj. metanolu 40 mL; obj. pierwotnego wyciągu 20 mL). Tak otrzymane ekstrakty przechowywano w chłodziarce, w temp. $5\pm 2^{\circ}\text{C}$, z przeznaczeniem do dalszych analiz chromatograficznych (HPLC-DAD-ESI/MS).

3.2.3.2.2 Analiza chromatograficzna HPLC-DAD-ESI/MS

Aparatura

W analizach chromatograficznych wykorzystano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z matrycową detekcją diodową (DAD) i detektorem mas (ESI/MS). W skład aparatury badawczej (Shimadzu, Japonia) wchodziły:

- autosampler typ SIL-20AC (15°C),
- dwie pompy typ LC-20AD,
- degazer typ DGU-20A3,
- detektor mas (2010 EV),
- piec termostatujący typ CTO-20AC,
- detektor diodowy typ SPD-M20.

Do opracowania danych analitycznych zastosowano program Shimadzu LC solution 3.40.

Badania chromatograficzne wykonano we współpracy z prof. dr hab. Adamem Bucieńskim z Katedry Biofarmacji *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Procedury analityczne

Do sporządzenia faz ruchomych posłużono się następującymi odczynnikami: ultraczystym acetonitrylem (ACN; LiChrosolv do analiz LC-MS – Merck, Niemcy), kwasem octowym (CH_3COOH , $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA) oraz wodą pochodzącą z systemu oczyszczania wody (Direct-Q 3UV – Merck, Niemcy).

Skład ilościowy faz przedstawiono poniżej:

A – woda : kwas octowy (100,0 : 0,1 v/v)

B – acetonitryl (100,0)

W analizach stosowano elucję gradientową wg. programu: 0,01-70 min: 0-100% B w A; 70-90 min: 100% B w A; 90-100 min: 100-0% B w A; 100-105 min: 0% B w A; stop.

Przepływ fazy ruchomej wynosił $0,8\text{ mL min}^{-1}$. Rozdzielenia prowadzono w temp. 40°C .

Bezpośrednio przed rozpoczęciem analiz, wyciągi metanolowe z badanych matryc roślinnych odwirowano (rozd. 3.2.3.2.1; wirówka MPW-65R, Warszawa, Polska) i w formie nierozcieńczonej wprowadzono do aparatury (objętość nastrzyku $5\mu\text{L}$). Proces rozdzielania wtórnych metabolitów w badanych wyciągach przeprowadzono na kolumnie Phenomenex Luna (00G-4252-E0, $5\mu\text{m}$, C18, 100\AA ; $250 \times 4,6\text{ mm}$).

Widma DAD rejestrowano w zakresie 190-800 nm. Detekcję ESI-MS wykonano zarówno w trybie jonizacji pozytywnej jak i negatywnej, przy następujących parametrach:

- Blok grzejny 270°C
- Napięcie detektora 1,5 kV
- Temperatura desolwatacji 270°C
- Przepływ gazu nebulizacyjnego 1,5 L/min.

Sygnały rejestrowano w trybie przemiatania (*scan*), w zakresie mas m/z 100-800.

Analizy jakościowe

Metabolity wtórne, wchodzące w skład badanego zespołu związków polifenolowych oraz terpenowych, w materiale roślinnym szałwii białej, identyfikowano w oparciu o kochromatografię z substancjami wzorcowymi, a także na drodze analizy widm DAD oraz ESI-MS. W pracach badawczych posługiwano się metanolowymi (MeOH $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Francja) roztworami następującymi substancji wzorcowych:

- Kwas rozmarynowy (Sigma-Aldrich, USA)
- Hesperydyna (Fluka, Buchs, Szwajcaria)
- Karnozol (Sigma-Aldrich, USA)
- Kwas karnozowy (Sigma-Aldrich, USA)
- Flawon (Fluka, Buchs, Szwajcaria)
- Tanszinon 2A (Sigma-Aldrich, USA)
- Kryptotanszinon (Sigma-Aldrich, USA)
- Dihydrotanszinon I (Sigma-Aldrich, USA)
- Tanszinon I (Sigma-Aldrich, USA)
- Kwas ursolowy (Sigma-Aldrich, USA)

Analizy ilościowe

Zawartość wybranych metabolitów wtórnych z grupy polifenoli (kwas rozmarynowy, cirsimarytyna, hesperydyna) oraz nietlotnych terpenów (kwas karnozowy, kwas hydroksykarnozowy, karnozol, kryptotanszinon), w badanych próbkach roślinnych szałwii białej, określono w oparciu o zależności ilościowe pomiędzy polami powierzchni pików, odpowiadających poszczególnym połączeniom naturalnym, które rejestrowano przy długości fali $\lambda = 280$ nm (detektor DAD), a stężeniami analitów w testowanych matrycach.

Stężenia powyższych związków w matrycach analitycznych wyznaczano w oparciu o sporządzone krzywe kalibracyjne: kwasu rozmarynowego (0,01-2,00 mg mL⁻¹), hesperydyny (0,03-0,60 mg mL⁻¹), karnozolu (0,03-0,25 mg mL⁻¹), kwasu karnozowego (0,03-1,00 mg mL⁻¹), flawonu (0,03-0,25 mg mL⁻¹) oraz kryptotanszinonu (0,05-1,50 mg mL⁻¹). Roztwory substancji wzorcowych, użytych w analizach, przygotowano poprzez rozpuszczenie standardów w metanolu (MeOH $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Francja), za wyjątkiem hesperydyny, dla której użyto mieszaniny metanolu i dimetylosulfotlenku – DMSO [Sigma-Aldrich, Francja; 8 : 2 (v/v)]. Dla krzywych kalibracyjnych wyznaczono równania regresji oraz współczynniki determinacji (R^2).

3.3 Materiały i metodyka badań biologicznych

3.3.1 Wpływ wybranych frakcji lotnych *S. apiana* na aktywność inhibicyjną względem acetylocholinoesterazy, tyrozynazy oraz hialuronidazy

3.3.1.1 Materiał do badań

Materiałem do badań aktywności inhibicyjnej wobec acetylocholinoesterazy, tyrozynazy oraz hialuronidazy był olejek eteryczny *S. apiana* Jeps. wyizolowany z liści rośliny gruntowej (zbiór surowca: lato 2019 r., pozyskany komercyjnie z firmy Deesis, Warszawa, Polska) oraz z mikropędów, pochodzących z kolekcyjnej kultury stacjonarnej szalwii białej (medium SH_B; rozdz. 3.1.8.2.4). Do doświadczeń włączono także frakcje lotne, pochodzące z kultur ciągłych mikropędów, otrzymanych w toku eksperymentów biotechnologicznych (medium SH_B ; rozdz. 3.1.9.3.4.1). Biomasę, wykorzystaną do pozyskania olejku eterycznego z mikropędów *in vitro*, zbierano w ostatnich dniach doświadczeń i suszono przez 24h, w temp. 30°C (rozdz. 3.2.2), a następnie poddano hydrodestylacji (rozdz. 3.2.3.1.1).

Prace badawcze przeprowadzono we współpracy z dr hab. Danielem Załuskim, prof. UMK z Katedry Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu).

3.3.1.2 Badanie aktywności inhibicyjnej względem acetylocholinoesterazy

Badanie aktywności inhibicyjnej względem acetylocholinoesterazy (AChE) przez frakcje lotne *S. apiana* przeprowadzono w oparciu o spektrofotometryczną metodę Ellmana z modyfikacjami (Ellman i in., 1961). W skrócie, 45 μL roztworu acetylocholinoesterazy (0,4 U mL⁻¹, bufor fosforowy pH = 7,5 – Merck, Niemcy) zmieszano z 5 μL próbki (0,45 mg mL⁻¹ w DMSO) i inkubowano przez 15 min. w temp. pokojowej (Thermosheiker PST-100HL, Łotwa). Jako kontrolę dodatnią wykorzystano roztwór DMSO bez ekstraktu. Jako substancję referencyjną zastosowano donepezil (Sigma-Aldrich, USA), w stężeniu 1,00 mg mL⁻¹. W dalszej kolejności, do mieszaniny dodano 150 μL roztworu złożonego z 154 μL buforu, 1 μL acetylocholino (Sigma-Aldrich, USA) i 0,5 μL kwasu 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoesowego) (DNTB; Sigma Aldrich, USA). Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali wynoszącej 405 nm dla 2 punktów czasowych: t₁=0 i t₂=10 min. (LEDETECT 96, Biogenet, Austria). Aktywność anty-AChE została wyznaczana zgodnie z następującym równaniem:

$$\%_{INHIBICJI} = \frac{1 - A_S}{A_C} \times 100 [\%]$$

gdzie: %_{INHIBICJI} – inhibicja AChE [%]; A_S – absorbancja mieszaniny acetylocholino, acetylocholinoesterazy (Sigma-Aldrich, USA) i próbki olejku eterycznego; A_C – absorbancja acetylocholino i enzymu

Wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 powtórzeń \pm SD.

3.3.1.3 Badanie aktywności inhibicyjnej względem hialuronidazy

Badanie aktywności inhibicyjnej względem hialuronidazy (Hyal) przez wybrane frakcje lotne *S. apiana* przeprowadzono w oparciu o zmodyfikowaną metodę opisaną przez Di Ferrante (Di Ferrante, 1956) i Studzińską-Srokę (Studzińska-Sroka i in., 2018). W badaniu wykorzystano destylat o stężeniu 0,45 mg mL⁻¹. Do dołka dodano 10 μ L frakcji lotnej, 15 μ L buforu octanowego (pH=5,35; Merck, Niemcy), 25 μ L buforu inkubacyjnego (bufor octanowy o pH=5,35, 0,45% NaCl oraz 0,01% albuminy bydlęcej – Sigma-Aldrich, USA) oraz 25 μ L roztworu hialuronidazy (30 U mL⁻¹ w buforze inkubacyjnym – Sigma-Aldrich, USA). W celu zniwelowania wpływu barwy destylatu na absorbancje zamiast enzymu wykorzystano 25 μ L buforu inkubacyjnego. W kontroli dodatkowo, zamiast 10 μ L frakcji lotnej, zastosowano 10 μ L DMSO. W badaniu, jako standard, wykorzystano escynę o stężeniu 0,45 mg mL⁻¹ (Sigma-Aldrich, USA). Przygotowaną płytkę inkubowano przez 10 min. w temp. 37°C, a następnie, do każdego dołka, dodano po 25 μ L roztworu kwasu hialuronowego (Thermosheiker PST-100HL, Łotwa). Następnie płytkę inkubowano przez kolejne 45 min. w temp. 37°C. Po tym okresie do każdego dołka dodano po 200 μ L roztworu bromku cetylotrimetyloamoniowego (CTAB) i utrzymywano w temp. pokojowej przez 10 min. Pomiar spektrofotometryczny wykonano przy długości fali wynoszącej $\lambda = 600$ nm (LEDETECT 96, Biogenet, Austria). Aktywność związków/frakcji lotnych określono przez wytrącanie kwasu hialuronowego CTAB, zgodnie z następującym równaniem:

$$\%_{INHIBICJI} = \frac{A_S - A_C}{A_T - A_C} \times 100 [\%]$$

gdzie: $\%_{INHIBICJI}$ – inhibicja Hyal [%]; A_S – absorbancja mieszaniny hialuronidazy, olejku eterycznego i hialuronidazy bydlęcej (Sigma-Aldrich, USA); A_C – absorbancja mieszaniny hialuronidazy i enzymu; A_T – absorbancja mieszaniny hialuronidazy i próbki.

Wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 powtórzeń \pm SD.

3.3.1.4 Badanie aktywności inhibicyjnej względem tyrozynazy

Badanie aktywności inhibicyjnej względem tyrozynazy (Tyr) przez wybrane frakcje lotne *S. apiana* przeprowadzono w oparciu o metodę spektrofotometryczną (LEDETECT 96, Biogenet, Austria), z wykorzystaniem zmodyfikowanego, komercyjnie dostępnego zestawu MAK257 (Sigma-Aldrich, USA). W skrócie, 10 μ L próbki, 140 μ L buforu fosforowego (pH=6,8; Merck, Niemcy) i 25 μ L tyrozynazy grzybowej (125 U mL⁻¹ w buforze fosforowym pH=6,8, Sigma-Aldrich, USA) zmieszano i inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej (Thermosheiker PST-100HL, Łotwa). Dodatkowo przygotowano kontrolę bez dodatku destylatu/inhibitora (Ac). Po inkubacji, do mieszaniny dodano 25 μ L L-tyrozyny (0,3 mg mL⁻¹). Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali wynoszącej 510 nm. Jako standard wykorzystano kwas kojowy o stężeniu 1 mg mL⁻¹ (Sigma-Aldrich, USA). Aktywność anty-Tyr została wyznaczana zgodnie z następującym równaniem:

$$\%_{INHIBICJI} = \frac{\Delta A_C - \Delta A_S}{\Delta A_C} \times 100 [\%]$$

gdzie: $\%_{INHIBICJI}$ – inhibicja Tyr [%]; ΔA_S – różnica absorbancji próbki olejku eterycznego w punktach czasowych t_1 i t_2 (5 min. i 20 min.); ΔA_C – różnica absorbancji kontroli w punktach czasowych t_1 i t_2 .

3.3.2 Wpływ olejków eterycznych z *S. apiana* oraz 1,8-cineolu na obwodowe limfocyty T u osób zdrowych

3.3.2.1 Materiał roślinny do badań

Olejek eteryczny *S. apiana* Jeps. wyizolowany, na drodze hydrodestylacji, z liści rośliny gruntowej (zbiór surowca: lato 2019 r., pozyskany komercyjnie z firmy Deesis, Warszawa, Polska) oraz mikropędów, pochodzących z kolekcyjnej kultury *in vitro* szałwii białej (medium SH_B; rozdz. 3.1.8.2.4) przeznaczono do badań biologicznych przeprowadzonych na kulturach pierwotnych limfocytów T pobranych od zdrowych ochotników. Do doświadczeń włączono także dominujący składnik frakcji lotnej *S. apiana* – 1,8-cineol (Sigma-Aldrich, USA). Biomasę, wykorzystaną do otrzymania olejku eterycznego z mikropędów *in vitro*, zbierano w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego, suszono przez 24h w temp. 30°C (rozdz. 3.2.2), a następnie poddano hydrodestylacji (rozdz. 3.2.3.1.1).

3.3.2.2 Badane osoby

Materiał biologiczny stanowiła krew pobrana od zdrowych osób (n=5; 3 mężczyzn i 2 kobiety; średnia wieku: 35 lat). W badaniu brali udział ochotnicy bez zdiagnozowanych zaburzeń somatycznych oraz innych schorzeń wpływających na układ immunologiczny.

Na prowadzenie doświadczenia, na kulturze pierwotnych limfocytów T, wyraziła zgodę Niezależna Komisja Bioetyczna ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/999/2021-2022). Prace zostały wykonane we współpracy z prof. dr hab. Jackiem Witkowskim z Katedry i Zakładu Fizjopatologii GUMed.

3.3.2.3 Proliferacja limfocytów

Krew pełną pobierano do probówek VacutainerTM, zawierających antykoagulant EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy; BD Pharmingen, San Diego, USA). Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej wyizolowano z wykorzystaniem zestawu HistopaqueTM (flotacja; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) i barwiono znacznikiem fluorescencyjnym *Violet Proliferation Dye 450* (VPD450; Becton Dickinson, USA) przez 10–15 min., w ciemności, w temp. 37°C, zgodnie z protokołem prof. dr hab. J. Witkowskiego (Witkowski, 2008). Następnie, badane komórki zawieszono w kompletnej pożywce hodowlanej (RMPI 1640), uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą, 2 mM glutaminy, 100 U mL⁻¹

penicyliny oraz $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycyny (odczynniki firmy Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) w stężeniu $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, a następnie stymulowano anty-CD3 (BD Pharmingen, San Diego, USA).

Do wyizolowanych komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, namnażanych na sterylnej płytce 24-dołkowej (24 Well Cell Cluster, Corning, USA), opłaszczonej monoklonalnym przeciwciałem anty-CD3, w kompletnym środowisku hodowlanym, wprowadzano etanolowe (99,8%, POCH, Polska) roztwory: olejków eterycznych *S. apiana*, wyizolowanych z liści rośliny gruntowej i mikropędów *in vitro*, oraz 1,8-cineolu. Komórki były stymulowane wyżej wymienionymi substancjami lotnymi w trzech rozcieńczeniach: 1:400, 1:4000 oraz 1:40000 (*v/v*). Końcowe stężenie alkoholu etylowego w pożywce hodowlanej wynosiło 0,25%. Kultury limfocytów T, potraktowane badanymi frakcjami lotnymi, a także kontrole, zawierające jedynie etanol (99,8%, POCH, Polska), inkubowano w standardowych warunkach hodowlanych: 5% CO₂, 100% wilgotności, w 37°C, przez 72 i 120 h. Po zakończonym eksperymencie komórki zebrano, przemyto solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (PBS) i wybarwiono następującymi przeciwciałami: anty-CD3 skoniugowane z 5-izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC/anty-CD3), anty-CD8 skoniugowane z fikoerytryną (PE/ anty-CD8) i anty-CD4 skoniugowane z tandemowym fluoroforem emitującym czerwień, który łączy fikoerytrynę i Cy5 (RPE-Cy5/anty-CD4). Wszystkie odczynniki zakupiono w BD Pharmingen, USA.

3.3.2.4 Cytometria przepływowa

Dynamikę proliferacji wyizolowanych, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej analizowano cytometrycznie (FCSalyzer, Becton Dickinson, USA). Fenotyp komórek, parametry proliferacji oraz procesu apoptozy oceniano poprzez analizę rozproszenia światła przez powyższe komórki oraz emitowaną przez nie fluorescencję. Dynamikę proliferacji limfocytów określono metodą DCT (ang. *Diving Cell Tracking*), która pozwala śledzić podziały komórkowe za pomocą barwnika fluorescencyjnego VPD450. Wiąże się on trwale z białkami, znajdującymi się w cytoplazmie i w czasie każdego podziału jest rozdzielany równomiernie do komórek potomnych. Pomiar jego fluorescencji umożliwia natomiast ocenę liczby podziałów komórkowych. Różnicowanie limfocytów na wczesno- oraz późnoapoptyczne wykonano na podstawie zdolności do wiązania aneksyny V oraz 7- AAD, gdzie komórki żywe wyznakowane są AnnV(-)7AAD(-), komórki wczesnoapoptyczne AnnV(+)-7AAD(-), komórki późnoapoptyczne AnnV(+)-7AAD(+) i nekrotyczne AnnV(-)-7AAD(+).

3.4 Analiza statystyczna

Statystyczną analizę danych, uzyskanych, w projekcie doktorskim, w toku wszystkich prac eksperymentalnych, przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism, wersja 9 (GraphPad Software, USA) oraz Statistica PQStat (Statsoft, Polska).

W badaniach biologicznych nad kulturą pierwotną limfocytów T zgodność rozkładu danych sprawdzono testem Shapiro-Wilka i Kołmogorowa-Smirnowa. Analiza znamienności różnic między

badanymi grupami przeprowadzono za pomocą testu nieparametrycznego dla powtarzanych pomiarów (ANOVA Friedmann z testem post hoc Dunna) z poziomem istotności $p < 0,05$.

W doświadczeniach fitochemicznych oraz pozostałych badaniach dotyczących aktywności biologicznej, do weryfikacji hipotezy o nieistotności różnicy rozkładu badanej zmiennej z rozkładem normalnym, wykorzystano test Lillieforsa.

Ocenę równości wariancji przeprowadzono przy pomocy testu Levena, a do porównania badanych grup zastosowano analizę wariancji z testem LSD.

Rezultaty eksperymentów, prezentowane w ramach niniejszego projektu doktorskiego, przedstawiono na rycinach (zdjęcia, schematy, wykresy), bądź w formie tabelarycznej. Zawarte w nich wyniki stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 próbek \pm SD. Odmiernymi literami oznaczono dane różniące się statystycznie (dla poziomu ufności $p < 0,05$).

WYNIKI I WNIOSKI

Poniżej zestawiono najważniejsze wyniki badań, realizowanych w poszczególnych obszarach przedstawionego projektu doktoranckiego, a także wypływające z nich wnioski:

Badania biotechnologiczne i fitochemiczne – otrzymanie inicjalnych i kolekcyjnych kultur *in vitro* *S. apiana*

- W toku przeprowadzonych prac otrzymano, po raz pierwszy, kultury *in vitro* endemicznego gatunku *Salvia apiana* Jeps., wykorzystując do tego celu nasiona badanej rośliny.
- Sterylny materiał nasienny szalwii białej uzyskano metodą powierzchniowego odkażania materiału roślinnego roztworem podchlorynu sodu (5,25%; 5-10 min.). Zastosowana procedura sterylizacji wyjaławiania charakteryzowała się 100% skutecznością, jednak pierwotny materiał inicjalny wyróżniała niska siła kiełkowania (ok. 4%).
- Otrzymano kultury inicjalne *S. apiana* o różnym stopniu zróżnicowania tkankowego, wykorzystując do tego celu fragmenty sterylnej siewki badanego gatunku. Kultury wytrąsane korzeni anatomicznych wyprowadzono z korzeniowej części siewki, inkubując eksplantat inicjalny w płynnej pożywce Schenka-Hildebrandta (SH), suplementowanej 1,0 mg L⁻¹ kwasu indolilomasłowego (IBA), w warunkach całkowitej ciemności. Z fragmentu hypokotylowego siewki uzyskano, w warunkach oświetlenia cyklicznego, dwie linie kalusa *S. apiana*, wykorzystując do tego celu zestalone agarem podłoże Murashiga-Skooga (MS), z dodatkiem 0,5 mg L⁻¹ kinetyny oraz 1,0 mg L⁻¹ kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), a także SH, suplementowane 2,0 mg L⁻¹ kwasu indoliloctowego (IAA) i 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D. Z liścieni szalwii białej, rosnących w warunkach oświetlenia cyklicznego na stacjonarnej pożywce SH, zawierającej 2,0 mg L⁻¹ N-6-(γ,γ -dimetyloalliloamino)-puryny (2iP) oraz 0,22 mg L⁻¹ tidiazuronu (TDZ), otrzymano inicjalne kultury mikropędów.
- Na drodze wielokrotnego pasażowania biomas inicjalnych (odstępny 3-4 tygodniowe – 6 miesięcy) wyprowadzono kultury kolekcyjne *S. apiana*. Biomasy namnażano w warunkach opracowanych wcześniej dla odpowiednich kultur inicjalnych. Wyjątek stanowiły mikropędy badanego gatunku, do stabilizacji których konieczne było zastąpienie 2iP (skutecznej na etapie inicjacji kultury), benzyloaminopuryną (BAP) zastosowanego w takim samym stężeniu jak poprzednia cytokinina. Niepowodzeniem zakończyły się próby uzyskania stabilnej zawiesiny komórek parenchymatycznych *S. apiana*. Uzyskane kultury kolekcyjne charakteryzowały się dobrymi parametrami wzrostowymi. Współczynnik przyrostu Gi wynosił: dla kalusa rosnącego na podłożach MS i SH – odpowiednio ok. 1200% i 920%, dla kultury wytrąsanej korzeni odciętych – ok. 1070%, zaś dla mikropędów namnażanych na podłożu stacjonarnym – 580%.

- Otrzymano kultury korzeni transformowanych *S. apiana*, wykorzystując do tego celu linie bakteryjne *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 oraz A4, aplikowane na jałowe eksplantaty pędowe metodą nanoszenia powierzchniowego. Próby transformacji materiału roślinnego szczepem 15834 zakończyły się niepowodzeniem. Analizy PCR potwierdziły transgeniczny charakter namnożonych biomas, a także ich jałowość (bakterie usunięto, utrzymując uzyskane kultury w podłożu SH₀, wzbogaconym cefotaksymem i karbenicyliną, przez okres 3 miesięcy). W efekcie przeprowadzonych prac, wyprowadzono pięć stabilnych, zdolnych do ciągłego wzrostu, linii klonalnych korzeni włósnikowatych szałwii białej, oznaczonych symbolami: TA1, TA2 i TA3 (transformacja szczepem A4) oraz TL1 i TL2 (transformacja linią LBA 9402). Współczynniki przyrostu Gi dla linii TA i TL wynosiły odpowiednio ok. 900 i 1000%.
- Analiza mikroskopowa wyprowadzonych kultur *in vitro* *S. apiana*, wykazała, w preparatach, obecność komórek charakterystycznych dla poszczególnych typów biomas. Kultury korzeniowe charakteryzowały się występowaniem wydłużonych i cienkościennych komórek mięksiszowych strefy włósnikowej, nie stwierdzono w nich natomiast czerwono wybarwionej perydermy oraz opalizujących włosków gruczołowych. W obrazie mikroskopowym kultur kalusowych widoczne były niezróżnicowane komórki parenchymatyczne. Dodatkowo, w przypadku kalusa rosnącego na pożywce SH, stwierdzono obecność pojedynczych komórek gruczołowych typu Lamiaceae oraz włosków mechanicznych o haczykowatym kształcie. W mikropędach szałwii białej, obok mięksiszu, dominowała cienkościenna parenchyma, której towarzyszyły gruczoły wydzielnicze właściwe dla rodziny jasnotowatych.
- Opracowano protokoły izolacji olejku eterycznego oraz frakcji nietlotnych terpenów i związków polifenolowych z materiału gruntowego oraz biomas *in vitro* szałwii białej, a także warunki ich analizy z wykorzystaniem wybranych technik chromatograficznych (GC-FID i GC-MS – frakcje lotne, HPLC-DAD-ESI/MS – pozostałe związki). Zoptymalizowane metody wykorzystano do oceny profili metabolicznych kultur kolekcyjnych *S. apiana* oraz porównania ich ze składem jakościowym i ilościowym badanych połączeń naturalnych w roślinie macierzystej (liście i korzeń szałwii białej) oraz z rodzimym gatunkiem szałwii, tj. *S. officinalis* L. (liście szałwii lekarskiej).
- Oznaczono zawartość olejków eterycznych oraz określono skład jakościowy i ilościowy frakcji lotnych, pozyskanych z testowanych matryc na drodze hydrodestylacji (aparatu typu Clevengera wg FP) materiału gruntowego (liście *S. apiana* oraz *S. officinalis*) oraz biomas *in vitro* szałwii białej (korzenie odcięte, kalus i mikropędy). Spośród badanych kultur, olejek eteryczny, na poziomie pozwalającym na jego izolację oraz rejestrację stosowanymi metodami, syntezowały i akumulowały jedynie mikropędy szałwii białej, jego ilość (1,27% *v/m*) była jednak niższa w porównaniu z rośliną macierzystą (4,32% *v/m*), a także z liśćmi *S. officinalis* (2,35% *v/m*). Skład frakcji lotnej, wyizolowanej z pędów *in vitro* szałwii białej,

był zbliżony do rośliny gruntowej. Dominował w nich 1,8-cineol, ponadto nie zawierał on neurotoksycznego tujonu, charakterystycznego dla szalwii lekarskiej.

- Scharakteryzowano skład nietlotnych frakcji polifenolowych oraz terpenowych w surowcu gruntowym (liście i korzeń *S. apiana*) oraz w wyprowadzonych kulturach *in vitro* szalwii białej. W mikropędach *S. apiana* stwierdzono obecność kwasu rozmarynowego (68,8 mg g⁻¹ DW), karnozolu (6,15 mg g⁻¹ DW), hesperydyny (1,20 mg g⁻¹ DW), kwasu karnozowego (0,41 mg g⁻¹ DW) oraz rosmanolu i kryptotanszinonu (ślady). Zawartości, w pędach *in vitro*, dwóch pierwszych z wymienionych metabolitów były wyższe, odpowiednio, 3,6- oraz 1,5-krotnie, niż w liściach rośliny gruntowej. Kultury kalusów badanego gatunku, prowadzone na podłożach SH oraz MS, zawierały jedynie kwas rozmarynowy w ilości, odpowiednio: 5,60 oraz 1,92 mg g⁻¹ DW. Powyższy związek był też głównym metabolitem, stwierdzonym w korzeniach odciętych (17,22 mg g⁻¹ DW) oraz transformowanych *S. apiana* (9,83-15,32 mg g⁻¹ DW), przy czym największe jego ilości występowały w liniach transgenicznych TL1 i TL2. W żadnej z kultur korzeniowych nie wykazano natomiast obecności diterpenów, charakterystycznych dla rośliny macierzystej.

Zaprezentowane wyniki pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

- Sterylizacja materiału nasiennego przy użyciu podchlorynu sodu (5,25%), prowadzona przez 5-10 min., pozwala na uzyskanie jałowych siewek szalwii białej ze 100% skutecznością. Wybrane fragmenty siewek mogą być następnie wykorzystane, jako eksplantaty bezpośrednie, do inicjacji kultur *in vitro* *S. apiana*.
- Możliwe jest wyprowadzenie kultur *in vitro* szalwii białej o różnym stopniu cytodyferencjacji (mikropędy, kalus oraz korzenie odcięte) na drodze doboru podłoża wzrostowego ze szczególnym uwzględnieniem fitohormonów oraz warunków hodowli, a także systematycznego, okresowego pasażowania biomas inicjalnych na świeże medium doświadczalne.
- Wyprowadzenie kultur mikropędów szalwii białej wymaga zastosowania tzw. bogatego podłoża (SH), wzbogaconego w cytokininy z grupy pochodnych adeniny i fenyloamocznika (TDZ + 2iP lub TDZ + BAP), odpowiednio: na etapie inicjacji oraz stabilizacji kultury. Wykształcenie gruczołów olejkowych (m. in. struktury typu *Labiatae*) przez biomasę kolekcijną wskazuje na ich zachowaną zdolność do biosyntezy olejku eterycznego.
- Otrzymanie, z fragmentów hipokotylowych siewki *S. apiana*, kolekcyjnych kultur kalusów badanego gatunku wymaga procedury dwustopniowej: inicjacji na bogatym podłożu MS, zawierającym kombinację dwóch regulatorów wzrostu z grupy cytokinin i auksyn (kinetyny oraz 2,4-D), a następnie ich stabilizacji (ograniczenie nekrozy oraz redukcja blaszki środkowej, łączącej komórki) możliwej na tożsamym medium wzrostowym lub pożywce SH,

- suplementowanej auksynami: 2,0 mg L⁻¹ kwasu indoliloctowego (IAA) i 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D. Wykształcenie struktur wydzielniczych przez kalus kolekcyjny, namnażany na wspomnianym podłożu SH, wskazuje na jego potencjalną zdolność do biosyntezy olejku eterycznego.
- Z uwagi na skłonność komórek parenchymatycznych *S. apiana* do agregacji, a także nekrozę wspomnianej biomasy w warunkach hodowli płynnej, nie jest możliwe wyprowadzenie wytrząsanych kultur zawiesinowych badanego gatunku metodą mechanicznej dyspersji.
 - Zastosowanie płynnego medium wzrostowego SH, suplementowanego auksyną (kwas indolilomasłowy – IBA) umożliwia zarówno inicjację, jak i stabilizację kultury korzeni odciętych *S. apiana*, pozwalając na otrzymanie biomasy roślinnej, charakteryzującej się brakiem wybarwienia perydermy na kolor czerwony (wstępne wykluczenie zdolności omawianej tkanki roślinnej do biosyntezy tanszynonów).
 - Możliwe jest otrzymanie korzeni transformowanych *S. apiana* w oparciu o wybrane fragmenty sterylnych siewek niniejszej rośliny metodą pośrednią z użyciem wektora bakteryjnego *Agrobacterium rhizogenes* linii A4 oraz LBA9402. Inicjację wytrząsanych kultur korzeni włóśnikowatych, a także ich dalszą stabilizację pozwala osiągnąć płynne medium wzrostowe SH, pozbawione regulatorów wzrostu, suplementowane antybiotykami z grupy cefalosporyn III generacji (cefotaksym) oraz pochodnych penicyliny (karbenicylina).
 - Kultury mikropędów szałwii białej zachowują zdolność do akumulacji, charakterystycznego dla badanej rośliny, zespołu lotnych mono- i seskwiterpenów oraz związków polifenolowych i diterpenoidów. Wyższa, w porównaniu z rośliną gruntową, zawartość karnozolu i kwasu rozmarynowego w pędach *in vitro* *S. apiana* wskazuje na istotny potencjał tej biomasy w zakresie pozyskiwania wymienionych połączeń metodami biotechnologicznymi.
 - Spośród analizowanych metabolitów wtórnych, niezróżnicowana kultura parenchymatyczna *S. apiana* (kalus) wykazuje zdolność jedynie do biosyntezy kwasu rozmarynowego, na poziomie znacznie niższym niż wyprowadzone kultury poszczególnych organów szałwii białej. Uzyskane dane dowodzą, że status morfotyczny niniejszej biomasy roślinnej wpływa na akumulację takich zespołów związków jak: diterpenoidy typu abietanu oraz olejek eteryczny, natomiast nie determinuje zdolności kultury do biosyntezy kwasów fenolowych, w tym kwasu rozmarynowego.
 - Części podziemne roślin gruntowych *S. apiana* mogą stanowić źródło kryptotanszinonu. Przeciwnie, kultury *in vitro* korzeni odciętych i transformowanych niniejszego gatunku, zachowują jedynie zdolność do produkcji kwasu rozmarynowego i mogą stanowić alternatywne oraz selektywne źródło jego pozyskiwania. Wyniki doświadczeń dowodzą, że transformacja komórek *S. apiana* bakteriami *A. rhizogenes* LBA9402 oraz A4 nie wiąże się ze zmianą profilu metabolicznego uzyskanych korzeni włóśnikowatych, względem kultur korzeni anatomicznych.

→ Ze względu na selektywną zdolność do biosyntezy wybranych metabolitów wtórnych, uzyskane biomasy *in vitro* szałwii białej stanowią wartościowe modele roślinne do prowadzenia dalszych prac nad pozyskiwaniem kwasu rozmarynowego oraz lotnych terpenów metodami biotechnologicznymi.

Badania biotechnologiczne oraz fitochemiczne nad morfogenicznymi kulturami ciągłymi *S. apiana* – kultury korzeni

- Na drodze doboru stężenia regulatorów wzrostu w pożywce, a także reżimie oświetleniowego, opracowano warunki prowadzenia kultur wytrząsanych korzeni odciętych i transformowanych linii TA1 w systemie ciągłym.
- W doświadczeniach nad kulturami korzeni odciętych *S. apiana*, prowadzonych w skali laboratoryjnej (reżim oświetleniowy: całkowita ciemność lub oświetlenie okresowe), wykazano, że omawiane biomasy charakteryzują się szybszym wzrostem przy braku dostępu do światła. Czynnikiem wpływającym na tempo wzrostu korzeni anatomicznych szałwii białej było również stężenie dodawanej do podłoża auksyny – IBA. W eksperymencie, prowadzonym w ciemności, przez okres 48 dni, z użyciem pożywek wzbogaconych różnymi ilościami IBA, wykazano, że najlepszymi parametrami wzrostowymi oraz pożądanymi cechami makroskopowymi (brak obecności kalusa oraz zmian nekrotycznych) charakteryzuje się kultura rosnąca w podłożu SH suplementowanym IBA w ilości 1,5 (Gi = 1373,5%; DW = 14,3 g L⁻¹) lub 1,0 mg L⁻¹ (Gi = 1139,8%; DW = 13,1 g L⁻¹). Krzywe wzrostowe, wykreślone dla korzeni anatomicznych, rosnących w podłożach SH wzbogaconych 1,0 oraz 1,5 mg L⁻¹ IBA, cechował sigmoidalny przebieg, z wydłużonymi fazami: opóźnienia oraz stacjonarną. Maksymalne wartości parametrów wzrostowych wyżej wymienionych kultur odnotowano, odpowiednio, w 48. (DW = 16,5 g L⁻¹) i 33. dniu eksperymentu (DW = 15,7 g L⁻¹). Analiza HPLC-DAD-ESI/MS ekstraktów z korzeni zebranych w wyżej wymienionych dniach wykazała, że niezależnie od stężenia fitohormonu w pożywce biomasy te zawsze akumulowały wybiórczo kwas rozmarynowy, na poziomie odpowiednio: 44,5 oraz 31,7 mg g⁻¹ DW.
- W eksperymentach prowadzonych w skali wielkolaboratoryjnej, zaadaptowano kultury korzeni odciętych *S. apiana* do wzrostu w instalacjach z mieszaniem pneumatycznym (bioreaktor kolumnowo-zalewowy) oraz w systemach z fazą gazową (prototypowy bioreaktor natryskowy). Korzenie szałwii białej, namnażane przez 40 dni, w pierwszym z wymienionych bioreaktorów, w pożywce wzbogaconej 1,0 mg L⁻¹ IBA, charakteryzowały się najszybszym wzrostem (Gi = 588,2%) oraz najwyższą zawartością kwasu rozmarynowego (18,7 mg g⁻¹ DW). W przypadku bioreaktora natryskowego, maksymalna wartość Gi tkanek wynosiła 480,2%, zaś stężenie kwasu rozmarynowego – 13,8 mg g⁻¹ DW. Uzyskane wartości Gi

biomas, a także zawartości kwasu rozmarynowego w korzeniach, były ok. 2,3 razy niższe w porównaniu z odpowiednimi kulturami wytrąsanymi. Korzenie odcięte szalwii białej, prowadzone w bioreaktorach, cechowała także nasilona nekroza oraz obecność kalusa embriogenicznego.

- W eksperymentach prowadzonych w skali laboratoryjnej, mających na celu określenie dynamiki przyrostu ciągłych kultur korzeni transformowanych *S. apiana* wykazano, że niezależnie od linii (TA1-3 oraz TL1-2), biomasy te charakteryzują się zbliżonym, sigmoidalnym przebiegiem krzywych wzrostowych. W zależności od linii klonalnej, maksimum przyrostu korzeni przypadało pomiędzy 50 a 60 dniem cyklu eksperymentalnego ($G_i = 2139,7\text{-}2610,3\%$). W porównaniu do korzeni odciętych, wykazano wyraźnie mniejszą zmienność populacyjną kultur transgenicznych, co przełożyło się na wyższą powtarzalność wyników uzyskiwanych w poszczególnych doświadczeniach biotechnologicznych. Najkorzystniejszą morfologię (brak kalusa), parametry wzrostowe ($G_i = 2264,6\%$; $DW = 15,94 \text{ g L}^{-1} - 50.$ dzień eksperymentu), a także wysoką zawartość kwasu rozmarynowego ($12,76 \text{ mg g}^{-1} DW$), stwierdzono w przypadku klonu TA1.
- W doświadczeniach, prowadzonych na skalę wielkolaboratoryjną, zaadaptowano kultury korzeni transformowanych TA1 do wzrostu w bioreaktorach: kolumnowo-zalewowym oraz natryskowym. Najwyższe stężenie kwasu rozmarynowego ($39,6 \text{ mg g}^{-1} DW$) oznaczono w biomasach rosnących w systemie natryskowym (pożywka SH_0 ; zbiór surowca w dniu 60. – $G_i = 1452,4\%$). W przypadku bioreaktora kolumnowo-zalewowego, współczynnik G_i tkanek wynosił $475,54\%$, zaś zawartość w nich kwasu rozmarynowego – $13,77 \text{ mg g}^{-1} DW$ po 60 dniach doświadczenia. W drugim z omawianych systemów, zarówno kinetyka przyrostu biomasy roślinnej, jak i stężenie w niej kwasu rozmarynowego, były zbliżone do wartości odnotowanych dla korzeni rosnących w kolbach Erlenmeyera ($12,76 \text{ mg g}^{-1} DW$). Kultury biomas transformowanych *S. apiana*, prowadzone w bioreaktorach, nie wykazywały tendencji do formowania kalusa.
- Spośród otrzymanych kultur korzeniowych *S. apiana*, najwyższą produktywnością, pod względem kwasu rozmarynowego ($9,66 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), charakteryzowały się korzenie włóśnikowate linii TA1, namnażane w bioreaktorze natryskowym przez 60 dni.

Zaprezentowane wyniki pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

- Morfologia korzeni odciętych *S. apiana*, a także tempo ich wzrostu, zależą od warunków oświetleniowych oraz ilości dodawanego, do podłoża wzrostowego, IBA. Prowadzenie powyższej kultury w ciemności, w pożywce płynnej suplementowanej IBA w ilości $1,0$ lub $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ umożliwia osiągnięcie najwyższych parametrów wzrostowych tkanek, przy zachowanej prawidłowej morfologii korzeni (brak kalusowania). Analizy fitochemiczne

wykazały, że korzenie odcięte stanowią wybiórcze źródło kwasu rozmarynowego. Modyfikacje warunków oświetleniowych, a także zmiany stężenia IBA w medium odżywczym, nie wywierają wpływu na metabolizm wtórny korzeni odciętych *S. apiana* w zakresie biosyntezy wspomnianego związku.

- Możliwe jest namnażanie korzeni odciętych *S. apiana* w bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym, a także w systemach z natryskowym podawaniem pożywki. Zmiana typu hodowli z wytrząsanej na wielkolaboratoryjną powoduje nasilenie zmian nekrotycznych w wewnętrznych partiach matryc roślinnych oraz tworzenie skupisk kalusa embriogenicznego. Zastosowane instalacje bioreaktorowe nie ograniczają zarazem zdolności korzeni odciętych do wybiórczej akumulacji kwasu rozmarynowego, charakterystycznej dla biomasy kolekcyjnej oraz kultur wytrząsanych. Zawartość powyższego metabolitu wtórnego w materiale roślinnym na opisywanym etapie doświadczeń zależna jest zarówno od konstrukcji urządzenia, jak i zawartości IBA w medium wzrostowym. Dla uzyskania najlepszych rezultatów w zakresie ilości biomasy oraz zawartości kwasu rozmarynowego w tkankach, celowe jest zastosowanie bioreaktora kolumnowo-zalewowego z mieszaniem pneumatycznym.
- Transformacja komórek roślinnych *S. apiana* szczepem *A. rhizogenes* LBA9402 oraz A4, prowadząca do powstania korzeni transgenicznych, przyczynia się do wydłużenia cyklu wzrostowego wspomnianych biomas, względem profilu wzrostowego kultur wytrząsanych korzeni odciętych, skracając jednocześnie okres fazy opóźnienia.
- Zmiana sposobu kultywacji korzeni transformowanych szalwii białej, związana ze zwiększeniem skali eksperymentu (doświadczenia wielkolaboratoryjne), prowadzi do obniżenia ilości biomas (przeliczenie na litr podłoża) otrzymanych w pojedynczym cyklu eksperymentalnym, w porównaniu do kultur wytrząsanych. Pomimo negatywnego wpływu na przyrost korzeni włośnikowatych, konstrukcja zastosowanych instalacji wielkoskalowych, a w szczególności bioreaktora natryskowego, pozwala zachować, w namnażanych tkankach, stężenie kwasu rozmarynowego porównywalne z zawartością wspomnianego metabolitu w korzeniach namnażanych w kolbach Erlenmeyera.
- Korzenie *in vitro* szalwii białej (zarówno anatomiczne jak i transgeniczne) mogą być wykorzystane jako selektywne źródło kwasu rozmarynowego, przy czym wyższą produktywność kultury pod względem niniejszego metabolitu wtórnego zapewnia bioreaktor natryskowy, stosowany dla organów transformowanych (linia TA1).
- Biorąc pod uwagę wszystkie warianty doświadczalne wykonane w projekcie, można wnioskować, że wielkoskalowe kultury okresowe korzeni transformowanych *S. apiana* charakteryzują się wyższą produktywnością oraz korzystniejszymi cechami morfologicznymi (brak kalusa), w porównaniu do odpowiednich systemów *in vitro* opartych na korzeniach odciętych *S. apiana*.

Badania biotechnologiczne, fitochemiczne oraz biologiczne nad morfogenicznymi kulturami ciągłymi *S. apiana* – kultury pędów

- Zoptymalizowano warunki prowadzenia stacjonarnych (płynne i agarowe) oraz wytrząsanych kultur mikropędów *S. apiana*. Biomasy o najwyższym współczynniku przyrostu ($G_i = 641,3\%$) oraz morfologii najbardziej zbliżoną do rośliny macierzystej (bez cech wityfikacji i liści potwornych) uzyskano w warunkach kultur wytrząsanych. Krzywa wzrostowa niniejszej biomasy miała typowy przebieg, zaś maksymalny przyrost mikropędów przypadął na dzień 21. ($G_i = 734,3\%$), co odpowiadało początkowi fazy stacjonarnej, trwającej aż do 25 dnia cyklu wzrostowego.
- Mikropędy *S. apiana* zaadaptowano do wzrostu w bioreaktorach, różniących się pod względem sposobu dostarczania pożywki i napowietrzania kultury. W doświadczeniach wykorzystano instalacje okresowo-zalewowe – PLANTFORM[®] i RITA[®], a także prototypowy bioreaktor natryskowy. Spośród wszystkich hodowli mikropędów prowadzonych w urządzeniach wielkoskalowych, kultura pędów *in vitro*, namnażana z użyciem pożywki SH, suplementowanej $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP oraz $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ (SH_B), w ostatnim z wymienionych systemów, charakteryzowała się najszybszym wzrostem ($G_i = 575,9\%$), najwyższą zawartością olejku eterycznego ($1,27\%$ – 28. dzień doświadczenia) oraz największą produktywnością pod względem związków lotnych ($0,93 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ – 21-dniowy okres kultywacji).
- Dodatek ergosterolu ($10 \mu\text{M}$) do kultury mikropędów *S. apiana*, prowadzonej w bioreaktorze RITA[®] (pożywka SH_B), na końcowym etapie fazy wzrostu liniowego (14. dzień) oraz na początku fazy stacjonarnej (18. dzień), skutkowało obniżeniem zawartości lotnych terpenów ($0,46\text{-}0,64\%$ – dzień 21), względem próby zerowej ($1,10\%$), przy jednoczesnej, niewielkiej poprawie parametrów wzrostowych biomasy ($G_i = 485,9\text{-}556,6\%$).
- Dodatek chitosanu (200 mg L^{-1}) do kultury mikropędów *S. apiana*, prowadzonej w bioreaktorze RITA[®] z użyciem pożywki SH_B, na końcowym etapie fazy wzrostu liniowego (14. dzień) oraz na początku fazy stacjonarnej kultury (18. dzień), również przyczynił się do obniżenia, w testowanym systemie *in vitro*, stężenia olejku eterycznego ($0,85\text{-}1,06\%$ w dniu 21), względem próby zerowej ($1,10\%$). Podobnie jak w przypadku dodatku ergosterolu, zastosowana strategia skutkowała nieznaczną poprawą parametrów wzrostowych biomasy ($G_i = 478,8\text{-}492,3\%$).
- Wyciąg drożdżowy (50 i 100 mg L^{-1}), dodany do kultury mikropędów *S. apiana*, rosnącej w bioreaktorze RITA[®] (medium SH_B), na końcowym etapie fazy wzrostu liniowego (14. dzień) oraz na początku fazy stacjonarnej kultury (18. dzień), spowodował obniżenie zawartości frakcji lotnej w tkankach ($0,93\text{-}1,20\%$ – dzień 21.), względem próby zerowej ($1,10\%$).

Obserwowanemu zjawisku towarzyszyła niewielka poprawa parametrów wzrostowych biomasy ($G_i = 430,3-474,7\%$). Wyjątek stanowił wariant eksperymentalny, obejmujący użycie wyższego stężenia elicytora (100 mg L^{-1}), dodawanego na 7 dni przez zbiorem mikropędów, skutkujący ok. 9% wzrostem zawartości olejku eterycznego w systemie (1,20%).

- Suplementacja kultury mikropędów *S. apiana*, rosnących w bioreaktorze RITA[®] (medium SH_B), sokiem z liści pokrzywy zwyczajnej – *U. dioica* (2,5%) skutkowała, podobnie jak w przypadku pozostałych wariantów doświadczalnych, obniżeniem poziomu lotnych terpenów w tkankach (dzień 21.; 0,48%), w porównaniu z próbą zerową (1,10%). Spadek zawartości olejku eterycznego był skorelowany z zahamowaniem przyrostu biomasy ($G_i = 401,7\%$).
- Zastosowane strategie zwiększania akumulacji terpenów w mikropędach *S. apiana* (dokarmianie biomas substancjami odżywczymi, bądź elicytacja), spowodowały jedynie niewielkie różnice w składzie jakościowym i ilościowym frakcji lotnej, występujących w testowanych kulturach (analizy GC/FID oraz GC/MS). We wszystkich przypadkach, obserwowano jedynie niewielki wzrost akumulacji seskwiterpenów oraz obniżenie zawartości monoterenów utlenionych w systemie roślinnym, względem kultury referencyjnej. Ogólnie, profil metaboliczny frakcji lotnej z elicytowanych i dokarmianych substancjami odżywczymi mikropędów szalwii białej, pokrywał się ze składem jakościowym i ilościowym olejku eterycznego w badanym gatunku, opisanym w literaturze. Niezależnie od wariantu eksperymentalnego, podstawowym składnikiem lotnym badanych kultur *in vitro* był 1,8-cineol.
- Olejki eteryczne, wyizolowane z liści rośliny gruntowej oraz mikropędów *S. apiana* (biomasa kolekcyjna, jak i kultury bioreaktorowe), testowane w stężeniu $0,45 \text{ mg mL}^{-1}$, wykazały aktywność inhibicyjną wobec acetylocholinoesterazy, tyrozyminy oraz hialuronidazy. W doświadczeniach wykazano większą aktywność anty-AChE (90,33%) oraz anty-Tyr (82,38%) frakcji lotnych terpenów otrzymanych z liści rośliny gruntowej, w porównaniu z próbkami olejku eterycznego pozyskanego z biomas *in vitro* (odpowiednio, 24,73-67,78% oraz 1,92-64,54%). W testach dotyczących inhibicji hialuronidazy, najwyższą aktywnością charakteryzował się natomiast olejek eteryczny pozyskany z kultur tkankowych szalwii białej (54,27%).
- Populacje limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ (pierwotne kultury *in vitro*) okazały się wrażliwe na działanie zespołu lotnych terpenów, obecnych w surowcu gruntowym oraz w mikropędach *S. apiana*, jak również głównego składnika tych frakcji, 1,8-cineolu. W obecności olejku eterycznego (rozcieńczenia 1:400, 1:4000 oraz 1:40000) obserwowano nasilenie apoptozy (spadek udziału komórek żywych i wczesnoapoptycznych oraz wzrost ułamka komórek późnoapoptycznych i martwych), a także obniżenie proliferacji badanych komórek krwi. Obserwowany efekt był zależny od stężenia olejku eterycznego w kulturze limfocytów –

największy wzrost apoptozy oraz ograniczenie proliferacji komórek krwi odnotowano przy rozcieńczeniu 1:400, zaś działanie to utrzymywało się w czasie zarówno 72-, jak i 120-godzinnej hodowli komórek.

Zaprezentowane wyniki pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

- Mikropędy *S. apiana* zdolne są do wzrostu w zróżnicowanych typach systemów *in vitro* (kultury stacjonarne – płynne i agarowe oraz wytrząsane – płynne), wpływających bezpośrednio na tempo wzrostu biomas. Fakt ten świadczy o znacznej odporności namnażanych matryc roślinnych na stres mechaniczny oraz umiarkowanej tolerancji stanów hipoksji. Omawianą biomasę cechuje ponadto klasyczny profil wzrostowy, charakteryzujący się dynamicznym przebiegiem.
- Możliwa jest adaptacja mikropędów *S. apiana* do wzrostu w różnych typach bioreaktorów, o odmiennym systemie napowietrzania i podawania pożywki (instalacje okresowo-zalewowe oraz systemy natryskowe). Kultury bioreaktorowe pędów szaławii białej zachowały przy tym prawidłową morfologię oraz zdolność do biosyntezy zespołu lotnych terpenów, występujących zarówno w roślinie gruntowej, jak i w kulturach laboratoryjnych.
- Zmiana warunków kultywacji mikropędów szaławii białej, związana z ich wprowadzeniem do instalacji wielkolaboratoryjnych, powoduje pogorszenie parametrów wzrostowych namnażanych biomas oraz obniżenie w nich zawartości frakcji lotnych. Jedynie użycie bioreaktora natryskowego pozwoliło zachować stężenie olejku eterycznego w tkankach na poziomie kultury kolekcyjnej, przy jednoczesnym zwiększeniu skali hodowli.
- Elicytory (ergosterol, chitosan i wyciąg drożdżowy) oraz substancje odżywcze (sok z liści pokrzywy zwyczajnej), dodawane do bioreaktorowych kultur mikropędów *S. apiana*, nie spełniły oczekiwanej roli czynników stymulujących wzrost oraz/lub produktywność testowanych hodowli w zakresie frakcji lotnej. Wpływ powyższych substancji na wymienione parametry jest zależny od momentu ich wprowadzenia do systemu *in vitro*, i prawie zawsze ma wymiar negatywny. Zróżnicowane efekty poszczególnych eksperymentów, realizowanych w ramach strategii zwiększania produktywności kultur mikropędów *S. apiana*, są w przeważającej mierze trudne do interpretacji oraz sformułowania wniosków o charakterze ogólnym. Uzyskane wyniki wskazują tym samym na konieczność kontynuacji doświadczeń w opisanym zakresie, w oparciu o szerszy panel czynników stresogennych, dodawanych do hodowli w różnych dniach eksperymentu.
- Olejek eteryczny, obecny w częściach nadziemnych *S. apiana*, a także frakcje lotne, otrzymane metodami biotechnologicznymi z mikropędów badanego gatunku, mogą stanowić źródło aktywnych biologicznie związków terpenowych o potencjalnym działaniu przeciwstarzeniowym i poprawiającym funkcje poznawcze, w przebiegu chorób

neurodegeneracyjnych, z uwagi na zdolność wspomnianych substancji do hamowania aktywności enzymów takich jak: acetylocholinoesteraza, tyrozynaza i hialuronidaza.

→ Olejek eteryczny z szałwii białej wykazuje, w testach *in vitro*, działanie immunosupresyjne poprzez aktywność proapoptotyczną oraz antyproliferacyjną względem limfocytów T, co wskazuje na potencjalną możliwość wykorzystania frakcji lotnych z badanej rośliny w zapobieganiu oraz leczeniu chorób o podłożu autoimmunologicznym. Działanie takie wywierają lotne terpeny pozyskane zarówno z rośliny macierzystej, jak i z biomas *in vitro* badanego gatunku, a także główny składnik omawianego zespołu mono- i seskwiterpenów, tj. 1,8-cineol.

Za najistotniejsze osiągnięcia prezentowanej pracy doktorskiej uznano:

- ✓ Wyprowadzenie, po raz pierwszy, kultur *in vitro* endemicznego gatunku *S. apiana* o różnym stopniu zróżnicowania morfogenicznego, w tym: dwóch kultur kalusowych rosnących na różnych podłożach, mikropędów oraz korzeni anatomicznych. Ponadto, na drodze infekcji jałowych pędów szałwii białej za pomocą wektorów bakteryjnych (szczepy A4 oraz LBA9402 – *A. rhizogenes*), uzyskano kultury korzeni transgenicznych badanej rośliny (5 linii klonalnych).
- ✓ Opracowanie szczegółowej charakterystyki fitochemicznej, w zakresie lotnych mono- i seskwiterpenów (analizy GC-FID/MS), a także di- i triterpenów, kwasów fenolowych oraz flawonoidów (analizy HPLC/DAD-ESI/MS), zarówno matryc roślinnych pochodzących z szałwii białej rosnącej w warunkach naturalnych (części nadziemne oraz korzenie), jak i biomas kolekcyjnych ze wszystkich typów hodowli *in vitro*. W efekcie, możliwe było określenie potencjału wyprowadzonych kultur dotyczącego biosyntezy metabolitów wtórnych o spodziewanej aktywności biologicznej.
- ✓ Otrzymanie, w wyniku selekcji biomas (analiza przyrostu, morfologii oraz zawartości wtórnych metabolitów), trzech ciągłych kultur *S. apiana*, mogących stanowić źródło wybranych połączeń naturalnych, charakterystycznych dla rośliny macierzystej (kultury kalusowe oraz korzenie anatomiczne i odcięte – kwas rozmarynowy, mikropędy – olejek eteryczny, a także frakcje związków fenolowych i nielotnych terpenów).
- ✓ Adaptację wybranych kultur *in vitro* szałwii białej do wzrostu w skali wielkolaboratoryjnej (instalacje bioreaktorowe o zmiennym sposobie dostarczania pożywki i napowietrzania biomas roślinnych). W toku prac otrzymano następujące systemy *in vitro*:
 - Kultury korzeni odciętych *S. apiana*, prowadzone w bioreaktorze kolumnowo-zalewowym, w pożywce SH wzbogaconej 1,0 mg L⁻¹ IBA, syntezujące 18,70 mg g⁻¹ DW kwasu rozmarynowego (produktywność 4,30 mg L⁻¹ d⁻¹)
 - Kultury korzeni włóśnikowatych szałwii białej (klon TA1, uzyskany na drodze transformacji mikropędów szczepem A4 *A. rhizogenes*), namnażane w prototypowej instalacji natryskowej,

w pożywce SH, bez dodatku regulatorów wzrostu (cykl 60-dniowy), syntezujące 39,62 mg g⁻¹ DW kwasu rozmarynowego (produktywność 9,66 mg L⁻¹ d⁻¹)

- Kultury mikropędów *S. apiana*, rosnące w prototypowym bioreaktorze natryskowym, w medium odżywczym SH (cykl 21-dniowy), wzbogaconym w 2,0 mg L⁻¹ BAP oraz 0,22 µg L⁻¹ TDZ, akumulujące olejek eteryczny w ilości 1,10% (produktywność 0,93 ml L⁻¹ d⁻¹). W otrzymanej frakcji lotnej dominował, w zespole monoterypenów, 1,8-cineol (stężenie 54,30%), zaś w grupie seskwiterpenów – kariofilen (stężenie 3,05%). Podobnie jak w przypadku rośliny gruntowej, w olejku eterycznym pozyskanym z kultur *in vitro* nie stwierdzono obecności toksycznego tujonu.
- ✓ Wykazanie potencjalnego działania prozdrowotnego olejku eterycznego, wyizolowanego z liści rośliny gruntowej, a także z frakcji lotnych, występujących w kulturach mikropędów badanego gatunku. Stwierdzono aktywność proapoptotyczną powyższej grupy metabolitów wtórnych wobec limfocytów T u zdrowych ochotników (hipotetyczne zastosowanie olejku *S. apiana* w schorzeniach o podłożu autoimmunologicznym), jak również ich działanie hamujące względem acetylocholinoesterazy, tyrozynazy i hialuronidazy (możliwość wykorzystania związków lotnych z szałwii białej w chorobach neurodegeneracyjnych oraz cywilizacyjnych o podłożu zapalnym).

BIBLIOGRAFIA

- Abdalla N., El-Ramady H., Seliem M. K., El-Mahrouk M. E., Taha N., Bayoumi Y., Shalaby, T.A., Dobránszki J., 2022, *An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges*, „Horticulturae” 8, nr 8: 677, DOI: 10.3390/horticulturae8080677.
- Abreu M. E., Müller M., Alegre L., Munné-Bosch S., 2008, *Phenolic diterpene and α -tocopherol contents in leaf extracts of 60 Salvia species*, „Journal of the Science of Food and Agriculture” 88, nr 15: 2648-2653, DOI: 10.1002/jsfa.3384.
- Adams J. D., Garcia C., 2005a, *The Advantages of Traditional Chumash Healing*, „Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine” 2, nr 1: 19-23, DOI: 10.1093/ecam/neh072.
- Adams J. D., Garcia C., 2005b, *Spirit, Mind and Body in Chumash Healing*, „Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine” 2, nr 4: 459-463, DOI: 10.1093/ecam/neh130.
- Adams J. D., Garcia C., 2006, *Women's Health Among the Chumash*, „Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine” 3, nr 1: 125-131, DOI: 10.1093/ecam/nek021.
- Adelberg J., Fári M., 2010, *Applied physiology and practical bioreactors for plant propagation*, „Propagation of Ornamental Plants” 10, nr 4: 205-219.
- Adlof C. C., 2015, *How Does Harvesting Impact White Sage (Salvia apiana) as a Cultural Resource in Southern California?* [Praca magisterska, California State University].
- Afonso A. F., Pereira O. R., Fernandes Â., Calhelha R. C., Silva A. M. S., Ferreira R. C. F., Cardoso S. M., 2019a, *Phytochemical Composition and Bioactive Effects of Salvia africana, Salvia officinalis 'Icterina' and Salvia mexicana Aqueous Extracts*, „Molecules” 24, nr 23: 1-13, DOI: 10.3390/molecules24234327.
- Afonso A. F., Pereira O. R., Fernandes Â. S. F., Calhelha R. C., Silva A. M. S., Ferreira I. C. F. R., Cardoso S. M., 2019b, *The Health-Benefits and Phytochemical Profile of Salvia apiana and Salvia farinacea var. Victoria Blue Decoctions*, „Antioxidants” 8, nr 8: 241, DOI: 10.3390/antiox8080241.
- Agatonovic-Kustrin S., Kustrin E., Morton D. W., 2019, *Essential oils and functional herbs for healthy aging*, „Neural Regeneration Research” 14, nr 3: 441, DOI: 10.4103/1673-5374.245467.
- Agatonovic-Kustrin S., Morton D. W., 2018, *Essential Oils and Cognitive Performance*, w: Atta-ur-Rahman (red.), „Frontiers in Natural Product Chemistry” 4, nr 4: 91-118, DOI: 10.2174/9781681087252118040005.
- Agatonovic-Kustrin S., Wong S., Dolzhenko A. V., Gegechkori V., Ku H., Tan W. K., Morton D. W., 2023, *Effect directed analysis of bioactive compounds in leaf extracts from two Salvia species by High-performance thin-layer chromatography*, „Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis” 227: 115308, DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115308.
- Ahmed I. A., Mikail M. A., Zamakshshari N. H., Mustafa R., Hashim M., Othman R., 2022, *Trends and challenges in phytotherapy and phytocosmetics for skin aging*, „Saudi Journal of Biological Sciences” 29: 103363, DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.103363.
- Akdeniz M., Yener I., Yilmaz M. A., Irtegun Kandemir S., Tekin F., Ertas A., 2021, *A potential species for cosmetic and pharmaceutical industries: Insight to chemical and biological investigation of naturally grown and cultivated Salvia multicaulis Vahl*, „Industrial Crops and Products” 168: 113566, DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.113566.
- Akita M., Shigeoka T., Koizumi Y., Michio K., 1994, *Mass propagation of shoots of Stevia rebaudiana using a large scale bioreactor*, „Plant cell reports” 13, nr 3-4: 180, DOI: 10.1007/BF00239888.
- Akulova Z., 2011, *Salvia apiana seeds*, https://calscape.com/species_images/calphotos/images/0000_0000_1111_1178.jpeg (dostęp: 6 maja 2023).
- Alagawany M., Abd El-Hack M. E., Farag M. R., Gopi M., Karthik K., Malik Y. S., Dhama K., 2017, *Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits*, „Animal Health Research Reviews” 18, nr 2: 167-176, DOI: 10.1017/S1466252317000081.
- Ali A., Tabanca N., Demirci B., Blythe E. K., Ali Z., Baser K. H. C., Khan I. A., 2015, *Chemical Composition and Biological Activity of Four Salvia Essential Oils and Individual Compounds against Two Species of Mosquitoes*, „Journal of Agricultural and Food Chemistry” 63, nr 2: 447-456, DOI: 10.1021/jf504976f.
- Allison B. J., Allenby M. C., Bryant S. S., Min J. E., Hieromnimon M., Joyner P. M., 2017, *Antibacterial activity of fractions from three Chumash medicinal plant extracts and in vitro inhibition of the enzyme enoyl reductase by the flavonoid jaceosidin*, „Natural Product Research” 31, nr 6: 707-712, DOI: 10.1080/14786419.2016.1217201.

- Alonso-Castro J., Ertas A., Yigitkan S., Orhan I. E., 2023, *A Focused Review on Cognitive Improvement by the Genus Salvia L. (Sage)-From Ethnopharmacology to Clinical Evidence*, „Pharmaceuticals” 16, nr 2: 171, DOI: 10.3390/ph16020171.
- Amador-Patarroyo M. J., Rodriguez-Rodriguez A., Montoya-Ortiz G., 2012, *How Does Age at Onset Influence the Outcome of Autoimmune Diseases?*, „Autoimmune Diseases” 2012: 251730, DOI: 10.1155/2012/251730.
- Amirghofran Z., 2010, *Medicinal Plants as Immunosuppressive Agents in Traditional Iranian Medicine*, „Iranian Journal of Immunology” 7, nr 2: 65-73.
- Amirghofran Z., Bahmani M., Azadmehr A., Javidnia K., Ramazani M., Ziaei A., 2010, *Effect of Salvia mirzayanii on the immune system and induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes*, „Natural Product Research” 24, nr 6: 500-508, DOI: 10.1080/14786410802267502.
- Amirghofran Z., Hashemzadeh R., Javidnia K., Golmoghaddam H., Esmailbeig A., 2011, *In vitro immunomodulatory effects of extracts from three plants of the Labiatae family and isolation of the active compound(s)*, „Journal of Immunotoxicology” 8, nr 4: 265-273, DOI: 10.3109/1547691X.2011.590828.
- Anandakumar P., Kamaraj S., Vanitha M. K., 2021, *D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects*, „Journal of Food Biochemistry” 45, nr 1, DOI: 10.1111/jfbc.13566.
- Anastasiou C., Buchbauer G., 2017, *Essential Oils as Immunomodulators: Some Examples*, „Open Chemistry” 15, nr 1: 104-114, DOI: 10.1515/chem-2017-0037.
- Argyropoulos D., Müller J., 2014, *Effect of convective-, vacuum- and freeze drying on sorption behaviour and bioactive compounds of lemon balm (Melissa officinalis L.)*, „Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants” 1, nr 2: 59-69, DOI: 10.1016/j.jarmap.2014.06.001.
- Arikat N. A., Jawad F. M., Karam N. S., Shibli R. A., 2004, *Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (Salvia fruticosa Mill.)*, „Scientia Horticulturae” 100, nr 1-4: 193-202, DOI: 10.1016/j.scienta.2003.07.006.
- Arroo R. R. J., Alfermann A. W., Medarde M., Petersen M., Pras N., Woolley J. G., 2002, *Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans*, „Phytochemistry Reviews” 1, nr 1: 27-35, DOI: 10.1023/A:1015824000904.
- Attaran Dowom S., Abrishamchi P., Radjabian T., Salami S. A., 2022, *Elicitor-induced phenolic acids accumulation in Salvia virgata Jacq. hairy root cultures*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 148: 107-117, DOI: 10.1007/s11240-021-02170-8.
- Aumeeruddy-Elalfi Z., Gurib-Fakim A., Mahomoodally M. F., 2016, *Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants*, „South African Journal of Botany” 103: 89-94, DOI: 10.1016/j.sajb.2015.09.010.
- 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, nr 1: 29-36, DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.02.004.
- Baj T., Ludwiczuk A., Sieniawska E., Skalica-Woźniak K., Widelski J., Zięba K., Głowniak K., 2013, *GC-MS Analysis of Essential Oils From Salvia Officinalis L.: Comparison of extraction methods of the volatile components*, „Acta Poloniae Pharmaceutica” 70, nr 1: 35-40.
- Baque M. A., Moh S.-H. H., Lee E.-J. J., Zhong J.-J. J., Paek K.-Y. Y., 2012, *Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor*, „Biotechnology Advances” 30, nr 6: 1255-1267, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.11.004.
- Barão Paixão V. L., de Carvalho F. J., 2021, *Essential oil therapy in rheumatic diseases: A systematic review: Essential oils in rheumatic diseases*, „Complementary Therapies in Clinical Practice” 43, nr 101391, DOI: 10.1016/j.ctcp.2021.101391.
- Barbacka K., Baer-Dubowska W., 2011, *Searching for Artemisinin Production Improvement in Plants and Microorganisms*, „Current Pharmaceutical Biotechnology” 12, nr 11: 1743-1751, DOI: 10.2174/138920111798376923.
- Bassolino L., Giacomelli E., Giovannelli S., Pistelli L., Casseti A., Damonte G., Bisio A., Ruffoni B., 2015, *Tissue culture and aromatic profile in Salvia dolomitica Codd*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 121: 83-95, DOI: 10.1007/s11240-014-0681-3.
- Bavi K., Khavari-Nejad R. A., Najafi F., Ghanati F., 2022, *Phenolics and terpenoids change in response to yeast extract and chitosan elicitation in Zataria multiflora cell suspension culture*, „3 Biotech” 12, nr 8: 163, DOI: 10.1007/s13205-022-03235-x.

- Ben Jemia M., Tundis R., Pugliese A., Menichini F., Senatore F., Bruno M., ... Loizzo M. R., 2015, *Effect of bioclimatic area on the composition and bioactivity of Tunisian Rosmarinus officinalis essential oils*, „Natural Product Research” 29, nr 3: 213-222, DOI: 10.1080/14786419.2014.942305.
- Benny A., Thomas J., 2019, *Essential Oils as Treatment Strategy for Alzheimer's Disease: Current and Future Perspectives*, „Planta Medica” 85, nr 3: 239-248, DOI: 10.1055/a-0758-0188.
- Berkov S., Ivanov I., Georgiev V., Codina C., Pavlov A., 2014, *Galanthamine biosynthesis in plant in vitro systems*, „Engineering in Life Sciences” 14, nr 6: 643-650, DOI: 10.1002/elsc.201300159.
- Boix Y. F., Arruda R. C. O., Defaveri A. C. A., Sato A., Lage C. L. S., Victório C. P., 2013, *Callus in Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae): A morphoanatomical, histochemical and volatile analysis*, „Plant Biosystems” 147, nr 3: 751-757, DOI: 10.1080/11263504.2012.751067.
- Bondarev N., Reshetnyak O., Nosov A., 2002, *Features of Development of Stevia rebaudiana Shoots Cultivated in the Roller Bioreactor and their Production of Steviol Glycosides*, „Planta Medica” 68, nr 8: 759-762, DOI: 10.1055/s-2002-33809.
- Bondarev N., Reshetnyak O., Nosov A., 2003, *Effects of nutrient medium composition on development of Stevia rebaudiana shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides*, „Plant Science” 165, nr 4: 845-850, DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00283-8.
- Borek T. T., Hochrein J. M., Irwin A. N., 2003, *Composition of the essential oils from Rocky Mountain juniper (Juniperus scopulorum), Big sagebrush (Artemisia tridentata), and White Sage (Salvia apiana)*, Sandia National Laboratories, Sandia Corporation, Albuquerque, Livermore.
- Borek T. T., Hochrien J. M., Irwin A. N., 2006, *Composition of the essential oil of white sage, Salvia apiana*, „Flavour and Fragrance Journal” 21, nr 3: 571-572, DOI: 10.1002/ffj.1618.
- Bourgau F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., 2001, *Production of plant secondary metabolites: a historical perspective*, „Plant Science” 161, nr 5: 839-851, DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00490-3.
- Boutebouhart H., Didaoui L., Tata S., Sabaou N., 2019, *Effect of Extraction and Drying Method on Chemical Composition, and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils from Salvia officinalis L.*, „Journal of Essential Oil Bearing Plants” 22, nr 3: 717-727, DOI: 10.1080/0972060X.2019.1651223.
- Brown S. K., Garver W. S., Orlando R. A., 2017, *1,8-cineole: An Underappreciated Anti-inflammatory Therapeutic*, „Journal of Biomolecular Research & Therapeutics” 06, nr 01, DOI: 10.4172/2167-7956.1000154.
- Bulgakov V. P., Inyushkina Y. V., Fedoreyev S. A., 2012, *Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications*, „Critical Reviews in Biotechnology” 32, nr 3: 203-217, DOI: 10.3109/07388551.2011.596804.
- Cai Z.-M., Peng J.-Q., Chen Y., Tao L., Zhang Y.-Y., Fu L.-Y., ... Shen X.-C., 2021, *1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application*, „Journal of Asian Natural Products Research” 23, nr 10: 938-954, DOI: 10.1080/10286020.2020.1839432.
- Calgaro L. C., Aparecida V., Dos P., Melisinas S., Gonçalves J. E., 2023, *Biochemical responses and volatile compounds in a peppermint chemotype grown in a controlled environment*, „Research Square”, nr 1: 1-29, DOI:10.21203/rs.3.rs-2391173/v1.
- Cao F., Cheng M.-H., Hu L.-Q., Shen H.-H., Tao J.-H., Li X.-M., ... Gao J., 2020, *Natural products action on pathogenic cues in autoimmunity: Efficacy in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis as compared to classical treatments*, „Pharmacological Research” 160: 105054, DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105054.
- Caruso J. L., Callahan J., Dechant C., Jayasimhulu K., Winget G. D., 2000, *Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of Rosmarinus officinalis*, „Plant Cell Reports” 19, nr 5, DOI: 10.1007/s002990050763.
- Chakraborty A., Chattopadhyay S., 2008, *Stimulation of menthol production in Mentha piperita cell culture*, „In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant” 44, nr 6: 518-524, DOI: 10.1007/s11627-008-9145-y.
- Chang J. H., Shin J. H., Chung I. S., Lee H. J., 1998, *Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of Mentha piperita*, „Biotechnology Letters” 20, 1097-1099, DOI: 10.1023/A:1005396924568.
- Chen H., Chen F., Chiu F. C. K., Lo C. M. Y., 2001, *The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of Salvia miltiorrhiza*, „Enzyme and Microbial Technology” 28, nr 1: 100-105, DOI: 10.1016/s0141-0229(00)00284-2.

- Chen W., Vermaak I., Viljoen A., 2013, *Camphor – A fumigant during the black death and a coveted fragrant wood in ancient Egypt and Babylon – A review*, „Molecules” 18, nr 5: 5434-5454, DOI: 10.3390/molecules18055434.
- Ciesielska-Figlon K., Wojciechowicz K., Wardowska A., Lisowska K. A., 2023, *The Immunomodulatory Effect of Nigella sativa*, „Antioxidants” 12, nr 7: 1340, DOI: 10.3390/antiox12071340.
- Cooper G. S., Bynum M. L. K., Somers E. C., 2009, *Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: Improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases*, „Journal of Autoimmunity” 33, nr 3-4: 197-207, DOI: 10.1016/j.jaut.2009.09.008.
- Cordova-Guerrero I., Aragon-Martinez O. H., Díaz-Rubio L., Franco-Cabrera S., Serafín-Higuera N. A., Pozos-Guillén A., Pozos-Guillén A., Soto-Castro T., Isirdia-Espinoza M., 2016, *Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de Salvia apiana frente a microorganismos de importancia clínica*, „Revista Argentina de Microbiología” 48, nr 3: 217-221.
- Cortes-Morales J. A., López-Laredo A. R., Zamilpa A., Bermúdez-Torres K., Trejo-Espino J. L., Trejo-Tapia G., 2018, *Morphogenesis and secondary metabolites production in the medicinal plant castilleja tenuiflora benth. Under nitrogen deficiency and starvation stress in a temporary immersion system*, „Revista Mexicana de Ingeniería Química” 17, nr 1: 229-242.
- Coskun Y., Taslidere F., 2022, *Influence of biotic and abiotic elicitors on artemisinin, quercetin, caffeic acid and essential oil production in Artemisia dracuncululus L.*, „Flavour and Fragrance Journal” 37, nr 5: 322-330, DOI: 10.1002/ffj.3715.
- Craft J. D., Satyal P., Setzer W. N., 2017, *The Chemotaxonomy of Common Sage (Salvia officinalis) Based on the Volatile Constituents*, „Medicines” 4, nr 3: 47, DOI: 10.3390/medicines4030047.
- Croteau R., El-Bialy H., Dehal S. S., 1987, *Metabolism of Monoterpenes: Metabolic Fate of (+)-Camphor in Sage (Salvia officinalis)*, „Plant Physiology” 84, nr 3: 643-648, DOI: 10.1104/pp.84.3.643.
- Croteau R., El-Bialy H., El-Hindawi S., 1984, *Metabolism of monoterpenes: Lactonization of (+)-camphor and conversion of the corresponding hydroxy acid to the glucoside-glucose ester in sage (Salvia officinalis)*, „Archives of Biochemistry and Biophysics” 228, nr 2: 667-680, DOI: 10.1016/0003-9861(84)90037-7.
- Cuenca S., Amo-Marco J. B., 2000, *In vitro propagation of two spanish endemic species of Salvia through bud proliferation*, „In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant” 36, nr 3: 225-229, DOI: 10.1007/s11627-000-0042-2.
- Cutillas A. B., Carrasco A., Martínez-Gutiérrez R., Tomas V., Tudela J., 2018, *Rosmarinus officinalis L. essential oils from Spain: composition, antioxidant capacity, lipoxygenase and acetylcholinesterase inhibitory capacities, and antimicrobial activities*, „Plant Biosystems” 152, nr 6: 1282-1292, DOI: 10.1080/11263504.2018.1445129.
- Cvetkovikj I., Stefkov G., Acevska J., Stanoeva J. P., Karapandzova M., Stefova M., ... Kulevanova S., 2013, *Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary Salvia species from South East Europe*, „Journal of Chromatography A” 1282: 38-45, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.068.
- Cvetkovikj I., Stefkov G., Karapandzova M., Kulevanova S., 2015, *Essential oil composition of Salvia fruticosa Mill. populations from Balkan Peninsula*, „Macedonian Pharmaceutical Bulletin” 61, nr 01: 19-26, DOI: 10.33320/MACED.PHARM.BULL.2015.61.01.04.
- D'Amelia V., Ruggiero A., Tranchida-Lombardo V., Leone A., Tucci M., Docimo T., 2018, *Biosynthesis of Salvia Specialized Metabolites and Biotechnological Approaches to Increase Their Production*, w: V. Georgiev, A. Pavlov (red.), „Salvia Biotechnology”, wyd. 1, Cham, Switzerland: 241, DOI: 10.1007/978-3-319-73900-7_7.
- Darwesh H. Y., Alayafi A. A., 2018, *In vitro Propagation Response of Rosmarinus officinalis L. to Biotic and Abiotic Elicitors on Phenolic Content and Photosynthetic Pigments*, „Journal of Agricultural Science” 10, nr 2: 301, DOI: 10.5539/jas.v10n2p301.
- Das D. D., Sharma N., Chawla V., Chawla P. A., 2023, *Current Trends of Analytical Techniques for Bioactive Terpenoids: A Review*, „Critical Reviews in Analytical Chemistry”: 1-17, DOI: 10.1080/10408347.2023.2219757.
- Deepa A. V., Thomas D. T., 2022, *Tissue Culture Studies in Lamiaceae: A Review*, w: Kumar N. (red.), „Biotechnology and Crop Improvement”: 181-211, CRC, Press, New York.
- Del Baño M. J., Lorente J., Castillo J., Benavente-García O., Del Río J. A., Ortuño A., ... Gerard D., 2003, *Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of*

- Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity, „Journal of Agricultural and Food Chemistry” 51, nr 15: 4247-4253, DOI: 10.1021/jf0300745.
- Dentali S. J., Hoffmann J. J., 1992, *Potential antiinfective agents from Eriodictyon angustifolium and Salvia apiana*, „Pharmaceutical Biology” 30, nr 3: 223-231, DOI: 10.3109/13880209209054003.
- Dentali Steven John, 1991, *Potential antiinfective agents from Eriodictyon angustifolium Nutt. and Salvia apiana Jeps.* [Dysertacja doktorska, University of Arizona].
- Deschamps C., Simon J. E., 2006, *Terpenoid Essential Oil Metabolism in Basil (Ocimum basilicum L.) Following Elicitation*, „Journal of Essential Oil Research” 18, nr 6: 618-621, DOI: 10.1080/10412905.2006.9699183.
- Di Ferrante N., 1956, *Turbidimetric Measurement Of Acid Mucopoly-Saccharides And Hyaluronidase Activity*, „Journal of Biological Chemistry” 220, nr 1: 303-306, DOI: 10.1016/S0021-9258(18)65354-2.
- Diwan R., Malpathak N., 2008, *Novel technique for scaling up of micropropagated Ruta graveolens shoots using liquid culture systems: A step towards commercialization*, „New Biotechnology” 25, nr 1: 85-91, DOI: 10.1016/j.nbt.2008.02.002.
- Don M.-J., Ko H.-C., Yang C.-W., Lin Y.-L., 2020, *Detection of polyphenols and tanshinones in commercial Danshen by liquid chromatography with UV and mass spectrometry*, „Journal of Food and Drug Analysis” 14, nr 3, DOI: 10.38212/2224-6614.2473.
- Dong J., Wan G., Liang Z., 2010, *Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in Salvia miltiorrhiza cell culture*, „Journal of Biotechnology” 148, nr 2-3: 99-104, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.05.009.
- Doran P. M., 1993, *Design of reactors for plant cells and organs*, W „Bioprocess Design and Control. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 48”, Springer, Berlin, Heidelberg, 115-168, DOI: 10.1007/BFb0007198.
- Dörnenburg H., Knorr D., 1995, *Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures*, „Enzyme and Microbial Technology” 17, nr 8: 674-684, DOI: 10.1016/0141-0229(94)00108-4.
- Dreger M., Krajewska-Patan A., Górska-Paukszta M., Pieszak M., Buchwald W., Mikołajczak P., 2010, *Production of the secondary metabolites in Salvia miltiorrhiza in vitro cultures*, „Herba Polonica” 56, nr 4: 78-90.
- Ducos J. P., Terrier B., Courtois D., Pétiard V., 2008, *Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs*, „Phytochemistry Reviews” 7, nr 3: 607-613; DOI: 10.1007/s11101-008-9089-1.
- Ducos J.-P., Terrier B., Courtois D., 2009, *Disposable Bioreactors for Plant Micropropagation and Mass Plant Cell Culture*, w: Eibl, R., Eibl, D. (red.) „Disposable Bioreactors. Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology, vol 115.”, Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/10_2008_28.
- Dziomba S., Łepek T., Jaremicz Z., Łuczkiwicz M., Prahł A., Kowalski P., 2015, *Simultaneous determination of scopolamine, hyoscyamine and anisodamine in in vitro growth media of selected Solanaceae hairy roots by CE method*, „Journal of Chromatography B” 1001: 17-21, DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.06.029.
- Echeverrigaray S., Carrer R. P., Andrade L. B., 2010, *Micropropagation of Salvia guaranitica benth. Through axillary shoot proliferation*, „Brazilian Archives of Biology and Technology” 53, nr 4: 883-888, DOI: 10.1590/S1516-89132010000400018.
- Eibl R., Eibl D., 2009, *Plant Cell-Based Bioprocessing*, w: Eibl R., Eibl D., Pörtner R., Catapano G., Czermak P. (red.), „Cell and Tissue Reaction Engineering. Principles and Practice”, Springer, Berlin, Heidelberg: 315-356, DOI: 10.1007/978-3-540-68182-3_8.
- Eibl R., Eibl D., 2008, *Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures*, „Phytochemistry Reviews” 7, nr 3: 593-598, DOI: 10.1007/s11101-007-9083-z.
- El Basset W., Kanaan H., Azar S., Alhajjar L., Haddad M., 2020, *Potent Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibition Activities of the Essential Oil of Salvia Libanotica Grown in Lebanon*, „European Journal Pharmaceutical and Medical Research” 7, nr 9: 75-81.
- El Euch S. K., Hassine D. B., Cazaux S., Bouzouita N., Bouajila J., 2019, *Salvia officinalis essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities*, „South African Journal of Botany” 120, nr February 2019: 253-260, DOI: 10.1016/j.sajb.2018.07.010.
- El Jaber-Vazdekis N., Barres M. L., Ravelo Á. G., Zárate R., 2008, *Effects of Elicitors on Tropane Alkaloids and Gene Expression in Atropa baetica Transgenic Hairy Roots*, „Journal of Natural

- Products” 71, nr 12: 2026-2031, DOI: 10.1021/np800573j.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M., 1961, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, „Biochemical Pharmacology” 7, nr 2: 88-95, DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- ElNaker N. A., Daou M., Ochsenkühn M. A., Amin S. A., Yousef A. F., Yousef L. F., 2021, *A metabolomics approach to evaluate the effect of lyophilization versus oven drying on the chemical composition of plant extracts*, „Scientific Reports” 11: 22679, DOI: 10.1038/s41598-021-02158-6.
- Erdag B., Emek Y., Aydogan S., 2010, *Clonal propagation of *Dorystoechas hastata* via axillary shoot proliferation*, „Turkish Journal of Botany” 34, nr 3: 233-240, DOI: 10.3906/bot-0906-36.
- Erişen S., Kurt-Gür G., Servi H., 2020, *In vitro propagation of *Salvia sclarea* L. by meta-Topolin, and assessment of genetic stability and secondary metabolite profiling of micropropagated plants*, „Industrial Crops and Products” 157: 112892, DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112892.
- Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C., Garcia-Lara S., 2018, *In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds*, „Planta” 248: 1-18, DOI: 10.1007/s00425-018-2910-1.
- Etienne H., Berthouly M., 2002, *Temporary immersion systems in plant micropropagation*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 69, nr 3: 215-231, DOI: 10.1023/A:1015668610465.
- European Medicines Agency, 2012, *Public statement on the use of herbal medicinal products containing thujone*, EMA/HMPC/732886/2010 Rev. 1.
- European Medicines Agency, 2016, *European Union herbal monograph on *Salvia officinalis* L., folium*, EMA/HMPC/277152/2015.
- European Pharmacopoeia 11.0, 2023, *Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma*, Council of Europe, Strasbourg, France.
- Farhat A., Benmoussa H., Bachoual R., Nasfi Z., Elfalleh W., Romdhane M., Bouajila J., 2017, *Efficiency of the optimized microwave assisted extractions on the yield, chemical composition and biological activities of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. essential oil*, „Food and Bioproducts Processing” 105: 224-233, DOI: 10.1016/j.fbp.2017.07.011.
- Farmakopea Polska, 2008, wydanie VIII, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Rzeczpospolita Polska.
- Farmakopea Polska, 2014, wydanie X, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Rzeczpospolita Polska.
- Fay M. F., 1994, *In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservations?*, „Biodiversity and Conservation” 3, nr 2: 176-183, DOI: 10.1007/BF02291887.
- Fazili M. A., Bashir I., Ahmad M., Yaqoob U., Geelani S. N., 2022, *In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review*, „Bulletin of the National Research Centre” 46, nr 1: 35, DOI: 10.1186/s42269-022-00717-z.
- Frers A. K. R., Otero-Losada M., Inés Herrera M., Porta S., Cosentino V., Kerzberg E., ... Capani F., 2020, *Immune-Mediated Inflammation: Human T CD4 Helper Lymphocyte Diversity and Plasticity in Health and Disease*, w: Fuchs O., S. Shamsadin (red.) „Athari Cells of the Immune System”, IntechOpen, Rijeka, DOI: 10.5772/intechopen.89230.
- Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G., Scheffer J. J. C., 2008, *Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils*, „Flavour and Fragrance Journal” 23, nr 4: 213-226, DOI: 10.1002/ffj.1875.
- Fraternale D., Bisio A., Ricci D., 2013, *Salvia x jamensis J. Compton: In vitro regeneration of shoots through TDZ and BA*, „Plant Biosystems” 147, nr 3: 713-716, DOI: 10.1080/11263504.2013.788570.
- Frense D., 2007, *Taxanes: Perspectives for biotechnological production*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 73, nr 6: 1233-1240, DOI: 10.1007/s00253-006-0711-0.
- Frett J. F., 1987, *Influence of nutrient salts, auxins and cytokinins on the in vitro growth of *Salvia greggii**, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 9, nr 1: 89-93, DOI: 10.1007/BF00046083.
- Fu Z., Wang H., Hu X., Sun Z., Han C., 2013, *The Pharmacological Properties of *Salvia* Essential Oils*, „Journal of Applied Pharmaceutical Science” 3, nr 07: 122-127, DOI: 10.7324/JAPS.2013.3723.
- Fulzele D. P., Heble M. R. R., Rao P. S. S., 1995, *Production of terpenoid from *Artemisia annua* L. plantlet cultures in bioreactor*, „Journal of Biotechnology” 40, nr 2: 139-143, DOI: 0.1016/0168-1656(95)00034-N.

- Funk C., Koepp A. E., Croteau R., 1992, *Catabolism of camphor in tissue cultures and leaf disks of common sage (Salvia officinalis)*, „Archives of Biochemistry and Biophysics” 294, nr 1: 306-313, DOI: 10.1016/0003-9861(92)90173-T.
- Furman D., Campisi J., Verdin E., Carrera-Bastos P., Targ S., Franceschi C., ... Slavich G. M., 2019, *Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span*, „Nature Medicine” 25: 1822–1832, DOI: 10.1038/s41591-019-0675-0.
- Gai Q.-Y., Jiao J., Wang X., Zang Y.-P., Niu L.-L., Fu Y.-J., 2019, *Elicitation of Isatis tinctoria L. hairy root cultures by salicylic acid and methyl jasmonate for the enhanced production of pharmacologically active alkaloids and flavonoids*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)” 137, nr 1: 77-86, <http://link.springer.com/10.1007/s11240-018-01553-8>.
- Galan D. M., Ezeudu N. E., Garcia J., Geronimo C. A., Berry N. M., Malcolm B. J., 2020, *Eucalyptol (1,8-cineole): an underutilized ally in respiratory disorders?*, „Journal of Essential Oil Research” 32, nr 2: 103-110, DOI: 10.1080/10412905.2020.1716867.
- Garmendia A., Raigón M. D., Marques O., Ferriol M., Royo J., Merle H., 2018, *Effects of nettle slurry (Urtica dioica L.) used as foliar fertilizer on potato (Solanum tuberosum L.) yield and plant growth*, „PeerJ” 6: e4729, DOI: 10.7717/peerj.4729.
- Georgiev M. I., Eibl R., Zhong J.-J., 2013, *Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 97: 3787-3800, DOI: 10.1007/s00253-013-4817-x.
- Georgiev M. I., Pavlov A. I., Bley T., 2007, *Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 74, nr 6: 1175-1185, DOI: 10.1007/s00253-007-0856-5.
- Georgiev M. I., Weber J., Maciuk A., 2009, *Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 83, nr 5: 809-823, DOI: 10.1007/s00253-009-2049-x.
- Georgiev V., Ivanov I., Berkov S., Ilieva M., Georgiev M., Gocheva T., Pavlov A., 2012, *Galanthamine production by Leucojum aestivum l. shoot culture in a modified bubble column bioreactor with internal sections*, „Engineering in Life Sciences” 12, nr 5: 534-543, DOI: 10.1002/elsc.201100177.
- Georgiev V., Ivanov I., Berkov S., Pavlov A., 2014, *Temporary immersion systems for Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis by Pancratium maritimum L. shoot culture*, „Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology” 23, nr 4: 389-398, DOI: 10.1007/s13562-013-0222-x.
- Gerth A., Schmidt D., Wilken D., 2007, *The production of plant secondary metabolites using bioreactors*, „Acta Horticulturae” 764: 95-103, DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.764.11.
- Gębalski J., Graczyk F., Załuski D., 2022, *Paving the way towards effective plant-based inhibitors of hyaluronidase and tyrosinase: a critical review on a structure–activity relationship*, „Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry” 37, nr 1: 1120-1195, DOI: 10.1080/14756366.2022.2061966.
- Gębalski J., Małkowska M., Graczyk F., Słomka A., Piskorska E., Gawenda-Kempczyńska D., ... Załuski D., 2023, *Phenolic Compounds and Antioxidant and Anti-Enzymatic Activities of Selected Adaptogenic Plants from South America, Asia, and Africa*, „Molecules” 28, nr 16: 6004, DOI: 10.3390/molecules28166004.
- Ghanbar T., Hosseini B., Jabbarzadeh Z., Farokhzad A., Sharafi A., 2016, *High-frequency in vitro direct shoots regeneration from axillary nodal and shoot tip explants of clary sage (Salvia sclarea L.)*, „Bulgarian Journal of Agricultural Science” 22, nr 1: 73-78.
- Gharehbagh H. J., Ebrahimi M., Dabaghian F., Mojtavavi S., Hariri R., Saeedi M., ... Khanavi M., 2023, *Chemical composition, cholinesterase, and α -glucosidase inhibitory activity of the essential oils of some Iranian native Salvia species*, „BMC Complementary Medicine and Therapies” 23: 184, DOI: 10.1186/s12906-023-04004-w.
- Giannouli A., Kintzios S. E., 2000, *Essential oils of Salvia spr: Examples of Intraspecific and Seasonal Variation*, w: S. E. Kintzios (red.), „SAGE The Genus Salvia”: 69-79.
- Gokdogan Y. E., Burun B., 2022, *The Studies on Seed Germination and in Vitro Cultures of Salvia L. Species from Turkish Flora*, „Natural Products and Biotechnology” 2, nr 1: 60-73, DOI: 10.58465/natprobiotech.2022.6.
- Gonçalves S., Mansinhos I., Rodríguez-Solana R., Pérez-Santín E., Coelho N., Romano A., 2019, *Elicitation improves rosmarinic acid content and antioxidant activity in Thymus lotocephalus shoot cultures*, „Industrial Crops and Products” 137: 214-220, DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.04.071.
- Gontier E., Piutti S., Gravot A., Milesi S., Grabner A., Massot B., Lievre K., Tran M., Goergen J.L.,

- Bourgaud F., 2005, *Development and validation of an efficient low cost bioreactor for furanocoumarin production with Ruta graveolens shoot cultures.*, w: Hvoslef-Eide A. K., Preil W. (red.), „Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation, Dordrecht”, DOI: 10.1007/1-4020-3200-5.
- González A. G., Aguiar Z. E., Grillo T. A., Luis J. G., 1992, *Diterpenes and diterpene quinones from the roots of Salvia apiana*, „Phytochemistry” 31, nr 5: 1691-1695, DOI: 10.1016/0031-9422(92)83130-Q.
- Gostin I., 2008, *Effects of Different Plant Hormones on Salvia officinalis Cultivated in vitro*, „International Journal of Botany” 4: 430-436, DOI: 10.3923/ijb.2008.430.436
- Gounaris Y., 2010, *Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review.*, „Flavour and Fragrance Journal” 25, nr 5: 367-386, DOI: 10.1002/ffj.1996.
- Grant K. A., Grant V., 1964, *Mechanical Isolation of Salvia apiana and Salvia mellifera (Labiatae)*, „Evolution” 18, nr 2: 196-212, DOI: 10.2307/2406392.
- Grdiša M., Jug-dujaković M., Lončarić M., 2015, *Dalmatian Sage (Salvia officinalis L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity*, „Agriculae Conspectus Scientificus” 80, nr 2: 69-78.
- Grzegorzczak I., Bilichowski I., Mikiciuk-Olasik E., Wysokińska H., 2005, *In vitro cultures of Salvia officinalis L. as a source of antioxidant compounds*, „Acta Societatis Botanicorum Poloniae” 74, nr 1: 17-21, DOI: 10.5586/asbp.2005.003.
- 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” 77, nr 2: 99-104, DOI: 10.5586/asbp.2008.013.
- Grzegorzczak I., Wysokińska H., 2010, *Antioxidant compounds in Salvia officinalis L. shoot and hairy root cultures in the nutrient sprinkle bioreactor*, „Acta Societatis Botanicorum Poloniae” 79, nr 1: 7-10, DOI: 10.5586/asbp.2010.001.
- Grzegorzczak I., Wysokińska H., 2004, *Mikrorozmnażanie Salvia officinalis L. z wierzchołków pędów*, „Biotechnologia” 2, nr 65: 212-218.
- Grzegorzczak-Karolak I., Hnatuszko-Konka K., Krzemińska M., Olszewska M. A., Owczarek A., 2021, *Cytokinin-Based Tissue Cultures for Stable Medicinal Plant Production: Regeneration and Phytochemical Profiling of Salvia bulleyana Shoots*, „Biomolecules” 11, nr 10: 1513, DOI: 10.3390/biom11101513.
- Grzegorzczak-Karolak I., Hnatuszko-Konka K., Zarzycka M., Kuźma Ł., 2020, *The Stimulatory Effect of Purine-Type Cytokinins on Proliferation and Polyphenolic Compound Accumulation in Shoot Culture of Salvia viridis*, „Biomolecules” 10, nr 2: 178, DOI: 10.3390/biom10020178.
- Grzegorzczak-Karolak I., Krzemińska M., Kiss A. K., Olszewska M. A., Owczarek A., 2020, *Phytochemical profile and antioxidant activity of aerial and underground parts of Salvia bulleyana Diels*, „Plants, „Metabolites” 10, nr 12: 1-18, DOI: 10.3390/metabo10120497.
- Grzegorzczak-Karolak I., Rytczak P., Bielecki S., Wysokińska H., 2017, *The influence of liquid systems for shoot multiplication, secondary metabolite production and plant regeneration of Scutellaria alpina*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 128, nr 2: 479-486, DOI: 10.1007/s11240-016-1126-y.
- Grzegorzczak-Karolak I., Staniewska P., Lebelt L., Piotrowska D. G., 2022, *Optimization of cultivation conditions of Salvia viridis L. shoots in the Plantform bioreactor to increase polyphenol production*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)” 149, nr 1-2: 269-280, DOI: 10.1007/s11240-021-02168-2.
- Hafez Ghoran S., Taktaz F., Mozafari A. A., Tunçtürk M., Sekeroglu N., Kijjoa A., 2022, *Uncommon Terpenoids from Salvia Species: Chemistry, Biosynthesis and Biological Activities*, „Molecules” 27, nr 3: 1128, DOI: 1420-3049/27/3/1128.
- Hagimori M., Mikami Y., Matsumoto T., 1984, *Jar Fermenter Culture of Shoot-forming Cultures of Digitalis purpurea L. Using a Revised Medium*, „Agricultural and Biological Chemistry” 48, nr 4: 965-970, DOI: 10.1080/00021369.1984.10866243.
- Hajimehdipoor H., Saeidnia S., Gohari A., Hamedani M., Shekarchi M., 2012, *Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family*, „Pharmacognosy Magazine” 8, nr 29: 37, DOI: 10.4103/0973-1296.93316.
- Halder M., Sarkar S., Jha S., 2019, *Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures*, „Engineering in Life Sciences” 19, nr 12: 880-895, doi: 10.1002/elsc.201900058.
- Hamdeni I., Louhaichi M., Slim S., Boulila A., Bettaieb T., 2022, *Incorporation of Organic*

- Growth Additives to Enhance In Vitro Tissue Culture for Producing Genetically Stable Plants*, „Plants” 11, nr 22: 3087, DOI: 10.3390/plants11223087.
- Hazrati S., Lotfi K., Govahi M., Ebadi M., 2021, *A comparative study: Influence of various drying methods on essential oil components and biological properties of Stachys lavandulifolia*, „Food Science & Nutrition” 9, nr 5: 2612-2619, DOI: 10.1002/fsn3.2218.
- Hilton M. G., Jay A., Rhodes M. J. C., Wilson P. D. G., 1995, *Growth and monoterpene production by transformed shoot cultures of Mentha citrata and Mentha piperita in flasks and fermenters*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 43: 452-459, DOI: 10.1007/BF00218448.
- Hosoki T., Tahara Y., 1993, *In vitro propagation of Salvia leucantha Cav.*, „HortScience” 28, nr 3: 226, DOI: 10.21273/HORTSCI.28.3.226.
- Hossain M. B., Barry-Ryan C., Martin-Diana A. B., Brunton N. P., 2010, *Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs*, „Food Chemistry” 123, nr 1: 85-91, DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.003.
- Hou Y., Dan X., Babbar M., Wei Y., Hasselbalch S. G., Croteau D. L., Bohr V. A., 2019, *Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease*, „Nature Reviews Neurology” 15, nr 10: 565-581, DOI: 10.1038/s41582-019-0244-7.
- Hu J, Wang F, Liang F, Wu Z, Jiang R, Li J, Chen J, Qiu S, Wang J, Zhang Y, Li Q, Chen W, 2022, *Identification of Abietane-Type Diterpenoids and Phenolic Acids Biosynthesis Genes in Salvia apiana Jepson Through Full-Length Transcriptomic and Metabolomic Profiling*, „Frontiers in Plant Science” 13, nr 919025: 1-12, DOI: 10.3389/fpls.2022.919025.
- Huang C.-F., Lin S.-S., Liao P.-H., Young S.-C., Yang C.-C., 2008, *The Immunopharmaceutical Effects and Mechanisms of Herb Medicine*, „Cellular & Molecular Immunology” 5, nr 1: 23-31, DOI: 10.1038/cmi.2008.3.
- Huang L.-D., van Staden J., 2002, *Salvia chamelaeagnea can be micropropagated and its callus induced to produce rosmarinic acid*, „South African Journal of Botany” 68, nr 2: 177-180, DOI: 10.1016/S0254-6299(15)30417-8.
- Hussain M. J., Abbas Y., Nazli N., Fatima S., Drouet S., Hano C., Abbasi B. H., 2022, *Root Cultures, a Boon for the Production of Valuable Compounds: A Comparative Review*, „Plants” 11, nr 3: 439, DOI: 10.3390/plants11030439.
- Ikeuchi M., Favero D. S., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Rymen B., Sugimoto K., 2019, *Molecular Mechanisms of Plant Regeneration*, „Annual Review of Plant Biology” 70: 377-406, DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-100434.
- Ippoushi K., Yamaguchi Y., Itou H., Azuma K., Higashio H., 2000, *Evaluation of Inhibitory Effects of Vegetables and Herbs on Hyaluronidase and Identification of Rosmarinic Acid as a Hyaluronidase Inhibitor in Lemon Balm (Melissa officinalis L.)*, „Food Science and Technology Research” 6, nr 1: 74-77, DOI: 10.3136/fstr.6.74.
- Isah T., Umar S., Mujib A., Sharma M. P., Rajasekharan P. E., Zafar N., Frukh A., 2018, *Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)” 132: 239-265, DOI: 10.1007/s11240-017-1332-2.
- Ivanov I., Georgiev V., Berkov S., Pavlov A., 2012, *Alkaloid patterns in Leucojum aestivum shoot culture cultivated at temporary immersion conditions*, „Journal of Plant Physiology” 169, nr 2: 206-211, DOI: 10.1016/j.jplph.2011.09.010.
- Ivanov I., Georgiev V., Georgiev M., Ilieva M., Pavlov A., 2011, *Galanthamine and related alkaloids production by Leucojum aestivum L. shoot culture using a temporary immersion technology*, „Applied Biochemistry and Biotechnology” 163, nr 2: 268-277, DOI: 10.1007/s12010-010-9036-7.
- Jafari S., Daneshvar M. H., Salmi M. S., Jalal-Abadi A. L., 2017, *Indirect Organogenesis and Plant Regeneration in Common Sage (Salvia officinalis L.): An Important Medicinal Plant of Iran*, „Modern Applied Science” 11, nr 5: 22, DOI: 10.5539/mas.v11n5p22.
- Jain M., Banerji R., Nigam S., Scheffer J., Chaturvedi H., 1991, *In Vitro Production of Essential Oil from Proliferating Shoots of Rosmarinus officinalis*, „Planta Medica” 57, nr 02: 122-124, DOI: 10.1055/s-2006-960046.
- Jain N., Sharma V., Ramawat K. G., 2012, *Shoot culture of Bacopa monnieri: Standardization of explant, vessels and bioreactor for growth and antioxidant capacity*, „Physiology and Molecular Biology of Plants” 18, nr 2: 185-190; DOI: 10.1007/s12298-012-0103-0.
- Jan T., Gul S., Khan A., Pervez S., Noor A., Amin H., Bibi S., Nawaz M.A., Rahim A., Ahmad M. S., Azam R., Ullah H., 2023, *Range of factors in the reduction of hyperhydricity associated with in vitro shoots of Salvia santolinifolia Bioss*, „Brazilian Journal of Biology” 83, DOI: 10.1590/1519-6984.246904.

- Jang H. R., Lee H. J., Shohael A. M., Park B. J., Paek K. Y., Park S. Y., 2016, *Production of biomass and bioactive compounds from shoot cultures of Rosa rugosa using a bioreactor culture system*, „Horticulture Environment and Biotechnology” 57, nr 1: 79-87, DOI: 10.1007/s13580-016-0111-z.
- Jamwal K., Bhattacharya S., Puri S., 2018, *Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants*, „Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants” 9: 26-38, DOI: 10.1016/j.jarmap.2017.12.003.
- Jaremicz Z., Luczkiewicz M., Kisiel M., Zárate R., Jaber-Vazdekis N. El, Migas P., 2014, *Multi-development-HPTLC Method for Quantitation of Hyoscyamine, Scopolamine and their Biosynthetic Precursors in Selected Solanaceae Plants Grown in Natural Conditions and as In Vitro Cultures*, „Phytochemical Analysis” 25, nr 1: 29-35, DOI: 10.1002/pca.2455.
- Jaremicz Z., Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A., Krolicka A., Sowinski P., 2014, *Production of tropane alkaloids in Hyoscyamus niger (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors*, „Biotechnology Letters” 36, nr 4: 843-853, DOI: 10.1007/s10529-013-1426-9.
- Jažo Z., Glumac M., Paštar V., Bektić S., Radan M., Carev I., 2023, *Chemical Composition and Biological Activity of Salvia officinalis L. Essential Oil*, „Plants” 12, nr 9: 1794, DOI: 10.3390/plants12091794.
- Jebri M., Maaloul A., Bon J., Romdhane M., 2023, *Essential Oils of Salvia officinalis Cultivated in Tunisia: Variations Regarding Plant Organs, Harvest Time and Drying Process*, „Chemistry Africa”, DOI: 10.1007/s42250-023-00696-2.
- Jeong J. H., Jung S. J., Murthy H. N., Yu K. W., Paek K. Y., Moon H. K., Choi Y. E., 2005, *Production of eleutherosides in in vitro regenerated embryos and plantlets of Eleutherococcus chiisanensis*, „Biotechnology Letters” 27, nr 10: 701-704; DOI: 10.1007/s10529-005-4693-2.
- Jepson W. L., 1901, *Flora of Western Middle California*, Berkeley, California, Encina Publishing Company.
- Jepson W. L., 1943, *A Flora of California*, t. 3, Cunningham, Curtis & Welch.
- Jesionek A., Kokotkiewicz A., Krolicka A., Zabiegala B., Luczkiewicz M., 2018, *Elicitation strategies for the improvement of essential oil content in Rhododendron tomentosum (Ledum palustre) bioreactor-grown microshoots*, „Industrial Crops and Products” 123, nr 1: 461-469, DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.07.013.
- Jesionek A., Kokotkiewicz A., Mikosik-Roczynska A., Ciesielska-Figlon K., Luczkiewicz P., Bucinski A., ... Luczkiewicz M., 2019, *Chemical variability of Rhododendron tomentosum (Ledum palustre) essential oils and their pro-apoptotic effect on lymphocytes and rheumatoid arthritis synoviocytes*, „Fitoterapia” 139: 104402, DOI: 10.1016/j.fitote.2019.104402.
- Jesionek A., Kokotkiewicz A., Wlodarska P., Zabiegala B., Bucinski A., Luczkiewicz M., 2017, *Bioreactor shoot cultures of Rhododendron tomentosum (Ledum palustre) for a large-scale production of bioactive volatile compounds*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 131, nr 1: 51-64, DOI: 10.1007/s11240-017-1261-0.
- Jesionek A., Luczkiewicz M., Zabiegala B., Bucinski A., 2019, *From Harvesting To Distillation – Effect Of Analytical Procedures On The Yield And Chemical Composition Of Rhododendron Tomentosum (Ledum Palustre) Essential Oil*, „Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research” 76, nr 1: 83-92, DOI: 10.32383/appdr/93932.
- Jha Y., Mohamed H. I., 2022, *Plant Secondary Metabolites as a Tool to Investigate Biotic Stress Tolerance in Plants: A Review*, „Gesunde Pflanzen” 74, nr 4: 771-790, DOI: 10.1007/s10343-022-00669-4.
- Jiang Z, Gao W., Huang L., 2019, *Tanshinones, Critical Pharmacological Components in Salvia miltiorrhiza*, „Frontiers in Pharmacology” 10: 202, DOI: 10.3389/fphar.2019.00202.
- Jiang Z.-Y., Huang C.-G., Xiong H.-B., Tian K., Liu W.-X., Hu Q.-F., Wang H.-B., Yang G.-Y., Huang X.-Z., 2013, *Perovskatone A: A novel C23 terpenoid from Perovskia atriplicifolia*, „Tetrahedron Letters” 54, nr 29: 3886-3888, DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.05.056.
- Jiang Z., Kempinski C., Chappell J., 2016, *Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids*, „Current Protocols in Plant Biology” 1: 345-358, DOI: 10.1002/cppb.20024.
- Jones A. M. P., Saxena P. K., Murch S. J., 2009, *Elicitation of secondary metabolism in Echinacea purpurea L. by gibberellic acid and triazoles*, „Engineering in Life Sciences” 9, nr 3: 205-210, DOI:10.1002/elsc.200800104.
- Juergens J. L., Worth H. J., Juergens U. R., 2020, *New Perspectives for Mucoytic, Anti-inflammatory and Adjunctive Therapy with 1,8-Cineole in COPD and Asthma: Review on the New*

- Therapeutic Approach*, „Advances in Therapy” 37: 1737-1753, DOI: 10.1007/s12325-020-01279-0.
- Jug-Dujaković M., Ristić M., Pljevljakušić D., Dajić-Stevanović Z., Liber Z., Hančević K., ... Šatović Z., 2012, *High diversity of indigenous populations of dalmatian sage (Salvia officinalis L.) in essential-oil composition*, „Chemistry and Biodiversity” 9, nr 10: 2309-2323, DOI: 10.1002/cbdv.201200131.
- Kabir M. H., Mamun A. N. K., Roy P. K., Islam M. R., Jahan M. T., Talukder S. U., 2014, *In Vitro Mass Propagation of Salvia (Salvia splendens) from Nodal Explant*, „Nuclear Science And Applications” 23, nr 1&2.
- Kabouche A., Kabouche Z., 2008, *Bioactive diterpenoids of Salvia species*, „Studies in Natural Products Chemistry” 35, nr C: 753-833, DOI: 10.1016/S1572-5995(08)80017-8.
- Kai G., Liao P., Xu H., Wang J., Zhou C., Zhou W., ... Zhang L., 2012, *Molecular mechanism of elicitor-induced tanshinone accumulation in Salvia miltiorrhiza hairy root cultures*, „Acta Physiologiae Plantarum” 34, nr 4: 1421-1433, DOI: 10.1007/s11738-012-0940-z.
- Karatoprak G. Ş., Göger F., Çelik İ., Budak Ü., Akkol E. K., Aschner M., 2022, *Phytochemical profile, antioxidant, antiproliferative, and enzyme inhibition-docking analyses of Salvia ekimiana Celep & Doğan*, „South African Journal of Botany” 146, nr 5: 36-47, DOI: 10.1016/j.sajb.2021.09.033.
- Karppinen K., Hohtola A., Tolonen A., Jalonen J., György Z., Neubauer P., 2006, *Comparison of growth and secondary metabolite accumulation in cultures of compact callus aggregates and shoots of Hypericum perforatum L. in shake flasks and in a bubble column bioreactor*, „Acta Horticulturae”, 725: 605-612, DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.725.84.
- Karppinen K., György Z., Kauppinen M., Tolonen A., Jalonen J., Neubauer P., Hohtola A., Häggman H., 2006, *In vitro propagation of hypericum perforatum L. and accumulation of hypericins, pseudohypericins and phlotoglucinols*, „Propagation of Ornamental Plants” 6, nr 4: 170-179.
- Kawamura M., Shigeoka T., Akita M., Kobayashi Y., 1996, *Newly developed apparatus for inoculating plant organs into large-scale fermentor*, „Journal of Fermentation and Bioengineering” 82, nr 6: 618-619, DOI: 10.1016/S0922-338X(97)81266-4.
- Kentsop R. A. D., Iobbi V., Donadio G., Ruffoni B., De Tommasi N., Bisio A., 2021, *Abietane Diterpenoids from the Hairy Roots of Salvia corrugata*, „Molecules” 26, nr 17: 5144, DOI: 10.3390/molecules26175144.
- Khanam M. N., Anis M., Javed S. Bin, Mottaghipisheh J., Csupor D., 2022, *Adventitious Root Culture — An Alternative Strategy for Secondary Metabolite Production: A Review*, „Agronomy” 12, nr 5: 1178, https://www.mdpi.com/2073-4395/12/5/1178.
- Khare R., Upmanyu N., Jha M., 2021, *Exploring the Potential Effect of Methanolic Extract of Salvia officinalis Against UV Exposed Skin Aging: In vivo and In vitro Model*, „Current Aging Science” 14, nr 1: 46-55, DOI: 10.2174/1874609812666190808140549.
- Khodadadi F., Ahmadi F. S., Talebi M., Moshtaghi N., Matkowski A., Szumny A., Rahimmalek M., 2022, *Essential oil composition, physiological and morphological variation in Salvia abrotanoides and S. yangii under drought stress and chitosan treatments*, „Industrial Crops and Products” 187: 115429, DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115429.
- Kiferle C., Lucchesini M., Maggini R., Pardossi A., Mensuali-Sodi A., 2014, *In vitro culture of sweet basil: gas exchanges, growth, and rosmarinic acid production*, „Biologia Plantarum” 58, nr 4: 601-610, DOI: 10.1007/s10535-014-0434-5.
- Kim S. W., Lee J. H., Kim B., Yang G., Kim J. U., 2023, *Natural Products as the Potential to Improve Alzheimer's and Parkinson's Disease*, „International Journal of Molecular Sciences” 24, nr 10: 8827, DOI: 10.3390/ijms24108827.
- Kintzios S. E. (red.), 2000, *Sage The Genus Salvia*, The Netherlands Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands.
- Kokotkiewicz A., Bucinski A., Luczkiewicz M., 2014, *Light and temperature conditions affect bioflavonoid accumulation in callus cultures of Cyclopia subternata Vogel (honeybush)*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)” 118, nr 3: 589-593, DOI: 10.1007/s11240-014-0502-8.
- Kokotkiewicz A., Bucinski A., Luczkiewicz M., 2015, *Xanthone, benzophenone and bioflavonoid accumulation in Cyclopia genistoides (L.) Vent. (honeybush) shoot cultures grown on membrane rafts and in a temporary immersion system*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 120, nr 1: 373-378, DOI: 10.1007/s11240-014-0586-1.
- Kokotkiewicz A., Luczkiewicz M., Pawłowska J., Luczkiewicz P., Sowinski P., Witkowski J., ... Bucinski A., 2013, *Isolation of xanthone and benzophenone derivatives from Cyclopia genistoides (L.) Vent. (honeybush) and their pro-*

- apoptotic activity on synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis, „Fitoterapia” 90: 199-208, DOI: 10.1016/j.fitote.2013.07.020.
- Kokotkiewicz A., Wnuk M., Bucinski A., Luczkiewicz M., 2009, *In vitro Cultures of Cyclopia Plants (Honeybush) as a Source of Bioactive Xanthenes and Flavanones*, „Zeitschrift für Naturforschung C” 64, nr 7-8: 533-540, DOI: 10.1515/znc-2009-7-812.
- Kokotkiewicz A., Zabiegała B., Kubica P., Szopa A., Bucinski A., Ekiert H., Luczkiewicz M., 2021, *Accumulation of volatile constituents in agar and bioreactor shoot cultures of Verbena officinalis L.*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 144, nr 3: 671-679, DOI: 10.1007/s11240-020-01986-0.
- Kopp W., 2019, *How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases*, „Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy” 12: 2221-2236, DOI: 10.2147/DMSO.S216791.
- Kowalczyk T., Łucka M., Szemraj J., Sakowicz T., 2016, *Kultury korzeni włośnikowatych źródłem cennych biofarmaceutyków*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 70: 1-9, DOI: 10.5604/17322693.1192186.
- Kozłowska W., Matkowski A., Zielińska S., 2022, *Light Intensity and Temperature Effect on Salvia yangii (B. T. Drew) Metabolic Profile in vitro*, „Frontiers in Plant Science” 13: 888509, DOI: 10.3389/fpls.2022.888509.
- Krajewska-Patan A., Dreger M., Górska-Paukszta M., Mścisiz A., Mielcarek S., Baraniak M., Buchwald W., Marecik R., Grajek W., Mrozikiewicz P. M., 2007, *Salvia milthiorrhiza Bunge in vitro cultivation in callus cultures*, „Herba Polonica” 53, nr 4: 88-96.
- Kreis W., 2017, *The Foxgloves (Digitalis) Revisited*, „Planta Medica” 83, nr 12-13: 962-976, DOI: 10.1055/s-0043-111240.
- Krol A., Kokotkiewicz A., Szopa A., Ekiert H., Luczkiewicz M., 2020, *Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production*, w: Ramawat, K.G., Ekiert, H.M., Goyal, S. (red.) „Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry”, Springer, Cham, DOI: 10.1007/978-3-030-30185-9_34.
- Krol A., Kokotkiewicz A., Gorniak M., Naczka A. M., Zabiegała B., Gebalski J., ... Luczkiewicz M., 2023, *Evaluation of the Yield, Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oil From Bioreactor-Grown Cultures of Salvia Apiana Microshoots*, „Scientific Reports” 13, nr 7141, DOI: 10.1038/s41598-023-33950-1.
- Krol A., Kokotkiewicz A., Luczkiewicz M., 2022, *White Sage (Salvia apiana)—a Ritual and Medicinal Plant of the Chaparral: Plant Characteristics in Comparison with Other Salvia Species*, „Planta Medica” 88, nr 08: 604-627, DOI:10.1055/a-1453-0964.
- Kruglova N., Zinatullina A., Yegorova N., 2023, *Histological Approach to the Study of Morphogenesis in Callus Cultures In Vitro: A Review*, „International Journal of Plant Biology” 14, nr 2, DOI: 10.3390/ijpb14020042.
- Kuźma Ł., Bruchajzer E., Wysokińska H., 2008, *Diterpenoid Production in Hairy Root Culture of Salvia sclarea L.*, „Zeitschrift für Naturforschung C” 63, nr 7-8: 621-624, DOI: 10.1515/znc-2008-7-827.
- Kuźma Ł., Kaiser M., Wysokińska H., 2017, *The production and antiprotozoal activity of abietane diterpenes in Salvia austriaca hairy roots grown in shake flasks and bioreactor*, „Preparative Biochemistry & Biotechnology” 47, nr 1: 58-66, DOI: 10.1080/10826068.2016.1168745.
- Kuźma Ł., Bruchajzer E., Wysokińska H., 2009, *Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in Salvia sclarea hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor*, „Enzyme and Microbial Technology” 44, nr 6-7: 406-410, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.01.005.
- Kuźma Ł., Skrzypek Z., Wysokińska H., 2006, *Diterpenoids and triterpenoids in hairy roots of Salvia sclarea*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 84, nr 2: 171-179, DOI: 10.1007/s11240-005-9018-6.
- Kwaśniewska-Karolak I., Mostowski R., 2021, *Effect of different drying processes on an antioxidant potential of three species of the Lamiaceae family*, „Herba Polonica” 67, nr 1: 8-17, DOI: 10.2478/hepo-2021-0004.
- Laidlaw B. J., Craft J. E., Kaech S. M., 2016, *The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory*, „Nature Reviews Immunology” 16: 102-111, DOI: 10.1038/nri.2015.10.
- Lee J., Wang M., Zhao J., Avula B., Chittiboyina A. G., Li J., ... Khan I. A., 2022, *Chemical Authentication and Speciation of Salvia Botanicals: An Investigation Utilizing GC/Q-ToF and Chemometrics*, „Foods” 11, nr 14: 2132, DOI: 10.3390/foods11142132.
- Leelavathi D., Kuppan N., 2013, *An efficient protocol for in vitro aseptic shoot multiplication and plant regeneration of Rosmarinus officinalis - an important medicinal plant using axillary bud*, „International Journal of Pure & Applied Bioscience” 1, nr 6: 51-55.

- Leontaritou P., Lamari F. N., Papisotiropoulos V., Iatrou G., 2020, *Morphological, genetic and essential oil variation of Greek sage (Salvia fruticosa Mill.) populations from Greece*, „Industrial Crops and Products” 150: 112346, DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112346.
- Leopold S., 2019, *What is going on with White Sage?*, „Journal of Medicinal Plant Conservation”: 3-5.
- Leporini M., Bonesi M., Loizzo M. R., Passalacqua N. G., Tundis R., 2020, *The essential oil of Salvia rosmarinus Spenn. From Italy as a source of health-promoting compounds: Chemical profile and antioxidant and cholinesterase inhibitory activity*, „Plants” 9, nr 6: 1-13, DOI: 10.3390/plants9060798.
- Li B., Wang B., Li H., Peng L., Ru M., Liang Z., Yan X., Zhu Y., 2016, *Establishment of Salvia castanea Diels f. tomentosa Stib. hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag+, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation*, „Protoplasma” 253, nr 1: 87-100, DOI: 10.1007/s00709-015-0790-9.
- Li H., Gao C., Liu C., Liu L., Zhuang J., Yang J., ... Wu J., 2021, *A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone, an important active constituent in Danshen*, „Biomedicine & Pharmacotherapy” 137: 111332, DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111332.
- Li L.-N., Liu X.-Q., Zhu D.-R., Chen C., Lin Y.-L., Wang W.-L., Zhu L., Luo J.-G. Kong L. Y., 2019, *Officinalins A and B, a pair of C23 terpenoid epimers with a tetracyclic 6/7/5/5 system from: Salvia officinalis*, „Organic Chemistry Frontiers” 6, nr 19: 3369-3373, DOI: 10.1039/C9QO00861F.
- Li M.-H., Peng Y., Xiao P.-G., 2010, *Distribution of tanshinones in the genus Salvia (family Lamiaceae) from China and its systematic significance*, „Journal of Systematics and Evolution” 48, nr 2: 118-122, DOI: 10.1111/j.1759-6831.2010.00070.x.
- Li W.-J., Kong S.-Z., Luo H., Jia Z.-B., Cheng Y., 2013, *Electrochemical and spectroelectrochemical studies of four tanshinones from Salvia miltiorrhiza Bunge*, „Chinese Chemical Letters” 24, nr 12: 1145-1147, DOI: 10.1016/j.ccl.2013.08.003.
- Lin C., Zhang L., Zhang X., Wang X., Wang C., Zhang Y., Wang J., Li X., Song Z., 2022, *Spatiotemporal and Transcriptional Characterization on Tanshinone Initial Synthesis in Salvia miltiorrhiza Roots*, „International Journal of Molecular Sciences” 23, nr 21: 13607, DOI: 10.3390/ijms232113607.
- Liu B.-L., Fan Z.-B., Liu Z.-Q., Qiu X.-H., Jiang Y.-H., 2018, *Comparison of Phytochemical and Antioxidant Activities in Micropropagated and Seed-derived Salvia miltiorrhiza Plants*, „HortScience” 53, nr 7: 1038-1044, DOI: 10.21273/HORTSCI13072-18.
- Liu C. Z., Wang Y. C., Zhao B., Guo C., Ouyang F., Ye H. C., Li G. F., 1999, *Development of a nutrient mist bioreactor for growth of hairy roots*, „In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant” 35, nr 3: 271-274.
- Liu C. Z., Guo C., Wang Y. C., Ouyang F., 2003, *Comparison of various bioreactors on growth and artemisinin biosynthesis of Artemisia annua L. shoot cultures*, „Process Biochemistry” 39, nr 1: 45-49, DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00294-7.
- Liu C. Z., Wang Y. C., Guo C., Ouyang F., Ye H. C., Li G. F., 1998, *Production of artemisinin by shoot cultures of Artemisia annua L. in a modified inner-loop mist bioreactor*, „Plant Science” 135, nr 2: 211-217, DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00086-7.
- Liu C. Z., Wang Y. C., Kang X. Z., Ouyang F., Ye H. C., Li G. F., 1999, *Artemisinin production by adventitious shoots of Artemisia annua in a novel mist bioreactor*, „Acta Botanica Sinica” 41, nr 5: 524-527.
- Liu W., Chilcott C. E., Reich R. C., Hellmann G. M., 2000, *Regeneration of Salvia sclarea via organogenesis*, „In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant” 36, nr 3: 201-206, DOI: 10.1007/s11627-000-0037-z.
- Lockwood G. B., Bunrathep S., Songsak T., Ruangrunsi N., 2007, *Production of d-Limonene in Chitosan Elicited Citrus Japonica Suspension Cultures*, „Journal of Essential Oil Research” 19, nr 2: 113-116, DOI: 10.1080/10412905.2007.9699242.
- Long J. M., Holtzman D. M., 2019, *Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies*, „Cell” 179, nr 2: 312-339, DOI: 10.1016/j.cell.2019.09.001.
- Lopresti A. L., 2017, *Salvia (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects*, „Drugs in R and D” 17: 56-64, DOI: 10.1007/s40268-016-0157-5.
- Lou J., Mao Z., Shan T., Wang Q., Zhou L., 2014, *Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Properties of the Essential Oils from the Roots and Cultures of Salvia miltiorrhiza*, „Journal of Essential Oil Bearing Plants” 17, nr 3: 380-384, DOI: 10.1080/0972060X.2014.895199.

- López C. Q., Corral P., Lorrain-Lorrette B., Martinez-Swatson K., Michoux F., Simonsen H. T., 2018, *Use of a temporary immersion bioreactor system for the sustainable production of thapsigargin in shoot cultures of Thapsia garganica*, „Plant Methods” 14, nr 1: 1-17, DOI: 10.1186/s13007-018-0346-z.
- Lu Y., Foo Y. L., 2002, *Polyphenolics of Salvia—a review*, „Phytochemistry” 59, nr 2: 117-140, DOI: 10.1016/S0031-9422(01)00415-0.
- Luczkiewicz M., Jesionek A., Kokotkiewicz A., Migas P., Mardarowicz M., Szreniawa-Sztajnert A., Zabiegała B., Bucinski A., 2015, *Production of essential oils from in vitro cultures of Caryopteris species and comparison of their concentrations with in vivo plants*, „Acta Physiologiae Plantarum” 37, nr 3: 58, DOI: 10.1007/s11738-015-1804-0.
- Luis J. G., Lahlou E. H., Andrés L. S., 1996a, *Hassananes: C23terpenoids with a new type of skeleton from Salvia apiana Jeps.*, „Tetrahedron” 52, nr 37: 12309-12312.
- Luis J. G., Lahlou E. H., Andrés L. S., Sood G. H. N., Ripo M. M., Gonzilez D. B. A., 1996b, *Apiananes: C23 terpenoids with a new type of skeleton from Salvia apiana*, „Tetrahedron Letters” 37, nr 24: 4213-4216.
- Luwańska A., Wielgus K., Szalata M., Lipiński D., Zeyland J., Słomski R., 2013, *Optymalizacja warunków regeneracji in vitro szalwii lekarskiej*, „Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin” 270: 133-142, DOI: 10.37317/biul-2013-0010.
- Luczkiewicz M., Głód D., 2003, *Callus cultures of Genista plants—in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity*, „Plant Science” 165, nr 5: 1101-1108, DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00305-4.
- Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A., 2005, *Cocultures of shoots and hairy roots of Genista tinctoria L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens*, „Plant Science” 169, nr 5: 862-871, DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.06.005.
- Mahagamasekera M. G. P., Doran P. M., 1998, *Intergeneric co-culture of genetically transformed organs for the production of scopolamine*, „Phytochemistry” 47, nr 1: 17-25, DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00551-7.
- Majewska M., Szymczyk P., Gomulski J., Jeleń A., Grąbkowska R., Balcerczak E., Kuźma Ł., 2022, *The Expression Profiles of the Salvia miltiorrhiza 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase 4 Gene and Its Influence on the Biosynthesis of Tanshinones*, „Molecules” 27, nr 14: 4354, DOI: 10.3390/molecules27144354.
- Makunga N. P., van Staden J., 2008, *An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: Salvia africana-lutea L.*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 92, nr 1: 63-72, DOI: 10.1007/s11240-007-9305-5.
- Malepszy S. (red.), 2014, *Biotechnologia roślin*, wyd. 2 Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa.
- Malik S., Cusidó R. M., Mirjalili M. H., Moyano E., Palazón J., Bonfill M., 2011, *Production of the anticancer drug taxol in Taxus baccata suspension cultures: A review*, „Process Biochemistry” 46, nr 1: 23-34, DOI: 10.1016/j.procbio.2010.09.004.
- Marchev A., Haas C., Schulz S., Georgiev V., Steingroewer J., Bley T., Pavlov A., 2014, *Sage in vitro cultures: a promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances*, „Biotechnology Letters” 36, nr 2: 211-221, DOI: 10.1007/s10529-013-1350-z.
- Marchev A., Ivanov I., Denev P., Nikolova M., Gochev V., Stoyanova A., ... Georgiev V., 2015, *Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant, and antimicrobial activities of Salvia tomentosa Mill. essential oil*, „Journal of BioScience and Biotechnology,” 4, nr 2: 219-229.
- Marchev A. S., Yordanova Z. P., Georgiev M. I., 2020, *Critical Reviews in Biotechnology Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites*, „Biotechnology” 40, nr 4: 443-458, DOI: 10.1080/07388551.2020.1731414.
- Maričić B., Radman S., Romić M., Perković J., Major N., Urlič B., ... Ban S. G., 2021, *Stinging Nettle (Urtica dioica L.) as an Aqueous Plant-Based Extract Fertilizer in Green Bean (Phaseolus vulgaris L.) Sustainable Agriculture*, „Sustainability” 13, nr 7: 4042, DOI: 10.3390/su13074042.
- Marrelli M., Amodeo V., Perri M. R., Conforti F., Statti G., 2020, *Essential oils and bioactive components against arthritis: A novel perspective on their therapeutic potential*, „Plants” 9, nr 10: 1-17, DOI: 10.3390/plants9101252.
- Martini A. N., Vlachou G., Papafotiou M., 2022, *Effect of Explant Origin and Medium Plant Growth Regulators on In Vitro Shoot Proliferation and Rooting of Salvia tomentosa, a Native Sage of the Northeastern Mediterranean Basin*, „Agronomy” 12, nr 8: 1889, DOI: 10.3390/agronomy12081889.
- Mascarello C., Mantovani E., Ruffoni B., 2006, *In Vitro Culture Of Several Ornamental And*

- Medicinal Salvia Species*, „Acta Horticulturae” nr 723: 375-380, DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.723.51.
- Matkowski A., 2008, *Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review*, „Biotechnology Advances” 26, nr 6: 548-560, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
- Mecocci P., Tinarelli C., Schulz R. J., Polidori M. C., 2014, *Nutraceuticals in cognitive impairment and Alzheimer's disease*, „Frontiers in Pharmacology” 5, nr 147: 1-11, DOI: 10.3389/fphar.2014.00147.
- Mederos-Molina S., 2004, *In vitro Callus Induction and Plants from Stem and Petiole Explants of Salvia canariensis L.*, „Plant Tissue Culture” 14, nr 2: 167-172.
- Meim X.-D., Cao Y.-F., Che Y.-Y., Li J., Shang Z.-P., Zhao W.-J., Qiao Y.-J., Zhang J.-Y., 2019, *Danshen: a phytochemical and pharmacological overview*, „Chinese Journal of Natural Medicines” 17, nr 1: 59-80, DOI: 10.1016/S1875-5364(19)30010-X.
- Meyer S. E., 2008, *The Woody Plant Seed Manual. Agriculture Handbook. Specific Handling Methods and Data for 236 Genera: Salvia L.*, The U.S. Department of Agriculture (USDA), Forest Service, Agriculture Handbook 727, red. Franklin T. Bonner i Robert P. Karrfalt, Northern Research Station, Hamden, Connecticut.
- Miguel G., Cruz C., Faleiro M. L., Simões M. T. F., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G., 2011, *Salvia officinalis L. essential oils: Effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities*, „Natural Product Research” 25, nr 5: 526-541, DOI: 10.1080/14786419.2010.499513.
- Mirjalili M. H., Salehi P., Vala M. M., Ghorbanpour M., 2019, *The effect of drying methods on yield and chemical constituents of the essential oil in Lavandula angustifolia Mill. (Lamiaceae)*, „Plant Physiology Reports” 24, nr 1: 96-103, DOI: 10.1007/s40502-019-0438-4.
- Mironova V. V., Omelyanchuk N. A., Yosiphon G., Fadeev S. I., Kolchanov N. A., Mjolsness E., Likhoshvai V. A., 2010, *A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root*, „BMC Systems Biology” 4, nr 98, DOI: 10.1186/1752-0509-4-98.
- Mirza F. J., Zahid S., Holsinger R. M. D., 2023, *Neuroprotective Effects of Carnosic Acid: Insight into Its Mechanisms of Action*, „Molecules” 28, nr 5: 2306, DOI: 10.3390/molecules28052306.
- Mishra B. N., Ranjan R., 2008, *Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites*, „Biotechnology and Applied Biochemistry” 49, nr 1: 1-10, DOI: 10.1042/BA20070103.
- Miura K., Kikuzaki H., Nakatani N., 2001, *Apianane terpenoids from Salvia officinalis*, „Phytochemistry” 58, nr 8: 1171-1175, DOI: 10.1016/S0031-9422(01)00341-7.
- Mokhtarikhah G., Ebadi M.-T., Ayyari M., 2020, *Qualitative changes of spearmint essential oil as affected by drying methods*, „Industrial Crops and Products” 153: 112492, DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112492.
- Molvray M., Kores P., Chase M., 2000, *Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters*, w: K. L. Wilson, D. A. Morrison (red.), „Monocots: systematics and evolution”, Collingwood: 441-448, DOI: 10.1071/9780643090149.
- Mojzer .B E., Knez Hrnčič M., Škerget M., Knez Ž., Bren U., 2016, *Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects*, „Molecules” 21, nr 7: 901, DOI: 10.3390/molecules21070901.
- Montalvo A. M., 2004, *Salvia apiana Jepson., Wildland Shrubs of the United States and its Territories: Thammic Descriptions. General Technical Report IITF-GTR-26*, vol. 1., U.S. Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry and Rocky Mounta, wyd. Francis, 671-675.
- Montalvo A. M., Riordan E. C., Beyers J. L., 2017, *Plant Profile for Salvia apiana, Updated 2017. Native Plant Recommendations for Southern California Ecoregions.*, Riverside-Corona Resource Conservation District and U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station, Riverside, CA. 6: 1-15.
- Moreno P. R. H., van der Heijden R., Verpoorte R., 1995, *Cell and tissue cultures of Catharanthus roseus: A literature survey*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 42, nr 1: 1-25, DOI: 10.1007/BF00037677.
- Morimoto S., Goto Y., Shoyama Y., 1994, *Production of Lithospermic Acid B and Rosmarinic Acid in Callus Tissue And Regenerated Plantlets of Salvia Miltiorrhiza*, „Journal of Natural Products” 57, nr 6: 817-823, DOI: 10.1021/np50108a020.
- Mot M.-D., Gavrilas S., Lupitu A. I., Moisa C., Chambre D., Tit D. M., ... Bungau S. G., 2022, *Salvia officinalis L. Essential Oil:*

- Characterization, Antioxidant Properties, and the Effects of Aromatherapy in Adult Patients*, „Antioxidants (Basel)” 11, nr. 5: 808, DOI: 10.3390/antiox11050808.
- Moudgil K. D., Venkatesha S. H., 2022, *The Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Natural Products to Control Autoimmune Inflammation*, „International Journal of Molecular Sciences” 24, nr 1: 95, DOI: 10.3390/ijms24010095.
- Murashige T., Skoog F., 1962, *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*, „Physiologia Plantarum” 15, nr 3: 473-497, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Murthy H. N., Dandin V. S., Paek K. Y., 2016, *Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures*, „Phytochemistry Reviews” 15, nr 1: 129-145, DOI: 10.1007/s11101-014-9391-z.
- Murthy H. N., Hahn E. J., Paek K. Y., 2008, *Adventitious Roots and Secondary Metabolism*, „Chinese Journal of Biotechnology” 24, nr 5: 711-716, DOI: 10.1016/S1872-2075(08)60035-7.
- Murthy H. N., Kim Y. S., Park S. Y., Paek K. Y., 2014, *Hypericins: biotechnological production from cell and organ cultures*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 98, nr 22: 9187-9198, DOI: 10.1007/s00253-014-6119-3.
- Nadeem M., Imran M., Gondal T. A., Imran A., Shahbaz M., Amir R. M., ... Martins N., 2019, *Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review*, „Applied Sciences (Switzerland)” 9, nr 15: 3139, DOI: 10.3390/app9153139.
- Paloukopoulos C., Karioti A., 2022, *A Validated Method for the Determination of Carnosic Acid and Carnosol in the Fresh Foliage of Salvia rosmarinus and Salvia officinalis from Greece*, „Plants” 11: 3106, DOI: 10.3390/plants11223106.
- Narayani M., Srivastava S., 2017, *Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production*, „Phytochemistry Reviews” 16, nr 6: 1227-1252, DOI: 10.1007/s11101-017-9534-0.
- Németh É. Z., Nguyen T. H., 2020, *Thujone, a widely debated volatile compound: What do we know about it?*, „Phytochemistry Reviews” 19, nr 2: 405-423, DOI: 10.1007/s11101-020-09671-y.
- Noor S., Mohammad T., Rub M. A., Raza A., Azum N., Yadav D. K., ... Asiri A. M., 2022, *Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid*, „Archives of Pharmacal Research” 45, nr 4: 205-228, DOI: 10.1007/s12272-022-01378-2.
- Nygaard Sorensen J., Thorup-Kristensen K., 2011, *Plant-based fertilizers for organic vegetable production*, „Journal of Plant Nutrition and Soil Science” 174, nr 2: 321-332, DOI: 10.1002/jpln.200900321.
- Obulesu M., Rao D. M., 2011, *Effect of plant extracts on Alzheimer's disease: An insight into therapeutic avenues*, „Journal of Neurosciences in Rural Practice” 2, nr 1: 56-61; DOI: 10.4103/0976-3147.80102.
- Oledzka H., Gajdzis-Kulis D., Gaska A., Stefanska K., Bogdanowicz A., Mistrzak P., Olszowska O., 2009, *Paclitaxel and cephalomannine in in vitro cultures of Taxus cuspidata Sieb. et Zucc. shoots and plantlets*, „Herba Polonica” 55, nr 3: 231-237.
- Olszowska O., Furmanowa M., 1990, *Micropropagation of Salvia officinalis by Shoot Buds*, „Planta Medica” 56, nr 06: 637-637, DOI: 10.1055/s-2006-961281.
- Orhan I., Aslan S., Kartal M., Şener B., Hüsni Can Başer K., 2008, *Inhibitory effect of Turkish Rosmarinus officinalis L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes*, „Food Chemistry” 108, nr 2: 663-668, DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.023.
- Ott D., Hühn P., Claßen-Bockhoff R., 2016, *Salvia apiana — A carpenter bee flower?*, „Flora” 221: 82-91, DOI: 10.1016/j.flora.2015.12.008.
- Paek K. Y., Chakrabarty D., Hahn E. J., 2005, *Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 81, nr 1: 63-72, DOI: 10.1007/s11240-004-6648-z.
- Park S. Y., Paek K. Y., 2014, *Bioreactor Culture of Shoots and Somatic Embryos of Medicinal Plants for Production of Bioactive Compounds*, w: Paek, K.Y., Murthy, H., Zhong, J.J. (red.) „Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology” Springer, Dordrecht, DOI: 10.1007/978-94-017-9223-3_14.
- Patra B., Schluttenhofer C., Wu Y., Pattanaik S., Yuan L., 2013, *Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants*, „Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms” 1829, nr 11:1236-1247, DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.09.006.
- Pereira O. R., Catarino M. D., Afonso A. F., Silva A. M. S., Cardoso S. M., 2018, *Salvia elegans, salvia greggii and salvia officinalis decoctions: Antioxidant activities and inhibition of*

carbohydrate and lipid metabolic enzymes, „Molecules” 23, nr 12, DOI: 10.3390/molecules23123169.

Pérez-Alonso N., Capote A., Gerth A., Jiménez E., 2012, *Increased cardenolides production by elicitation of Digitalis lanata shoots cultured in temporary immersion systems*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 110, nr 1: 153-162, DOI: 10.1007/s11240-012-0139-4.

Pérez-Alonso N., Wilken D., Gerth A., Jähn A., Nitzsche H. M., Kerns G., Capote-Perez A., Jiménez E., 2009, *Cardiotonic glycosides from biomass of Digitalis purpurea L. cultured in temporary immersion systems*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 99, nr 2: 151-156, DOI: 10.1007/s11240-009-9587-x.

Perry N. S. L., Bollen C., Perry E. K., Ballard C., 2003, *Salvia for dementia therapy: Review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial*, „Pharmacology Biochemistry and Behavior” 75, nr 3: 651-659; DOI: 10.1016/s0091-3057(03)00108-4.

Perry N.S.L., Houghton P.J., Jenner P., Keith A., Perry E.K., 2002, *Salvia lavandulaefolia essential oil inhibits cholinesterase in vivo*, „Phytomedicine” 9, nr 1: 48-51, DOI: 10.1078/0944-7113-00082.

Petrova M., Nikolova M., Dimitrova L., Zayova E., 2015, *Micropropagation and evaluation of flavonoid content and antioxidant activity of Salvia officinalis L.*, „Genetics and Plant Physiology” 5, nr 1: 48-60.

Phrompittayarat W., Hongratanaworakit T., Sarin Tadtong K., Sareedenchai V., Ingkaninan K., 2015, *Survey of Acetylcholinesterase Inhibitory Activity in Essential Oils From Aromatic Plants*, „The Open Conference Proceedings Journal” 4, nr 1: 84-84, DOI: 10.2174/2210289201304010084.

Piactzak E., Chmiel A., Wysokińska H., 2005, *Mist trickling bioreactor for Centaurium erythraea Rafn growth of shoots and production of secoiridoids*, „Biotechnology Letters” 27, nr 10: 721-724; DOI: 10.1007/s10529-005-5189-9.

Piactzak E., Grzegorzczuk-Karolak I., Wysokińska H., 2014, *Micropropagation of Rehmannia glutinosa Libosch.: Production of phenolics and flavonoids and evaluation of antioxidant activity*, „Acta Physiologiae Plantarum” 36, nr 7: 1693-1702, DOI: 10.1007/s11738-014-1544-6.

Piactzak E., Kuźma Ł., Skała E., Żebrowska M., Balcerczak E., Wysokińska H., 2015, *Iridoid and phenylethanoid glycoside production and phenotypical changes in plants regenerated from hairy roots of Rehmannia glutinosa Libosch.*,

„Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 122, nr 2: 259-266, DOI: 10.1007/s11240-015-0727-1.

Pietrosiuk A., Furmanowa M., Łata B., 2007, *Catharanthus roseus: Micropropagation and in vitro techniques*, „Phytochemistry Reviews” 6, nr 2-3: 459-473, DOI: 10.1007/s11101-006-9049-6.

Pistelli L. L., Giovannini A., Ruffoni B., Bertoli A., Pistelli L. L., 2010, *Hairy Root Cultures for Secondary Metabolites Production*, w: Giardi, M.T., Rea, G., Berra, B. (red.) „Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology”, 698: 167-184, Springer, Boston, MA., DOI: 10.1007/978-1-4419-7347-4_13.

Pistelli L., Noccioli C., D'Angiolillo F., Pistelli L., 2013, *Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from Tuscany Islands.*, „Acta Biochimica Polonica” 60, nr 1: 43-50, DOI: 10.18388/abp.2013_1949.

Pramita A. D., Kristanti A. N., Sugiharto, Utami E. S. W., Manuhara Y. S. W., 2018, *Production of biomass and flavonoid of Gynura procumbens (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system*, „Journal of Genetic Engineering and Biotechnology” 16, nr 2: 639-643, DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.05.007.

Qiao X., Zhang Y. T., Ye M., Wang B. R., Han J., Guo D. A., 2009, *Analysis of chemical constituents and taxonomic similarity of Salvia species in China using LC/MS*, „Planta Medica” 75, nr 15: 1613-1617, DOI: 10.1055/s-0029-1185866.

Radović M., Šiler B., Nestorović Živković J., Banjanac T., Živković S., Nikolić M., ... Mišić D., 2013, *Bioreactor cultivation of Zeltnera beyrichii (Torr. & A. Gray) Mans.: A novel source of biologically active compounds*, „Records of Natural Products” 7, nr 4: 266-280.

Rahman N. A., Zakaria Z., Kadir M. O., 2003, *Influence Of Elicitor Availability On Limonene And Linalool Accumulation From Citrus Grandis Cell Cultures*, „Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences” 1: 39-49.

Raj D., Kokotkiewicz A., Luczkiewicz M., 2014, *Production of Therapeutically Relevant Indolizidine Alkaloids in Securinega suffruticosa In Vitro Shoots Maintained in Liquid Culture Systems*, „Applied Biochemistry and Biotechnology” 175, nr 3: 1576-1587, DOI: 10.1007/s12010-014-1386-0.

Rajbhar K., Dawda H., Mukundan U., 2015, *Polyphenols: Methods Of Extraction*, „Scientific Reviews & Chemical Communications” 51: 1-6.

- Ramachandra Rao S., Ravishankar G. A., 2002, *Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites*, „Biotechnology Advances” 20, nr 2: 101-153, DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.
- Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó RM, Palazon J., 2016, *Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories*, „Molecules”. 21, nr 2:182, DOI: 10.3390/molecules21020182.
- Rashed A., Rahman A. Z., Rathi D. N. G., 2021, *Essential Oils as a Potential Neuroprotective Remedy for Age-Related Neurodegenerative Diseases: A Review*, „Molecules” 26, nr 4: 1107, DOI: 10.3390/molecules2604110
- Rassem H. H. A., Nour A. H., Yunus R. M., 2016, *Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review*, „Australian Journal of Basic and Applied Sciences” 10, nr 16: 117-127.
- Reyes A., Mohanty A., Pharaon R., Massarelli E., 2022, *Association between Immunosuppressive Therapy Utilized in the Treatment of Autoimmune Disease or Transplant and Cancer Progression*, „Biomedicines”, 11, nr 1: 99, DOI: 10.3390/biomedicines11010099.
- Sadowska U., Kopeć A., Kourimska L., Zarubova L., Kloucek P., 2017, *The effect of drying methods on the concentration of compounds in sage and thyme*, „Journal of Food Processing and Preservation” 41, nr 6, DOI: 10.1111/jfpp.13286.
- Saeed M. E. M., Meyer M., Hussein A., Efferth T., 2016, *Cytotoxicity of South-African medicinal plants towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells*, „Journal of Ethnopharmacology” 186: 209-223, DOI: 10.1016/j.jep.2016.04.005.
- Sankar-Thomas Y. D., Lieberei R., 2011, *Camptothecin accumulation in various organ cultures of Camptotheca acuminata Decne grown in different culture systems*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 106, nr 3: 445-454, DOI: 10.1007/s11240-011-9942-6.
- Santos-Gomes P. C., Fernandes-Ferreira M., 2003, *Essential oils produced by in vitro shoots of sage (Salvia officinalis L.)*, „Journal of Agricultural and Food Chemistry” 51, nr 8: 2260-2266, DOI: 10.1021/jf020945v.
- Sarhadi E., Ebrahimi S. N., Hadjiakhoondi A., Manayi A., 2021, *Chemical Composition and Antioxidant Activity of Root Essential Oil of Different Salvia leriifolia Populations*, „Journal of Essential Oil Bearing Plants” 24, nr 2: 209-217, DOI: 10.1080/0972060X.2021.1921622.
- Saroya A. S., Singh J., 2018, *Neuropharmacology of Lavender, Rosemary and Salvia, Pharmacotherapeutic Potential of Natural Products in Neurological Disorders*, w: „Pharmacotherapeutic Potential of Natural Products in Neurological Disorders” 43-58, Springer, Singapore, DOI: 10.1007/978-981-13-0289-3_4.
- Savelev S., Okello E., Perry N. S. L., Wilkins R. M., Perry E. K., 2003, *Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in Salvia lavandulaefolia essential oil*, „Pharmacology Biochemistry and Behavior” 75, nr 3: 661-668, DOI: 10.1016/s0091-3057(03)00125-4.
- Schenk R. U., Hildebrandt A. C., 1972, *Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures*, „Canadian Journal of Botany” 50, nr 1: 199-204, DOI: 10.1139/b72-026.
- Schumann A., Berkov S., Claus D., Gerth A., Bastida J., Codina C., 2012, *Production of galanthamine by Leucojum aestivum shoots grown in different bioreactor systems*, „Applied Biochemistry and Biotechnology” 167, nr 7: 1907-1920, DOI: 10.1007/s12010-012-9743-3.
- Selwal N., Rahayu F., Herwati A., Latifah E., Supriyono, Suhara C., ... Wani A. K., 2023, *Enhancing secondary metabolite production in plants: Exploring traditional and modern strategies*, „Journal of Agriculture and Food Research” 14: 100702, DOI: 10.1016/j.jafr.2023.100702.
- Semwal P., Rauf A., Olatunde A., Singh P., Zaky M. Y., Islam Md. M., ... Ribaud G., 2023, *The medicinal chemistry of Urtica dioica L.: from preliminary evidence to clinical studies supporting its neuroprotective activity*, „Natural Products and Bioprospecting” 13, nr 1: 16, DOI: 10.1007/s13659-023-00380-5.
- Seong G.-U., Kim M.-Y., Chung S.-K., 2019, *Marker compounds contents of Salvia miltiorrhiza Radix depending on the cultivation regions*, „Journal of Applied Biological Chemistry” 62, nr 2: 129-135, DOI: 10.3839/jabc.2019.018.
- Sequeida Á., Tapia E., Ortega M., Zamora P., Castro Á., Montes C., Zúñiga G. E., Prieto H., 2012, *Production of phenolic metabolites by Deschampsia antarctica shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor*, „Electronic Journal of Biotechnology” 15, nr 4, DOI: 10.2225/vol15-issue4-fulltext-7.
- Sharaf-Eldin M., Elkholy S., 2009, *Artemisinin production from different shoot culture systems of*

- Artemisia annua* L., „Australian Journal of Basic and Applied Sciences” 3, nr 3: 2212-2216.
- Sharma V., Goyal S., Ramawat K. G., 2011, *Increased puerarin biosynthesis during in vitro shoot formation in Pueraria tuberosa grown in Growtek bioreactor with aeration*, „Physiology and Molecular Biology of Plants” 17, nr 1: 87-92, DOI: 10.1007/s12298-011-0049-7.
- Sharma Y., Fagan J., Schaefer J., 2020, *In vitro Screening for Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Potential in Different Extracts of Sage (Salvia officinalis L.) and Rosemary (Rosmarinus officinalis L.)*, „Journal of Biologically Active Products from Nature” 10, nr 1: 59-69.
- Shi M., Kwok K. W., Wu J. Y., 2007, *Enhancement of tanshinone production in Salvia miltiorrhiza Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor*, „Biotechnology and Applied Biochemistry” 46, nr 4: 191, DOI: 10.1042/BA20060147.
- Shimomura K., Kitazawa T., Okamura N., Yagi A., 1991, *Tanshinone Production in Adventitious Roots and Regenerates of Salvia miltiorrhiza*, „Journal of Natural Products” 54, nr 6: 1583-1587, DOI: 10.1021/np50078a014.
- Shohael A. M., Chakrabarty D., Yu K. W., Hahn E. J., Paek K. Y., 2005, *Application of bioreactor system for large-scale production of Eleutherococcus sessiliflorus somatic embryos in an air-lift bioreactor and production of eleutherosides*, „Journal of Biotechnology” 120, nr 2: 228-236, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.06.010.
- Simeoni M. C., Pellegrini M., Sergi M., Pittia P., Ricci A., Compagnone D., 2018, *Analysis of Polyphenols in the Lamiaceae Family by Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction Followed by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Determination*, „ACS Omega” 3, nr 12: 17610-17616, DOI: 10.1021/acsomega.8b02239.
- Singhal A., Bangar O., Naithani V., 2012, *Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms*, „International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases” 2, nr 2: 84, DOI: 10.4103/2231-0738.95927.
- Skąła E., Kalembe D., Wajs A., Różalski M., Krajewska U., Różalska B., Wieckowska-Szakiel M., Wysokińska H., 2007, *In vitro Propagation and Chemical and Biological Studies of the Essential Oil of Salvia przewalskii Maxim.*, „Zeitschrift für Naturforschung C” 62, nr 11-12: 839-848, DOI: 10.1515/znc-2007-11-1212.
- Skąła E., Mielicki W., Wysokińska H., 2014, *Tanshinones in culture of Salvia przewalskii maxim in vitro*, „Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica” 56, nr 1: 104-110, DOI: 10.2478/abcsb-2014-0012.
- Skendi A., Irakli M., Chatzopoulou P., 2017, *Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC*, „Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants” 6: 62-69, DOI: 10.1016/j.jarmap.2017.02.001.
- Smetanska I., 2008, *Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures*, w: Stahl, U., Donalies, U.E., Nevoigt, E. (red.), “Food Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 111.”, Springer, Berlin, Heidelberg: 187-228, DOI: 10.1007/10_2008_103.
- Smith R. W., 2015, *Salvia apiana (White sage)*, NPIN, https://www.wildflower.org/gallery/result.php?id_image=43753 (dostęp: 6 maja 2023).
- Soltis D. E., Soltis P. S., 1998, *Choosing an Approach and an Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis*, w: D. E. Soltis, P. S. Soltis, J. J. Doyle (red.), „Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing”, Massachusetts: 1-42, DOI: 10.1007/978-1-4615-5419-6.
- Strivedavyasari R., Hayes T., Ross S. A., 2017, *Phytochemical and biological evaluation of Salvia apiana*, „Natural Product Research” 31, nr 17: 2058-2061, DOI: 10.1080/14786419.2016.1269096.
- Stafiniak M., Ślusarczyk S., Pencakowski B., Matkowski A., Rahimmalek M., Bielecka M., 2021, *Seasonal Variations of Rosmarinic Acid and Its Glucoside and Expression of Genes Related to Their Biosynthesis in Two Medicinal and Aromatic Species of Salvia subg. Perovskia*, „Biology” 10, nr 6: 458, DOI: 10.3390/biology10060458.
- Steingroewer J., Bley T., Georgiev V., Ivanov I., Lenk F., Marchev A., Pavlov A., 2013, *Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems*, „Engineering in Life Sciences” 13, nr 1: 26-38, DOI: 10.1002/elsc.201100226.
- Stevens M., O'Brien B., 2003, *Plant Guide: White Sage*, The U.S. Department of Agriculture (USDA), NRCS National Plant Data Center & Rancho Santa Ana Botanic Garden.
- Steward F. C., Caplin S. M., Millar F. K., 1952, *Investigations on Growth and Metabolism of Plant Cells*, „Annals of Botany” 16, nr 1: 57-79, DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a083303.

- Studzińska-Sroka E., Dudek-Makuch M., Chanaj-Kaczmarek J., Czepulis N., Korybalska K., Rutkowski R., ... Witowski J., 2018, *Anti-inflammatory Activity and Phytochemical Profile of Galinsoga Parviflora Cav.*, „Molecules” 23, nr 9: 2133, DOI: 10.3390/molecules23092133.
- Subroto M. A., Hamill J. D., Doran P. M., 1996, *Development of shooty teratomas from several solanaceous plants: Growth kinetics, stoichiometry and alkaloid production*, „Journal of Biotechnology” 45, nr 1: 45-57, DOI: 10.1016/0168-1656(95)00142-5.
- Subroto M. A., Kwok K. H., Hamill J. D., Doran P. M., 1996, *Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites*, „Biotechnology and Bioengineering” 49, nr 5: 481-494.
- Sun Y., Skinner D. Z., Liang G. H., Hulbert S. H., 1994, *Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA*, „Theoretical and Applied Genetics” 89, nr 1: 26-32, DOI: 10.1007/BF00226978.
- Swamy M. K., Sinniah U. R., Ghasemzadeh A., 2018, *Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 102: 7775-7793, 10.1007/s00253-018-9223-y.
- Szopa A., Klimek-Szczykutowicz M., Kokotkiewicz A., Maślanka A., Król A., Luczkiewicz M., Ekiert H., 2018, *Phytochemical and biotechnological studies on Schisandra chinensis cultivar Sadova No. 1 — a high utility medicinal plant*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 102, nr 12: 5105-5120, DOI: 10.1007/s00253-018-8981-x.
- Szopa A., Kokotkiewicz A., Bednarz M., Jafernik K., Luczkiewicz M., Ekiert H., 2019, *Bioreactor type affects the accumulation of phenolic acids and flavonoids in microshoot cultures of Schisandra chinensis (Turcz.)*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)” 139, nr 1: 199-206, DOI: 10.1007/s11240-019-01676-6.
- Szopa A., Kokotkiewicz A., Król A., Luczkiewicz M., Ekiert H., 2018, *Improved production of dibenzocyclooctadiene lignans in the elicited microshoot cultures of Schisandra chinensis (Chinese magnolia vine)*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 102, nr 2: 945-959, DOI: 10.1007/s00253-017-8640-7.
- Szopa A., Kokotkiewicz A., Luczkiewicz M., Ekiert H., 2017, *Schisandra lignans production regulated by different bioreactor type*, „Journal of Biotechnology” 247: 11-17, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.02.007.
- Szpitter A., Królicka A., 2005, *Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach in vitro*, „Biotechnologia” 4, nr 71: 82-108.
- Śledzik K., Płoska R., Chmielewski M., Barembuch A., Szmelter-Jarosz A., Kędzierska-Szczepaniak A., Antonowicz P., 2023, *Multivariate Pharma Technology Transfer Analysis: Civilization Diseases and COVID-19 Perspective*, „International Journal of Environmental Research and Public Health” 20, nr 3: 1954, DOI: 10.3390/ijerph20031954.
- Tabata H., 2004, *Paclitaxel production by plant-cell-culture technology*, „Advances in biochemical engineering/biotechnology” 87: 1-23, DOI: 10.1007/b13538.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J., 1991, *Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA*, „Plant Molecular Biology” 17: 1105-1109, DOI: 10.1007/BF00037152.
- Takayama S., Akita M., 1994, *The types of bioreactors used for shoots and embryos*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 39, nr 2: 147-156, DOI: 10.1007/BF00033922.
- Takeoka G. R., Hobbs C., Park B. S., 2010, *Volatile Constituents of the Aerial Parts of Salvia apiana Jepson*, „Journal of Essential Oil Research” 22, nr 3: 241-244, DOI: 10.1080/10412905.2010.9700314.
- Takhtajan A., 2009, *Flowering Plants*, Dordrecht, Springer Dordrecht, DOI: 10.1007/978-1-4020-9609-9.
- Tapia A., Cheel J., Theoduloz C., Rodríguez J., Schmeda-Hirschmann G., Gerth A., Wilken D., Jordan M., Jiménez-González E., Gomez-Kosky R., Mendoza E. Q., 2007, *Free radical scavengers from Cymbopogon citratus (DC.) stapf plants cultivated in bioreactors by the temporary immersion (TIS) principle*, „Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences” 62, nr 5-6: 447-457, DOI: 10.1515/znc-2007-5-620.
- Taya M., Yoyama A., Kondo O., Kobayashi T., Matsui C., 1989, *Growth Characteristics of Plant Hairy Roots and Their Cultures in Bioreactors*, „Journal of Chemical Engineering of Japan” 22, nr 1.

- Tholl D., 2015, *Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants*, w: Schrader, J., Bohlmann, J. (red.) "Biotechnology of Isoprenoids. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology" 148, 63-106, Springer, Cham, DOI: 10.1007/10_2014_295.
- Thorsted S., 2016, *Salvia apiana*, <https://calscape.org/photos/3353/ord-artist/> (dostęp: 6 maja 2023).
- Tibaldi G., Fontana E., Nicola S., 2005, *Cultivation practices do not change the Salvia sclarea L. essential oil but drying process does*, "Journal of Food Agriculture and Environment" 8, nr 3: 790-794.
- Timbrook J., 1986, *Chia and the Chumash: A Reconsideration of Sage Seeds in Southern California*, "Journal of California and Great Basin Anthropology" 8, nr 1: 50-64.
- Timbrook J., 1990, *Ethnobotany of Chumash Indians, California, Based on Collections by John P. Harrington*, "Economic Botany" 44, nr 2: 236-253, DOI: 10.1007/BF02860489.
- Towler M. J., Kim Y., Wyslouzil B. E., Correll M. J., Weathers P. J., 2007, *Design, Development, And Applications Of Mist Bioreactors For Micropropagation And Hairy Root Culture*, w: Gupta, S.D., Ibaraki, Y. (red.) "Plant Tissue Culture Engineering. Focus on Biotechnology, vol 6.", Springer, Dordrecht., DOI: 10.1007/978-1-4020-3694-1_7.
- Trócsányi E., György Z., Zámoriné-Németh É., 2020, *New insights into rosmarinic acid biosynthesis based on molecular studies*, "Current Plant Biology" 23: 100162, DOI: 10.1016/j.cpb.2020.100162.
- Tsai K. L., Chen E. G., Chen J. T., 2016, *Thidiazuron-induced efficient propagation of Salvia miltiorrhiza through in vitro organogenesis and medicinal constituents of regenerated plants*, "Acta Physiologiae Plantarum" 38, nr 1: 1-9, DOI: 10.1007/s11738-015-2051-0.
- Tugizimana F., Steenkamp P. A., Piater L. A., Dubery I. A., 2012, *Ergosterol-Induced Sesquiterpenoid Synthesis in Tobacco Cells*, "Molecules" 17, nr 2: 1698-1715, DOI: 10.3390/molecules17021698.
- Tugizimana F., Steenkamp P. A., Piater L. A., Dubery I. A., 2014, *Multi-Platform Metabolomic Analyses of Ergosterol-Induced Dynamic Changes in Nicotiana tabacum Cells*, "PLoS ONE" 9, nr 1: e87846, DOI: 10.1371/journal.pone.0087846.
- Tundis R., Leporini M., Bonesi M., Rovito S., Passalacqua N. G., 2020, *Salvia officinalis L. from Italy: A Comparative Chemical and Biological Study of Its Essential Oil in the Mediterranean Context*, "Molecules" 25, nr 24: 5826, DOI: 10.3390/molecules25245826.
- Tzima K., Brunton N. P., Rai D. K., 2018, *Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in Lamiaceae plants — a review*, "Plants" 7, nr 2: 1-30, DOI: 10.3390/plants7020025.
- Uribe E., Marín D., Vega-Gálvez A., Quispe-Fuentes I., Rodríguez A., 2016, *Assessment of vacuum-dried peppermint (Mentha piperita L.) as a source of natural antioxidants*, "Food Chemistry" 190: 559-565, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.108.
- Vaccaro M., Bernal V. O., Malafronte N., De Tommasi N., Leone A., 2019, *High Yield of Bioactive Abietane Diterpenes in Salvia sclarea Hairy Roots by Overexpressing Cyanobacterial DXS or DXR Genes*, "Planta Medica" 85, nr 11-12: 973-980, DOI: 10.1055/a-0895-5878.
- Valdez-Tapia R., Capataz-Tafur J., López-Laredo A. R., Trejo-Espino J. L., Trejo-Tapia G., 2014, *Effect of immersion cycles on growth, phenolics content, and antioxidant properties of Castilleja tenuiflora shoots*, "In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant" 50, nr 4: 471-477, DOI: 10.1007/s11627-014-9621-5.
- Valdiani A., Hansen O. K., Nielsen U. B., Johannsen V. K., Shariat M., Georgiev M. I., Omidvar V., Ebrahimi M., Dinanai E. T., Abiri R., 2019, *Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects*, "Critical Reviews in Biotechnology" 39, nr 1: 20-34, <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1489778>.
- Van Der Heijden R., Verpoorte R., Ten Hoopen H. J. G., 1989, *Cell and tissue cultures of Catharanthus roseus (L.) G. Don: a literature survey*, "Plant Cell, Tissue and Organ Culture" 18, nr 3: 231-280, DOI: 10.1007/BF00043397.
- Velamuri R., Sharma Y., Fagan J., Schaefer J., 2020, *Application of UHPLC-ESI-QTOF-MS in Phytochemical Profiling of Sage (Salvia officinalis) and Rosemary (Rosmarinus officinalis)*, "Planta Medica International Open" 07, nr 04: e133-e144, DOI: 10.1055/a-1272-2903.
- Venugopalan A., Srivastava S., 2015, *Enhanced camptothecin production by ethanol addition in the suspension culture of the endophyte, Fusarium solani*, "Bioresource Technology" 188: 251-257, DOI: 10.1016/j.biortech.2014.12.106.
- Verma S. K., Das A. K., Cingoz G. S., Gurel E., 2016, *In vitro culture of Digitalis L. (Foxglove)*

- and the production of cardenolides: An up-to-date review, „Industrial Crops and Products” 94, nr August: 20-51, DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.08.031.
- Verpoorte R., Contin A., Memelink J., 2002, *Biotechnology for the production of plant secondary metabolites*, „Phytochemistry Reviews” 1: 13-25, DOI: 10.1023/A:1015871916833.
- Villegas-Sánchez E., Macías-Alonso M., Osegueda-Robles S., Herrera-Isidró L., Nuñez-Palenius H., González-Marrero J., 2021, *In Vitro Culture of Rosmarinus officinalis L. in a Temporary Immersion System: Influence of Two Phytohormones on Plant Growth and Carnosol Production*, „Pharmaceuticals” 14, nr 8: 747, DOI: 10.3390/ph14080747.
- Vosoughi N., Gomarian M., Ghasemi Pirbalouti A., Khaghani S., Malekpoor F., 2018, *Essential oil composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (Salvia officinalis L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies*, „Industrial Crops and Products” 117: 366-374.
- Wan X., Tian M., Row K. H., 2009, *Extraction and HPLC Analysis of Tanshinone I, Tanshinone IIA and Cryptotanshinone from Salvia miltiorrhiza Bunge*, „Asian Journal of Chemistry” 21, nr 8: 5999-6004.
- Wang J. W., Wu J. Y., 2010, *Tanshinone biosynthesis in Salvia miltiorrhiza and production in plant tissue cultures*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 88, nr 2: 437-449, DOI: 10.1007/s00253-010-2797-7.
- Wang L., Wang F.-S., Gershwin M. E., 2015, *Human autoimmune diseases: a comprehensive update*, „Journal of Internal Medicine” 278, nr 4: 369-395, DOI: 10.1111/joim.12395.
- Wang L., Ma R., Liu C., Liu H., Zhu R., Guo S., Tang M., Li Y., Niu J., Fu M., Gao S., Zhang D., 2016, *Salvia miltiorrhiza: A Potential Red Light to the Development of Cardiovascular Diseases*, „Current Pharmaceutical Design” 23, nr 7: 1077-1097, DOI:10.2174/1381612822666161010105242.
- Wasilewska A., Królicka A., 2005, *Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych*, „Biotechnologia” 4, nr 71: 173-188.
- Watt M. P., 2012, *The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation*, „African Journal Of Biotechnology” 11, nr 76, DOI: 10.5897/AJB12.1693.
- Wawrosch C., Zotchev S. B., 2021, *Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies—status and outlook*, 105: 6649–6668 „Applied Microbiology and Biotechnology”, DOI: 10.1007/s00253-021-11539-w.
- Weathers P. J., Towler M. J., Xu J., 2010, *Bench to batch: Advances in plant cell culture for producing useful products*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 85, nr 5: 1339-1351, DOI: 10.1007/s00253-009-2354-4.
- Welander M., Persson J., Asp H., Zhu L. H., 2014, *Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation*, „Scientia Horticulturae” 179: 227-232, DOI: 10.1016/j.scienta.2014.09.035.
- WHO, 2014, *Global status report on noncommunicable diseases*, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland
- WHO, 2017, *Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025*, Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, ISBN 978–92–4–151348–7, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
- Wink M., Alfermann A. W., Franke R., Wetterauer B., Distl M., Windhövel J., Krohn O., Fuss E., Garden H., Mohagheghzadeh A., Wildi E., Ripplinger P., 2005, *Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents*, „Plant Genetic Resources” 3, nr 2: 90-100, DOI: 10.1079/PGR200575.
- Witkowski J. M., 2008, *Advanced Application of CFSE for Cellular Tracking*, „Current Protocols in Cytometry” 44, nr 1, DOI: 10.1002/0471142956.cy0925s44.
- Wojciechowska M., Owczarek A., Kiss A. K., Grąbkowska R., Olszewska M. A., Grzegorzyc-Karolak I., 2020, *Establishment of hairy root cultures of Salvia bulleyana Diels for production of polyphenolic compounds*, „Journal of Biotechnology” 318, nr April: 10-19, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.05.002.
- Wu C. F., Karioti A., Rohr D., Bilia A. R., Efferth T., 2016, *Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of Salvia miltiorrhiza with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells*, „Food Chemistry” 201: 292-297, DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.054.
- Wu C.-T., Mulabagal V., Nalawade S. M., Chen C.-L., Yang T.-F., Tsay H.-S., 2003, *Isolation and Quantitative Analysis of Cryptotanshinone, an Active Quinoid Diterpene Formed in Callus of Salvia miltiorrhiza Bunge*, „Biological &

- Pharmaceutical Bulletin” 26, nr 6: 845-848, DOI: 10.1248/bpb.26.845.
- Wu J.-Y., Shi M., 2008, *Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of Salvia miltiorrhiza hairy roots*, „Applied Microbiology and Biotechnology” 78, nr 3: 441-448, DOI: 10.1007/s00253-007-1332-y.
- Wu R. Z., Baque M. A., Paek K. Y., 2010, *Establishment of a large-scale micropropagation system for Anoectochilus formosanus in bioreactors*, „Acta Horticulturae” 878: 167-174, DOI: 10.17660/ActaHortic.2010.878.18.
- Wysokińska H., 2000a, *Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach korzeni transformowanych*, „Biotechnologia” 4, nr 51: 32-39.
- Wysokińska H., 2000b, *Modyfikacje genetyczne dróg wtórnego metabolizmu w roślinnych kulturach in vitro*, „Biotechnologia” 4, nr 51: 48-61.
- Wyss-Coray T., 2016, *Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation*, „Nature” 539: 180-186, DOI: 10.1038/nature20411.
- Xavier V., Spréa R., Finimundy T. C., Heleno S. A., Amaral J. S., Barros L., Ferreira I. C. F. R., 2023, *Terpenes*, w: Carochi, M., Heleno, S.A., Barros, L. (red.), „Natural Secondary Metabolites”, Springer, Cham: 107-156, DOI: 10.1007/978-3-031-18587-8_5.
- Xu J., Shen J., Cheng Y., Qu H., 2008, *Simultaneous detection of seven phenolic acids in Danshen injection using HPLC with ultraviolet detector*, „Journal of Zhejiang University Science B” 9, nr 9: 728-733, DOI: 10.1631/jzus.B0820095.
- Yadav A., Kothari S. L., Kachhwaha S., Joshi A., 2019, *In vitro propagation of chia (Salvia hispanica L.) and assessment of genetic fidelity using random amplified polymorphic DNA and intersimple sequence repeat molecular markers*, „Journal of Applied Biology & Biotechnology” 7, nr 1: 42-47, DOI: 10.7324/JABB.2019.70108.
- Yan S., Gao W., Wang J., Huang T., Cao Y., 2009, *Affects of different bioreactors in process of Salvia miltiorrhiza adventitious root culture*, „China Journal of Chinese Materia Medica” nr 24: 2027-2030.
- Yang H., Dou Q. P., 2010, *Targeting Apoptosis Pathway with Natural Terpenoids: Implications for Treatment of Breast and Prostate Cancer*, „Current Drug Targets” 11, nr 6: 733-744, DOI: 10.2174/138945010791170842.
- Yiannopoulou K. G., Papageorgiou S. G., 2020, *Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update*, „Journal of Central Nervous System Disease” 12: 117957352090739, DOI: 10.1177/1179573520907397.
- Yingjin Y., Zongding H., 1994, *A bioreactor for two-stage multiple shoot culture of Catharanthus roseus*, „Chinese Journal of Chemical Engineering” 2, nr 2: 92-97.
- Yu L., Chen H., Hong P., Wang H., Liu K., 2015, *Adventitious Bud Induction and Plant Regeneration from Stem Nodes of Salvia splendens „Cailinghong”*, „HortScience” 50, nr 6: 869-872, DOI: 10.21273/HORTSCI.50.6.869.
- Yu Q., Chen H., Sheng L., Liang Y., Li Q., 2014, *Sodium tanshinone IIA sulfonate prolongs the survival of skin allografts by inhibiting inflammatory cell infiltration and T cell proliferation*, „International Immunopharmacology” 22, nr 1: 277-284, DOI: 10.1016/j.intimp.2014.07.002.
- Zengin G., Mahomoodally F., Picot-Allain C., Diuzheva A., Jekó J., Cziáky Z., ... Rengasamy K. R. R., 2019, *Metabolomic profile of Salvia viridis L. root extracts using HPLC-MS/MS technique and their pharmacological properties: A comparative study*, „Industrial Crops and Products” 131, nr December 2018: 266-280, DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.01.060.
- Zhang W., Zeng Y., Jiao M., Ye C., Li Y., Liu C., Wang J., 2023, *Integration of high-throughput omics technologies in medicinal plant research: The new era of natural drug discovery*, „Frontiers in Plant Science” 14, DOI: 10.3389/fpls.2023.1073848.
- Zhang X., Li Z., Yong H., Xie Z., 2018, *Biomimetic syntheses of C23 terpenoids: Structural revision of salynnannin A and confirmation of hassanane*, „Organic Chemistry Frontiers” 5, nr 23: 3469-3475, DOI: 10.1039/c8qo00772a.
- Zhang Y., Smuts J. P., Dodbiba E., Rangarajan R., Lang J. C., Armstrong D. W., 2012, *Degradation Study of Carnosic Acid, Carnosol, Rosmarinic Acid, and Rosemary Extract (Rosmarinus officinalis L.) Assessed Using HPLC*, „Journal of Agricultural and Food Chemistry” 60, nr 36: 9305-9314, DOI: 10.1021/jf302179c.
- Zhang Y., Jiang P., Ye M., Kim S.-H., Jiang C., Lü J., 2012, *Tanshinones: Sources, Pharmacokinetics and Anti-Cancer Activities*, „International Journal of Molecular Sciences” 13, nr 12: 13621-13666, <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/10/13621>.
- Zhao J. L., Zhou L. G., Wu J. Y., 2010, *Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in Salvia miltiorrhiza*

- cell cultures, „Applied Microbiology and Biotechnology” 87, nr 1: 137-144, DOI: 10.1007/s00253-010-2443-4.
- Zhao J., Verpoorte R., 2007, *Manipulating indole alkaloid production by Catharanthus roseus cell cultures in bioreactors: From biochemical processing to metabolic engineering*, „Phytochemistry Reviews” 6, nr 2-3: 435-457; DOI: 10.1007/s11101-006-9050-0.
- Zhi B. H., Alfermann A. W., 1993, *Diterpenoid production in hairy root cultures of Salvia miltiorrhiza*, „Phytochemistry” 32, nr 3: 699-703, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)95156-2.
- Zhong J. J., 2002, *Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes*, „Journal of Bioscience and Bioengineering” 94, nr 6: 591-599, DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80200-6.
- Zhou X., Li Y., Shi X., Ma C., 2016, *An overview on therapeutics attenuating amyloid β level in Alzheimer's disease: Targeting neurotransmission, inflammation, oxidative stress and enhanced cholesterol levels*, „American Journal of Translational Research” 8, nr 2: 246-269.
- Ziaei A., Amirghofran Z., Zapp J., Ramezani M., 2011, *Immunoinhibitory Effect of Teuclatriol a Guaiane Sesquiterpene from Salvia mirzayanii*, „Iranian Journal of Immunology” 8, nr 4: 226-235.
- Ziaková A., Brandšteterová E., 2003, *Validation of HPLC Determination of Phenolic Acids Present in Some Lamiaceae Family Plants*, „Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies” 26, nr 3: 443-453, DOI: 10.1081/JLC-120017181.
- Zimmerman R. H., 1988, *Micropropagation Of Woody Plants: Post Tissue Culture Aspects*, „Acta Horticulturae” nr 227: 489-499, DOI: 10.17660/ActaHortic.1988.227.102.
- Zobayed S. M. A., Murch S. J., Rupasinghe H. P. V., De Boer J. G., Glickman B. W., Saxena P. K., 2004, *Optimized system for biomass production, chemical characterization and evaluation of chemo-preventive properties of Scutellaria baicalensis Georgi*, „Plant Science” 167, nr 3: 439-446, DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.04.022.
- Zobayed S. M. A., Murch S. J., Rupasinghe H. P. V., Saxena P. K., 2003, *Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (Hypericum perforatum) grown in bioreactors*, „Plant Cell, Tissue and Organ Culture” 75, nr 2: 143-149, DOI: 10.1023/A:1025053427371.
- Zobayed S. M. A., Murch S. J., Rupasinghe H. P. V., Saxena P. K., 2004, *In vitro production and chemical characterization of St. John's wort (Hypericum perforatum L. cv 'New Stem')*, „Plant Science” 166, nr 2: 333-340, DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.10.005.

SPIS TABEL I RYCIN

- Tabela 1** Produkcja metabolitów wtórnych w mono- oraz kokulturach *in vitro* pędów roślin wyższych, w bioreaktorach z mieszaniem mechanicznym
- Tabela 2** Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym
- Tabela 3** Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, prowadzonych w bioreaktorach okresowo-zalewowych oraz zalewowych
- Tabela 4** Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, w bioreaktorach natryskowych
- Tabela 5** Dane chromatograficzne i spektralne wykorzystane do identyfikacji związków terpenowych i polifenolowych w wyciągach z biomas *in vitro* kultur kolekcyjnych oraz z surowców gruntowych *Salvia apiana* (liście, korzeń).
- Tabela 6** Zawartość wybranych związków terpenowych i polifenolowych w kulturach kolekcyjnych oraz roślinach gruntowych *S. apiana*. Wartości przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.
- Tabela 7** Zawartość wybranych związków terpenowych i polifenolowych w kulturach kolekcyjnych oraz roślinach gruntowych *S. apiana*. Wartości przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.
- Tabela 8** Parametry walidacyjne dla metody HPLC, wykorzystanej do prowadzenia analiz ilościowych związków polifenolowych oraz nietlotnych terpenów w badanych matrycach roślinnych *S. apiana*.
- Tabela 9** Zawartość olejku eterycznego w biomasach *in vitro* i surowcach gruntowych *S. apiana* (liście, korzeń) oraz *S. officinalis* (liście). Wartości przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.
- Tabela 10** Skład jakościowy i ilościowy olejku eterycznego, otrzymanego z mikropędów *S. apiana* (kultura kolekcyjna) oraz liści rośliny gruntowej.
- Tabela 11** Skład jakościowy i ilościowy olejków eterycznych otrzymanych z biomas *S. apiana*, namnażanych w różnych systemach *in vitro* (analiza GC-FID i GC-MS).
- Tabela 12** Skład jakościowy i ilościowy olejku eterycznego otrzymanego z mikropędów *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μ M) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz poddanych zabiegowi dokarmiania sokiem z liści pokrzywy zwyczajnej (2,5%).
- Tabela 13** Podstawowy skład pożywki wzrostowej Murashige'a i Skooga (MS) oraz Schenka-Hildebrandta (SH), wykorzystanych w trakcie realizacji eksperymentów biotechnologicznych (Murashige i Skoog, 1962; Schenk i Hildebrandt, 1972).

- Rycina 1** Kwitnący okaz *Salvia apiana* Jepson; A – widok ogólny (Thorsted, 2016), B – zbliżenie na kwiaty (Smith, 2015), C – nasiona (Akulova, 2011).
- Rycina 2** Nasiona *S. apiana* Jeps.; A – nasiona przed sterylizacją; B – nasiona, na szalce Petriego, w 15. dniu po sterylizacji (widoczna jedna wykształcona siewka).
- Rycina 3** Inicjacja kultur korzeni anatomicznych *Salvia apiana* Jeps. w medium SH_{IBA1,0}; A – korzonek inicjalny w ostatnim, 25. dniu pierwszego cyklu wzrostowego; B – biomasa inicjalna w ostatnim dniu trzeciego pasażu; C – biomasa pochodząca z kultury kolekcyjnej w ostatnim, 21. dniu cyklu wzrostowego.
- Rycina 4** Obraz mikroskopowy kultur korzeni odciętych *Salvia apiana*; A – powiększenie 10-krotne; B – powiększenie 40-krotne.
- Rycina 5** Tkanka przyranna *Salvia apiana* Jeps.; A – inicjalna biomasa kalusa (pierwszy pasaż, na podłożu MS_{stand}); B – kalus w ostatnim dniu trzeciego cyklu wzrostowego, na pożywce SH_{stand}; C – biomasa kalusowa pochodząca z kultury kolekcyjnej (SH_{stand}); D – kalus w ostatnim dniu trzeciego cyklu wzrostowego, na pożywce MS_{stand}; E – biomasa kalusowa pochodząca z kultury kolekcyjnej (MS_{stand}).
- Rycina 6** Obraz mikroskopowy tkanki przyrannnej *Salvia apiana* (powiększenie 10. krotne); A – kalus pasażowany na pożywce SH_{stand}; B – słabo zróżnicowany kalus (medium SH_{stand}) z wykształconymi włoskami gruczołowymi typu *Labiatae* (czerwona strzałka); C – biomasa kalusa pasażowanego na pożywce MS_{stand}.
- Rycina 7** Kultura mikropędów *Salvia apiana* Jeps.; A – 20. dzień pierwszego pasażu (SH_P); B – ostatni dzień trzeciego, 28-dniowego pasażu (SH_P); C – ostatni, 21. dzień pasażu na pożywce SH_B (kultura kolekcyjna).
- Rycina 8** Obraz mikroskopowy mikropędów *Salvia apiana*; A – powiększenie 10-krotne; B, C – powiększenie 40-krotne.
- Rycina 9** Wiązki korzeni na eksplantatach inicjalnych *S. apiana*, powstałych w wyniku infekcji materiału roślinnego bakteriami *A. rhizogenes* (metoda nanoszenia powierzchniowego); A – infekcja szczepem A4; B – infekcja szczepem LBA9402.
- Rycina 10** Biomasy korzeni transformowanych *Salvia apiana*, uzyskane po infekcji fragmentów pędów *in vitro* bakteriami *A. rhizogenes*: szczepy LBA9402 (TL1-2) oraz A4 (TA1-3).
- Rycina 11** Obraz mikroskopowy kultur korzeni transformowanych *Salvia apiana* linii TA1 oraz TL1 (powiększenie 10. krotne); A – szczytowa (apikalna) część korzenia TA1; B – fragment korzenia TA1 okryty ryzodermą z wykształconymi włosnikami; C – szczytowa (apikalna) część korzenia TL1; D – fragment korzenia TL1 okryty ryzodermą z wykształconymi włosnikami.
- Rycina 12** Analiza PCR *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 [pasma 2-6], korzenie transformowane – klon TL1 [pasma 7-11] i nietransformowane *Salvia apiana* [pasma 12-16]. GeneRuler™ 100 pb Plus DNA ladder (pasma 1, 17). Amplifikowane fragmenty genów *rolB* (423 bp; pasma 2, 7, 12), *rolC* (626 bp; pasma 3, 8, 13), *virG* (273 bp; pasma 4, 9, 14), Tr (1672 bp, pasma 5, 10, 15) i *ags* (512 bp, pasma 6, 11, 16).
- Rycina 13** Analiza PCR *Agrobacterium rhizogenes* A4 [pasma 2-6], korzenie transformowane – klon TA2 [pasma 7-11] i nietransformowane *Salvia apiana* [pasma 12-16]. GeneRuler™ 100 pb Plus DNA ladder (pasma

1, 17). Amplifikowane fragmenty genów *rolB* (423 bp; pasma 2, 7, 12), *rolC* (626 bp; pasma 3, 8, 13), *virG* (273 bp; pasma 4, 9, 14), *Tr* (1672 bp, pasma 5, 10, 15) i *ags* (512 bp, pasma 6, 11, 16).

Rycina 14 Chromatogramy HPLC-DAD-ESI/MS ($\lambda = 280$ nm) frakcji terpenowych i polifenolowych w badanych matrycach roślinnych; A1-2 – liście rośliny gruntowej *S. apiana*; B1-2 – kultury kolekcyjne mikropędów *S. apiana* (medium SH_B). Piki: 1 – kwas neochlorogenowy; 3 – hesperydyna; 4 – kwas rozmarynowy; 8 – epirosmanol; 9 – rosmanol; 10 – cirsimarytyna; 11,12 – izomer rosmanolu; 13 – kwas hydroksykarnozowy; 14 – karnozol; 16 – kwas karnozowy; 17 – kryptotanszinon; 20 – kwas ursolowy.

Rycina 15 Chromatogramy HPLC-DAD-ESI/MS ($\lambda = 280$ nm) frakcji terpenowych i polifenolowych z biomas *in vitro* *Salvia apiana*; A1-2 – kalus namnażany na zmodyfikowanej pożywce MS (medium MS_{stand}); B1-2 – kalus namnażany na zmodyfikowanej pożywce SH (medium SH_{stand}). Piki: 4 – kwas rozmarynowy.

Rycina 16 Chromatogramy HPLC-DAD-ESI/MS ($\lambda = 280$ nm) frakcji terpenowych i polifenolowych w badanych matrycach roślinnych; A1-2 – korzeń rośliny gruntowej *S. apiana*; B1-2 – kultura kolekcyjna korzeni odciętych *S. apiana* (medium SH_{IBA1,0}). Piki: 2 – heksozyd kwasu sinapowego, 4 – kwas rozmarynowy, 5 – rozmarynian metylu, 6 – kwas salwianolowy F, 7 – izomer kwasu salwianolowego F, 12 – izomer rosmanolu; 13 – kwas hydroksykarnozowy; 15 – izomer kwasu hydroksykarnozowego; 17 – kryptotanszinon; 18 – tanszinon 2A; 19 – 1,6,6,9a-tetrametylo-1,2,4,5,5a,6,7,8,9,9a-dekahydrofenantro[1,2-b]furan-10,11-dion.

Rycina 17 Chromatogram HPLC-DAD-ESI/MS ($\lambda = 280$ nm) frakcji terpenowej i polifenolowej z biomas *in vitro* *Salvia apiana*; A1-2 – korzenie transformowane TA1 (medium SH₀). Piki: 4 – kwas rozmarynowy.

Rycina 18 Porównanie składu jakościowego i ilościowego olejków eterycznych z mikropędów (medium SH_B) i liści roślin gruntowych *S. apiana* oraz *S. officinalis* (liście zebrane w Ogrodzie Roślin Leczniczych GUMed i wysuszone w 30°C przez 24h). Wartości przedstawione na rycinie stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD.

Rycina 19 Porównanie parametrów wzrostowych [wartość suchej masy (DW) oraz współczynnik przyrostu (Gi)] kultury korzeni odciętych szalwii białej. Doświadczenie prowadzono w pożywce SH, suplementowanej IBA w zakresie stężeń 0,0-5,0 mg L⁻¹, przez 48 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 5 prób eksperymentalnych \pm SD.

Rycina 20 Kultura korzeni odciętych *S. apiana*, inkubowana w ciemności, w pożywce SH, suplementowana IBA w stężeniu 5,0 mg L⁻¹, w ostatnim, 48. dniu doświadczenia.

Rycina 21 Profile wzrostowe wykreślone na podstawie współczynnika przyrostu (Gi) i wartości suchej masy (DW) dla kultury wytrząsanej korzeni odciętych *S. apiana*, w warunkach zaciemnienia oraz przy fotoperiodzie 16/8h (medium SH_{IBA1,0} i SH_{IBA1,5}). Przedstawione wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD. Oznaczenia zawartości kwasu rozmarynowego:

○ - 31,70 \pm 0,22 mg g⁻¹ DW; ◆ - 44,49 \pm 0,41 mg g⁻¹ DW

Rycina 22 Kultura korzeni odciętych *S. apiana*, inkubowanych przy oświetleniu cyklicznym (16/8h), w pożywce SH_{IBA1,0}, w ostatnim, 45. dniu doświadczenia.

Rycina 23 Kultura korzeni odciętych *S. apiana*, inkubowanych w ciemności, w pożywce SH_{IBA1,0}, w 3. (A), 33. (B) oraz 48. (C) dniu doświadczenia.

- Rycina 24** Kultura *in vitro* korzeni odciętych *S. apiana*, prowadzona w bioreaktorze kolumnowo-zalewowym (medium SH_{IBA1,0}); A – biomasa inokularna w 0. dniu doświadczenia; B – biomasa korzeni w 40. dniu cyklu wzrostowego; C – kalus widoczny w ostatnim dniu doświadczenia (czerwona strzałka); D – widok na koszyk immobilizujący (40. dzień doświadczenia).
- Rycina 25** Kultura *in vitro* korzeni odciętych *S. apiana*, prowadzona w bioreaktorze natryskowym (medium SH_{IBA1,5}), w ostatnim, 48. dniu doświadczenia; A – zbiornik bioreaktora – widok ogólny; B – widok na wewnętrzny stelaż z biomasą korzeni.
- Rycina 26** Porównanie parametrów wzrostowych [wartość suchej masy (DW) oraz współczynnik przyrostu (Gi)] kultur korzeni odciętych szałwii białej namnażanych w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych. Doświadczenie prowadzono w ciemności, w pożywce SH, suplementowanej IBA w stężeniach: 1,0 i 1,5 mg L⁻¹, przez 40 (instalacje zalewowe) lub 48 dni (instalacje natryskowe). Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD. Oznaczenia osi poziomej: rodzaj bioreaktora/zawartość auksyny w medium SH/czas kultury w dniach.
- Rycina 27** Zawartość i produktywność kwasu rozmarynowego w kulturach korzeni odciętych szałwii białej, namnażanych w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych. Doświadczenie prowadzono w ciemności, w pożywce SH, suplementowanej IBA w stężeniach 1,0 i 1,5 mg L⁻¹, przez 40 (instalacje zalewowe) lub 48 dni (instalacje natryskowe). Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD. Oznaczenia osi poziomej: rodzaj bioreaktora/zawartość auksyny w medium SH/czas kultury w dniach.
- Rycina 28** Profile wzrostowe kultur korzeni transformowanych *S. apiana* (linie TA1-3), namnażanych w medium SH₀, opracowane na podstawie obliczonych wartości współczynników przyrostu (Gi) i suchej masy (DW). Podane wartości stanowią średnie arytmetyczne z 6 prób eksperymentalnych ± SD.
- Rycina 29** Profile wzrostowe kultur korzeni transformowanych *S. apiana* (linie TL1-2), namnażanych w medium SH₀, opracowane na podstawie obliczonych wartości współczynników przyrostu (Gi) i suchej masy (DW). Podane wartości stanowią średnie arytmetyczne z 6 prób eksperymentalnych ± SD.
- Rycina 30** Korzenie transgeniczne TA1 *S. apiana* (medium SH₀). Zdjęcia przedstawiają biomasy korzeni transgenicznych, pochodzących z kolejnych dni 60-dniowego cyklu doświadczenia.
- Rycina 31** Biomasa korzeni transgenicznych *S. apiana* (klon TL2) z widocznym kalusem (czerwona strzałka), w 30. dniu doświadczenia (medium SH₀).
- Rycina 32** Kultura *in vitro* korzeni transgenicznych *S. apiana* (klon TA1), prowadzona w bioreaktorze natryskowym (medium SH₀) w ostatnim, 60. dniu doświadczenia; A – bioreaktor; B – widok (od góry) na wewnętrzny stelaż z biomasą korzeni; C – koszyk immobilizujący z biomasą klonu TA1.
- Rycina 33** Porównanie parametrów wzrostowych (zawartość suchej masy – DW oraz współczynnik przyrostu – Gi) kultur korzeni transformowanych szałwii białej (klon TA1), prowadzonych w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych. Materiał roślinny kultywowano w pożywce SH₀, przez 60 dni, w ciemności. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD.
- Rycina 34** Zawartość i produktywność kwasu rozmarynowego w systemach *in vitro* korzeni transformowanych szałwii białej (klon TA1), prowadzonych w bioreaktorach kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych.

Doświadczenie prowadzono w ciemności w pożywce SH₀, przez 60 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD.

- Rycina 35** Porównanie produktywności kwasu rozmarynowego w obrębie wszystkich systemów *in vitro* korzeni *S. apiana*, prowadzonych w bioreaktorach: kolumnowo-zalewowych oraz natryskowych. Doświadczenie prowadzono w pożywce SH, pozbawionych regulatorów wzrostu lub suplementowanych IBA (1,0 – 1,5 mg L⁻¹), przez 40, 48 lub 60 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD. Oznaczenia osi poziomej: typ kultury (KA – korzenie anatomiczne; KT – klon TA1)/rodzaj bioreaktora/typ medium/czas kultywacji w dniach.
- Rycina 36** Mikropędy *S. apiana* (medium SH_B), namnażane w różnych systemach *in vitro*: kultura – stacjonarna płynna (A) i agarowa (B) oraz płynna wytrząsana (C). Zdjęcie wykonano w 3. dniu kultywacji tkanek, w warunkach standardowych.
- Rycina 37** Wzrost mikropędów *S. apiana* (SH_B), namnażanych w różnych systemach *in vitro*: kultura stacjonarna – płynna i agarowa oraz płynna wytrząsana (warunki standardowe). Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 6 prób ± SD.
- Rycina 38** Profile wzrostowe wykreślone, na podstawie wartości współczynnika przyrostu (Gi) i suchej masy (DW), dla kultur wytrząsanych mikropędów *S. apiana* (medium SH_B) w 48-dniowym cyklu eksperymentalnym. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.
- Rycina 39** Wytrząsana kultura mikropędów *S. apiana* (medium SH_B) w 21. dniu cyklu wzrostowego (faza stacjonarna) (Krol i in., 2023); A – biomasa w kolbie Erlenmeyera; B – widok na pojedynczą kępkę mikropędów.
- Rycina 40** Kultura mikropędów *S. apiana*, pochodząca z prototypowego bioreaktora natryskowego, w 28. dniu doświadczenia (Krol i in., 2023); A – widok na pojemnik hodowlany z mikropędami, z boku, B – zebrana biomasa, immobilizowana na stalowej siatce.
- Rycina 41** Porównanie wartości parametrów wzrostowych [sucha masa (DW) oraz współczynnik przyrostu (Gi)] kultur mikropędów szalwii białej, prowadzonych w instalacjach RITA[®], PLANTFORM[®] oraz w prototypowym bioreaktorze natryskowym. Doświadczenie prowadzono w pożywce SH_B, w warunkach standardowych, przez 21 lub 28 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób eksperymentalnych ± SD.
- Rycina 42** Kultura mikropędów *S. apiana*, pochodząca z bioreaktora PLANTFORM[®], w 28. dniu doświadczenia (Krol i in., 2023); A – widok na pojemnik hodowlany z mikropędami, z boku, B – zebrana biomasa w koszu immobilizującym.
- Rycina 43** Kultura mikropędów *S. apiana*, pochodząca z bioreaktora RITA[®], w 28. dniu doświadczenia (Krol i in., 2023); widok na pojemnik hodowlany z mikropędami, z góry (A) oraz z boku (B).
- Rycina 44** Profile wzrostowe mikropędów *S. apiana* wykreślone na podstawie wartości współczynników przyrostu (Gi) i suchej masy (DW), dla kultur namnażanych w instalacjach RITA[®], w pożywce SH_B, przez 42 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.
- Rycina 45** Zawartość olejku eterycznego w matrycach roślinnych *S. apiana* (liście rośliny gruntowej, kultura kolekcyjna *in vitro* oraz pędy namnażane w instalacjach RITA[®], PLANTFORM[®], a także

w prototypowym bioreaktorze natryskowym; medium SH_B; warunki standardowe), zebranych po różnym czasie kultury (7-42 dni). Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

Rycina 46 Procentowa zawartość wybranych terpenoidów w olejkach eterycznych, wyizolowanych z liści rośliny gruntowej oraz biomas *S. apiana* (mikropędy namnażane w instalacjach: RITA[®], PLANTFORM[®] oraz w prototypowym bioreaktorze natryskowym; medium SH_B; warunki standardowe), zebranych po różnym czasie kultury (7-42 dni). Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

Rycina 47 Produktywność olejku eterycznego w systemach *in vitro* *S. apiana* (mikropędy namnażane w instalacjach: RITA[®], PLANTFORM[®] oraz w prototypowym bioreaktorze natryskowym; medium SH_B; warunki standardowe), zebranych po różnym czasie kultury (7-42 dni). Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 3 prób ± SD.

Rycina 48 Porównanie parametrów wzrostowych: wartości suchej masy (DW) oraz współczynnika przyrostu (Gi) mikropędów *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μM) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz suplementowanych sokiem z liści *U. dioica* (2,5%). Eksperymenty prowadzono w bioreaktorach RITA[®] (warunki standardowe) przez 21 dni. Płynną pożywkę wzrostową SH_B modyfikowano poprzez dodatek elicytorów, bądź ich rozpuszczalników (kontrola dodatnia), na 3 (3d) lub 7 dni (7d) przed zbiorem. Kontrolę zerową stanowiła biomasa namnażana w podstawowej pożywce SH_B przez 21 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z min. 6 prób eksperymentalnych ± SD.

Rycina 49 Kultura pędów *S. apiana*, rosnąca w bioreaktorze RITA[®] w ostatnim, 21. dniu doświadczenia (medium SH_B); A – elicytowana ergosterolem, dodawanym w stężeniu 10 μM, w 14. dniu doświadczenia; B – kontrola pozytywna, pochodząca z wariantu elicytacji mikropędów ergosterolem, w 14. dniu doświadczenia (dodatek etanolu); C – próba zerowa.

Rycina 50 Porównanie zawartości olejku eterycznego w mikropędach *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μM) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz suplementowanych sokiem z liści *U. dioica* (2,5%). Eksperymenty prowadzono w bioreaktorach RITA[®] (warunki standardowe) przez 21 dni. Płynną pożywkę wzrostową SH_B modyfikowano poprzez dodatek elicytorów, bądź ich rozpuszczalników (kontrola dodatnia), na 3 (3d) lub 7 dni (7d) przed zbiorem. Kontrolę zerową stanowiła biomasa namnażana w podstawowej pożywce SH_B przez 21 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób eksperymentalnych ± SD.

Rycina 51 Zawartość głównych składników olejku eterycznego w mikropędach *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μM) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz suplementowanych sokiem z liści *U. dioica* (2,5%). Eksperymenty prowadzono w bioreaktorach RITA[®] (warunki standardowe) przez 21 dni. Płynną pożywkę wzrostową SH_B modyfikowano poprzez dodatek elicytorów, bądź ich rozpuszczalników (kontrola dodatnia), na 3 (3d) lub 7 dni (7d) przed zbiorem. Kontrolę zerową stanowiła biomasa namnażana w podstawowej pożywce SH_B przez 21 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób eksperymentalnych ± SD.

Rycina 52 Kultura mikropędów *S. apiana*, rosnąca w bioreaktorze RITA[®] w ostatnim, 21. dniu doświadczenia (medium SH_B), elicytowana chitosanem, dodawanym w stężeniu 200 mg L⁻¹, w 18. dniu eksperymentu.

- Rycina 53** Kultura pędów *S. apiana*, rosnąca w bioreaktorze RITA[®] w ostatnim, 21. dniu doświadczenia (medium SH_B), elicytowana ekstraktem drożdżowym, dodanym w stężeniu 100 mg L⁻¹ w 14. dniu cyklu wzrostowego; A – biomasa – widok z boku; B – biomasa – widok z góry.
- Rycina 54** Kultura mikropędów *S. apiana*, rosnąca w bioreaktorze RITA[®] w ostatnim, 21. dniu doświadczenia, w medium SH_B z dodatkiem soku z liści pokrzywy zwyczajnej (stężenie 2,5% w pożywce).
- Rycina 55** Porównanie produktywności olejku eterycznego w mikropędach *S. apiana*, elicytowanych wyciągiem drożdżowym (50 i 100 mg L⁻¹), ergosterolem (10 μM) i chitosanem (200 mg L⁻¹) oraz suplementowanych sokiem z liści *U. dioica* (2,5%). Eksperymenty prowadzono w bioreaktorach RITA[®] (warunki standardowe) przez 21 dni. Płynną pożywkę wzrostową SH_B modyfikowano poprzez dodatek elicytorów, bądź ich rozpuszczalników (kontrola dodatnia), na 3 (3d) lub 7 dni (7d) przed zbiorem. Kontrolę zerową stanowiła biomasa namnażana w podstawowej pożywce SH_B przez 21 dni. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób eksperymentalnych ± SD.
- Rycina 56** Aktywność inhibicyjna olejków eterycznych, otrzymanych z wybranych biomas *S. apiana*, wobec AChE, Tyr i Hyal. Wszystkie próbki frakcji lotnych oraz escynę badano w stężeniu 0,45 mg mL⁻¹, natomiast donepezyl i kwasu kojowy testowano w stężeniu 1,00 mg mL⁻¹. Przedstawione wartości stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób eksperymentalnych ± SD.
- Rycina 57** Wykresy obrazujące procent proliferacji, w warunkach *in vitro*, limfocytów T: CD4⁺ oraz CD8⁺, pochodzących od osób zdrowych (n = 5), w obecności różnych stężeń olejków eterycznych (rozcieńczenia etanolem w stosunku 1/400, 1/4000 oraz 1/40000), wyizolowanych z liści rośliny gruntowej (O1), mikropędów (O2), oraz 1,8-cineolu (O3). Eksperymenty obejmują pomiar cytometryczny po 72 i 120 h od stymulacji komórek olejkami i monoterpenem. Na wykresie ramki przedstawiają 25-75% badanych limfocytów T, natomiast wąsy – wartości minimalne i maksymalne udziału procentowego powyższych komórek krwi w populacji.
- Rycina 58** Wykresy obrazujące odsetek limfocytów T (osoby zdrowe; n = 5) ulegających apoptozie, w warunkach *in vitro*, w obecności różnych stężeń olejków eterycznych, wyizolowanych z liści rośliny gruntowej (O1) oraz mikropędów (O2) *S. apiana*, a także 1,8-cineolu (O3) (rozcieńczenia etanolem w stosunku: 1/400, 1/4000 i 1/40000). Eksperymenty obejmują pomiar cytometryczny po 72 i 120 h od stymulacji badanych komórek krwi powyższymi substancjami. Apoptozę limfocytów T określano na podstawie ich zdolności do wiązania aneksyny V oraz 7-AAD. Na wykresie ramki przedstawiają 25-75% badanych limfocytów T, natomiast wąsy – wartości minimalne i maksymalne udziału procentowego powyższych komórek krwi w populacji.
- Rycina 59** Schemat zastosowanych w doświadczeniach instalacji wielkoskalowych, do kultury korzeni odciętych i transformowanych: (A) bioreaktor natryskowy; (B) bioreaktor kolumnowo-zalewowy; 1 – filtr wyjąławiający PTFE, wylot powietrza; 2 – filtr wyjąławiający PTFE, wlot powietrza; 3 – filtr propylenowy; 4 – pompa; 5 – dysza zraszająca; 6 – koszyczki z siatki wykonanej ze stali nierdzewnej, odpowiadające za zawieszenie korzeni; 7 – płuczka wodna; 8 – kosz immobilizujący.
- Rycina 60** Pojemnik Magenta[®], zainokulowany mikropędami *S. apiana*; A – obudowa naczynia hodowlanego z poliwęglanu; B – mikropędy szałwii białej; C – siatka immobilizująca ze stali nierdzewnej; D – eksperymentalne medium wzrostowe (SH_B).

Rycina 61 Schemat zastosowanych w doświadczeniach instalacji wielkoskalowych (Krol i in., 2023): (A) RITA[®]; (B) PLANTFORM[®]; (C) prototypowy bioreaktor natryskowy; 1 – filtr wyjąławiający PTFE, wylot powietrza; 2 – filtr wyjąławiający PTFE, wlot powietrza; 3 – obudowa naczynia hodowlanego z poliwęglanu; 4 – siatka z tworzywa sztucznego, odpowiadająca za immobilizację mikropędów; 5 – eksperymentalne medium wzrostowe (SH_B); 6 – filtr propylenowy; 7 – pompa perystaltyczna; 8 – dysza zraszająca; 9 – siatka ze stali nierdzewnej, odpowiadająca za immobilizację mikropędów.

Rycina 62 Schemat aparatu Clevengera stosowanego do oznaczania zawartości olejku eterycznego (Farmakopea Polska VII, 2007): 1 – kolumna destylacyjna, 2 – chłodnica, 3 – układ odpowietrzający, składający się z korka z nacięciem i otworu w rurce, 4 – rurka kalibrowana, 5 - zawór trójdrożny, 6 – rurka przepływowa.

White Sage (*Salvia apiana*)—a Ritual and Medicinal Plant of the Chaparral: Plant Characteristics in Comparison with Other *Salvia* Species

Authors

Agata Krol, Adam Kokotkiewicz, Maria Luczkiewicz 

Affiliation

Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy,
Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

Key words

Salvia apiana, Lamiaceae, terpenoids, chemical composition, ethnomedicine, pharmacological activity

received

December 1, 2020

accepted after revision

March 16, 2021

published online

April 22, 2021

Bibliography

Planta Med 2022; 88: 604–627

DOI 10.1055/a-1453-0964

ISSN 0032-0943

© 2021. Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,

70469 Stuttgart, Germany

Correspondence

Prof. dr hab. n. farm. Maria Luczkiewicz

Department of Pharmacognosy, Medical University of Gdańsk

Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk, Poland

Phone: + 48 5 83 49 15 63, Fax: + 48 5 83 49 12 97

mlucz@gumed.edu.pl



Supplementary material is available under
<https://doi.org/10.1055/a-1453-0964>

ABSTRACT

Salvia apiana, commonly known as white sage, is an aromatic evergreen subshrub of the chaparral, commonly found in coastal plains in California and Baja California. It has been traditionally used by the Chumash people as a ritual and medicinal plant and used as a calmative, a diuretic, and a remedy for the common cold. However, until recently, relatively little has been known about the composition and biological activity of white sage. Phytochemical studies on *S. apiana* revealed the presence of substantial amounts of essential oil, accompanied by a variety of triterpenes, C23 terpenoids, diterpenes, and flavonoids. Extracts of the plant have been shown to exhibit antioxidative, antimicrobial, and cytotoxic effects. The influence of white sage constituents on the nervous system, including GABA, opioid, and cannabinoid receptors, has also been documented. The review aimed to compile information on the taxonomy, botany, chemical composition, and biological activities of *S. apiana*. White sage was compared with other representatives of the genus in terms of chemical composition. The differences and similarities between *S. apiana* and other sage species were noted and discussed in the context of their therapeutic applications. Reports on ethnomedicinal uses of white sage were confronted with reports on chemistry, bioactivity, and bioavailability of *S. apiana* constituents. Finally, a critical assessment of the available data was made and perspectives for the use of white sage preparations in modern phytomedicine were discussed.

ABBREVIATIONS

CB	cannabinoid
GABA	gamma-aminobutyric acid
LPS	lipopolysaccharides
TRPA1	transient receptor potential cation channel subfamily A member 1
TRPM8	transient receptor potential cation channel subfamily M member 8

Introduction

The genus *Salvia*, one of the largest members of the Lamiaceae family, is distributed in various regions throughout the world. Central America and, in particular, Mexico are hotspots of sage biodiversity with ca. 300 from ca. 900 *Salvia* species [1]. One important and characteristic sage species of southwestern North America, used as both sacred and therapeutic plant, is *Salvia apiana* Jeps., commonly known as white sage or bee sage. It has been used for food, medicine, and religious practices by the Chumash Indians of southern California, who called it *khapshikh* [2] or *xapcix* [3]. Due to the largely unwritten nature of American Indian cultures, herb healing was based on oral tradition, and it is impossible to determine when they recognized the therapeutic poten-

tial of *S. apiana*. However, by the time it was discovered by Western medicine it had already been well-grounded in Indian native healing practices [4].

This paper aimed to review the available data on *S. apiana* including its taxonomy, botany, chemical composition, and biological activity, as well as its traditional use in American Indian medical practices, to evaluate the potential use of this plant in modern medicine. This paper was based on the relevant literature gathered from the existing scientific databases, including Scopus, Google Scholar, PubMed, and The Biodiversity Heritage Library. The following terms were adopted as the search items: “*Salvia apiana*”, “white sage”, or “bee sage” (search in the title, abstract, and keywords). Moreover, sources like plant guides, books, master’s and Ph.D. theses, and government reports were used. The data search included all years up to the present. Molecular formulas and molar masses of compounds presented in figures were calculated using ACD/ChemSketch software (Advanced Chemistry Development, Toronto, Canada). The ethnopharmacological aspects of white sage usage were discussed in the context of the results of contemporary studies on the plant’s chemistry, as well as the biological activity and bioavailability of its components. From a broader perspective, *S. apiana* was also compared with other sage species in terms of the content of major bioactive metabolites, including essential oil constituents, diterpenes, and triterpenes. Based on the compiled data, we attempted to critically evaluate the potential of *S. apiana* for modern medicine, and confront its therapeutic value with other representatives of the genus.

Taxonomy

Salvia apiana Jeps. (also known as *Salvia californica* Jeps., *Ramona polystachya* (Benth.) Greene, *Audibertiella polystachya* (Benth.) Briq., *Audibertia polystachya* (Benth.) belongs to the family Lamiaceae, subfamily Nepetoideae, tribe Salviaeae, genus *Salvia* [5], section *Audibertia* Benth. The section *Audibertia* Benth. with sister section *Echinospheae* Benth. is specific for California’s and Baja California’s flora [1, 6]. The taxonomy of *S. apiana* has a long and dynamic history. For botanists coming into California from Europe or eastern North America, difficulties with the proper identification of the genus were due to the weak exploration of the American continent and the limited experience with the morphology and the habitat of American kinds of sage [7].

No written records document possible knowledge of *S. apiana* in pre-Columbian America. *S. apiana* was first recognized as *Audibertia polystachya* by George Bentham, based upon a specimen collected in California by David Douglas, and described in his *Labiatarum Genera et Species* [8].

Another botanist who investigated the *Salvia* genus, including nomenclatural issues of *S. apiana*, was John Briquet. Based on corolla analyses that revealed details that were not noticed by Bentham, he proposed a new taxonomic name for *S. apiana*, namely: *Audibertiella polystachya*. This is consistent with the original idea of Bentham [9].

Edward Greene, a pioneer taxonomist of California flora, in his papers [7] considered the *Audibertia* section as a part of the *Salvia* genus based on both the habitat and the floral structure. How-

ever, he made an exception for *S. apiana* because of its unique inflorescence and corolla, considering them as noncongeneric with other shrubs. He thus proposed a new name for the plant: *Ramona polystachya*.

The taxonomy of *S. apiana* was redefined by Willis Jepson [10], one of the most recognized botanists of California flora, who started his botanical research under the leadership of Edward Greene. He examined earlier studies of *S. apiana* and presented his proposal for its taxonomical position. He described the genus *Audibertia* as congeneric with *Salvia* and transferred *Ramona polystachya* Greene to *Salvia*, initially naming it *Salvia californica*. After finding that this name had been taken, he changed it to *Salvia apiana*, the name still accepted by botanists today [11]. *S. californica* is currently not a legitimate name in botanical nomenclature and is only of historical significance.

Subsequent revisions to *S. apiana* taxonomy came in 1927 from Philip Munz, who distinguished 2 varieties of the species: *S. apiana* var. *typica* (also known as var. *apiana*) and *S. apiana* var. *compacta*. The basis for the distinction was the difference in inflorescence morphology. Panicles in *S. apiana* var. *typica* are open and well-branched, while in *S. apiana* var. *compacta*, they are condensed and spicate. Moreover, these 2 varieties occupy different habitats—coastal slopes and edges of the desert, respectively [12].

Recent phylogenetic studies based on molecular data indicate that genus *Salvia* is polyphyletic and represented by 4 distinct evolutionary lineages [13–15]. The current state of knowledge is not sufficient to determine the route of phylogenetic origin that would account for the observed distribution of the genus *Salvia* into the New World. The probable diversification time of the *Salvia* genus from other Salviinae was early Oligocene [16] and the jump dispersal from Southwest Asia to the New World in the late Oligocene has given rise to subgenera *Audibertia* and *Calosphaea* [17]. Nevertheless, the putative origin of the section *Audibertia* is the Mediterranean area. *Audibertia* pollen fossils from Alaska, dated to the Upper Miocene, indicate the Bering Land Bridge as the most probable route of dispersal [6, 18]. It is also proposed that the 2 sections, *Audibertia* Benth. and *Echinospheae* Benth., should be separated as individual genus *Ramona* Greene [6].

Botany

S. apiana is a highly aromatic, evergreen, perennial herb or subshrub, which grows 1–3 m tall [11]. It forms rounded shrubs, woody at the base with rod-shaped erected branches coated with a tomentose layer. The root system is branched and fibrous, penetrating as much as 1.5 m deep. The plant produces 4–8 cm long pale-green leaves that persist throughout the year. They consist of petioles and widely lanceolate blades with crenulate margins. The base tapered leaves are covered with dense hairs and oil glands that give them a silvery sheen [19]. This important bee-food plant has white to pale lavender flowers, surrounded by 5.0–7.5 mm long calyx, whitened with very tiny appressed hairs. Its corolla conformation and pollination mechanism deviate from the ones typical in the Lamiaceae family and are in a class by themselves in the genus [20]. The corolla consists of 2 lips. The upper one is reduced, whereas the lower, cushion-shaped corolla lip is huge and

obstructs the entrance to the corolla chamber. Two long (14–17 mm) erected stamens, each with 2 pollen sacks, and a pistil's style (13–15 mm) are exerted over the flower tube. Such construction of the flower is an adaptation for pollination by large insects like carpenter bees and bumblebees [20, 21]. Flowering time is April to August. The fruit is a shiny, light brown, rectangular narrow in cross-section, 5–3 mm nutlet [11]. The plant has $2n = 30$ chromosomes [22].

The details in the morphology of the inflorescence differentiate *S. apiana* populations located in the coastal slopes and the edge of deserts. *S. apiana* var. *compacta*, found on the edge of deserts, has open and well-branched panicles, while *S. apiana* var. *typica* forms condensed and spicate panicles [12, 23].

The chaparral and desert sage communities in California Floristic Province are represented by 19 species of *Salvia*, members of sections *Audibertia* and *Echinosphece*. Hybrids between *S. apiana* and other native sages with the same number of chromosomes and structurally similar genomes (e.g., *Salvia mellifera* Greene, *Salvia munzii* Epl., *Salvia leucophylla* Greene, *Salvia clevelandii* [Grey] Greene, *Salvia eremostachya* Jeps., *Salvia pachyphylla* Epl. Ex Munz., and *Salvia vaseyi* [Porter] Parish) are possible but restricted mainly by ecological, seasonal, mechanical, and ethological isolation of autochthonous species. Hybridizations between *S. apiana* and *S. mellifera* are particularly common, but the fertility of the resulting plants is reduced [20, 24–26].

Ecology and Cultivation

S. apiana (white sage) is a notable species of the coastal sage formation of the Californian and Baja California chaparral, the coastal sage scrub, and the upper edges of desert scrub. However, it extends even further, including as far as the yellow-pine forest. It often neighbors species like *S. mellifera* (black sage), *Eriogonum fasciculatum* (California buckwheat), *Artemisia californica* (California sage-brush), and *S. leucophylla* (purple sage) [24, 27]. Its preferred habitat is in the drier sites of coastal slopes below 1500 m with sandy and rocky soils [19]. *S. apiana* is resistant to drought; in the area of its occurrence, there are high summer temperatures and annual precipitation between 250–450 mm [28]. During the dry season, its leaves often become folded and are held vertically, probably as an adaptation to avoid overheating. Observations made in chaparral have shown that the white sage is better adjusted to water shortage than other evergreen shrubs (e.g., *S. mellifera*) [20]. Because of specific environmental requirements, *S. apiana* occurs in ecosystems between Santa Barbara County, California south to the middle of Baja California and the Colorado Desert.

The peculiar structure of the *S. apiana* flower reflects its atypical pollination mechanism: unlike other *Salvia* species, it has adapted to be pollinated by large insects. Co-evolution with *Xylocopa* bees, whose shape and size ensure the highest possible pollination efficiency, is considered to be the most probable reason for the unusual morphology of *S. apiana*'s flower. Effective pollination by honeybees is also possible since they visit the flowers of white sage in great numbers [21].

The coastal sage community is one of the areas most susceptible to frequent wildfires, historically every 20–150 y [28].

S. apiana is well adapted to recurring fires, and its recovery is possible thanks to sprouting from distinct basal burls [19, 29]. There was a custom among the Cahilla and Chumash to periodically burn grasslands, plains, and chaparral covered with sage shrubs to promote the next season's growth [3]. It is worth noting that *S. apiana* can be successfully used for renewing and restoring degraded, damaged, or destroyed areas [30].

A progressive decline of white sage populations has been observed. The California floristic province is a Mediterranean-type climate area where 1315 of 4976 native plant species (26.4%) are endemic [28]. The introduction of foreign and invasive species, the increase of fire frequency, the expansion of urban areas, and the overharvesting of the plant for spiritual ceremonies are considered to be the main factors responsible for the decline of the species. Although *S. apiana* is currently not a threatened plant, the restricted distribution range in the California Floristic Provinces puts it at high risk of rapid decline or extinction [21, 28]. Uncontrolled harvesting without necessary permits is a major issue, only exacerbated by the growing commercialization of white sage in recent years. *S. apiana* is widely advertised and sold as a ceremonial plant. However, the harvesting practices employed are often illegal despite the claims by the distributors that the material has been obtained sustainably. Cases were reported of illegal harvesting of substantial amounts of white sage from protected areas [31].

Although threatened by overexploitation, white sage can be cultivated, and nursery stocks can be established from seeds or cuttings [19]. As of 2020, there were over 40 nurseries in California that carry *S. apiana* [32]. So far, no formal industry of white sage has been established; however, there seems to be a huge potential for sustainable production of white sage raw material for medicinal purposes. If responded properly, the increasing demand for sage material can give rise to a profitable industry without negatively affecting natural resources. A good example of an industry that transitioned from being based solely on the harvesting of wild plants to developed farm cultivation is South Africa's honeybush production [33]. *Cyclopia* plants used to manufacture the honeybush tea belong to fynbos shrublands, which are South Africa's counterpart of Californian chaparral. Similar to white sage, *Cyclopia* spp are endemic and thus vulnerable to overexploitation and habitat loss. The growing demand for honeybush, mainly for international markets, necessitated the development of a sustainable industry that now provides the bulk of raw materials of high quality [33].

Studies concerning endemic plants can also be aided by cell culture techniques. For instance, *in vitro* cultures of the aforementioned *Cyclopia* plants have been used to produce compounds of interest [34, 35] and to develop micropropagation protocols [36]. Such techniques, enabling efficient propagation and production of bioactive metabolites independently of natural resources, have also been applied to different sage species: examples include *in vitro* cultures of *S. officinalis* and *S. miltiorrhiza* which have been examined for the biosynthesis of salvia-specific diterpenes and phenolic acids [37].

Ethnomedicinal Uses

Native American medicine and religion are strongly connected. Phytotherapy is a coherent part of the spiritual healing system rather than a standalone treatment method. This system includes not only herbal treatment elements accepted by Western medicine but also prayers, shamanistic practices, and other ways of spiritual healing. From this point of view, the application of particular herbs for a medical purpose involves not only giving a drug to the patient but also sacral action conducted by the healer (medicine man, as called by Native Americans) [38]. One of the plants with a long tradition of medical use is *S. apiana*, which has significant religious meaning to Californian Native American tribes. White sage is deeply rooted in tribal culture as an apotropaic herb. It is believed to have a great power of cleansing the spirit, restoring its balance, drawing a blessing upon people, or even carrying the prayers to God. The illness itself is considered as an imbalance or impurity in the sick person's soul, so the core of the healing process is restoring the balance and driving the impurities away. White sage is used for healing due to its valuable properties. It is possibly the reason for its major role in Native American healing (and, consequently, in religion) [4, 39].

S. apiana is used both as a herbal drug itself and as an addition to other herbal compositions; it is believed to exert a magnifying effect on other herbs' properties [40]. It is used as a calmative and analgesic agent in native medicine. Other observed effects of its use are decreased sweating, salivation, and milk secretions and reduced mucous secretions of the sinuses, throat, and lungs [30]. Drinking cold water with pounded leaves could induce vomiting [2]. Antimicrobial activity also was reported [30]. As for the healing methods of a spiritual nature, the preferred ways of application include smudging or sucking the plant to bless or cleanse the spirit. The treatment methods involving less religious aspects include drinking infusions, tinctures, and macerations, as well as rubbing into the skin [41].

Ethnomedicinal uses of *S. apiana* include the social initiation ceremony of 8-yr-old Chumash children. The addition of white sage leaves to a decoction of *Datura meteloides*, containing tropane alkaloids, enhanced the effects of the potion, referring to white sage's ability to purify the mind and spirit [39]. *S. apiana* seeds or infusions and tinctures of leaves were taken orally to cure cough due to its diuretic and diaphoretic activity [30]. Infusion of *S. apiana* roots was taken orally by women during the postpartum period to facilitate passage of the afterbirth and to promote healing [42]. Moreover, Chumash women take the infusion for menstrual problems, like hypermenorrhea, and during weaning to decrease lactation [30].

Also, *S. apiana* is applied as an eye treatment. The method is to put on a few *Salvia* seeds to the eyes during sleep. While moving under the eyelids, mucilage obtained from the seeds collects all pollutants from the eyeballs. Removing them in the morning leaves the eyes purified [30]. Fresh leaves of *S. apiana* are placed on the head to get relief from headaches [2].

S. apiana plays a major role in the life of California Native American tribes, as it is not only used for healing and religious rituals but is also a part of their diet. White sage and 3 other sage shrubs: *S. mellifera*, *S. columbariae*, and *S. leucophylla* are the source of

seeds that are called "chia". Chia seeds are prepared by toasting and pounding in a mortar and are eaten mixed with water as a gruel or as cakes. Young shoots of *S. apiana* are also eaten by Native American Indian tribes. White sage seeds contain about 8% water, 10% protein, 12% fat, and 65% carbohydrate and as such were an important source of food for California Native Americans [3]. Today, *S. apiana* seeds have lost their importance due to the high popularity of *S. columbariae* Benth. chia seeds with their higher nutritional value [2, 3, 43]. Apart from the medical and nutritional use of *S. apiana*, California Native Americans also use white sage as a cosmetic and shampoo [30, 44].

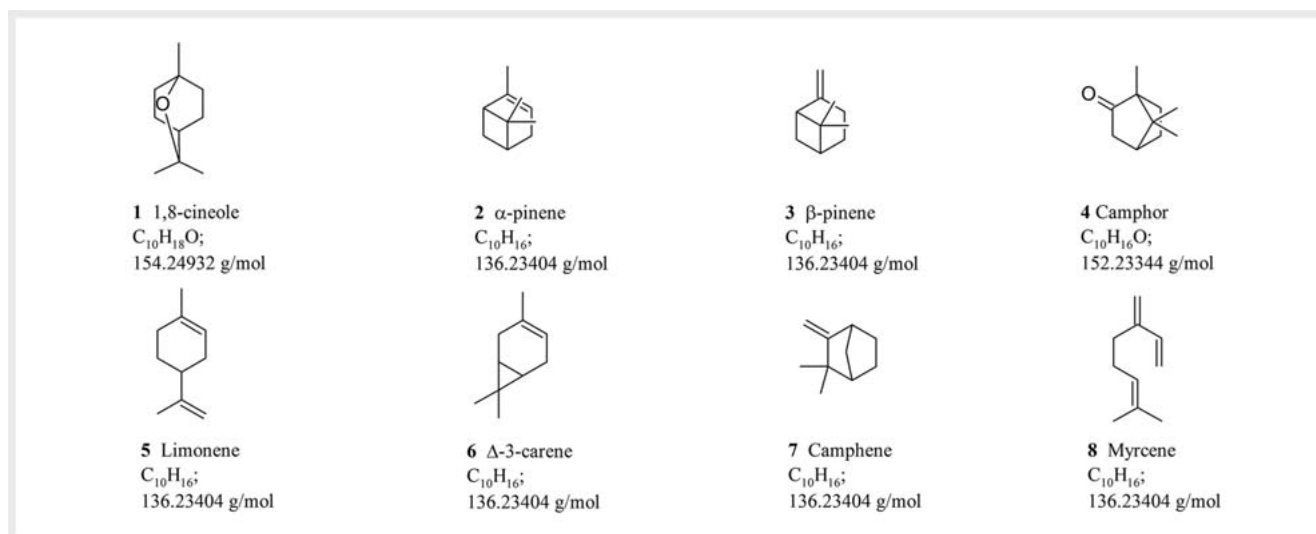
Chemical Composition

Similar to other *Salvia* species, the main components of *S. apiana* are terpenoids, (represented by monoterpenes, diterpenes, C23 terpenoids, and triterpenes), as well as flavonoids and phenolic acids. In the current work, the data concerning *S. apiana* chemistry was compiled. For compounds that are present in the plant in known quantities, the quantitative data were compared with other representatives of the genus. The purpose was to find differences and similarities between white sage and other sage species and discuss them in the context of the therapeutic uses of the plant.

Essential Oil

There is only a limited number of reports concerning white sage phytochemistry, and the studies conducted so far have been focused mainly on determining the essential oil content of the plant. The first investigation of terpene content using gas chromatography-flame ionization detector (GC/FID) in fresh leaves of *S. apiana* revealed the presence of 6 compounds: α -pinene, camphene, β -pinene, dipentene, cineole, and camphor [45]. The GC/FID, together with GC/MS analysis showed the presence of 14 constituents, which accounted for 97.76% of the total essential oil obtained through steam distillation of the entire plant. 1,8-cineole (1), constituting 60.65% of the oil, was the major component [46]. Takeoka et al. [47] identified 84 compounds that comprise 95.1% of the volatile fraction. In all cases, essential oil was primarily composed of 1,8-cineole (26,1–71,1%), α -pinene (2) (5.1–10.14%), β -pinene (3) (3.8–10.68%), camphor (4) (2.1–21.7%), limonene (5) (1.5–3.5%), δ -3-carene (6) (1.3–6.3%), camphene (7) (0.4–5.5%), and myrcene (8) (0.5–3.2%). The structures of volatiles present in *S. apiana* are presented in ► Fig. 1.

Various studies have demonstrated that quantitative differences in essential oil content are common in *Salvia* species and depend on environmental conditions, harvesting time, and geographic and climatic factors [48, 49]. In *S. apiana*, age-dependent variations were not reported, but some variability in the composition of the volatile fraction between day and night was described [50]. Moreover, the differences in terpene content between the subspecies of *S. apiana* were observed. *S. apiana* var. *compacta* contains a notably higher amount of β -pinene and lower concentration of cineole than *S. apiana* var. *apiana* [51]. The data concerning the composition of *S. apiana* essential oil was summarized in ► Table 1.



► **Fig. 1** Structures of major components of *S. apiana* essential oil.

► **Table 1** Composition of *S. apiana* essential oil (the amounts of individual terpenoids expressed as a percentage of the total volatile fraction).

Main components of essential oil	Raw material	Collection place and time	Method of isolation and analysis	Ref.
Cineole (1), camphor (4), α-pinene (2), β-pinene (3), camphene (7) ^a	Fresh leaves	Data not specified	Extraction with anhydrous ethyl ether for 48 h; GC/FID	[45]
Camphor (4) (44.6%), 1,8-cineole (1) (33.1%), β-pinene (3) (6.3%), α-pinene (2) (5.8%), camphene (7) (5.5%), limonene (5) (2.7%) ^b	Leaves	Botanical Gardens, University of California, Los Angeles	Extraction with anhydrous ethyl ether; GC	[51]
Camphor (4) (46.9%), 1,8-cineole (1) (26.4%), β-pinene (3) (7.5%), α-pinene (2) (5.3%), camphene (7) (5.5%), limonene (5) (2.7%) ^c				
1,8-cineole (1) (60.7%), β-pinene (3) (10.7%), α-pinene (2) (10.1%), δ-3-carene (6) (3.2%), camphor (4) (2.7%)	Branches and leaves	Data not specified	Steam distillation; GC/FID and GC/MS	[46]
1,8-cineole (1) (71.6%), β-pinene (3) (9.1%), α-pinene (2) (9.0%), limonene (5) (2.0%), camphor (4) (2.1%), δ-3-carene (6) (1.3%)	Entire plant	Data not specified	Steam distillation; GC/FID and GC/MS	[123]
1,8-cineole (1) (34.5%), camphor (4) (21.7%), β-pinene (3) (7.4%), α-pinene (2) (6.4%), δ-3-carene (6) (6.3%), camphene (7) (3.9%), myrcene (8) (3.2%)	Fresh aerial parts of the plant	Davis Botanical Gardens, University of California; June 2007	Extraction with diethyl ether followed by high vacuum distillation with a solvent-assisted flavor evaporation apparatus; GC/FID and GC/MS	[47]
1,8-cineole (1) (71.1%), α-pinene (2) (5.1%), camphor (4) (4.4%), β-pinene (3) (3.8%), δ-3-carene (6) (2.4%), limonene (5) (1.5%), myrcene (8) (1.2%)	Dried aerial parts of the plant	The South Mississippi Branch Experiment Station in Poplarville, Mississippi, USA; February and March 2010	Hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus; GC/MS	[54]

^a confirmed presence, quantitative data not available; ^b composition of essential oil of *S. apiana* var. *apiana*; ^c composition of essential oil of *S. apiana* var. *compacta*

In ► **Table 2**, *S. apiana* was compared with other *Salvia* species in terms of essential oil content and its composition. The compilation reveals white sage to be exceptionally rich in essential oils: the content reported by Dentali [44] was 3.8%, which is even

higher than in *S. officinalis* (up to 3.7%) [52, 53]. If confirmed, this would place *S. apiana* in the first place in terms of essential oil content within the genus *Salvia*. However, the data regarding volatiles yield in white sage has to be confirmed, and further studies are

► **Table 2** Comparison of essential oil composition in different sage species. Only major compounds are included (i.e., exceeding 3% content in at least 1 of the considered species).

Compound [% in oil]	<i>Salvia apiana</i> Jeps.	<i>Salvia officinalis</i> L.		<i>Salvia sclarea</i> L.	<i>Salvia lavandulaefolia</i> Vahl.	<i>Salvia hispanica</i> L.	<i>Salvia melifera</i> Greene	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	<i>Salvia rosmarinus</i> Schleiden (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)
		α -thujone/camphor chemotype ²	1,8-cineole/camphor chemotype ²						
Oil yield [%]	0.6–3.8	1.2–3.7 ^g	1.2–3.7 ^g	0.3–2.5 ^{m,n}	0.9–2.7 ^q	0.05 ^r	0.68 ^t	1.47 ^w	1.1–1.9 ^x
δ -Amorphene						3.1 ^r			
Aromadendrene oxide-(1)								8.3 ^w	
Aromadendrene oxide-(2)								3.4 ^w	
Bicyclogermacrene	0.1 ^a			1.2–8.7 ^{m,o}					
Borneol	0.2 ^{a,c,e}	0.2–11.8 ^{f,g,h,i,k}	5.6 ⁱ	0.1 ^m	1.6–4.3 ^q	0.2 ^r		0.24 ^w	0.46–5.1 ^{x,y,z}
Bornyl acetate	0.0–0.2 ^{a,e}	0.05–7.8 ^{f,g,h,i,k}	1.8 ⁱ	T ⁿ	T–0.6 ^q		0.5 ^t	2.5 ^w	0.1–3.5 ^{x,z}
α -Cadinol						1.7 ^r	1.9 ^t	7.3 ^w	
Camphene (7)	0.4–5.5 ^{a,b,c,d,e}	0.1–9.7 ^{f,g,h,i,k}	5.5 ⁱ	T ⁿ	2.7–5.8 ^q	T–0.01 ^s	0.6 ^t		0.3–12.0 ^{x,y}
Camphor (4)	2.1–21.7 ^{a,b,c,d,e}	0.15–36.5 ^{f,g,h,i,k}	18.6 ⁱ		6.1–9.4 ^q	T–0.27 ^s	12.2 ^t		5.0–24.1 ^{x,y,z}
Δ -3-Carene (6)	1.3–6.3 ^{a,b,c,d}		3.0 ^j		0.1 ^q	0.2 ^r			
β -Caryophyllene (trans-Caryophyllene)	1.0–1.7 ^{abc}	0.2–8.7 ^{f,g,h,i,k}	3.8 ⁱ	1.2–17.2 ^{m,n,o,p}	4.0–8.5 ^q	13.3–35.7 ^s	0.9 ^t	4.7 ^w	3.3 ^x
(Z)-Caryophyllene						11.5 ^r			
(E)-Caryophyllene						10.6 ^r			
Caryophyllene oxide		0.0–4.3 ^{f,g,h,i,k}	0.0 ^j	0.2–10.4 ^{m,n,o}	0.1–1.2 ^q	2.7 ^r	1.4 ^t	2.6 ^w	0.94 ^x
1,8-Cineole (1)	26.4–71.7 ^{a,b,c,d,e}	1.2–19.6 ^{f,g,h,i,k}	20.8 ⁱ	T–0.1 ^{m,n}	21.4–33.8 ^q	T–0.47 ^s	39.8 ^t	1.3 ^w	16.0–38.0 ^{x,y,z}
α -Copaene	0.1–0.2 ^{ac}	T–0.5 ^{h,i}		1.0–6.7 ^{m,o}	0.0–T ^q	0.7 ^r		0.8 ^w	
p-Cymene	T ^l –3.1 ^{ab,c,d}	0.1–3.6 ^{f,g,h,i,k}	0.73 ^j	0.5 ^m	0.0–T ^q		0.5 ^t		0.8–2.5 ^z
α -Eudesmol				0.2–0.5 ^{m,n}		3.8 ^r			
Ferruginol								35.2 ^u	
Geraniol				6.5 ⁿ	0.0–0.1 ^q		0.1 ^t		
Geranyl acetate				3.5–7.5 ^{m,n,p}					
Germacrene D	0.2 ^a			11.4–20.8 ^{m,o}	0.0–T ^q		0.1 ^t	0.15–6.82 ^{u,w}	
Globulul						12.7–23.4 ^s	1.8 ^t		
α -Gurjunene	0.1 ^a					3.1 ^r			continued

▶ Table 2 Continued

Oil yield [%] Compound [% in oil]	<i>Salvia apiana</i> Jeps.	<i>Salvia officinalis</i> L.		<i>Salvia sclarea</i> L.	<i>Salvia lavandulaefolia</i> Vahl.	<i>Salvia hispanica</i> L.	<i>Salvia melifera</i> Greene	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	<i>Salvia rosmarinus</i> Schleiden (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)
		α -thujone/camphor chemotype ²	1,8-cineole/camphor chemotype ²						
Humulane-1, 6-dien-3-ol	0.6–3.8	1.2–3.7 ^g		0.3–2.5 ^{m,n}	0.9–2.7 ^q	0.05 ^r	0.68 ^t	1.47 ^w	1.1–1.9 ^x
α -Humulene	0.1 ^{a,c}	0.18–16.7 ^{fg,h,i,k}	6.0 ⁱ	0.1–1.0 ^{m,n,o}		2.9–6.1 ^{ts}	0.2 ^t	14.1 ^u	0.54 ^x
Humulene epoxide I		0.0–3.5 ^{fg,k}							
Humulene epoxide II		0.5–3.2 ^{fg,h}				0.4 ^r		3.1 ^w	0.06 ^x
Isoborneol									5.6 ^x
7-Isopropyl-1, 1,4a-trimethyl-1, 2, 3, 4, 4a, 9, 10, 10a-octahydrophenanthrene								12.3 ^u	
Limonene (5)	1.5–3.5 ^{a,d,c,e}	1.4–3.4 ^{fg,i}	7.5 ⁱ	0.15–2.1 ^{m,n,o}	5.6–10.4 ^q	T–0.05 ^s	2.2 ^t		0.26–5.0 ^{yz}
Linalool	0.2–0.22 ^{a,b,c}			12.5–38.0 ^{m,n,p}	0.0–T ^q	0.33–1.0 ^r		1.5 ^w	3.7 ^x
Linalyl acetate				3.6–39.2 ^{m,p}		2.0 ^r			
Manool		0.4–15.9 ^{fg,h}		0.2–2.5 ^{m,n}				0.93 ^w	
γ -Murolene	0.1 ^a	0.0–0.7 ^{g,h,i}	0.0 ⁱ	T ⁿ		4.4–17.5 ^s	0.1 ^t		
Myrcene (8)	0.5–3.2 ^{a,b,c,d}	0.0–4.2 ^{fg,h,i,k}		0.25–0.7 ^{m,n}	T–10.0 ^q	0.09–1.4 ^r	2.0 ^t		0.11–5.0 ^{x,z}
1-Naphthalenopropanol, alpha.-ethenyldecahydralpha., 5, 8a-tetramethyl-2-Methylene-, [1S-[1.alpha.(R), 4a.beta, 8a.alpha.]								17.37 ^u	
Nerol				1.1–5.5 ^{m,n}	0.0–T ^q				
Neryl acetate				1.9–5.2 ^{m,n}		0.6 ^r			
1-Octen-3-ol								5.9 ^w	
α -Pinene (2)	5.1–10.1 ^{a,b,c,d,e}	T–6.4 ^{fg,h,i,k}	4.0 ⁱ	0.1–0.49 ^{m,n,o}	10.5–17.5 ^q	T–0.72 ^s	9.2 ^t		1.4–26.0 ^{x,y,z}
β -Pinene (3)	3.8–10.6 ^{a,b,c,d,e}	0.0–13.1 ^{fg,h,i,k}	6.1 ⁱ	0.1 ^{m,n}	6.0–17.3 ^q	2.5–15.1 ^s			0.42–9.0 ^{x,y,z}
Sciareol				1.2–5.2 ^{m,n}					
β -Selinene				0.2 ^m	1.5–4.1 ^q	2.0 ^r			
Spathulenol		0.0–0.2 ^k		0.2–9.9 ^{m,n,o}	0.0–1.0 ^q	0.7–2.2 ^{ts}		0.18 ^w	continued

▶ Table 2 Continued										
Oil yield [%] Compound [% in oil]	<i>Salvia apiana</i> Jeps.	<i>Salvia officinalis</i> L.		<i>Salvia sclarea</i> L.	<i>Salvia lavandulaefolia</i> Vahl.	<i>Salvia hispanica</i> L.	<i>Salvia mellifera</i> Greene	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	<i>Salvia rosmarinus</i> Schleiden (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	
		α -thujone/camphor chemotype ²	1,8-cineole/camphor chemotype ²							
	0.6–3.8	1.2–3.7 ^g		0.3–2.5 ^{m,n}	0.9–2.7 ^q	0.05 ^r	0.68 ^t	1.47 ^w	1.1–1.9 ^x	
γ -Terpinene	0.4–0.5 ^{ac}	0.0–2.9 ^{f,g,h,i,k}	1.0 ⁱ	0.3 ^m	2.1–7.0 ^q		2.0 ^t	0.14 ^w	0.15 ^x	
α -Terpineol	T–0.47 ^{ab,c}	0.0–2.3 ^{f,g,h,i,k}		5.5–15.1 ^{m,n}	0.3–0.4 ^q	0.2 ^r	0.7 ^t	0.91 ^w	1.0–6.4 ^{x,z}	
<i>Cis</i> -Thujone (β -thujone)		1.33–29.3 ^{f,g,h,i,k}	1.0 ⁱ	0.5 ^m	0.0–T ^q		0.2 ^t			
<i>Trans</i> -Thujone (α -thujone)		1.5–27.1 ^{f,g,h,k}	4.5 ⁱ	0.4 ^m	0.0–T ^q			0.49		
Tridecyl acrylate									5.5 ^x	
Verbenone									0.4–18.8 ^{x,z}	
Viridiflorol		1.7–15.7 ^{f,g,h,i,k}	0.0 ⁱ			0.7 ^r			0.08 ^x	

¹ Traces; ² Division into chemotypes in accordance with Craft and co-workers [124]; ^a Fresh leaves and flowering tops; extraction with diethyl ether followed by high vacuum distillation with a solvent-assisted flavor evaporation apparatus; GC/FID and GC/MS [47]; ^b Branches and leaves; steam distillation; GC/FID and GC/MS [46]; ^c Dried aerial parts; hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus; GC/FID and GC/MS [54]; ^d Entire plant; steam distillation; analyzed with GC/FID and GC/MS [123]; ^e Dried leaves; extraction in anhydrous ethyl ether; GC [51]; ^f Fresh leaves; hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus; GC/FID and GC/MS [125]; ^g Dried distal parts of leafy shoots; hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus; GC/FID and GC/MS [126]; ^h Dried leaves; hydrodistillation, using n-hexane as collecting solvent; GC/FID and GC/MS [127]; ⁱ Tops of plant; steam distillation with a Clevenger apparatus; GC [128]; ^k Dried herb; hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus and xylene as collecting solvent; GC/FID [55]; ^m Dried aerial parts; hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus; GC/MS [129]; ⁿ Fresh leaves and flowers; steam distillation; GC/MS [130]; ^o Dried leaves; hydrodistillation; GC/FID [132]; ^p Leaves; hydrodistillation; GC/MS [131]; ^q Dried aerial parts; steam distillation; GC/MS [133]; ^r Aerial parts; hydrodistillation; GC/MS [134]; ^s Dried leaves; steam distillation with a Clevenger-type apparatus; GC/MS [135]; ^t Dried aerial parts; hydrodistillation; GC/MS [136]; ^u Dried aerial parts; hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus; GC/MS [137]; ^w Fresh leaves; hydrodistillation with a modified simultaneous distillation extraction apparatus; GC/MS [138]; ^x Fresh leaves; hydrodistillation; GC/MS [139]; ^y Fresh leaves; solvent-free microwave extraction; GC/MS [140]; ^z Composition of Spanish, Morocco and Tunisia rosemary essential oil (European Pharmacopoeia 2005) [141]

necessary to assess intraspecies variation in this regard. One must be aware that essentially only single reports are available on the essential oil content of *S. apiana* [44, 54] whereas *S. officinalis* has been extensively studied in this aspect [53]. The study by Ali et al. [54] showed that essential oil yield in *S. apiana* (0.6%) is 2.5 times higher than in *S. officinalis* (0.24%). However, the reported values do not seem to be representative since common sage typically contains higher amounts of oil, and 1.0% (v/w) is the lower limit set in European Pharmacopoeia [55].

In terms of essential oil composition, *S. apiana* bears resemblance to *S. lavandulaefolia*, *S. rosmarinus*, and the cineole chemotypes of *S. officinalis*. All these plants are characterized with high contents of 1,8-cineole and camphor in varying proportions (► **Table 2**). Apparently, there are no major essential oil constituents differentiating white sage from other representatives of the genus (for detailed information concerning minor constituents of the oil, please refer to supplementary **Table 15**). It is worth noting that the essential oil of *S. apiana* does not contain the neurotoxic thujone [54], the presence of which limits the daily intake of leaf preparations of *S. officinalis* [56]. According to EMA, the daily exposure to thujone must not exceed 6.0 mg. At recommended doses, *S. officinalis* preparations are considered safe even for long-term use; however, chemotypes with low-thujone content should be preferred in therapy [57]. Given this, *S. apiana* appears to have a wider safety margin than thujone chemotypes of common sage. Overdose of common sage preparations, corresponding to over 15 g of leaves, was reported to cause tachycardia and epileptic seizures. This applied in particular to the isolated essential oil of *S. officinalis*, which was shown to exhibit convulsant properties. Cases of children who experienced seizures after ingesting sage oil were described [57]. On the other hand, the main component of white sage oil, 1,8-cineole, is regarded as safe in amounts usually used in phytotherapy. However, exposure to camphor can still cause toxic effects, especially in children [46, 58]. Given the above, recommendations discouraging the use of common sage in children and adolescents [57] seem to be valid also for *S. apiana*, even if there is no apparent risk of inducing epileptic seizures.

Diterpenoids

A distinctive feature of several American *Salvia* species is the presence of clerodane-type diterpenoids in the aerial part of the plant or the whole plant [59]. However, in *S. apiana*, the diterpenoid fraction (► **Fig. 2**) is represented by abietane derivatives [60]. Dentali [44] confirmed the presence of carnosic acid (9) and 16-hydroxycarnosic acid (10) in the acid fraction of methylene chloride extract of the herb. Moreover, in the aerial part of the plant, the following diterpenoids were identified: salvicanol (11), 16-hydroxyrosmanol (12), 16-hydroxycarnosol (13), 16-hydroxy-7-methoxyrosmanol (14), rosmanol (15), and 7-epirosmanol (16) [61]. Gonzalez et al. [62] found other compounds of this group in the roots of white sage: 6,7-didehydroferruginol (17), 6,7-didehydrosempervirool (18), 16-hydroxy-6,7-didehydroferruginol (19), 11,12,16-trihydroxy-20(10 → 5)abeo-abieta-1(10),6,8,11,13-pentaene (20), 16-hydroxyroleanone (21), 6-deoxy-5,6-didehydrolanugon Q (22), ferruginol (23), miltiodiol (24), cryptotanshi-

none (25), and lanugon Q (26). Besides the above compounds, the presence of carnosol (27) was confirmed in the plant [63]. Also, Srivedavyasari et al. [64] reported the presence of sageone (28) and rosmadial (29) in an aqueous ethanolic extract from *S. apiana* herb. The quantitative data concerning *S. apiana* diterpenoids are scarce; so far, only carnosic acid has been quantified at 21.8 mg/g dry weight [63].

Triterpenoids

Besides essential oil, *S. apiana* was shown to contain triterpenoids such as α -amyrin (30), oleanolic acid (31), and ursolic acid (32) (► **Fig. 3**), which were isolated from a hexane extract of the aerial parts of the plant [65]. Oleanolic and ursolic acid are common triterpenoids, found in almost all *Salvia* species [59,66]. Another compound of this group is uvaol (33), found in the ethanolic extract of *S. apiana* [64]. So far, no quantitative data on these constituents are available.

C23 Terpenoids

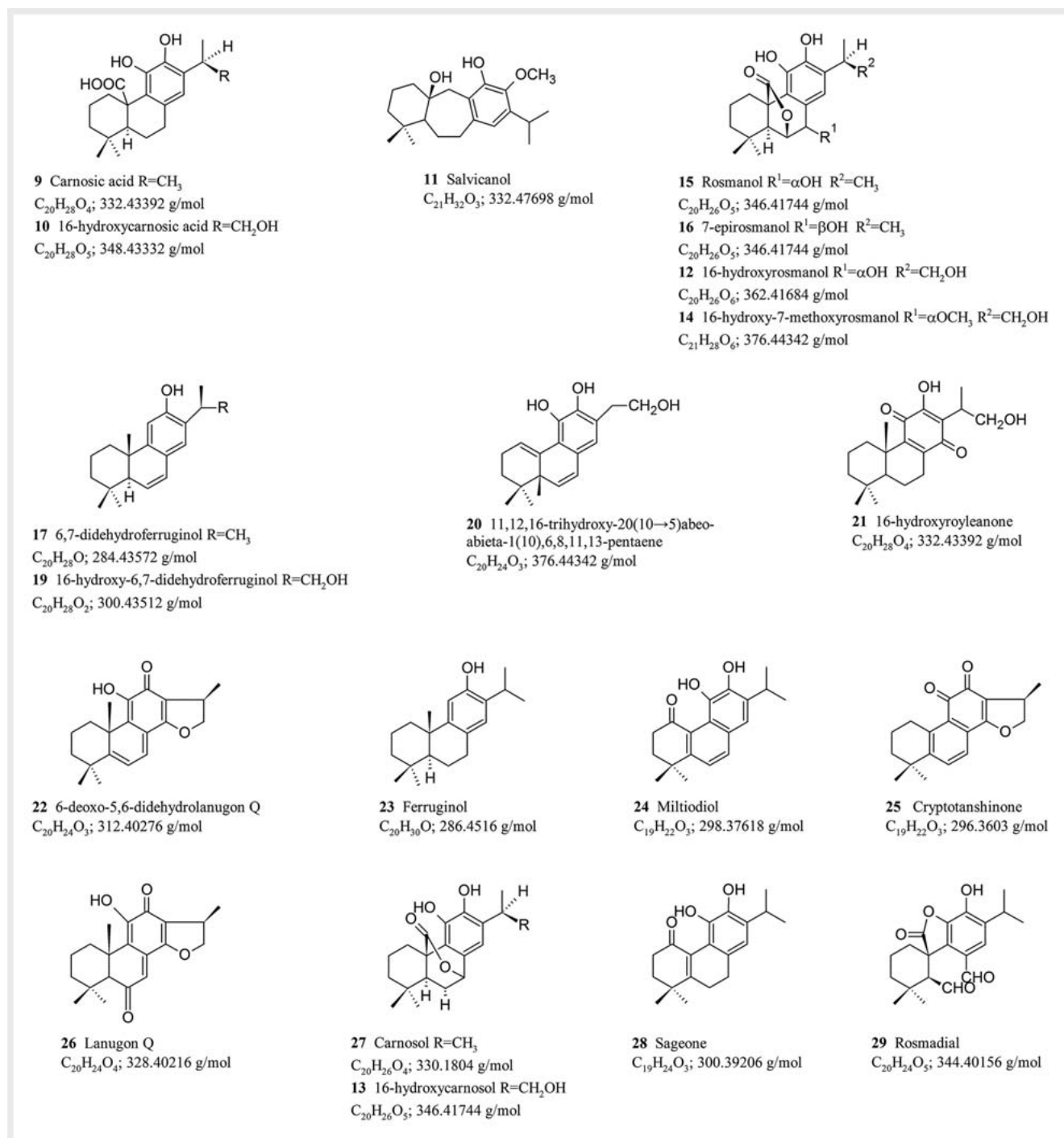
C23 terpenoids were isolated by Luis et al. from acetonetic extract of aerial parts of *S. apiana* [61,67] and named hassananes and apiananes: 13,14-dioxo-11-hydroxy-7-methoxy-hassane-8,11,15-trien-(22,6)-olide (34), 14-hydroxy-7-methoxy-11,16-diketo-apian-8-en-(22,6)-olide (35), and 7-methoxy-11,16-diketo-apian-8,14-dien-(22,6)-olide (36) (► **Fig. 4**). The initially proposed structures of hassananes [67], based on spectroscopic methods, were revised by Yang et al. (37) [68] through chemical structure analysis of these novel compounds and similar C23 terpenoids przewalskins A and B. The revised structures of hassananes were confirmed by Zhang et al. [69] (► **Fig. 4**). No quantitative data concerning C23 terpenoids of white sage are available.

Flavonoids and Phenolic Acids

The aerial parts of the *Salvia* species contain several polar constituents, including flavonoids such as flavones, flavonols, and their glycosides [70]. These are accompanied by rosmarinic acid (38) [71, 72] and quinic acid (39) [72], which are common constituents of the plants from the mint family.

The data concerning flavonoid constituents in white sage are scarce. The presence of 2 flavonoids, cirsimaritin (40) and salvigenin (41), has been documented in ethanolic extracts of *S. apiana* [64]. Moreover, the decoction from aerial parts of the plant was shown to contain hesperidin (42) and quercetin-O-hexoside (► **Fig. 5**) [72]. However, none of these compounds have been quantitatively analyzed. So far, quantitative data are available only for rosmarinic acid, which was determined in methanol extracts (ca. 1.1 mg/ml) [71] and white sage decoction (57 mg per g of the extract) [72].

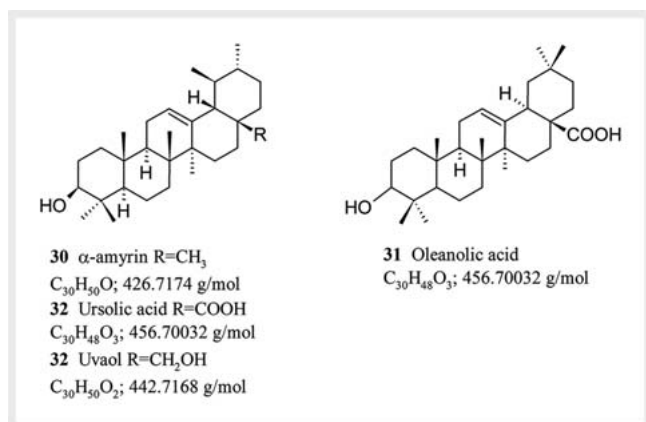
The nonvolatile constituents of *S. apiana* were listed in ► **Table 3**. A substantial number of secondary metabolites have been identified and isolated from the plant, however, the quantitative studies are scarce and limited to major abietane diterpenes (i.e., carnosic acid and carnosol) and rosmarinic acid. The results of these analyses are summarized in ► **Table 4** and confronted with quan-



► **Fig. 2** Structures of diterpenoids isolated from *S. apiana*.

titative data available for 2 widely used plants of the *Salvia* genus: *S. officinalis* and *S. rosmarinus*. It has to be emphasized that the compiled values are difficult to compare because of different types of plant material (leaves vs. whole aerial parts, fresh vs. dried), extraction methodologies, as well as differences in data presentation (mg/g DW, mg/g of extract, or mg/ml of extract). In this regard, comparative studies can provide reliable data since the same extraction and analytical methodology is applied to dif-

ferent plant materials. Unfortunately, only one such work is available: in the study by Abreu et al. [63], *S. apiana* was shown to contain the highest amounts (21.8 mg/g DW) of carnosic acid out of 60 investigated sage species. The second was the common sage, with a carnosic acid content of 14.6 mg/g DW. The same study showed that the content of carnosol in *S. apiana* and *S. officinalis* was 0.3 and 0.4 mg/g DW, respectively. The work did not include *S. rosmarinus*, however, other studies indicate its diterpene con-



► **Fig. 3** Structures of triterpenoids isolated from *S. apiana*.

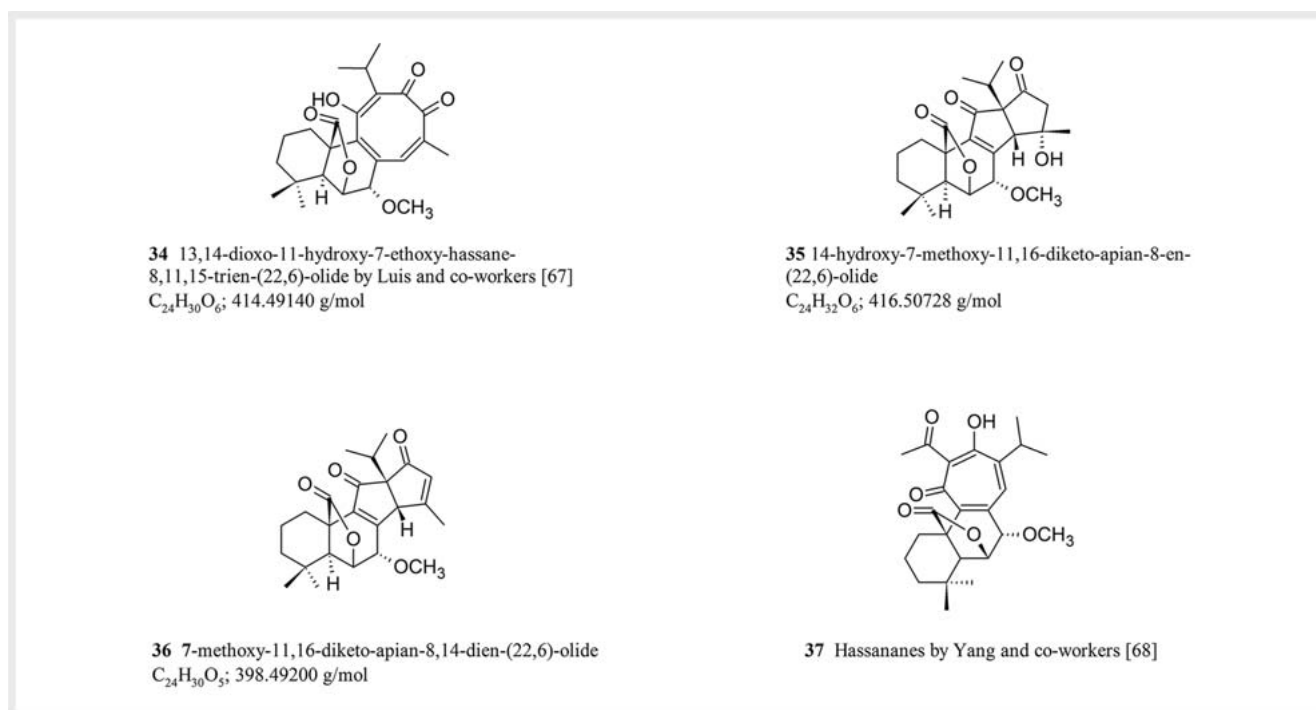
tent can be even higher. For instance, the concentration of carnosic acid determined by Hidalgo et al. [73] ranged from 31.1 to 73.5 mg/g DW. As mentioned earlier, *S. apiana* extracts were shown to contain rosmarinic acid (► **Table 4**), however, the reported values only refer to its content in white sage extracts. According to Vulganova et al. [71], rosmarinic acid concentration in *S. apiana* extracts (1.1 mg/ml) was higher than in *S. officinalis*, but no specific values were provided for the latter. Besides, the cited work is the only one dealing with total phenolic and total flavonoid contents of *S. apiana* and other sage species. In comparison to *S. officinalis*, total phenolic and total flavonoid contents of white sage were 1.3–1.6-fold and 1.3–2.0-fold higher, respectively [71].

Biological Activities

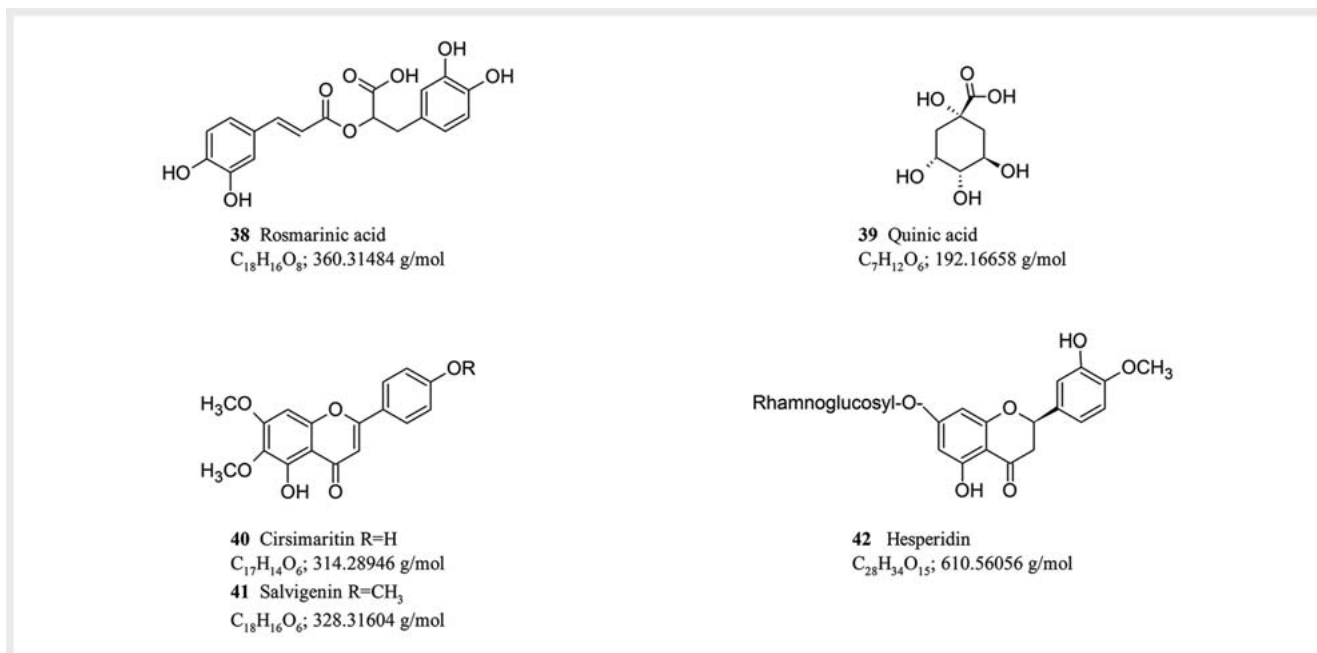
As mentioned earlier, *S. apiana* is well-known among Native American tribes for its medicinal properties. Collected from the wild, it has been used mainly as an antimicrobial, calmative, and diuretic agent, as well as a cold remedy [2, 30]. In the current work, the results of studies on the biological activity of white sage were reviewed, in an attempt to determine to what extent, the empirical knowledge of Native American and the traditional usage were confirmed by modern research. The results of the studies revealing new activities and potential fields of application of *S. apiana*, like cytotoxic properties and cancer treatment, were also critically reviewed [74–76].

Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities

S. apiana extracts were investigated by several bioassays to confirm their antimicrobial properties, in accordance with the traditional use of this plant. However, only tentative *in vitro* bioassays have so far been performed. The most in-depth experiment was conducted by Dentali [44] who characterized dichloromethane extract from white sage to identify bioactive compounds using the agar dilution-streak test. Firstly, screening bioassays of 20 herbal remedies of Southwestern US revealed *S. apiana* to be the only plant in this study that completely inhibited the growth of all 4 tested pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Candida albicans*. Further analysis of white sage extracts revealed that its antibacterial and antifungal activity resulted from the presence of carnosic acid and 16-hydroxycarnosic acid. The tests excluded antimicrobial activity of essential oil and ursolic acid [44]. Unfortunately, quantitative results



► **Fig. 4** Structures of C23 terpenoids isolated from *S. apiana*.



► **Fig. 5** Structures of flavonoids and phenolic acids isolated from *S. apiana*.

of growth inhibition (the MIC values) are not provided by the author, so it is not possible to confirm these findings and compare the results with other papers. If confirmed, the above-mentioned antimicrobial effects could be indeed therapeutically relevant. Following the respiratory pathogenesis, *K. pneumoniae* and *S. aureus* are microorganisms able to develop respiratory disorders such as pneumonia [77, 78]. However, the agar dilution-streak method investigates antimicrobial activity against bacteria in the planktonic mode of growth. Given this, the prediction of therapeutic outcome basing on an *in vivo* test can be of limited value as *S. aureus* can colonize the nasopharyngeal mucosa as a biofilm [79, 80]. *S. aureus* is the most frequent microbe found in biofilm-associated infections [81, 82].

It is noteworthy that carnosic acid and the related abietane-type diterpenoid, carnosol, were found to be responsible for antibacterial activity against oral pathogens *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, and *Enterococcus faecalis* during the bioassay-guided fractionation of *R. officinalis* leaf extracts [83]. Carnosic acid and other phenolic diterpenoids, identified in dichloromethane extract, also are present in water and alcoholic extracts of aerial parts of *S. apiana* (► **Table 4**). Pharmacokinetic studies of carnosic acid and carnosol from rosemary extract using the rat *in vivo* model give insight into the bioavailability of these compounds. Carnosic acid is absorbed into the bloodstream after oral administration and is present in its free form in plasma. Administration of ca. 40 mg of carnosic acid in rosemary extract (ca. 100 mg) resulted in plasma concentration at the level of 2–30 µM. The concentrations measured in the small and large intestine were up to several hundred µg/g, and the levels recorded in the liver were 1–15 µg/g [84]. Also, the main elimination route is the fecal route [85]. Carnosic acid was found in relatively high concentrations of over 1% in *S. apiana* extracts (► **Table 4**). How-

ever, neither bioavailability nor active concentrations from human studies are available, so it is not clear if achieved systemic concentrations of carnosic acid could show significant antimicrobial effect. Besides being used in digestive therapies, white sage was employed for gargling in sore throats. Carnosic acid inhibited clinical isolates of *S. aureus* methicillin-resistant and *E. faecalis* gentamicin and streptomycin-resistant bacteria with MIC and MBC values 60 µg/ml. Another main phenolic compound in the extract, rosmarinic acid, was inactive against these bacterial strains even at a high concentration of 480 µg/ml [86]. Also, in this study, carnosic acid showed antibacterial activity against the Gram-negative multidrug-resistant bacteria *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, and *Providencia stuartii*, and its MIC values are at a level of 120 to 240 µg/ml. The results suggest that topically applied water extracts of *S. apiana* can exert antimicrobial activity because of a high content of carnosic acid.

► **Table 5** intends to succinctly collate the available quantitative data on the antimicrobial activity of *S. apiana* extracts. Afonso et al. [72] investigated the antibacterial activity of *S. apiana* leaves decoction against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *Salmonella typhimurium* using the broth microdilution method. The highest activity was observed for *S. epidermidis* with an MIC value of 0.34 mg/ml and *S. aureus* with an MIC value of 0.69 mg/ml. The MBC value was 0.69 mg/ml for both *S. epidermidis* and *S. aureus*. As suggested by van Vuuren et al. [87], noteworthy antimicrobial activity of crude extract of medicinal plants is ascribed for concentrations less than or equal to 160 µg/ml. Since the MIC concentration of *S. apiana* decoction towards *S. epidermidis* was over 2-times higher than the aforementioned value, its effectiveness against said pathogen is doubtful.

► **Table 3** Nonvolatile constituents found in *S. apiana* extracts.

Type of secondary metabolite	Solvent for extraction	Metabolites	Ref.
Root extracts			
Diterpene	Acetone	Cryptotanshinone (25) Lanugon Q (26) Salvicanol (11) 6,7-didehydroferruginol (17) 6,7-didehydrosemperviol (18) 16-hydroxy-6,7-didehydroferruginol (19) 11,12,16-trihydroxy-20(10 → 5)abeo-abieta-1(10),6,8,11,13-pentaene (20) 16-hydroxyroyleanone (21) 6-deoxo-5,6-didehydrolanugon Q (22) Ferruginol (23) Miltiodiol (24)	[62]
Leaf extracts			
Triterpene	Hexane	α-amyrin (30) Oleanolic acid (31) Ursolic acid (32)	[65]
Diterpene	Methanol	Carnosic acid (9) Carnosol (27)	[63]
	Dichloromethane	Carnosic acid (9) 16-hydroxycarnosic acid (10)	[44, 142]
Tocopherols	Methanol	α-tocopherol	[63]
Aerial parts extracts			
Triterpene	Ethanol	Oleanolic acid (31) Ursolic acid (32) Uvaol (33)	[64, 116]
Diterpene	Acetone	16-hydroxycarnosic acid (10) Salvicanol (11) Rosmanol (15) 7-epirosmanol (16) 16-hydroxycarnosol (13) 16-hydroxyrosmanol (12) 16-hydroxy-7-methoxyrosmanol (14)	[61, 67]
	Ethanol	Sageone (28) Carnosol (27) 16-hydroxycarnosol (13) Rosmadial (29)	[64, 116]
	Water (decoction)	Rosmanol (15) Sageone derivative (28) Hydroxycarnosic acid (10) Carnosol (27) Carnosic acid (9)	[72]
C23 terpenoids	Acetone	13,14-dioxo-11-hydroxy-7-methoxy-hassane-8,11,15-trien-(22,6)-olide (34) 14-hydroxy-7-methoxy-11,16-diketo-apian-8-en-(22,6)-olide (35) 7-methoxy-11,16-diketo-apian-8,14-dien-(22,6)-olide (36)	[61, 67]
Phenolic acids	Water (decoction)	Rosmarinic acid (38) Quinic acid (39)	[72]
	Methanol	Rosmarinic acid (38)	[71]
Flavonoids	Ethanol	Cirsimaritin (40) Salvigenin (41)	[64, 116]
	Water (decoction)	Hesperidin (42) Quercetin-O-hexoside Cirsimaritin (40)	[72]

► **Table 4** Content of carnosic acid, camosol, and rosmarinic acid in *S. apiana*, *S. officinalis*, and *S. rosmarinus* (*Rosmarinus officinalis*).

	<i>S. apiana</i> Jeps.			<i>S. officinalis</i> L.			<i>S. rosmarinus</i> Schleiden		
	material/extract type	concentration	Ref.	material/extract type	concentration	Ref.	material/extract type	concentration	Ref.
Carnosic acid (9)	Aerial parts/decoction	14.3 mg/g extract	[72]	Fresh leaves/acetic	12.40 mg/g extract	[143]	Leaves/supercritical CO ₂ extraction	31.1–73.5 mg/g DW	[73]
	Leaves/methanolic	21.8 mg/g DW	[63]	Leaves/methanolic	14.6 mg/g DW	[63]	Leaves/75% dichloro-methane + 25% ethanol	3.4–17.7 mg/g fresh leaves	[144]
				Postdistilled aerial parts/methanolic	746.43–3109.28 µg/g DW	[145]	Fresh leaves; dried leaves/acetic	22.79 mg/g extract; 42.05 mg/g extract	[143]
Carnosol (27)				Leaves/supercritical CO ₂ extraction	0.29–120.0 µg/g extract	[146]	Leaves/hexane and ethyl acetate	177.3 mg/g dry extract	[147]
				Leaves/hexane and ethyl acetate	42.9 mg/g dry extract	[147]			
	Aerial parts/decoction	17.3 mg/g extract	[72]	Fresh leaves/acetic	1.66 mg/g extract	[143]	Fresh leaves; dried leaves/acetic	2.38 mg/g extract; 3.87 mg/g extract	[143]
	Leaves/methanolic	0.3 mg/g DW	[63]	Leaves/methanolic	0.4 mg/g DW	[63]	Leaves/hexane and ethyl acetate	21.5 mg/g dry extract	[147]
				Postdistilled aerial parts/methanolic	2535.11–5541.11 µg/g DW	[145]			
Rosmarinic acid (38)				Leaves/supercritical CO ₂ extraction	0.46–65.5 µg/g extract	[146]			
				Leaves/hexane and ethyl acetate	31.1 mg/g dry extract	[147]			
	Leaves/methanolic	1120 µg/ml extract	[71]	Postdistilled aerial parts/methanolic	8195.80 to 9731.15 µg/g DW	[145]	Leaves/ethanolic 70%	48.09 µg/g	[148]
	Aerial parts/decoction	56.8 mg/g extract	[72]	Leaves/ethanolic 30%	8.5–14.1 mg/g	[149]	Leaves/ethanolic 30%	10.0–11.0 mg/g	[149]
				Leaves/ethanolic 80%	19.5 mg/g DW	[150]	Leaf/methanolic	4040.00 mg/100 g extract	[151]
			Leaves/ethanolic 30%	3634.12 mg/100 g DW	[152]	Leaves/hexane and ethyl acetate	10.0 mg/g dry extract	[147]	
			Leaves/hexane and ethyl acetate	11.6 mg/g dry extract	[147]				

► **Table 5** Antimicrobial bioassays performed on *S. apiana* extracts.

Strain	Type of extract; test conc. [mg/ml]	Positive control/ test conc.	Zone diam. in agar diffusion test [mm]		MIC and MBC values in agar dilution test [mg/ml]		Ref.
			Extract	Control	Extract	Control	
<i>S. aureus</i>	Hexanic 27; 13.5; 6.8; 3.4 [mg/ml]	NP	10.0–24.0	–			[90]
<i>S. pyogenes</i>	Hexanic 27; 13.5; 6.8; 3.4 [mg/ml]	NP	28.0–40.0	–			[90]
<i>E. faecalis</i>	Hexanic 27; 13.5; 6.8; 3.4 [mg/ml]	NP	9.0–17.0	–			[90]
<i>C. albicans</i>	Hexanic 27; 13.5; 6.8; 3.4 [mg/ml]	NP	8.0–13.0	–			[90]
<i>S. aureus</i>	Decoction	Nisin			MIC 0.69; MBC 0.69	> 0.63; > 0.63	[72]
<i>S. epidermidis</i>	Decoction	Nisin			MIC 0.34; MBC 0.69	> 0.63; > 0.63	[72]
<i>S. typhimurium</i>	Decoction	Nisin			MIC 2.75; MBC 2.75	> 0.5; > 0.5	[72]
<i>E. coli</i>	Decoction	Nisin			MIC 2.75; MBC 2.75	> 0.5; > 1.0	[72]
<i>P. aeruginosa</i>	Decoction	Nisin			MIC 2.75; MBC 2.75	> 1.0; > 1.0	[72]

NP: not provided

Allison et al. [88] reported inhibition of growth of a Δ tolC mutant strain of the bacterium *E. coli* by dichloromethane fraction of methanol extract from leaves and stems of white sage in concentration 100 μ g/ml. Unfortunately, the study should be considered as an initial screening since no phytochemical analysis of the obtained extract was performed.

Dentali [44] excluded antimicrobial activity of *S. apiana* essential oil, which was tested in a concentration of 1000 μ g/ml in agar dilution-streak test. According to the criteria described by van Vuuren et al., [87], an essential oil cannot be considered as a noteworthy antimicrobial agent if its active concentration value exceeds 1000 μ g/ml. In such a case, therapeutic doses necessary to achieve contact inhibition may result in dangerously high systemic concentrations and possible toxic effects. Antimicrobial activity *in vivo* of essential oils should be considered mainly for topical therapies since MIC concentrations cannot be realistically achieved in the plasma [89].

The majority of studies on the antimicrobial activity of *S. apiana* were conducted using extracts from aerial parts of the plant; however, there is one report dedicated to the evaluation of the antibacterial activity of a hexane extract of roots in concentrations of 27, 13.5, 6.8, and 3.4 mg/ml using agar disk-diffusion method [90]. All concentrations of the extract significantly inhibited the growth of bacteria, depending on the applied dose: *S. aureus* (inhibition zone in the range of 10 to 24 mm), *Streptococcus pyogenes* (inhibition zone in the range of 28 to 40 mm), *E. faecalis* (inhibition zone in the range of 9 to 17 mm), and fungi *C. albicans* (inhibition zone in the range of 8 to 13 mm). No growth inhibition was revealed for *E. coli* and *Candida tropicalis*.

The folkloric use of aromatic plants as anti-infective agents may be associated with the antimodulatory effects of essential oils [91–93]. Most reports on the traditional use of *S. apiana* mentions using water for extract preparation. This can be done by macerating fresh leaves in water (a few leaves per 1 liter) [39,41] or by preparing an infusion (tea) from white sage [4,30]. Essential oil can be administered as an infusion; however, during its preparation, part of volatile compounds will be lost. For instance, rosemary infusions contain only 19.6% of the initial essential oil (1.84% v/w in leaves and 0.36% oil yield in infusion). The major compounds of essential oil in leaves were 1,8-cineole (41.6%), camphor (17.0%), α -pinene (9.9%), α -terpineol (4.9%), and borneol (4.8%), whereas volatiles present in the infusion included 1,8-cineole (42.4%), camphor (31.4%), α -terpineol (8.6%), and borneol (8.3%) [94]. Radulescu et al. [95] presented the composition of volatile compounds in the infusion from *S. officinalis* leaves. The essential oil of leaves, obtained using Clevenger-type apparatus, consisted mainly of thujone (α and β ; 27.36%), camphor (11.25%), 1-octen-3-ol (8.5%), and 1,8-cineole (6.72%). The losses of volatile compounds in *S. officinalis* infusions were most evident for monoterpene hydrocarbons like ocimene and camphene, which were not found in this delivery form. The volatile fraction of common sage infusion contained mainly thujone (α and β ; 32.85%), camphor (24.94%), and 1,8-cineole (16.16%). As mentioned earlier, the composition of *S. apiana* essential oils (► **Table 2**) is similar to rosemary and common sage. Since 1,8-cineole was found in infusions from *S. rosmarinus* and *S. officinalis*, it can be assumed that it is probably present also in an *S. apiana* infusion. If this were to be confirmed experimentally, it would be

important from a therapeutic standpoint. It is worth noticing that 1,8-cineol has good bioavailability after oral administration, and about 20% of an oral dose reaches the peripheral airways [96, 97]. *In vivo* and *in vitro* studies have confirmed that 1,8-cineole has a potential therapeutic role in inflammatory-based respiratory diseases [96, 97]. Its mechanism of action is based on inhibition of cytokine production: tumor necrosis factor TNF α , interleukin-1b, leukotriene B4, thromboxane B2, IL-8, and IL-5, as well as inhibition of arachidonic acid metabolism [98–101]. Further studies revealed that 1,8-cineole reduces pro-inflammatory NF- κ B-activity [102] and inhibits the expression of the mucin genes MUC2 and MUC19 [103]. 1,8-cineole possibly exhibits antiviral activity due to the increase of antiviral transcription factor interferon regulatory factor 3 activity [102]. The anti-inflammatory capabilities of 1,8-cineole were studied also in various multi-center, double-blinded, and randomized trials in humans with acute and chronic respiratory conditions like asthma or rhinosinusitis. The results revealed a promising efficacy profile and safety, with few side effects reported when consuming therapeutic doses of 1,8-cineole [96]. In Germany, 1,8-cineol has been registered as a drug Sole-dum forte® (200 mg dose). The daily recommended dose of the drug is 400–800 mg.

The anti-inflammatory activity of *S. apiana* decoction and its potency to counteract NO radical was evaluated in the lipopolysaccharide LPS-activated RAW264.7 macrophage model. The ability to modulate inflammatory reactions was about one-third of that of dexamethasone [72].

To sum up, studies on antibacterial and immunomodulatory activity of *S. apiana* preparations may provide some explanation of therapeutic effects observed by the Chumash in infections like cold and sore throats [30]. The presence of volatile compounds may be vital especially because ethnopharmacological reports warned against treating white sage leaves with boiling water in order not to lose the effect [4]. Also, experiments linked the presence of diterpenes, which are abundant in *S. apiana* (► Table 4), with the antimicrobial activity of the extracts. The studies were conducted with the use of panels of clinically relevant bacterial strains, and the results generally support the topical use of *S. apiana* extracts for the treatment of infections. This is not the case in all of the studies, however, since MIC values reported in some of them are not considered noteworthy according to the proposed criteria. The systemic antibacterial effects of white sage have not been confirmed and are unlikely, given the doses that would be required to achieve necessary concentrations. Also, it has to be noted that the majority of the studies conducted thus far should be considered preliminary. Their limitations include the use of extracts with unknown composition, the absence of positive controls, no MIC or IC50 values, and the absence of cytotoxicity studies involving reference cell lines that would enable evaluation of the specificity of antimicrobial actions.

GABA-ergic Activity

A number of studies investigated the influence of sage constituents on the GABA-ergic system. Among these, abietane diterpenes have been the most extensively studied; however, experiments involving flavonoids and volatile compounds have also

been conducted. The results of selected studies from this field are presented in ► Table 6.

Carnosic acid and carnosol have been shown to enhance the function of ionotropic GABA receptors by inhibiting the binding of antagonists to its chloride channel site [104–106]. More recently, the GABA-ergic activity of carnosol was confirmed by Khan et al. [107]; however, the results suggest that the compound acts via the benzodiazepine site of the receptor. This observation is in agreement with other studies that demonstrated that related diterpenes like 7-methoxyrosmanol, rosmanol, and miltirone also bind to GABA receptors at the benzodiazepine site [108–110]. Apart from diterpenes, flavonoids and volatile compounds found in *S. apiana* have also been shown to exhibit GABA-ergic and anxiolytic effects (► Table 6).

The above-described activities of *S. apiana* constituents might explain the use of white sage as a calmative agent in folk medicine. However, the plausibility of the proposed mechanism needs to be verified. In particular, one must consider the bioavailability of potentially active constituents. The pharmacokinetics of carnosic acid in humans have not been studied so far, however, its bioavailability in rats is ca. 40% [85]. The results of animal experiments [84] indicate that after ingestion, the concentration of carnosic acid in brain tissue can reach 1.5–1.9 μ g/g (roughly equal to 4.5–5.7 μ M), which is lower as compared to effective levels reported in most of the receptor studies (► Table 6). Moreover, it has to be noted that Zucker rats involved in the study were fed a diet supplemented with 0.5% enriched rosemary extract containing ca. 40% carnosic acid for over 2 months [84]. At the assumed 15–25 g daily food intake in rats, this corresponds to a daily dose of 30–50 mg of carnosic acid. Given the above, it seems unlikely that carnosic acid is the sole constituent responsible for the putative psychoactive properties of *S. apiana*, even with its high content of over 20 mg/g. However, the observed effects might be the result of the synergistic action of white sage diterpenes and different constituents. Recent studies indicate that 1,8-cineole, which is present in substantial quantities in *S. apiana* essential oil, exerts anxiolytic and antidepressant effects in rats [111] and mice [112]. The results of both studies suggest that 1,8-cineole may act at the benzodiazepine site of GABA receptors. This phenomenon is certainly worth further investigation, especially given that 1,8-cineole has been shown to have good bioavailability and is capable of crossing the blood-brain barrier [113, 114]. Nevertheless, it has to be stated that 1,8-cineole has so far not been reported to exhibit sedative properties in humans, and no such effect has been observed even after the intake of high doses (200 mg 3 times daily) of pure compound [96].

Summing up, the available data indicate that studies concerning the GABA-ergic activity of *S. apiana* are certainly worth further attention. Given the availability of constituents exhibiting said activity, the biological effects cannot be definitively excluded. However, one must note that this statement is based on an extrapolation of activities reported *in vitro* for specific constituents of the plant. Further studies are necessary to determine whether this translates to clinical effects.

► **Table 6** Selected studies concerning GABA-ergic activity of white sage constituents

Investigated compounds	Experimental model	Results	Ref.
Carnosic acid, carnosol (abietane diterpenes)	<i>In vitro</i> : isolated Wistar rat cortex membranes; inhibition of binding of radiolabeled ligands to different sites of GABA receptors	Inhibition of binding of tert-butylbicyclophosphorothionate to chloride channel site of the receptor (IC ₅₀ values for carnosic acid and carnosol: 33 and 57 μM, respectively); no effect on muscimol and diazepam binding	[106]
7-Methoxyrosmanol (abietane diterpene), cirsimaritin (flavonoid)	<i>In vitro</i> : crude synaptic tissue membranes isolated from post-mortem human frontal cortex; inhibition of binding of radiolabeled flumazenil to benzodiazepine site of GABA receptors	Competitive inhibition of flumazenil binding (IC ₅₀ values for 7-methoxyrosmanol and cirsimaritin: 350 and 7.2 μM, respectively)	[109]
Carnosol (abietane diterpene)	<i>In vitro</i> : <i>Xenopus</i> oocytes expressing recombinant GABA receptors; electrophysiological studies	Positive modulation of GABA receptor at 1–10–30–100–300 μM, effect attenuated by flumazenil indicating binding at benzodiazepine site	[107]
Carnosol (abietane diterpene)	<i>In vivo</i> : male Swiss mice; elevated plus maze and light-dark box test	Anxiolytic effect at 10–100 mg/kg dose	[107]
Carnosol, rosmanol (abietane diterpenes), salvigenin, cirsimaritin (flavonoids)	<i>In vitro</i> : <i>Xenopus</i> oocytes expressing recombinant GABA receptors; electrophysiological studies	Carnosol (100–300–1000 μM): found to act as a non-competitive GABA blocker at high GABA doses; slight positive modulation at low GABA doses Rosmanol (100 μM): flumazenil-independent inhibition of GABA currents at high GABA doses; positive modulation at low GABA doses, inhibited by flumazenil Salvigenin (100 μM): flumazenil-independent inhibition of GABA currents at high GABA doses; positive modulation at low GABA doses, inhibited by flumazenil Cirsimaritin (100 μM): inhibition of GABA currents at high GABA doses; flumazenil-independent positive modulation at low GABA doses	[110]
1,8-Cineole (monoterpene)	<i>In vivo</i> : male Sprague-Dawley rats; elevated plus maze	Anxiolytic effect at 1 mg/kg (intraperitoneal route), diminished by flumazenil	[111]
1,8-Cineole (monoterpene)	<i>In vivo</i> : male ddY mice; light-dark box test, marble-burying test	Anxiolytic effect at 4 × 10 ⁻⁴ mg/400 μl (inhalation), reversed by flumazenil	[112]

Analgesic Activity

Besides being used as a calmative, white sage has been reported to possess analgesic properties. With this in mind, the role of the cannabinoid and opioid system in the antinociceptive effects of ethanolic extract of *S. apiana* was investigated. The crude extract of the plant was shown to exhibit moderate activity towards CB1. Further isolation and analysis of the compounds in that fraction showed the diterpene sageone to be active toward CB1 and CB2 (73 and 78% displacement at 33 μM, respectively) and moderately active towards the μ-opioid receptor (55% displacement at 33 μM) [64]. The reported values were higher (in the case of CBs) or lower (for μ-opioid receptor) as compared to positive controls. The reported activity on opioid receptors is not typical for abietane-type terpenoids present in plants from the genus *Salvia*. So far, the best-known nonalkaloid modulators of opioid receptors are neoclerodane diterpenes from *Salvia divinorum*, which act mostly as κ-opioid receptor agonists [76, 115]. As opposed to other sage species found in the Americas, clerodane-type diterpenes were not identified in *S. apiana* aerial parts [59]. Another white sage constituent that showed moderate inhibition of the μ-opioid receptor was the triterpene uvaol [64, 116]. Since neither the exact content nor bioavailability of sageone and uvaol are known, it is

not possible to tell whether they actually contribute to analgesic effects of the plant. The reported activity needs to be confirmed and validated using other *in vitro* and *in vivo* models.

Besides di- and triterpenoids, the pain-relieving activity of *S. apiana* can be possibly attributed to the composition of the essential oil and its high level of 1,8-cineole, which inhibits the formation of prostaglandins and cytokines [117] and has TRPM8-activating and TRPA1-inhibiting abilities [118]. As a small lipophilic molecule, 1,8-cineole is absorbed by inhalation or ingestion, and can easily cross the blood-brain barrier [113, 114].

Antioxidant Activity

Antioxidant activity of *S. apiana* decoction was confirmed by Afonso et al. [72] using 4 methods: DPPH, ferric reducing power assay, thiobarbituric acid reactive substances, and bleaching of β-carotene. Likewise, in the DPPH scavenging test, ABTS radical cation assay, FRAP method, and reducing power assay, methanolic extract of *S. apiana* has been reported to have the ability to change the oxidation status [71]. Quantitative results of antioxidant assays are presented in ► **Table 7**.

Antioxidant capacity and ability to scavenge free radicals are most likely associated with the presence of phenolic components,

► **Table 7** Antioxidant bioassays performed on *S. apiana* extracts.

Test of antioxidant activity	Type of extract	Positive control	Antioxidant activity [µg/ml]	Antioxidant activity of positive control [µg/ml]	Ref.
DPPH ^a	Decoction	Ascorbic acid	13.3 ^b	6.7	[72]
FRAP ^c	Decoction	BHA ^d	55.0 ^b	16.1	[72]
TBARS ^e	Decoction	Trolox	2.79 ^b	23.0	[72]
BCBA ^f	Decoction	Trolox	41.2 ^b	41.7	[72]
DPPH	Methanolic	Trolox	2935.57 ^g	NA	[71]
ABTS	Methanolic	Trolox	1710.91 ^g	NA	[71]
FRAP	Methanolic	Trolox	1959.39 ^g	NA	[71]
RP ⁱ	Methanolic	Trolox	4669.13 ^g	NA	[71]

NA: not available; ^a DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) scavenging test; ^b expressed as the sample concentration providing 50% of antioxidant activity; ^c FRAP: ferric reducing antioxidant power assay; ^d BHA: 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol; ^e TBARS: thiobarbituric acid reactive substances assay; ^f BCBA: β -Carotene bleaching assay; ^g expressed as micrograms of Trolox equivalent; ^h ABTS: 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radical scavenging assay; ⁱ RP: reducing power method

such as rosmarinic acid and phenolic diterpenoids. Among the latter are carnosic acid, carnosol, rosmanol, hydroxycarnosic acid, and a derivative of sageone. Methanolic extracts of *S. apiana* leaves are rich in polyphenols. Total phenolic contents of the investigated plant are about 1.3–1.6-fold higher than in *S. officinalis* and 2.5-fold higher than in *S. divinorum* methanolic extract. Also, *S. apiana* was confirmed to be the richest source of flavonoid compounds among these species, as its total flavonoid content was about 1.3–2.0-fold and 6.6-fold higher than in *S. officinalis* and *S. divinorum*, respectively [71]. Interestingly, the described differences did not directly translate to the results of antioxidant activity studies. *S. apiana* and *S. officinalis* yielded comparable results in terms of antioxidant activity determined by DPPH and ABTS assays; however, *S. apiana* performed better in FRAP and RP (reducing power) method. Also, both species had stronger antioxidant activity as compared to *S. divinorum* (3- to over 10-fold difference, depending on the test used). Rosmarinic acid was the dominant secondary metabolite in all sage extracts examined in the study. The highest content of this compound was detected in white sage extract (1120 µg/ml), higher than in *S. officinalis* and *S. divinorum* [71]. In decoction, rosmarinic acid concentration was 56.8 mg per g of the extract [72].

It has to be emphasized that promising results obtained using *in vitro* bioassays of antioxidant capacity cannot be a predictor of its ability to reduce oxidative stress in *in vivo* free-radical diseases. Numerous studies indicate that bioavailable concentrations of phenolic compounds of plant origin are too low to exhibit antioxidant effects *in vivo* [119]. Nevertheless, a polyphenol-rich diet has beneficial effects on health and diseases associated with free-radical pathological mechanisms, like diabetes, obesity, cancer, cardiovascular, and neurodegenerative diseases. Their mode of action may be related to mediation of interactions with specific proteins central to intracellular signaling cascades, modification of the expression and activity of key proteins, modulation by epigenetics modifications, or impact on the gut microbiota [120]. Vulganova et al. [71] reported the significant inhibitory activity

of methanolic extract of dried leaves of *S. apiana* against 4 selected serine proteinases: trypsin, thrombin, urokinase, and plasmin. These proteinases are responsible for the pathological mechanisms of some diseases (e.g., cancer and viral infections).

Cytotoxic and Antitumor Activity

Recent *in vitro* studies show that *S. apiana* methanolic and water extracts exhibit cytotoxic effects on cancer cell lines. So far, no studies indicate that white sage would have chemopreventive activity, and only the chemotherapeutic antitumor effect was investigated for the plant. The results of the tests conducted on drug-sensitive parental CCRF-CEM leukemia cells and their multidrug-resistant P-glycoprotein-overexpressing subline CEM/ADR5000 confirmed the cytotoxic activity of the methanol extract of *S. apiana* [74]. A decoction of white sage exhibited significant, tumor-selective cytotoxic effects against tumor cell lines: hepatocellular carcinoma HepG2, cervical carcinoma HeLa, and breast carcinoma MCF-7 [72]. Quantitative data of conducted experiments are presented in ► **Table 8**.

Besides therapeutically-relevant effects, it was shown that the essential oil of the plant inhibits the growth of *Cucumis sativa* and *Avena* seedling roots. Growth inhibition was induced by the presence of terpenes and the highest cytotoxic effect was observed during the exposition of the seedlings to camphor and cineole. The weakest effect was observed during the treatment of seedlings with α -pinene and β -pinene [45, 121].

Both methanolic and water extracts of *S. apiana* contain carnosic acid and carnosol. These 2 compounds were identified in supercritical *Rosmarinus officinalis* extracts as the key components responsible for its antitumor effects, demonstrated using colon and pancreatic cancer cell lines, as well as by *in vivo* experiments. In this study, carnosic acid inhibited tumor cell viability in a dose-dependent manner, and carnosol significantly enhanced the antitumor activity of carnosic acid [122]. The relatively good bioavailability of carnosic acid [84] and its high content in *S. apiana* ex-

► **Table 8** Cytotoxic bioassays performed on *S. apiana* extracts.

Cell model	Type of extract	Positive control/ test conc.	Cytotoxic activity (IC ₅₀) [µg/ml]	Cytotoxic activity of posi- tive control (IC ₅₀) [µg/ml]	Ref.
CCRF-CEM	Methanolic	NP	7.17	NP	[74]
CEM/ADR5000	Methanolic	NP	9.91	NP	[74]
HepG2	Decoction	Ellipticine	40.9	1.0	[72]
HeLa	Decoction	Ellipticine	57.3	2.0	[72]
MCF-7	Decoction	Ellipticine	60.2	1.0	[72]
NCI-H460	Decoction	Ellipticine	254.7	1.0	[72]
PLP2	Decoction	Ellipticine	361.7	3.0	[72]

NP: not provided

tracts suggests the potential anti-tumor activity of this plant. Moreover, according to the study on rosemary [122], not only carnosic acid and carnosol but also other components like volatile compounds are involved in antitumor activity of the plant. Thus, white sage extracts may be a good candidate for further research aimed at examining the effective doses in animal models.

Conclusions and Future Prospects

In the current work, the information concerning botany, chemistry, biological activity, and possible therapeutic use of *S. apiana* (white sage) was compiled. Given the available data, the following conclusions can be made:

- *S. apiana* is rich in essential oil and abietane-type diterpenes. The reported contents of these constituents are comparable or higher than in common sage. Studies also revealed the presence of rosmarinic acid; however, its content in white sage cannot be reliably compared with other representatives of the genus. The composition of essential oil is similar to *S. lavandulaefolia*, *S. rosmarinus*, and cineole chemotypes of *S. officinalis* whose notable characteristic is the lack of neurotoxic thujone. This feature of white sage is clearly beneficial in terms of safety of use. Phytochemical studies revealed the presence of species-specific C23 terpenoids hassananes and apiananes; however, their exact contents were not reported and it is not known whether they contribute to the biological effects of the plant. Given the above, future studies should focus on more detailed quantitative analyses that would include major compounds typical for the *Salvia* genus, as well as unique constituents of white sage. Moreover, the chemical variability of the plant depending on the time and place of harvesting needs to be assessed.
- Studies on antimicrobial and anti-inflammatory activity of white sage generally support its topical use as an anti-infective agent, which is similar to the traditional use of other representatives of the genus, such as common sage (*S. officinalis*). Some results link the above effects with the presence of diterpenoids and 1,8-cineole, which is in agreement with phytochemical studies demonstrating the high content of these

compounds in *S. apiana*. However, these reports do not definitely prove the clinical efficacy of the plant extracts. Some of the results indicate that the effective concentrations reported cannot be considered therapeutically noteworthy. Also, there are several limitations of the conducted studies including the use of nonstandardized extracts or extracts prepared using biologically incompatible solvents such as hexane. Other limitations include lack of positive controls, IC₅₀ or MIC values, and parallel cytotoxicity studies. Given this, more state-of-the-art studies are needed if the plant is to be included in modern phytotherapy.

- Several *in vitro* and animal studies demonstrated that selected compounds present in *S. apiana*, including monoterpenes, diterpenes, and flavonoids, exhibit GABA-ergic properties. Given the results of bioavailability studies, the calmative effects reported in traditional medicine cannot be completely excluded. However, none of the studies in this field have been conducted with the use of white sage extracts, and the above assumption is based solely on the reported effects of single compounds. Moreover, it must be confronted with the fact that other sage species with similar compositions (such as *S. officinalis*) are not traditionally used as calmative agents. Thus, conducting experiments using *S. apiana* extracts is crucial to exclude or confirm its calmative action.
- Biological activity studies concerning the analgesic activity of *S. apiana* constituents have been performed. Selected diterpenes and triterpenes present in the plant were shown to bind to CB and opioid receptors *in vitro*, which is in agreement with the traditional use of white sage. However, given the lack of data on the exact contents and bioavailability of these constituents, the reports should be considered preliminary.
- Antioxidant activity studies on *S. apiana* have so far been limited to simple *in vitro* tests whose results likely do not translate to *in vivo* effects. However, this is a common issue that does not refer specifically to studies on white sage. Comparative experiments in this field demonstrated that the antioxidant activity of white sage is similar to common sage. These studies reflect the high phenolic content of both plants.

- Studies concerning the cytotoxic and antitumor activity of the plant are limited to *in vitro* assays. These experiments showed that white sage extracts are active against different cancer cell lines, albeit at concentrations noticeably higher as compared to positive controls. Literature data indicate that the observed effects may result from the high diterpenoid content of *S. apiana* extracts. However, none of the studies indicate that white sage contains compounds with exceptionally high cytotoxic properties.
- Limited availability and threats of overexploitation of *S. apiana* populations is an important issue. If white sage is to be used and investigated more extensively, sustainable and standardized cultivation practices have to be employed to provide a sufficient amount of raw material. On the positive side, the plant can be successfully propagated by seeds or cuttings, and farm cultivation can be established.

Summing up, the results of contemporary studies on white sage suggest that at least some of the therapeutic effects claimed in Native American phytotherapy may be plausible, and the plant has great potential for practical application in modern phytomedicine. However, as compared to other sage species, the reports concerning the chemistry and biological activity of *S. apiana* are scarce, and further studies are required to confirm its therapeutic value. Given the similarities to the common sage in terms of major constituents, white sage can likely find the same use but research concerning other activities is so far preliminary.

Supporting Information

The detailed composition of essential oils in different sage species is provided as Supporting information.

Contributors' Statement

Data collection: A. Krol, A. Kokotkiewicz; design of the study: A. Krol, A. Kokotkiewicz, M. Luczkiewicz; analysis and interpretation of the study: A. Krol, A. Kokotkiewicz, M. Luczkiewicz; preparing a first version of the manuscript: A. Krol, A. Kokotkiewicz, M. Luczkiewicz; critical revision of the manuscript: M. Luczkiewicz. All authors read and approved the manuscript in its final form.

Acknowledgements

The study was supported by the project POWR.03.02.00-00-1014/17-00 cofinanced by the European Union through the European Social Fund under the Operational Programme Knowledge Education Development 2014–2020.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Walker JB, Drew BT, Sytsma KJ. Unraveling species relationships and diversification within the iconic California floristic province sages (*Salvia* subgenus *Audibertia*, Lamiaceae). *Syst Bot* 2015; 40: 826–844. doi:10.1600/036364415X689285
- [2] Timbrook J. Ethnobotany of Chumash indians, California, based on collections by John P. Harrington. *Econ Bot* 1990; 44: 236–253. doi:10.1007/BF02860489
- [3] Timbrook J. Chia and the Chumash: a reconsideration of sage seeds in Southern California. *J Calif Gt Basin Anthropol* 1986; 8: 50–64
- [4] Adams JD, Garcia C. The advantages of traditional Chumash healing. *Evid Based Complement Altern Med* 2005; 2: 19–23. doi:10.1093/ecam/neh072
- [5] Takhtajan A. *Flowering Plants*. Second ed. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009. doi:10.1007/978-1-4020-9609-9
- [6] Will M, Claßen-Bockhoff R. Time to split *Salvia* s.l. (Lamiaceae)—new insights from Old World *Salvia* phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 2017; 109: 33–58. doi:10.1016/j.ympev.2016.12.041
- [7] Greene EL. On certain Californian Labiatae. *Pittonia* 1892; 2: 233–236
- [8] Bentham G. *Labiatarum Genera et Species: or, a Description of the Genera and Species of Plants of the Order Labiatae; with their general History, Characters, Affinities, and geographical Distribution*. London: James Ridgway and Sons, Piccadilly; 1836
- [9] Briquet J. Questions de nomenclature. *Bull L'Herbier Boissier* 1894; 2: 49–88
- [10] Jepson WL. Northernmost stations for two common Californian Trees. *Muhlenbergia* 1908; 3: 144
- [11] Averett DE. *Salvia apiana*. Jepson Flora Proj Jepson eFlora 2012. Accessed December 2, 2018 at: http://ucjeps.berkeley.edu/eflora/eflora_display.php?tid=43038
- [12] Munz PA. The Southern California species of *Salvia*. *Bull South Calif Acad Sci* 1927; 26: 17–29
- [13] Walker JB, Sytsma KJ, Treutlein J, Wink M. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae*. *Am J Bot* 2004; 91: 1115–1125. doi:10.3732/ajb.91.7.1115
- [14] Walker JB, Sytsma KJ. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Ann Bot* 2007; 100: 375–391. doi:10.1093/aob/mcl176
- [15] Will M, Claßen-Bockhoff R. Why Africa matters: evolution of old world *Salvia* (Lamiaceae) in Africa. *Ann Bot* 2014; 114: 61–83. doi:10.1093/aob/mcu081
- [16] Hu GX, Takano A, Drew BT, Liu ED, Soltis DE, Soltis PS, Peng H, Xiang CL. Phylogeny and staminal evolution of *Salvia* (Lamiaceae, Nepetoideae) in East Asia. *Ann Bot* 2018; 122: 649–668. doi:10.1093/aob/mcy104
- [17] Kriebel R, Drew BT, Drummond CP, González-Gallegos JG, Celep F, Mahdjoub MM, Rose JP, Xiang CL, Hu GX, Walker JB, Lemmon EM, Lemmon AR, Sytsma KJ. Tracking temporal shifts in area, biomes, and pollinators in the radiation of *Salvia* (sages) across continents: leveraging anchored hybrid enrichment and targeted sequence data. *Am J Bot* 2019; 106: 573–597. doi:10.1002/ajb2.1268
- [18] Drew BT, Sytsma KJ. Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe *Mentheae* (Lamiaceae). *Am J Bot* 2012; 99: 933–953. doi:10.3732/ajb.1100549
- [19] Montalvo AM, Riordan EC, Beyers JL. Plant profile for *Salvia apiana*, Updated 2017. Native plant recommendations for Southern California Ecoregions. Riverside-Corona Resource Conservation District and U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station, Riverside, CA. Accessed April 5, 2021 at: <https://www.fs.usda.gov/treesearch/pubs/57258>
- [20] Grant KA, Grant V. Mechanical isolation of *Salvia apiana* and *Salvia mellifera* (Labiatae). *Evolution* (N Y) 1964; 18: 196–212. doi:10.2307/2406392
- [21] Ott D, Hühn P, Claßen-Bockhoff R. *Salvia apiana*—a carpenter bee flower? *Flora* 2016; 221: 82–91. doi:10.1016/j.flora.2015.12.008
- [22] Epling C, Lewis H, Raven PH. Chromosomes of *Salvia*: section *Audibertia*. *Aliso A J Syst Evol Bot* 1962; 5: 217–221

- [23] Jepson WL. *S. apiana*. In: A Flora of California, Vol. 3, Part 2. Berkeley: Jepson Herbarium and Library, University of California; 1943: 407–408
- [24] Epling C. The Californian *Salvias*. A review of *Salvia*, section *Audibertia*. Ann Missouri Bot Gard 1938; XXV: 95–188
- [25] Epling C. Natural hybridization of *Salvia apiana* and *S. mellifera*. Evolution (NY) 1947; 1: 69–78. doi:10.2307/2405405
- [26] Montalvo AM. *Salvia apiana* Jepson. In: Francis JK, ed. Wildland Shrubs of the United States and its Territories: Thamnisc Descriptions. General Technical Report IITF-GTR-26, Vol. 1. San Juan: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry and Rocky Mountain Research Station 2004; 671–675. Accessed April 5, 2021 at: <https://www.fs.usda.gov/treesearch/pubs/27005>
- [27] Boyd S. Vascular flora of the Liebre Mountains, western Transverse Ranges, California. Aliso A J Syst Evol Bot 1999; 18: 93–139. doi:10.5642/aliso.19991802.15
- [28] Adlof CC. How does harvesting impact white sage (*Salvia apiana*) as a cultural resource in Southern California? [Dissertation] Northridge: California State University; 2015
- [29] Riaño D, Chuvieco E, Ustin S, Zomer R, Dennison P, Roberts D, Salas J. Assessment of vegetation regeneration after fire through multitemporal analysis of AVIRIS images in the Santa Monica Mountains. Remote Sens Environ 2002; 79: 60–71. doi:10.1016/S0034-4257(01)00239-5
- [30] Stevens M, O'Brien B. Plant guide: white sage. 2003. Accessed November 30, 2020 at: https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs_saap2.pdf
- [31] Leopold S. What is going on with white sage? J Med Plant Conserv 2019; 2019: 3–5
- [32] Calscape California Native Plant Society. White sage, *Salvia apiana*. Accessed August 16, 2020 at: [https://www.calscape.org/Salvia-apiana-\(White-Sage\)?srchr=sc5f393fa471655](https://www.calscape.org/Salvia-apiana-(White-Sage)?srchr=sc5f393fa471655)
- [33] Joubert E, Joubert ME, Bester C, de Beer D, De Lange JH. Honeybush (*Cyclopia* spp.): from local cottage industry to global markets—the catalytic and supporting role of research. South African J Bot 2011; 77: 887–907. doi:10.1016/j.sajb.2011.05.014
- [34] Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Kowalski W, Badura A, Piekus N, Bucinski A. Isoflavone production in *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) suspension cultures grown in shake flasks and stirred-tank bioreactor. Appl Microbiol Biotechnol 2013; 97: 8467–8477. doi:10.1007/s00253-013-5099-z
- [35] Kokotkiewicz A, Bucinski A, Luczkiewicz M. Xanthone, benzophenone and bioflavonoid accumulation in *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. (honeybush) shoot cultures grown on membrane rafts and in a temporary immersion system. Plant Cell Tissue Organ Cult 2015; 120: 373–378. doi:10.1007/s11240-014-0586-1
- [36] Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Hering A, Ochockab R, Gorynski K, Bucinski A, Sowinski P. Micropropagation of *Cyclopia genistoides*, an endemic South African plant of economic importance. Z Naturforsch C J Biosci 2012; 67: 65–76. doi:10.1515/znc-2012-1-209
- [37] D'Amelia V, Ruggiero A, Tranchida-Lombardo V, Leone A, Tucci M, Docimo T. Biosynthesis of *Salvia* specialized Metabolites and Biotechnological Approaches to increase their Production. In: Georgiev V, Pavlov A, eds. *Salvia* Biotechnology. Cham: Springer International Publishing; 2017: 241–270. doi:10.1007/978-3-319-73900-7_7
- [38] Taşçıoğlu AB, Taşçıoğlu AO. Wichasha wakan: medicine man (Lakota Sioux) Native American medicine and the role of the medicine man. Turk Neurosurg 2002; 12: 1–8
- [39] Adams JD, Garcia C. Spirit, mind and body in Chumash healing. Evid Based Complement Alternat Med 2005; 2: 459–463. doi:10.1093/ecam/neh130
- [40] Adams JD, Garcia C, Lien EJ. A comparison of Chinese and American Indian (Chumash) medicine. Evid Based Complement Alternat Med 2010; 7: 219–225. doi:10.1093/ecam/nem188
- [41] Adams JD, Garcia C. Palliative care among Chumash people. Evid Based Complement Alternat Med 2005; 2: 143–147. doi:10.1093/ecam/neh090
- [42] Adams JD, Garcia C. Women's health among the Chumash. Evid Based Complement Alternat Med 2006; 3: 125–131. doi:10.1093/ecam/nek021
- [43] Dayton WA. Important Western browse plants. Washington, D. C.: U. S. Department of Agriculture; 1931; 141. Accessed April 5, 2021 at: <https://books.google.pl/books?id=FqooAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=pl#v=onepage&q&f=false>
- [44] Dentali SJ. Potential antiinfective agents from *Eriodictyon angustifolium* Nutt. and *Salvia apiana* Jeps. [Dissertation] Ann Arbor: University of Arizona; 1991
- [45] Muller WH, Muller CH. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia* species. Bull Torrey Bot Club 1964; 91: 327–330. doi:10.2307/2483297
- [46] Borek TT, Hochrein JM, Irwin AN. Composition of the essential Oils from Rocky Mountain Juniper (*Juniperus scopulorum*), big Sagebrush (*Artemisia tridentata*), and white Sage (*Salvia apiana*). Albuquerque, NM, and Livermore, CA: Sandia National Laboratories; 2003. doi:10.2172/918273
- [47] Takeoka GR, Hobbs C, Park BS. Volatile constituents of the aerial parts of *Salvia apiana* Jepson. J Essent Oil Res 2010; 22: 241–244. doi:10.1080/10412905.2010.9700314
- [48] Perry NB, Anderson RE, Brennan NJ, Douglas MH, Heaney AJ, McGimpsey JA, Smallfield BM. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. J Agric Food Chem 1999; 47: 2048–2054. doi:10.1021/jf981170m
- [49] Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour Fragr J 2008; 23: 213–226. doi:10.1002/ffj.1875
- [50] Giffen JE, Lesiak AD, Dane AJ, Cody RB, Musah RA. Rapid species-level identification of *Salvias* by chemometric processing of ambient ionisation mass spectrometry-derived chemical profiles. Phytochem Anal 2017; 28: 16–26. doi:10.1002/pca.2639
- [51] Emboden WA, Lewis H. Terpenes as taxonomic characters in *Salvia* section *Audibertia*. Brittonia 1967; 19: 152. doi:10.2307/2805272
- [52] Giannouli A, Kintzios SE. Essential Oils of *Salvia* spr: Examples of intraspecific and seasonal Variation. In: Kintzios SE, ed. SAGE The Genus *Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000: 69–79
- [53] Grdiša M, Jug-Dujaković M, Lončarić M, Carović-Stanko K, Ninčević T, Liber Z, Radosavljević I, Šatović Z. Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. Agric Conspec Sci 2015; 80: 69–78
- [54] Ali A, Tabanca N, Demirci B, Blythe E, Ali Z, Baser K, Husnu C, Khan I. Chemical composition and biological activity of four *Salvia* essential oils and individual compounds against two species of mosquitoes. J Agric Food Chem 2015; 63: 447–456. doi:10.1021/jf504976f
- [55] Raal A, Orav A, Arak E. Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from various European countries. Nat Prod Res 2007; 21: 406–411. doi:10.1080/14786410500528478
- [56] European Medicines Agency. Public statement on the use of herbal medicinal products containing thujone. EMA/HMPC/732886/2010 Rev. 1. 2012. Accessed April 12, 2021 at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/public-statement-use-herbal-medicinal-products-containing-thujone-revision-1_en.pdf
- [57] European Medicines Agency. Assessment report on *Salvia officinalis* L., folium and *Salvia officinales* L., aetheroleum. EMA/HMPC/150801/2015. 2016. Accessed April 12, 2021 at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/draft-assessment-report-salvia-officinalis-l-folium-salvia-officinalis-l-aetheroleum_en.pdf
- [58] Baricevic D, Bartol TV. Pharmacology 11. The biological/pharmacological Activity of the *Salvia* Genus. In: Kintzios SE, ed. SAGE The Genus *Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000: 143–184

- [59] Ulubelen A. III. Chemical Constituents 4. Terpenoids in the Genus *Salvia*. In: Kintzios SE, ed. SAGE The Genus *Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000: 55–68
- [60] Bisio A, Pedrelli F, D'Ambola M, Labanca F, Schito A, Govaerts R, Tommasi N, Milella L. Quinone diterpenes from *Salvia* species: chemistry, botany, and biological activity. *Phytochem Rev* 2019; 18: 665–842. doi:10.1007/s11101-019-09633-z
- [61] Luis JG, Lahlou EH, Andres LS, Sood GHN, Ripoll MM. Apiananes: C23 terpenoids with a new type of skeleton from *Salvia apiana*. *Tetrahedron Lett* 1996; 37: 4213–4216
- [62] González AG, Aguiar ZE, Grillo TA, Luis JG. Diterpenes and diterpene quinones from the roots of *Salvia apiana*. *Phytochemistry* 1992; 31: 1691–1695. doi:10.1016/0031-9422(92)83130-Q
- [63] Abreu ME, Müller M, Alegre L, Munné-Bosch S. Phenolic diterpene and α -tocopherol contents in leaf extracts of 60 *Salvia* species. *J Sci Food Agric* 2008; 88: 2648–2653. doi:10.1002/jsfa.3384
- [64] Srivedavyasari R, Hayes T, Ross SA. Phytochemical and biological evaluation of *Salvia apiana*. *Nat Prod Res* 2017; 31: 2058–2061. doi:10.1080/14786419.2016.1269096
- [65] Pettit GR, Klinger H, Jorgensen NON, Occolowitz J. Steroids and related natural products–XXVII. *Salvia apiana*. *Phytochemistry* 1966; 5: 301–309. doi:10.1016/S0031-9422(00)82144-5
- [66] Shyamal KJ, Gorai D, Roy R. *Salvia* genu and triterpenoids. *Int J Pharm Sci Res* 2016; 7: 4710–4732. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.7(12).4710-32
- [67] Luis JG, Lahlou EH, Andrés LS. Hassananes: C23terpenoids with a new type of skeleton from *Salvia apiana* Jeps. *Tetrahedron* 1996; 52: 12309–12312. doi:10.1016/0040-4020(96)00717-X
- [68] Yang J, Huang SX, Zhao QS. Structure revision of hassananes with use of quantum mechanical ¹³C NMR chemical shifts and UV-Vis absorption spectra. *J Phys Chem A* 2008; 112: 12132–12139. doi:10.1021/jp8072415
- [69] Zhang X, Li Z, Yong H, Xie Z. Biomimetic syntheses of C 23 terpenoids: structural revision of salynnannin A and confirmation of hassanane. *Org Chem Front* 2018; 5: 3469–3475. doi:10.1039/C8QO00772A
- [70] Lu Y, Yeap Foo L. Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochemistry* 2002; 59: 117–140. doi:10.1016/S0031-9422(01)00415-0
- [71] Vulganová K, Maliar T, Maliarová M, Nemeček P, Viskupičová J, Balážová A, Sokol J. Biologically valuable components, antioxidant activity and proteinase inhibition activity of leaf and callus extracts of *Salvia* sp. *Nov Biotechnol Chim* 2019; 18: 25–36. doi:10.2478/nbec-2019-0004
- [72] Afonso AF, Pereira OR, Fernandes ÁSF, Calhelha RC, Silva AMS, Ferreira ICFR, Cardoso SM. The health-benefits and phytochemical profile of *Salvia apiana* and *Salvia farinacea* var. *Victoria Blue* decoctions. *Antioxidants* 2019; 8: 241. doi:10.3390/antiox8080241
- [73] Hidalgo PJ, Ubera JL, Tena MT, Valcárcel M. Determination of the carnosic acid content in wild and cultivated *Rosmarinus officinalis*. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 2624–2627. doi:10.1021/jf970974j
- [74] Saeed MEM, Meyer M, Hussein A, Efferth T. Cytotoxicity of South-African medicinal plants towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *J Ethnopharmacol* 2016; 186: 209–223. doi:10.1016/j.jep.2016.04.005
- [75] Akaberi M, Mehri S, Iranshahi M. Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species. *Fitoterapia* 2015; 100: 118–132. doi:10.1016/j.fitote.2014.11.008
- [76] Bonito MC, Cicala C, Marcotullio MC, Maione F, Nicola M. Biological activity of bicyclic and tricyclic diterpenoids from *Salvia* Species of immediate pharmacological and pharmaceutical interest. *Nat Prod Commun* 2011; 6: 1934578X1100600. doi:10.1177/1934578X1100600839
- [77] Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28: 603–661. doi:10.1128/CMR.00134-14
- [78] Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev* 2019; 43: 123–144. doi:10.1093/femsre/fuy043
- [79] Hakansson AP, Orihuela CJ, Bogaert D. Bacterial-host interactions: physiology and pathophysiology of respiratory infection. *Physiol Rev* 2018; 98: 781–811. doi:10.1152/physrev.00040.2016
- [80] Blanchette KA, Orihuela CJ. Future perspective on host-pathogen interactions during bacterial biofilm formation within the nasopharynx. *Future Microbiol* 2012; 7: 227–239. doi:10.2217/fmb.11.160
- [81] Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 163–173. doi:10.1016/j.femsle.2004.06.005
- [82] Reffuveille F, Josse J, Vallé Q, Mongaret C, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the medical Field. In: Enany S, Alexander LC, eds. *The Rise of Virulence and antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus*. London: InTech; 2017. doi:10.5772/66380
- [83] Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Souza MGM, Silva MLA, da Silva Filho AA, Martins CHG, Crotti AEM, Pauletti PM, Groppo M, Cunha WR. Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chem Biodivers* 2010; 7: 1835–1840. doi:10.1002/cbdv.200900301
- [84] Romo Vaquero M, García Villalba R, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, Fromentin E, Flanagan J, Roller M, Tomás-Barberán FA, Espín JC, García-Conesa MT. Bioavailability of the major bioactive diterpenoids in a rosemary extract: metabolic profile in the intestine, liver, plasma, and brain of Zucker rats. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 1834–1846. doi:10.1002/mnfr.201300052
- [85] Doolaega EHA, Raes K, De Vos F, Verhé R, De Smet S. Absorption, distribution and elimination of carnosic acid, a natural antioxidant from *Rosmarinus officinalis*, in rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2011; 66: 196–202. doi:10.1007/s11130-011-0233-5
- [86] Zampini IC, Arias ME, Cudmani N, Zampini IC, Arias ME, Cudmani N, Ordóñez RM, Isla MI, Moreno S. Antibacterial potential of non-volatile constituents of *Rosmarinus officinalis* against 37 clinical isolates of multi-drug-resistant bacteria. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 2013; 2: 201–208
- [87] Van Vuuren S, Holl D. Antimicrobial natural product research: a review from a South African perspective for the years 2009–2016. *J Ethnopharmacol* 2017; 208: 236–252. doi:10.1016/j.jep.2017.07.011
- [88] Allison BJ, Allenby MC, Bryant SS, Min JE, Hieromnimon M, Joyner PM. Antibacterial activity of fractions from three Chumash medicinal plant extracts and *in vitro* inhibition of the enzyme enoyl reductase by the flavonoid jaceosidin. *Nat Prod Res* 2017; 31: 707–712. doi:10.1080/14786419.2016.1217201
- [89] Sadgrove NJ, Jones GL. From petri dish to patient: bioavailability estimation and mechanism of action for antimicrobial and immunomodulatory natural products. *Front Microbiol* 2019; 10: 1–26. doi:10.3389/fmicb.2019.02470
- [90] Cordova-Guerrero I, Aragon-Martinez OH, Díaz-Rubio L, Santiago FC, Serafín-Higuera NA, Pozos-Guillén A, Soto-Castro TA, Martínez-Morales F, Isordia-Espinoza M. Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica. *Rev Argent Microbiol* 2016; 48: 217–221. doi:10.1016/j.ram.2016.05.007
- [91] Anastasiou C, Buchbauer G. Essential oils as immunomodulators: some examples. *Open Chem* 2017; 15: 104–114. doi:10.1515/chem-2017-0037
- [92] Valdivieso-Ugarte M, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J, Gil A. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: a systematic review. *Nutrients* 2019; 11: 1–29. doi:10.3390/nu11112786
- [93] Peterfalvi A, Miko E, Nagy T, Reger B, Simon D, Miseta A, Czéh B, Szereday L. Much more than a pleasant scent: a review on essential oils supporting the immune system. *Molecules* 2019; 24: 1–16. doi:10.3390/molecules24244530

- [94] Tschiggerl C, Bucar F. Investigation of the volatile fraction of rosemary infusion extracts. *Sci Pharm* 2010; 78: 483–492. doi:10.3797/scipharm.1004-23
- [95] Radulescu V, Chiliment S, Oprea E. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *J Chromatogr A* 2004; 1027: 121–126. doi:10.1016/j.chroma.2003.11.046
- [96] Galan DM, Ezeudu NE, Garcia J, Geronimo CA, Berry NM, Malcolm BJ. Eucalyptol (1, 8-cineole): an underutilized ally in respiratory disorders? *J Essent Oil Res* 2020; 32: 103–110. doi:10.1080/10412905.2020.1716867
- [97] Juergens LJ, Worth H, Juergens UR. New perspectives for mucolytic, anti-inflammatory and adjunctive therapy with 1,8-Cineole in COPD and asthma: review on the new therapeutic approach. *Adv Ther* 2020; 37: 1737–1753. doi:10.1007/s12325-020-01279-0
- [98] Juergens UR, Stöber M, Vetter H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes *in vitro*. *Eur J Med Res* 1998; 3: 508–510
- [99] Juergens UR, Dethlefsen U, Steinkamp G, Gillissen A, Repges R, Vetter H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med* 2003; 97: 250–256. doi:10.1053/rmed.2003.1432
- [100] Bastos VPD, Gomes AS, Lima FJB, Brito TS, Soares PMG, Pinho JPM, Silva CS, Santos AA, Souza MHL, Magalhães PJC. Inhaled 1,8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of ovalbumin-challenged guinea pigs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 108: 34–39. doi:10.1111/j.1742-7843.2010.00622.x
- [101] Juergens UR, Engelen T, Racké K, Stöber M, Gillissen A, Vetter H. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulm Pharmacol Ther* 2004; 17: 281–287. doi:10.1016/j.pupt.2004.06.002
- [102] Müller J, Greiner JFW, Zeuner M, Brotzmann V, Schäfermann J, Wieters F, Widera D, Sudhoff H, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. 1,8-Cineole potentiates IRF3-mediated antiviral response in human stem cells and in an *ex vivo* model of rhinosinusitis. *Clin Sci* 2016; 130: 1339–1352. doi:10.1042/CS20160218
- [103] Sudhoff H, Klenke C, Greiner JFW, Müller J, Brotzmann V, Ebmeyer J, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. 1,8-Cineol reduces mucus-production in a novel human *ex vivo* model of late rhinosinusitis. *PLoS One* 2015; 10: 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0133040
- [104] Perry N, Howes MJ, Houghton P, Perry E. Why Sage may be a wise Remedy: Effects of *Salvia* on the nervous System. In: Kintzios SE, ed. *SAGE The Genus Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000: 207–223
- [105] Chebib M, Hanrahan JR, Mewett KN, Duke RT, Johnston G. Ionotropic GABA Receptors as therapeutic Targets for Memory and Sleep Disorders. In: Wustrow D, Arbor A, eds. *Annual Reports in medicinal Chemistry*. Amsterdam: Academic Press; 2004: 13–23. doi:10.1016/S0065-7743(04)39002-0
- [106] Rutherford DM, Nielsen MPC, Hansen SK, Witt MR, Bergendorff O, Sterner O. Isolation and identification from *Salvia officinalis* of two diterpenes which inhibit t-butylbicyclophosphoro[35S]thionate binding to chloride channel of rat cerebrocortical membranes *in vitro*. *Neurosci Lett* 1992; 135: 224–226. doi:10.1016/0304-3940(92)90441-9
- [107] Khan I, Karim N, Ahmad W, Abdelhalim A, Chebib M. GABA-A receptor modulation and anticonvulsant, anxiolytic, and antidepressant activities of constituents from *Artemisia indica* Linn. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2016; 2016: 1–12. doi:10.1155/2016/1215393
- [108] Lee CM, Wong HNC, Chui KY, Choang TF, Hon PM, Chang HM. Miltirone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia Miltiorrhiza*. *Neurosci Lett* 1991; 127: 237–241. doi:10.1016/0304-3940(91)90802-Z
- [109] Kavvadias D, Monschein V, Sand P, Riederer P, Schreier P. Constituents of Sage (*Salvia officinalis*) with *in vitro* affinity to human brain benzodiazepine receptor. *Planta Med* 2003; 69: 113–117. doi:10.1055/s-2003-37712
- [110] Abdelhalim A, Chebib M, Aburjai T, Johnston GAR, Hanrahan JR. GABAA Receptor modulation by compounds isolated from *Salvia triloba* L. *Adv Biol Chem* 2014; 04: 148–159. doi:10.4236/abc.2014.42019
- [111] Ceremuga TE, McClellan CB, Green XC, Heber B, Jolly M, Malone T, Schaaf J, Isaacs A. Investigation of the anxiolytic and antidepressant effects of eucalyptol (1,8-Cineole), a compound from eucalyptus, in the adult male Sprague-Dawley rat. *AANA* 2017; 85: 277–284
- [112] Dougnon G, Ito M. Inhalation administration of the bicyclic ethers 1,8- and 1,4-cineole prevent anxiety and depressive-like behaviours in mice. *Molecules* 2020; 25: 1884. doi:10.3390/molecules25081884
- [113] Agatonovic-Kustrin S, Morton DW. Essential Oils and cognitive Performance. In: Atta-ur-Rahman, ed. *Frontiers in natural Product Chemistry: Volume 4*. Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers; 2018: 91–118. doi:10.2174/9781681087252118040005
- [114] Moss M, Oliver L. Plasma 1,8-cineole correlates with cognitive performance following exposure to rosemary essential oil aroma. *Ther Adv Psychopharmacol* 2012; 2: 103–113. doi:10.1177/2045125312436573
- [115] Li R, Morris-Natschke SL, Lee KH. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. *Nat Prod Rep* 2016; 33: 1166–1226. doi:10.1039/C5NP00137D
- [116] Hayes T. Terpenes and flavonoids from *Salvia apiana* and their affinities to cannabinoid and opioid receptors [Dissertation]. Oxford: University of Mississippi; 2016
- [117] Santos FA, Rao VSN. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phyther Res* 2000; 14: 240–244. doi:10.1002/1099-1573(200006)14:4<240::aid-ptr573>3.0.co;2-x
- [118] Takaishi M, Fujita F, Uchida K, Sawada Shimizu M, Hatai Uotsu C, Shimizu M, Tominaga M. 1,8-Cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. *Mol Pain* 2012; 8: 86. doi:10.1186/1744-8069-8-86
- [119] Goszcz K, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response? *Br J Pharmacol* 2017; 174: 1209–1225. doi:10.1111/bph.13708
- [120] Hrelia S, Angeloni C. New mechanisms of action of natural antioxidants in health and disease. *Antioxidants* 2020; 9: 1–5. doi:10.3390/antiox9040344
- [121] Muller CH. Inhibitory terpenes volatilized from *Salvia* shrubs. *Bull Torrey Bot Club* 1965; 92: 38. doi:10.2307/2483311
- [122] González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, Zarza V, Martín-Hernández R, García-Risco MR, Fornari T, Reglero T, de Molin AR. Expression of microRNA-15b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. *PLoS One* 2014; 9: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0098556
- [123] Borek TT, Hochrien JM, Irwin AN. Composition of the essential oil of white sage, *Salvia apiana*. *Flavour Fragr J* 2006; 21: 571–572. doi:10.1002/ffj.1618
- [124] Craft JD, Satyal P, Setzer WN. The chemotaxonomy of common sage (*Salvia officinalis*) based on the volatile constituents. *Medicines* 2017; 4: 47. doi:10.3390/medicines4030047
- [125] Lakušić BS, Ristić MS, Slavkovska VN, Lakusic D. Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. *Bot Serbica* 2013; 37: 127–140
- [126] Jug-Dujaković M, Ristić M, Pljevljakušić D, Dajić-Stevanović Z, Liber Z, Hančević K, Radić T, Šatović Z. High diversity of indigenous populations of dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) in essential-oil composition. *Chem Biodivers* 2012; 9: 2309–2323. doi:10.1002/cbdv.201200131

- [127] Couladis M, Tzakou O, Mimica-Dukić N, Dajić-Stevanović Z, Liber Z, Hančević K, Radić T, Šatović Z. Essential oil of *Salvia officinalis* L. from Serbia and Montenegro. *Flavour Fragr J* 2002; 17: 119–126. doi:10.1002/ffj.1065
- [128] Tucker AO, Maciarello MJ. Essential oils of cultivars of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). *J Essent Oil Res* 1990; 2: 139–144. doi:10.1080/10412905.1990.9697844
- [129] Sharopov FS, Setzer WN. The essential oil of *Salvia sclarea* L. from Tajikistan. *Rec Nat Prod* 2012; 6: 75–79
- [130] Souleles C, Argyriadou N. Constituents of the essential oil of *Salvia sclarea* growing wild in Greece. *Pharm Biol* 1997; 35: 218–220. doi:10.1076/phbi.35.3.218.13295
- [131] Safaei-Ghomi J, Masoomi R, Jookar Kashi F, Batooli H. Bioactivity of the essential oil and methanol extracts of flowers and leaves of *Salvia sclarea* L. from Central Iran. *J Essent Oil-Bearing Plants* 2016; 19: 885–896. doi:10.1080/0972060X.2016.1195292
- [132] Dzumayev KK, Tsubulskaya IA, Zenkevich IG, Tkachenko KG, Sazyperova IF. Essential oils of *Salvia sclarea* L. produced from plants grown in southern Uzbekistan. *J Essent Oil Res* 1995; 7: 597–604. doi:10.1080/10412905.1995.9700513
- [133] Usano-Aleman J, Herraiz-Peñalver D, Cuadrado J, Díaz S, Santa-Cruz M, Palá-Paúl J. Seasonal variation of the essential oils of *Salvia lavandulifolia*: antibacterial activity. *J Essent Oil Bear Plants* 2012; 15: 195–203. doi:10.1080/0972060X.2012.10644036
- [134] Elshafie HS, Aliberti L, Amato M, De Feo V, Camele I. Chemical composition and antimicrobial activity of chia (*Salvia hispanica* L.) essential oil. *Eur Food Res Technol* 2018; 244: 1675–1682. doi:10.1007/s00217-018-3080-x
- [135] Ahmed M, Ting IP, Scora RW. Leaf oil composition of *Salvia hispanica* L. from three geographical areas. *J Essent Oil Res* 1994; 6: 223–228. doi:10.1080/10412905.1994.9698368
- [136] De Martino L, Roscigno G, Mancini E, De Falco E, De Feo V. Chemical composition and antigerminative activity of the essential oils from five *Salvia* species. *Molecules* 2010; 15: 735–746. doi:10.3390/molecules15020735
- [137] Liu AD, Cai GH, Wei YY, Yu JP, Chen J, Yang J, Wang X, Che YW, Chen JZ, Wu SX. Anxiolytic effect of essential oils of *Salvia miltiorrhiza* in rats. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 12756–12764
- [138] Li B, Zhang C, Peng L, Liang Z, Yan X, Zhu Y, Liu Y. Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected *Salvia* species measured by GC-MS and HPLC methods. *Ind Crops Prod* 2015; 69: 329–334. doi:10.1016/j.indcrop.2015.02.047
- [139] Asressu KH, Tesema TK. Chemical and antimicrobial investigations on essential oil of *Rosmarinus officinalis* leaves grown in Ethiopia and comparison with other countries. *J Appl Pharm* 2014; 6: 132–142. doi:10.21065/19204159.6.3.112
- [140] Thanh TT, Lan LX, Thu H, Tam NKM. Isolation by different processes and *in vitro* bioactivities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil. *AIP Conf Proc* 2017; 020040: 1878. doi:10.1063/1.5000208
- [141] Begum A, Sandhya S, Ali SS, Vinod KR, Reddy S, Banji D. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (lamiaceae). *Acta Sci Pol Technol Aliment* 2013; 12: 61–73
- [142] Dentali SJ, Hoffmann JJ. 16-hydroxycarnosic acid, a diterpene from *Salvia apiana*. *Phytochemistry* 1990; 29: 993–994. doi:10.1016/0031-9422(90)80066-P
- [143] Okamura N, Fujimoto Y, Kuwabara S, Yagi A. High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *J Chromatogr A* 1994; 679: 381–386. doi:10.1016/0021-9673(94)80582-2
- [144] Wellwood CRL, Cole RA. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 6101–6107. doi:10.1021/jf035335p
- [145] Ben Farhat M, Jordán MJ, Chaouech-Hamada R, Landoulsi A, Sotomayor JA. Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of Tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 10349–10356. doi:10.1021/jf901877x
- [146] Pavić V, Jakovljević M, Molnar M, Jokić S. Extraction of carnosic acid and carnosol from sage (*Salvia officinalis* L.) leaves by supercritical fluid extraction and their antioxidant and antibacterial activity. *Plants* 2019; 8: 1–14. doi:10.3390/plants8010016
- [147] Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki AA, Sayyad N, Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Gerathanassis IP, Tzakos AG. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem* 2013; 136: 120–129. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.091
- [148] Chatterjee A, Tandon S, Ahmad A. Comparative extraction and downstream processing techniques for quantitative analysis of rosmarinic acid in *Rosmarinus officinalis*. *Asian J Chem* 2014; 26: 4313–4318. doi:10.14233/ajchem.2014.16266
- [149] Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem* 2004; 87: 307–311. doi:10.1016/j.foodchem.2003.12.029
- [150] Bandoniene D, Murkovic M, Venskutonis PR. Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *J Chromatogr Sci* 2005; 43: 372–376. doi:10.1093/chromsci/43.7.372
- [151] Elansary HO, Szopa A, Kubica P, Ekiert H, El-Ansary DO, Al-Mana FA, Mahmoud EA. Saudi *Rosmarinus officinalis* and *Ocimum basilicum* L. Polyphenols and Biological Activities. *Processes* 2020; 8: 446. doi:10.3390/pr8040446
- [152] Dent M, Dragović-Uzelac V, Penić M, Brncić M, Bosiljkov T, Levaj B. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol Biotechnol* 2013; 51: 84–91



Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production

Agata Krol, Adam Kokotkiewicz, Agnieszka Szopa, Halina Ekiert, and Maria Luczkiewicz

Contents

1	Introduction	3
2	Materials and Methods	4
3	Secondary Metabolite Production in Bioreactor-Grown Shoot Cultures	4
4	Types of Bioreactors Used for In Vitro Shoot Cultures	8
4.1	Mechanically Agitated Bioreactors	9
4.2	Pneumatically Agitated Bioreactors	11
4.3	Temporary and Continuous Immersion Systems	26
4.4	Gas Phase Bioreactors	27
5	Comparative Studies on Bioreactor Performance	52
6	Conclusions	54
	References	54

Abstract

In vitro shoot cultures have long been investigated as a potential source of added value chemicals. Similarly to cell cultures, they can be employed for the production of compounds of interest such as drugs, antioxidants, and flavorings. Since in vitro shoots retain tissue differentiation of the parent plant, they are often capable of biosynthesizing secondary metabolites not found in unorganized cell suspensions. However, large-scale cultivation of shoot cultures is challenging and

A. Krol · A. Kokotkiewicz · M. Luczkiewicz (✉)

Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

e-mail: agata.krol@gumed.edu.pl; adam.kokotkiewicz@gumed.edu.pl; mlucz@gumed.edu.pl; maria.luczkiwicz@gumed.edu.pl

A. Szopa · H. Ekiert

Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University, Medical College, Kraków, Poland

e-mail: a.szopa@uj.edu.pl; mfekiert@cyf-kr.edu.pl; halina.ekiert@uj.edu.pl

© Springer Nature Switzerland AG 2020

K. G. Ramawat et. al. (eds.), *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites*, Reference Series in Phytochemistry,

https://doi.org/10.1007/978-3-030-11253-0_34-1

requires specialized bioreactor systems. In the current work, reports concerning secondary metabolite production in bioreactor-grown shoot cultures were reviewed with respect to the examined compounds, types of bioreactors used, and comparative studies involving different fermenter systems. The aim of the chapter is to compile the results of experimental papers, with the emphasis on providing important experimental details and outcomes of the studies, including productivities of bioreactor-grown shoot cultures with respect to secondary metabolites.

Keywords

Bioreactors · Shoot cultures · In vitro culture · Secondary metabolites · Large-scale plant tissue culture

List of Abbreviations

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
2iP	6-(γ,γ -Dimethylallylamino)purine
ABA	Abscisic acid
ALB	Airlift Bioreactor
BA	6-Benzylaminopurine
BB	Balloon Bioreactor
BCB	Bubble Column Bioreactor
BFB	Bubble-Free Bioreactor
CIB	Continuous Immersion Bioreactor
GA ₃	Gibberellic acid
GPB	Gas Phase Bioreactor
HB	Hydraulic Bioreactor
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
ITR	Immersion Time Ratio
KIN	Kinetin
MC	Misting cycle
MS	Murashige-Skoog
NAA	Naphthaleneacetic acid
PGR	Plant Growth Regulators
RB	Roller Bioreactor
SAB	Simple Aeration Bioreactor
SH	Schenk and Hildebrandt
STB	Stirred-Tank Bioreactor
T	Temperature
TDZ	Thidiazuron
TIB	Temporary Immersion Bioreactor
TS	Timespan

1 Introduction

For several decades, plant *in vitro* cultures have been investigated as a potential source of secondary metabolites. In particular, they can be employed for the production of valuable plant substances such as drugs, dyes, natural pesticides, and antioxidants. As compared to wild-grown or cultivated plants, *in vitro* systems offer several advantages which have been extensively discussed in numerous review papers. Plant cells or organs grown *in vitro* can be used for the production of desired chemicals year-round, regardless of the season, climate zone, weather disturbances, and other environmental factors such as pests and soil quality. Both chemical environment and physical conditions can be strictly controlled, thus enabling to optimize the process for high and stable metabolite yields [1–8]. Plant *in vitro* cultures are especially useful in the case of high-value products whose natural resources are limited and threatened by overexploitation: the anticancer drug paclitaxel, red dye shikonin, and ginseng biomass are well-known and widely quoted examples of such substances [6, 9–14].

From a technical standpoint, nondifferentiated cell cultures are the most suitable for secondary metabolite production. The major advantage of plant cell suspensions is that they can be adapted for large-scale bioreactor cultivation with relative ease which is crucial for industrial production of a desired chemical. With some modifications, conventional stirred-tank bioreactor (STB) systems can be adjusted for plant cells and subsequently employed for high-volume batch processes [6, 7, 15, 16]. For example, the previously mentioned paclitaxel is produced on industrial scale using cell suspensions of *Taxus* sp. [10, 13, 17, 18]. Despite obvious advantages, the aforementioned type of culture also has its limitations. The most important ones are genetic instability and the inability to biosynthesize metabolites whose accumulation requires cytodifferentiation. The examples of such products include artemisinin [19], hypericins [20], and volatile constituents [21], stored in specialized secretory structures not present in nondifferentiated cells. In order to overcome these problems, attempts were made to establish large-scale *in vitro* systems based on plant organs which could be employed for the production wider range of secondary metabolites. These include adventitious and hairy roots, as well as shoots, microshoots, and plantlet cultures. The secondary metabolism of bioreactor-grown adventitious [22–24] and hairy roots [25–27] have been reviewed in several articles, however, analogous papers concerning *in vitro* shoots are scarce [28, 29].

The aim of the chapter is to compile the literature data concerning low molecular mass secondary metabolites production in bioreactor cultures of shoots, microshoots, and plantlets. For clarity and conciseness, the collected data are presented in tables which included information of the examined plant species, biomass type, bioreactor construction, experimental details, as well as concentration and productivities of the investigated compounds.

2 Materials and Methods

The experimental papers were collected using Scopus database, with “bioreactor”/“fermenter” + “shoots”/“microshoots”/“plantlets” used as search terms in “Article Title, Abstract, Keywords.” Of the articles published in the years 1984–2019, only the papers concerning secondary metabolite production were included in the review whereas the ones describing solely micropropagation procedures were omitted. The cultures of somatic embryos were not included unless they were used to establish plantlet cultures further investigated for the accumulation of secondary metabolites. Articles dealing with recombinant protein production using *in vitro* shoots and plantlet cultures are also not in the scope of the current work. Besides experimental papers, the so far published review papers concerning bioreactor systems, *in vitro* and *in vivo* production of specific groups of secondary metabolites and plant *in vitro* cultures in general, were included. The information concerning concentrations and productivities of secondary metabolites was extracted directly from text, tables, and graphs or calculated using the available experimental data, such as growth medium volume, fresh or dry weight of biomass, and duration of experiment. Xyscan software (version 4.3.0, Thomas S. Ullrich) was used to extract the data from graphs.

3 Secondary Metabolite Production in Bioreactor-Grown Shoot Cultures

The interest in the production of specific metabolites using *in vitro* culture methods stems from several factors. Most importantly, the compound of interest needs to be of high value and/or its natural resources limited, so that the *in vitro*-grown biomass can serve as commercially viable source [1, 2, 5, 30, 31]. As mentioned earlier, cell suspensions are preferred in this regard because of easier scale-up [6, 7, 15, 16, 31], but are often genetically unstable and/or fail to accumulate substantial amounts of desired substance [4, 7, 31, 32]. On the other hand, *in vitro* cultures of microshoots, shoots, and plantlets (further collectively referred to as “shoot cultures”) retain (at least some of them) tissue differentiation of their parent plants and thus are usually capable to accumulate a variety of secondary metabolites [1, 31]. Consequently, attempts were made to employ the aforementioned cultures for bioreactor-scale production of low molecular weight constituents. Figure 1 depicts the number of papers, dealing with bioreactor-grown shoot cultures evaluated for the presence of compounds representing different chemical classes, published between 1984 and 2019.

Clearly, plant phenolics was one of the most extensively investigated groups of secondary metabolites which is likely because of their abundance in plants, as well as the fact that several compounds of this group exhibit antioxidative, therapeutic, and health-promoting properties [33]. In several cases, general spectrophotometric assays were used to determine total phenolic or total flavonoid content of bioreactor-grown shoot cultures (9 and 9 reports, respectively, Fig. 1). These parameters do not allow to calculate the productivity of *in vitro* systems with respect to specific constituents but are sometimes used to assess the quality of the plant material

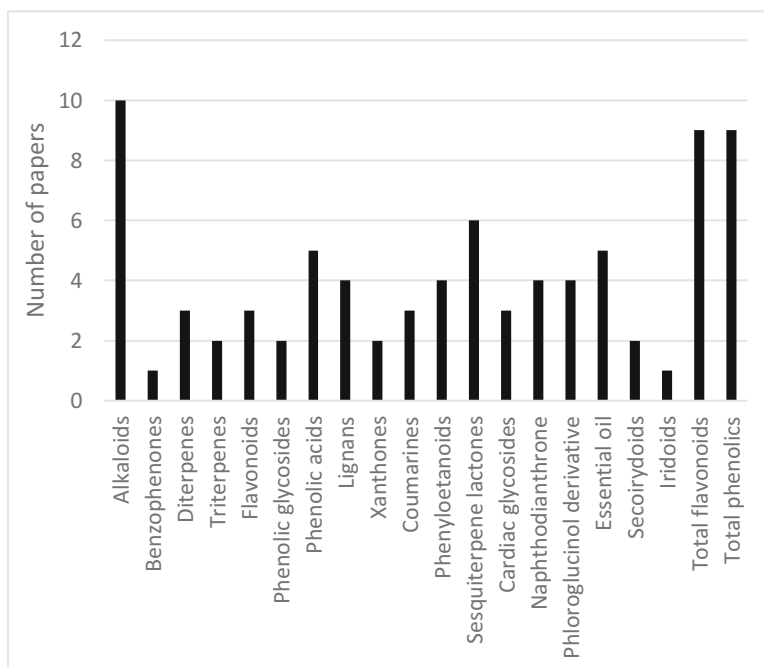


Fig. 1 The number of papers concerning the accumulation of different classes of secondary metabolites in bioreactor-grown shoot cultures, published between 1984 and 2019. The data was collected using Scopus database

obtained by micropropagation [34–37]. Other studies focused on the accumulation of selected phenolic metabolites like isoflavones [38, 39], flavones [40], xanthones [41], phenolic acids [42–45], lignans [46], and hypericins [20] (15 reports in total). The production of isoflavones, investigated chiefly because of their phytoestrogenic and potential anticancer properties, was studied in shoot cultures of legume plants such as *Genista tinctoria* [38], *Pueraria tuberosa* [39], and *Cyclopia genistoides* [41]. Bioactive flavones, responsible for therapeutic properties of skullcap (*Scutellaria* sp.), constitute another group of phenolics examined in bioreactor-grown biomasses [40]. There are also several studies concerning the accumulation of lignan constituents in shoot cultures. Within this group, anticancer aryltetralin lignans like podophyllotoxin are of particular interest. However, bioreactor-grown shoots have so far not been evaluated for their production, even despite the fact that experiments on suspension cultures of *Podophyllum hexandrum* and *Linum flavum* proved that loss of cell differentiation negatively affects lignan biosynthesis [47]. On the other hand, there are numerous reports dealing with accumulation of dibenzocyclooctadiene lignans in bioreactor cultures of shoots. This topic was extensively studied by Szopa and co-workers who evaluated in vitro shoot cultures of *Schisandra chinensis* and its cultivar “Sadova No. 1,” grown in different types of bioreactors, for the production of said constituents, along with flavonoids and phenolic acids [46, 48].

As mentioned before, the accumulation of several bioactive metabolites in plants is directly related to the presence of specialized structures like glands and secretory canals. The example of such constituents is hypericins, stored in secretory glands present in leaves, stems, and petals of *Hypericum perforatum* and related species [20]. Since the nonorganized cultures of the above plants yielded only low amounts of naphthodianthrones, bioreactor-grown *Hypericum* shoots were evaluated as their alternative source [20, 49–51]. Another example is artemisinin, a sesquiterpene lactone being the essential drug in malaria treatment. Similarly to hypericins, the accumulation of artemisinin was shown to be cytodifferentiation-dependent: the compound is localized in glandular trichomes on the leaf surface [19]. Consequently, research on organ cultures of *Artemisia annua* has been undertaken. Studies in this field were conducted by Liu and co-workers who examined artemisinin production in *A. annua* shoots grown in different bioreactor systems [52–56]. Besides hypericins and artemisinin, secretory structures are sink organs for a variety of volatile constituents [57]. Due to lack of tissue differentiation, accumulation of essential oils in callus and suspension cultures is usually limited (or completely inhibited) and their composition significantly altered as compared to differentiated cultures [21, 58]. So far, there are relatively few reports dealing with essential oil accumulation in bioreactor-grown shoots. The volatiles were produced by the biomass; however, qualitative differences in essential oil composition (as compared to parent plant) were still observed in several cases. For instance, instead of menthol, the fermenter-grown transformed shoot cultures of *Mentha piperita* accumulated pulegone (a precursor in menthol biosynthesis) as a major volatile compound [59]. Another example is bioreactor shoot cultures of *Rhododendron tomentosum* which failed to produce ledol and palustrol (i.e., major volatiles of the parent plant) and accumulated essential oil with ledene oxide as a dominant constituent [60, 61]. These data clearly indicate that even in differentiated shoot cultures, terpene and sesquiterpene pathways are not fully developed.

As presented in Fig. 1, several papers were published concerning the accumulation of alkaloids in bioreactor-grown shoots. However, studies on the production of anticancer compounds of this group are scarce. As mentioned earlier, diterpene alkaloids are industrially produced using cell suspensions of *Taxus* sp. [10, 13, 17, 18], and thus there was no strong rationale to develop plant organ cultures for paclitaxel manufacture. On the other hand, attempts to establish plant cell-based in vitro systems for the production of dimeric indole alkaloids were unsuccessful. Cell cultures of *Catharanthus roseus*, grown in bioreactors up to 5000 l volume, were shown to accumulate monoindole alkaloids including ajmalicine, serpentine, and catharanthine, but failed to biosynthesize bisindole derivatives vinblastine and vincristine [1, 11, 62, 63]. In vitro shoot cultures of *C. roseus* were demonstrated to produce dimeric indole alkaloids [63, 64] but low yields hampered the scale-up studies. So far, there is only one report dealing with alkaloid production in bioreactor-grown shoots of *C. roseus*. The culture, maintained in a mist-type bioreactor, accumulated monoindole alkaloids vindoline and catharanthine. However, the production of bisindole alkaloids was not examined in the study [65]. As far as other anticancer agents are concerned, there is a single report on the accumulation of camptothecin in bioreactor cultures of *Camptotheca acuminata* shoots [66].

Among other alkaloids, galanthamine gained much interest because of its ability to inhibit acetylcholinesterase (AChE), responsible for therapeutic effects in Alzheimer's disease [67]. Since cell differentiation favored accumulation of galanthamine, studies focused on evaluating shoot cultures of *Leucojum aestivum* for the production of said metabolite. Different bioreactor systems were tested [68–71] and the results of these experiments were summarized in the review paper Berkov and co-workers [67]. Another alkaloid which could be potentially used in the treatment of neurological diseases is securinine, the indolizidine-class compound present in East-Asian plant *Securinega suffruticosa*. In vitro shoot cultures of this species were established and subsequently adapted for bioreactor cultivation [72]. Studies on tropane alkaloids production using in vitro systems are also worth noting. Monocultures of shoots and shooty teratomas of solanaceous species proved to be a poor source of tropane alkaloids [73] which is due to the fact that hyoscyamine biosynthesis is localized in roots, while shoots serve as its pool organ and place where further steps of tropane pathway take place [74]. Nevertheless, bioreactor-grown co-cultures of hairy roots and shooty teratomas of plants from nightshade family were capable of producing alkaloids and proved to be useful for biotransformation studies [74, 75].

Cardiac glycosides comprise another group of bioactive compounds whose production in in vitro systems has been extensively studied. The major observation was that loss of tissue differentiation is followed with substantial loss of biosynthetic capability [76, 77]. Cell suspension cultures of *Digitalis lanata* (major commercial source of cardiac glycosides) were successfully scaled-up using pilot size fermenters. However, these cultures failed to produce therapeutically relevant compounds and could only be used for biotransformation reactions [77]. The decline in the use of digitalis glycosides in congestive heart failure [78] was reflected in diminishing number of papers dealing with large scale cell cultures of *Digitalis*. Nevertheless, cardiac glycosides gained interest as potential anticancer agents and studies on their production using in vitro systems, including shoot cultures, have been continued. This topic was comprehensively reviewed by Verma and co-workers [76]. In the studies concerning in vitro shoot cultures of foxglove, attempts were made to employ temporary immersion systems for the production of digitoxin and digoxin [79, 80].

From a practical standpoint, the productivity with respect to a desired metabolite is a key factor determining the usefulness of an in vitro system. Given the high cost of cell culture maintenance, substantial increase in secondary metabolite concentration is necessary to keep the production commercially viable. As far as bioreactor cultures of shoots are concerned, the experiments yielded rather unsatisfactory results. In Table 1, raw materials of selected plants were compared with bioreactor-grown shoot cultures of the respective species in terms of secondary metabolite content. In most cases, the achieved concentrations of compounds of interest were lower or comparable to wild grown or cultivated plants. The notable exception to this rule is in vitro shoot cultures of *Genista tinctoria* which accumulated over 4-times more genistin in comparison with intact plant material [38]. However, the reported concentrations were still lower than in cell suspensions of the above plant where genistin amounts of up to 94 mg g⁻¹ were reported [81]. In some cases, as, for

Table 1 Comparison of secondary metabolite levels in bioreactor-grown shoots and intact plant materials of selected plant species

Plant name	Compound	Concentration (mg g ⁻¹ DW)	
		In vitro shoots ^a	Intact plant material
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin (sesquiterpene lactone)	2.8–3.6 (GPB) [52, 54, 82]	0.1–15.0 (herb) [19, 54, 56]
<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptothecin (quinolizidine alkaloid)	0.1–2.6 (TIB) [66]	0.2–5.0 (leaves) [31, 83]
<i>Centaurium erythraea</i>	Gentiopicroside (secoiridoidglucoside)	8.0–22.0 (GPB) [84]	1.0–6.2 (herb) [85]
<i>Cyclopia genistoides</i>	Mangiferin (xanthone C-glucoside)	10.3–26.2 (TIB) [41]	36.0–59.4 (leaves) [86]
<i>Digitalis lanata</i>	Digoxin (cardiac glycoside)	0.0–3.1 × 10 ⁻² (TIB) [80]	8.6 × 10 ⁻² –2.0 (leaves) [87, 88]
<i>Digitalis purpurea</i>	Digitoxin (cardiac glycoside)	2.5 × 10 ⁻² –3.3 × 10 ⁻² (TIB) [79]	2.1 × 10 ⁻¹ –8.1 × 10 ⁻¹ (leaves) [89, 90]
<i>Echinacea purpurea</i>	Cichoric acid (phenolic acid)	15.3–21.0 (LR) [42]	4.9–21.4 (shoots) [42] 1.4–20.5 (roots) [42]
<i>Genista tinctoria</i>	Genistin (isoflavone glucoside)	69.4 (SAB) [38]	14.5 (herb) [91]
<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin (naphthodianthrone)	1.1 × 10 ⁻² –3.5 × 10 ⁻² (BB) [49, 50]	1.1 × 10 ⁻¹ –1.1 (herb) [20]
<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine (Amaryllidaceae alkaloid)	0.6 × 10 ⁻¹ –5.2 × 10 ⁻¹ (TIB) [68, 69]	1.0–5.0 (leaves) [67]
<i>Pueraria tuberosa</i>	Puerarin (isoflavone C-glucoside)	0.3–1.5 (SAB) [39]	0.0–100.8 (tubers) [92]
<i>Schisandra chinensis</i>	Schisandrin (dibenzocyclooctadiene lignan)	6.1 × 10 ⁻¹ –1.2 (TIB) [46]	0.3 (leaves) [46] 1.3–34.0 (fruits) [46, 93, 94]
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Baicalin (flavone glycoside)	2.7 (TIB) [40]	70.1–86.7 (root) [95] 1.2 (herb) [96]
<i>Securinega suffruticosa</i>	Securinine (indolizidine alkaloid)	5.0–5.3 (SAB) [72]	2.0–9.0 (herb) [97]
<i>Stevia rebaudiana</i>	Stevioside (diterpene glycoside)	6.7 × 10 ⁻¹ –6.5 (RB) [98, 99]	91.0 (leaves) [100]

^aBioreactor nomenclature according to the list of abbreviations

example *S. baicalensis* and *S. chinensis*, the contents of secondary metabolites in shoot cultures exceed those recorded in aerial parts of the parent plants, but are nevertheless noticeably lower as compared to raw materials like roots or fruits, serving as a major source of the desired compounds (Table 1).

4 Types of Bioreactors Used for In Vitro Shoot Cultures

The studies conducted during the few last decades demonstrated that in vitro shoot cultures can be successfully grown in a variety of bioreactor types. The stimulus for developing systems dedicated for shoot cultures was mainly from the

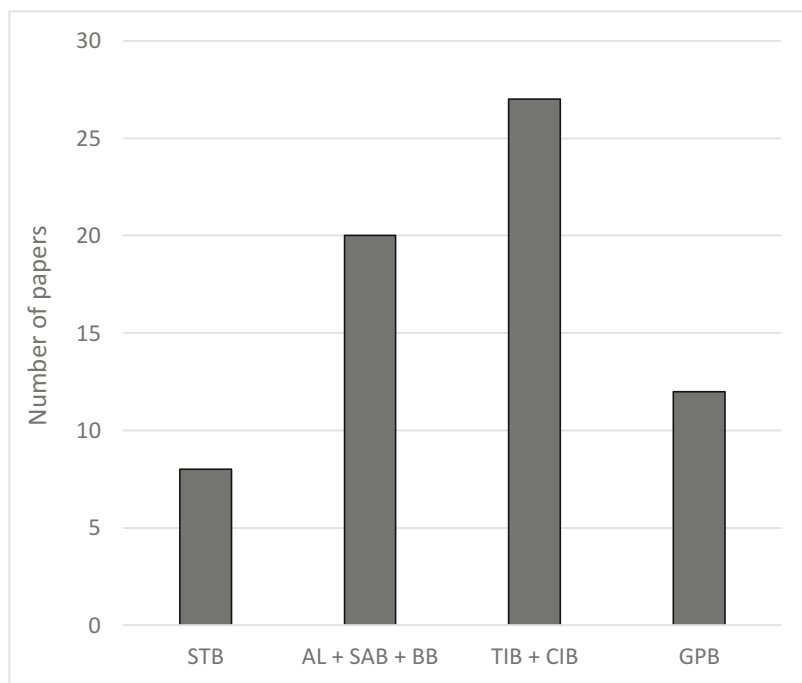


Fig. 2 The number of papers concerning the accumulation of secondary metabolites in shoot cultures grown in different types of bioreactors, published between 1984 and 2019. The data was collected using Scopus database. Bioreactor nomenclature according to list of abbreviations

micropropagation industry which was interested in large-scale production of genetically uniform, high quality plantlets [3, 101, 102]. Given the above, the majority of papers in this field concerned in vitro propagation of plants. However, bioreactor-grown shoots have also been investigated as a potential source of secondary metabolites, and this aspect of their use was reviewed in the current work. Since the construction details of bioreactors dedicated for differentiated plant cultures have been reviewed in several papers [3, 6, 28, 101–105], only general characteristics of the respective systems were provided, followed by compilation of data concerning secondary metabolite production. In Fig. 2, the data concerning the number of reports, dealing with secondary metabolite production in shoot cultures grown in various types of bioreactors, was presented, in order to illustrate the popularity of the respective systems.

4.1 Mechanically Agitated Bioreactors

Mechanically agitated bioreactors are widely used in industrial biotechnology [28, 102]. Within this group, the stirred-tank bioreactor (STB) is the most commonly used. Bioreactors of this type have been employed for years in industrial

microbiology and are hence popular and reliable systems [3, 7]. After necessary modifications, involving the selection of impeller suitable for shear-sensitive plant cells, these bioreactors can be used for large-scale (up to 75,000 l), high-density (>15 g dry weight per liter) suspension cultures [7, 15, 101, 102, 106]. However, as far as shoot cultures are concerned, these advantages are largely irrelevant because of scale limitations and inherent properties of differentiated biomass. While STBs can be equipped with suitable inoculation system [107] and mesh barrier preventing the shoots from being damaged by the impeller [28], the reactor size cannot be substantially increased due to light requirements of the culture which are difficult to meet in the case of densely packed biomass. As a result, simpler and cheaper bioreactor designs, such as pneumatically agitated vessels and temporary immersion systems, are preferred for the cultivation of in vitro shoots [3, 101–103]. As presented in Table 2, STBs were rarely employed in studies concerning secondary metabolite production in shoot cultures.

Besides conventional STBs, other types of mechanically agitated bioreactors were used for shoot cultivation. One of them is the Roller Bioreactor (RB), examined for steviosides production in *Stevia rebaudiana* plantlets [98, 99]. The apparatus, consisting of multiple low-volume (0.32 l) vessels placed on a rotating shaft, is similar to “Auxophyton,” previously devised by Steward and co-workers [103, 108]. Another example is the “Lab Rocker” (LR) system (Caisson Laboratories, Smithfield, USA), consisting of polycarbonate growth vessels (<1 l) agitated by rocking motion. In an experiment designed by Maxwell et al. [42], the LR bioreactor was used to study secondary metabolism of *Echinacea purpurea* plantlets. The similar system, the “rocker platform,” was based on Nalgene Biosafe vessels (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), [109]. It was successfully used to grow *Curcuma longa* plantlets, providing dry weight yields over two-times higher as compared to agar cultures. The secondary metabolism of plants was not investigated; however, the study proves that the system is scalable and enables the use of vessels of at least 5 l volume [109]. Another bioreactor type with mixing based on tilting motion of the culture vessel is the “Artificial Plant Ovary” (APO). As compared to “Lab Rocker” and “rocker platform,” the APO system is more sophisticated and enables controlled immersion of the explants, growth medium exchange, and headspace control [109]. The “3R” system, also designed with in vitro propagation in mind, consists of multiple cylindrical vessels, each divided into two compartments along the longitudinal axis. The *inoculum* is placed in one of the compartments and the container is filled with the growth medium. The rotational motion of the growth modules provides mixing and enables the explants to be periodically submerged in the growth medium [109]. To some extent, the above-described systems can be considered as hybrids of temporary immersion and mechanically agitated bioreactors. So far, however, they have not been employed for secondary metabolism studies. The results of experiments concerning metabolite production in mechanically agitated bioreactors were presented in Table 2.

4.2 Pneumatically Agitated Bioreactors

Similarly to STBs, the pneumatically agitated bioreactors are commonly used in industrial biotechnology. As compared to the former, systems of this type are characterized by lower energy consumption and reduced shear forces exerted on the growing biomass [3, 28, 102]. Due to the lack of the impeller, this type bioreactor is especially suitable for differentiated cultures of roots, shoots, somatic embryos, and plantlets [3, 101, 102]. Pneumatically agitated vessels are also easily scalable up to industrial scale: 10,000–20,000 l bioreactors have been successfully employed for the production of adventitious roots [23, 32]. Some of their disadvantages, such as lowered mixing performance, difficulties in obtaining truly industrial scale, and inability to deal with high density cultures, are irrelevant to shoot cultures. Research has shown that the scale of bioreactor-grown shoot in vitro cultures is effectively limited to 2–20 l because of light requirements of the biomass. As compared to large growth vessels, systems of this size are also cheaper and easier to handle [101]. Given the above, the production scale-up can be implemented by using several small vessels. In this respect, pneumatically agitated bioreactors may perform better because of the lower cost and ease of operation. A notable exception to this rule is the 500 l air-driven bioreactor with internal illumination, used for the production of *Stevia rebaudiana* shoots [101, 113]. The performance of the system, in terms of biomass yield per medium volume, was not negatively affected by scale-up; however, the biomass located in deeper layers still suffered from light deficit. The shoots in this bioreactor were not examined for secondary metabolite content [101, 113].

Depending on the height to width (h/w) ratio, pneumatically agitated systems can be classified as simple aeration bioreactors (SAB, $h/d < 3$) and bubble column bioreactors (BCB, $h/d > 3$) [101]. In order to deal with the excessive foaming, the cone-shaped balloon bioreactors (BB, alternatively termed as “balloon type bubble bioreactors” or BTBB) were devised [3, 102]. The airlift (ALB) systems, on the other hand, are equipped with a draft tube designed to reduce shear stress exerted on cells [28, 101]. Over the last two decades, air-driven bioreactors of SAB, BCB, and BB types were often employed in secondary metabolite studies, conducted on shoots, plantlets, and somatic embryos. Growth containers of up to 5 l volume were the most commonly used. Depending on the application, the bioreactors can be equipped with baskets [38, 46, 72], rafts [39] or meshes [37, 54] for biomass immobilization. In the case of *G. tinctoria* shoots-hairy roots co-culture, two concentric baskets were used to separate the two biomasses [32, 38]. In other instances, the installed supports were meant to reduce mechanical stress and hyperhydricity, a common issue with fully submerged shoot cultures [3, 102, 103, 114]. The low-cost and disposable versions of pneumatically agitated systems were also developed: the examples include the aerated Growtek bioreactor (Tarsons, India) [39] and LifeReactor (Osmotek, Israel) [114], respectively. In Table 3, the results of experiments on secondary metabolism of shoot cultures maintained in air-driven bioreactors were summarized.

Table 2 Secondary metabolite production in shoot cultures grown in mechanically agitated bioreactors

Type of stirrer and constructions details	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [gL ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Air flow rate [vvm]
Magnetic stirrer	1000	MS	30	–	24/0	7.8	25	28	0.11
Magnetic stirrer; the dual reactor system with mesh installed in the center of the vessel to support the root culture	3000+ 3000	MS	30	–	24/0 for shoots	7.8	25	28	0.037–0.067
Magnetic stirrer and turbine impeller	2000 + 2000	MS	–	–	24/0	21–28	25	29	0.2
Magnetic stirrer	1000	MS	–	–	24/0	21	25	28	0.11
Magnetic stirrer	3500	MS	–	–	24/0	21	25	28	0.029–0.057
Two flat-blade impellers having 4 blades with rotational speed 100 rpm	2500	MS	–	BA 1.0; IAA 1.0	24/0	78.3	28	15	1.4
“Southern Sun Liquid Lab Rocker” growth system with rocking motion of the system [30 s ON/ 132 s OFF]	100	MS	30	–	16/8	40–85	NS	12	NS
Impeller with rotational speed 10 rpm, equipped with	4800	B5	30	2,4-D 2.0	NS	NS	NS	23	NS

Plant culture						
Type	Species	Metabolite	Max. content [mg g ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
Co-culture of <i>A. belladonna</i> hairy roots and shooty teratomas	<i>Atropa belladonna</i> and a <i>Duboisia leichhardtii</i> X <i>D. myoporoides</i> hybrid	Hyoscyamine	8.00×10^{-2} in shoots	3.14×10^{-2} in shoots	Effects of different bioreactor systems on in vitro biomass production and accumulation of scopolamine	[75]
		Scopolamine	2.20×10^{-1} in shoots	8.64×10^{-2} in shoots		
Co-culture of <i>A. belladonna</i> hairy roots and shooty teratomas	<i>Atropa belladonna</i> and a <i>Duboisia leichhardtii</i> X <i>D. myoporoides</i> hybrid	Hyoscyamine	2.20×10^{-1} in shoots	8.51×10^{-2} in shoots	Effects of different bioreactor systems on in vitro biomass production and accumulation of scopolamine	[75]
		Scopolamine	1.50×10^{-1} in shoots	5.80×10^{-2} in shoots		
Co-culture of <i>Atropa belladonna</i> transformed roots and <i>Duboisia</i> hybrid shooty teratomas	<i>Atropa belladonna</i> and <i>Duboisia</i> hybrid	Hyoscyamine	ND	–	Effects of interspecies and intergenus organ co-culture on the production of plant secondary metabolites	[74]
		Scopolamine	4.80 in shooty teratomas	6.62×10^{-4} in shooty teratomas		
<i>Atropa belladonna</i> shooty teratomas	<i>Atropa belladonna</i>	Scopolamine	ND	–	Effects of different bioreactor systems on morphology of teratomas and scopolamine content	[73]
<i>Atropa belladonna</i> shooty teratomas	<i>Atropa belladonna</i>	Scopolamine	ND	–	Effects of different bioreactor systems on morphology of teratomas and scopolamine content	[73]
Shoot	<i>Digitalis purpurea</i>	Digitoxin	4.18×10^{-2}	4.29×10^{-2}	Effect of mechanical agitation on the growth of cells and digitoxin content	[110]
Plantlets	<i>Echinacea purpurea</i>	Cichoric acid	2.19×10^1 in 9th day	NA	Effects of GA3, paclobutrazol, and uniconazole on secondary metabolite production	[42]
Shoot	<i>Rutagraveolens</i>	Furanocoumarins	NA	2.00	Effects of different bioreactor systems on furanocoumarin production	[111]

(continued)

Table 2 (continued)

Type of stirrer and constructions details	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Air flow rate [vvm]
temperature, oxygen and pH probes									
The roller bioreactor – the flow of nutrient medium inside the vessel with 4 rpm rotation velocity of disks	4	MS	30	–	NS	28	25 ± 1	35	NS
The roller bioreactor – the flow of nutrient medium inside the vessel with rotation velocity of disks 4 rev/min.	4	MS	30	–	NS	28	25 ± 1	35	NS

NA data not available, *NS* data not specified, *ND* not detected

^aUnit conversion in accordance with Sager and McFarlane [112]

Plant culture						
Type	Species	Metabolite	Max. content [mg g ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
Shoot	<i>Stevia rebaudiana</i>	Stevioside	6.42 in leaves	4.27×10^{-1}	Effects of medium composition on growth and accumulation of steviol glycosides in the roller bioreactor	[98]
		Rebaudioside A	2.50 in leaves	1.66×10^{-1}		
		Rebaudioside C	1.20 in leaves	7.98×10^{-2}		
Shoot	<i>Stevia rebaudiana</i>	Stevioside	6.37×10^{-1} in leaves	5.74×10^{-1}	Effects of medium composition on growth and accumulation of steviol glycosides in the roller bioreactor	[98, 99]
		Rebaudioside A	2.53×10^{-1} in leaves	1.08×10^{-1}		
		Rebaudioside C	1.20×10^{-1} in leaves	1.08×10^{-1}		

Table 3 Secondary metabolite production in shoot cultures grown in pneumatically agitated bioreactors

Type of system	Medium				Experiment parameters					
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Air flow rate [vvm]	Air sparger constructions
AL	2000	MS	30	NAA 0.05; BA 0.5	16/8	42	25 ± 1	25	1	Vertical immersed tube with holes, fixed in the center of the bioreactor
AL	5000	MS	30	–	16/8	40	22	56	0.1	NS
SAB	NS	MS	30	–	16/8	75	23	28	NS	Collapsible vessel (“LifeReactor”) attached to an air pump via a filter disc
SAB	400	MS	–	IBA 0.05; TDZ 0.25	16/8	50	25 ± 0.2	28	0,1–0,3 ^b	“Growtek” bioreactor with aeration provided by a needle inserted through side tube of bioreactor
SAB	150	MS	30	BA 0.25	16/8	100	22 ± 1	28	NS	“Growtek” bioreactor
SAB	500	MS	30	BA 2.0; NAA 0.15	16/8	30	24 ± 2	56	0.1	NS

Plant culture						
Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
Shoot	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	1.80×10^{-1}	5.81×10^{-1}	Effect of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of artemisinin	[54]
Embryo genic cells	<i>Eleutherococcus chiisanensis</i>	Eleutheroside B	5.6×10^{-2} for plantlets	NA	Plantlets production	[115]
		Eleutheroside E	3.83×10^{-1} for plantlets	NA		
		Eleutheroside E1	3.80×10^{-1} for plantlets	NA		
Plantlets	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Baicalin	1.58×10^{-3}	NA	Effect of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of bioactive metabolites	[40]
		Baicalein	4.40×10^{-4}	NA		
		Wogonin	3.20×10^{-5}	NA		
Shoot	<i>Pueraria tuberosa</i>	Total isoflavonoid	1.89 for 20 v/v aeration	NA	Effect of aeration volume on biomass growth and isoflavonoid accumulation	[39]
		Puerarin	1.48 for 20 v/v aeration	NA		
		Daidzein	1.26×10^{-1} for 20 v/v aeration	NA		
		Genistein	3.26×10^{-2} with no aeration	NA		
		Genistin	2.51×10^{-1} for 20 v/v aeration	NA		
Shoot	<i>Ocimum basilicum</i>	Rosmarinic acid	5.12×10^{10}	1.10	Effects of different types of bioreactors on biomass production and rosmarinic acid content	[43]
Shoot	<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine	5.20×10^{-1}	4.08×10^{-2}	Effect of the type and size of bioreactors on growth and galanthamine content	[69]

(continued)

Table 3 (continued)

Type of system	Medium				Experiment parameters					
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Air flow rate [vvm]	Air sparger constructions
SAB	450	MS	–	NAA 1.0; KIN 0.1	16/8	NS	25 ± 2	15; 18; 30	0.08	Submerged horizontal sparger at the bottom of the bioreactor
SAB	NS	MS	–	BA 2.5; IAA 0.01	16/8	36	26 ± 0.5	40	0.1	“Growtek” bioreactor with aeration provided by a needle inserted through side tube of bioreactor
SAB	500	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	60	24 ± 1	30; 60	1.0	Aeration provided by a sparger placed at the bottom of the bioreactor vessel
SAB	500	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	90 ± 2	24 ± 2	30; 60	1.0	Aeration provided by a sparger placed at the bottom of the bioreactor vessel and internal rack for biomass immobilization
SAB	600	MS	–	BA 0.1; 2iP 3.0; NAA 0.3	16/8	88 ± 8	24 ± 1	70	1.33	NA; bioreactor with the immobilization basket placed above the bottom of the growth vessel

Plant culture						Ref
Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	
Shoot	<i>Artemisia annua</i>	Camphor	3.48 ^c for ethephon elicitation	3.37 × 10 ⁻¹ for ethephon elicitation	Effect of gibberellic acid and ethephon on terpenoids accumulation	[116]
		1,8-cineol	7.50 × 10 ^{-1c} for gibberellic acid elicitation	1.26 × 10 ⁻¹ for gibberellic acid elicitation		
		β-caryophyllene	6.50 × 10 ^{-1c} for ethephon elicitation	6.42 × 10 ⁻² for ethephon elicitation		
Shoot	<i>Bacopa monnieri</i>	Total phenolic content	3.4 × 10 ^{1d}	NA	Effects of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of phenolic compounds	[34]
Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Schisandrin	5.51 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	1.47 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of schisandra lignans	[46]
		Deoxyschisandrin	4.32 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	1.15 × 10 ⁻¹ for TS 30 d		
		Gomisin A	3.86 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	1.03 × 10 ⁻¹ for TS 30 d		
Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Total phenolics acid	3.16 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	8.35 × 10 ⁻² for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems and cultivation mode on biomass production and accumulation of phenolic acids and flavonoids	[44]
		Chlorogenic acid	2.46 × 10 ⁻² for TS 30 d	6.63 × 10 ⁻³ for TS 30 d		
		Gallic acid	8.50 × 10 ⁻² for TS 30 d	2.29 × 10 ⁻² for TS 30 d		
		Protocatechuic acid	8.38 × 10 ⁻² for TS 30 d	2.26 × 10 ⁻² for TS 30 d		
		Salicylic acid	5.09 × 10 ⁻² for TS 30 d	1.37 × 10 ⁻² for TS 30 d		
		Total flavonoids	2.20 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	5.93 × 10 ⁻² for TS 30 d		
Shoot	<i>Securinega suffruticosa</i>	Securinine	3.29 for supplementation with lysine hydrochloride on 20th day	1.39 for medium supplementation with lysine hydrochloride on 20th day	Effect of medium supplementation with biosynthesis precursors (lysine hydrochloride) on biomass yield and indolizidine alkaloids content	[72]
		Allosecurinine	3.44 for supplementation with lysine hydrochloride on 20th day	1.33 for medium supplementation with lysine hydrochloride on 20th day		

(continued)

Table 3 (continued)

Type of system	Medium				Experiment parameters					
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Air flow rate [vvm]	Air sparger constructions
BCB	1500	MS	–	BA 0.1	16/8	8.3	23	19	1.3	Aeration from the bottom of the bioreactor tank
BCB	1500	MS	–	BA 0.1	16/8	17	23 ± 1	NS	1.3	NS
BB	1000	MS	–	–	16/8	60	24 ± 1	56	0.1	NS; bioreactor with net
BB	1000	MS	–	–	16/8	60	24 ± 1	56	0.1	NS
BB	750	Hypo-nex I	30	–	16/8	45–50	25 ± 2	84	0.03; 0.06; 0.09; 0.12	NS
BB	NS	MS	30	–	16/8	75	23	28	NS	Sparger positioned at the bottom of the container and connected to an air pump

Plant culture						
Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
Shoot	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin	7.74×10^{-2}	1.87×10^{-1}	Effects of different culture systems on accumulation of biomass and concentrations of secondary metabolites	[117]
		Hyperforin	3.99	3.36		
		Pseudohypericin	2.23×10^{-1}	6.52×10^{-1}		
Shoot	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin	7.71×10^{-2}	NA	Effects of different culture systems on accumulation of biomass and concentrations of secondary metabolites	[117]
		Hyperforin	3.67	NA		
		Pseudohypericin	3.03×10^{-1}	NA		
Shoot	<i>Rosa rugosa</i>	Total phenolics	3.90×10^1	9.93	Effects of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of total phenolics and flavonoids	[37]
		Total flavonoids	1.31×10^1	3.34		
Shoot	<i>Rosa rugosa</i>	Total phenolics	3.92×10^{1d}	17.0^d	Effects of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of total phenolics and flavonoids	[37]
		Total flavonoids	1.33×10^{1e}	5.75^e		
Plantlets	<i>Anoectochilus formosanus</i>	Total phenolics	1.03×10^{1d}	NA	Effect of aeration volume and inoculum density on biomass growth	[118]
		Total flavonoids	2.00×10^{-1e}	NA		
Plantlets	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Baicalin	1.41×10^{-3}	NA	Effect of different bioreactor system on in vitro biomass production and accumulation of bioactive metabolites	[40]
		Baicalein	3.90×10^{-4}	NA		
		Wogonin	4.72×10^{-5}	NA		

(continued)

Table 3 (continued)

Type of system	Medium				Experiment parameters					
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Air flow rate [vvm]	Air sparger constructions
BB	500	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	90 ± 2	24 ± 2	30; 60	1.0	Aeration provided by a sparger placed at the bottom of the bioreactor vessel
BB	500	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	60	24 ± 1	30; 60	1.0	Aeration provided by Sparger placed at the bottom of the bioreactor vessel
BB	1000	MS	60	–	16/8	110	18; 22; 26	35	0.15; 0.30; 0.45	Aeration provided by ceramic Sparger placed at the bottom of the bioreactor vessel; bioreactor with internal sections
BB	NS	MS	30	BA 2.0; NAA 0.15	16/8	30	24 ± 2	56	0.3	NS

Plant culture						
Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Total phenolics acid	4.67 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	1.07 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems and cultivation mode on biomass production and the accumulation of phenolic acids and flavonoids	[44]
		Chlorogenic acid	4.65 × 10 ⁻² for TS 30 d	1.07 × 10 ⁻² for TS 30 d		
		Gallic acid	1.00 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	2.30 × 10 ⁻² for TS 30 d		
		Protocatechuic acid	1.63 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	3.74 × 10 ⁻² for TS 30 d		
		Salicylic acid	5.91 × 10 ⁻² for TS 60 d	1.52 × 10 ⁻² for TS 60 d		
		Total flavonoids	2.08 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	4.23 × 10 ⁻² for TS 30 d		
		Quercitrin	1.84 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	4.22 × 10 ⁻² for TS 30 d		
Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Schisandrin	6.73 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	1.53 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of schisandra lignans	[46]
		Deoxyschisandrin	4.28 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	9.71 × 10 ⁻² for TS 30 d		
		Gomisin A	3.49 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	7.90 × 10 ⁻² for TS 30 d		
Shoot	<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine	1.7 for 0.30 vvm and 22 °C	4.86 × 10 ⁻² for 0.30 vvm and 22 °C	Studies on biomass production and accumulation of galanthamine in the “modified bubble-column bioreactor”	[70]
Shoot	<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine	6.80 × 10 ⁻¹	3.29 × 10 ⁻²	Scale-up of biomass and galanthamine production	[69]

(continued)

Table 3 (continued)

Type of system	Medium				Experiment parameters					
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Air flow rate [vvm]	Air sparger constructions
BB	1000	SH	30	IBA 5.0; ABA 10.0	16/8	80 ± 8	25 ± 2	60	0.8	Aeration provided by a silicon hose from the bottom of the growth vessel; two stainless steel baskets with the smaller one placed concentrically inside the larger basket
Bb	2000	MS	30	GA ₃ 4.0	16/8	35	25	42	0.1	NS
BB	1000	MS	30	TDZ 1.1	16/8	35	23	25	0.1	Sparger placed at the bottom of the container
BB	1000	MS	15; 30; 45; 60	–	16/8	35	23	25	NS	Sparger positioned at the bottom of container

NA data not available, NS data not specified

^aUnit conversion in accordance with Sager and McFarlane [112]

^bExpressed as a v/v

^cExpressed as a mg% FW

^dExpressed as a gallic acid equivalents [mg GAE g⁻¹ DW or mg GAE L⁻¹ d⁻¹]

^eExpressed as mg of (+)-catechin equivalent [mg g⁻¹ DW or mg L⁻¹ d⁻¹]

Plant culture						
Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
Co-culture of shoots and hairy roots	<i>Genista tinctoria</i>	Genistin	6.94×10^1 for TS 40 d	1.38×10^3	Effect of prototype basket-bubble bioreactor on biomass production and accumulation of isoflavones	[38]
		Genistein	6.74×10^{-1} for TS 26 d	7.94		
		Daidzein	3.29 for TS 50 d	7.99×10^1		
		Daidzin	1.65×10^1 for TS 54 d	4.35×10^2		
Somatic embryos	<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	Total Eleutherosides	1.48×10^{-1}	NA	Effect of different bioreactor systems on growth and eleutherosides production	[119]
		Chlorogenic acid	3.40×10^{-2}	NA		
		Total flavonoids	1.84×10^1	NA		
		Total phenolics	1.67×10^1	NA		
Plantlets	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin	3.36×10^{-2}	4.51×10^{-3}	Effects of different culture systems on hypericin, pseudohypericin, and hyperforin contents	[50]
		Pseudohypericin	5.24×10^{-1}	7.01×10^{-2}		
		Hyperforin	4.04	5.44×10^{-1}		
Shoot	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin	3.18×10^{-2} for 30 g/l sucrose	1.5×10^{-2} for 30 g/l sucrose	Effects of CO ₂ and sucrose enrichment on biomass production and secondary metabolites accumulation	[49]
		Pseudohypericin	5.08×10^{-1} for 45 g/l sucrose	1.50×10^{-1} for 45 g/l sucrose		
		Hyperforin	5.35×10^{-1} for 15 g/l sucrose	2.97×10^{-1} for 15 g/l sucrose		

4.3 Temporary and Continuous Immersion Systems

Temporary immersion bioreactors (TIBs) were designed with the aim of overcoming problems associated with submerged cultures, such as anoxia, abnormal morphology including hyperhydricity, and low survivability of the explants. The discussed systems share the advantages of agar cultures, like lack of mechanical stress and good gas exchange, and liquid cultures which include better nutrients availability, easier handling, and scalability. Temporary immersion systems have been developed since 1980s and gradually became the most popular bioreactor type employed in micropropagation studies [28, 103, 105, 120, 121]. They have been extensively reviewed by Etienne and Berthouly [103] and, more recently, by Watt [121] and Georgiev et al. [105]. In the basic configuration, often referred to as the “twin flask” system, the TIB consists of two containers, one serving as medium reservoir and the other one being the growth vessel which is usually equipped with some sort of support for the shoots. The medium is periodically moved between the two vessels, usually by air pump/s which also provide gas exchange for the culture. The twin flask system offers several advantages: it is simple, scalable up to 10–20 l volume, and customizable. Given the above, this type of TIB is one of the most commonly used, and its various iterations have been successfully employed for micropropagation [103, 105, 120, 121] and secondary metabolite studies (Table 4). Over the years, TIBs have become simpler and easier to handle, and numerous systems are commercially available at the moment. The currently used bioreactors are usually made of transparent plastics and include two compartments (i.e., medium reservoir and growth container) in a single vessel. The systems are pneumatically driven which minimizes equipment and maintenance costs, whereas the single-vessel design simplifies handling and saves shelf space [103, 105]. The most popular and successful of TIBs is RITA[®] (Vitropic, France), presented in 1995 [105, 120, 121] and still available on the market after the 25th anniversary of its introduction. Despite relatively low volume (usually ca. 0.2 l of growth medium), the system shares all advantages of temporary immersion culture and thus has been often used in studies on secondary metabolism of plants (Table 4). The more recently introduced [122] Plantform system (Plant Form AB, Sweden) has also been employed in experiments on secondary metabolite accumulation in shoot cultures [44–46, 48, 60].

As in the case of pneumatically agitated bioreactors, attempts were made to develop the low-cost, disposable TIBs for economically viable production of plant material. The example of such a system is the “Box-in-Bag” (BIB) bioreactor which shares the advantages of rigid culture vessels and bag bioreactors [32, 105, 120]. Similarly to the twin flask system, the BIB consists of two containers: the 10 l disposable growth vessel and reservoir accommodating 5 l of growth medium. The flat design and vertical distribution of the plant material ensure good access to light which is crucial for the production of high quality plantlets. The “Box-in-Bag” bioreactor offers scale-up possibilities and is intended to improve the effectiveness of micropropagation. So far, it has been employed in industrial propagation of *Coffea sp.*, but no studies on secondary metabolite content in BIB-grown shoots have been conducted [32, 105, 120]. Another type of disposable bioreactor is the

previously mentioned LifeReactor which can be converted to twin flask-type temporary immersion system by simply connecting two separate bags [120].

In terms of plantlets quality and micropropagation effectiveness, TIBs are considered superior to continuous immersion bioreactors (CIBs). Nevertheless, in some instances, continuously submerged cultures showed better growth [43] as compared to shoots grown in TIBs. Some of the custom-made designs included periodic aeration of the continuously submerged culture and thus can be classified as hybrid pneumatically agitated/continuous immersion systems (CIB-SAB or CIB-BB, depending on bioreactor configuration). In experiments on *Leucojum aestivum* shoot cultures, these bioreactors yielded higher amounts of secondary metabolites as compared to TIB [69]. The commercially available CIBs, like Growtek, are often equipped with supports [43] to prevent the shoots from drowning. However, research has shown that the lack of thereof does not necessarily negatively affect system productivity [69]. Experiments on *Ruta graveolens* in vitro shoots demonstrated that CIB-grown culture can be scaled up to 5 l without detrimental effects on biomass yield and furanocoumarin content [123]. In order to prevent hypoxia, CIBs can be provided with silicone tubing for bubble-free aeration (BFB bioreactor); however, this solution has been rarely used for in vitro cultures of shoots [40].

The results of studies concerning secondary metabolite production in TIB- and CIB-grown shoot cultures are compiled in Table 4. In many cases, the experiments conducted focused on optimizing immersion frequency which is a crucial parameter affecting productivity of the system. Other strategies aimed at increasing secondary metabolite content, such as elicitation, have also been employed.

4.4 Gas Phase Bioreactors

Similarly to TIBs, the gas phase bioreactors (GPBs) were developed to overcome problems related to continuously submerged organ cultures like poor oxygen transfer, abnormal morphology, and (in some cases) mechanical stress. However, while the former were designed specifically for shoot cultures [103, 105], the gas phase systems were hairy and adventitious root cultures in mind [25, 104, 130]. Nevertheless, the assets of GPBs such as good gas exchange and complete lack of mechanical stress proved to be useful for shoot cultivation, providing good growth and higher secondary metabolite production as compared to other systems [54, 60].

In GPBs, the medium is applied in dispersed form onto the immobilized biomass, placed on a support in a ventilated growth container. Technically, depending on the droplet size, the gas phase systems can be divided into mist (0.01–10 μm) and spray (10–10³ μm) bioreactors [104]. However, the size of droplets is rarely provided in experimental papers focused on secondary metabolism of shoot cultures. Therefore, in the current study, the systems were classified according to the mode of medium application: the dispersion can be achieved by using a hydraulic nozzle [46, 60, 131], atomizer nozzle [59, 65], or ultrasonic mist generator [52, 54]. The nomenclature of the systems varies, and similar systems are often referred to as mist, sprinkle, spray,

Table 4 Secondary metabolite production in shoot cultures grown in temporary and continuous immersion bioreactors

Bio-reactor type	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°Cz]	Timespan (TS) [days]	Immersion time ratio (ITR) [min/h]
RITA	250	MS	30	BA 0.5	16/8	60	25 ± 1	28; 56	1/3; 1/6
RITA	200	B5	30	–	16/8	77	25 ± 2	4; 9; 21	5/24
RITA	200	B5	30	–	16/8	103	25 ± 2	21	30/3; 30/12; 30/24; 5/3; 5/12; 5/24
RITA	500	MS	30	TDZ 1.10	16/8	35	23	25	5/3
RITA	500	MS	30	TDZ 1.10	16/8	35	23	25	5/30

Plant culture							Ref
Immobilization and Constructions details	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	
–	Shoot	<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptothecin	2.60 for ITR 1/6 and TS 28 d	NA	Effects of different culture systems on camptothecin content	[66]
–	Shoot	<i>Castilleja tenuiflora</i>	Total phenolics	2.95 × 10 ^{1b} for N 1.32 mM and TS 21 d	1.40 ^b for N 1.32 mM and TS 21 d	Effects of nitrogen deficiency and starvation on morphogenesis and secondary metabolism	[124]
			Verbascoside	2.83 × 10 ² for N 0.66 mM and TS 21 d	1.35 × 10 ¹ for N 1.32 mM and TS 21 d		
			Isoverbascoside	9.00 × 10 ¹ for N 1.32 mM and TS 21 d	4.64 for N 1.32 mM and TS 21 d		
			Aucubin	1.25 × 10 ¹ for N 0.00 mM and TS 21 d	6.90 × 10 ⁻¹ for N 25.74 mM and TS 21 d		
–	Shoot	<i>Castilleja tenuiflora</i>	Total phenolics	3.06 × 10 ^{1a} for ITR 30/24	NA	Effects of different immersion cycles on morphogenesis and total phenolics and total flavonoids content	[36]
			Total flavonoids	4.58 × 10 ^{-2c} for ITR 30/24	NA		
	Plantlets	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin	3.39 × 10 ⁻²	2.33 × 10 ⁻³	Effects of different culture systems on the hypericin, pseudo-hypericin, and hyperforin contents	[50]
			Pseudohypericin	5.41 × 10 ⁻¹	3.75 × 10 ⁻²		
			Hyperforin	2.20 × 10 ⁻³	1.52 × 10 ⁻¹		
Temporary root zone immersion	Plantlets	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin	4.47 × 10 ⁻²	3.57 × 10 ⁻³	Effects of different culture systems on the hypericin,	[50]
			Pseudohypericin	8.80 × 10 ⁻¹	6.94 × 10 ⁻²		
			Hyperforin	3.29 × 10 ⁻³	2.56 × 10 ⁻¹		

(continued)

Table 4 (continued)

Bio-reactor type	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Temperature (T) [°Cz]	Timespan (TS) [days]	Immersion time ratio (ITR) [min/h]
RITA	200	MS	60	–	16/8	NS	18; 22; 26; 30	35	15/6; 15/8; 15/10; 15/12
RITA	200	MS	60	–	16/8	NS	18; 22; 26	35	15/4; 15/6; 15/7; 15/10; 15/12
RITA	150	MS	30	IBA 0.25	16/8	100	22 ± 1	28	1/12
RITA	200	MS	30	NAA 1.15; BA 2.0	16/8	110	26	35	15/6; 15/12; 15/24
RITA	200	SH	–	2iP 5.0	16/8	40	24 ± 2	28	5/1.5

Plant culture							
Immobilization and Constructions details	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
						pseudo-hypericin, and hyperforin contents	
	Shoot	<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine	1.06×10^{-1} for ITR 15/8 and T 26	3.79×10^{-2} for ITR 15/8 and T 26	Effects of immersion frequency and temperature on biomass and alkaloids production	[68]
			Lycorine	7.83×10^{-4} for ITR 15/10 and T 26	2.43×10^{-4} for ITR 15/10 and T 26		
			Norgalanthamine	2.60×10^{-1} for ITR 15/8 and T 22	5.54×10^{-2} for ITR 15/8 and T 22		
	Shoot	<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine	NA – immersion time ratio and temperature affected biomass production and alkaloids accumulation		Effects of immersion frequency and temperature on production of alkaloids compounds	[71]
			Hamayne				
			Lycorine				
	Shoot	<i>Ocimum basilicum</i>	Rosmarinic acid	1.55×10^2	1.07	Effect of different types of bioreactors on biomass production and rosmarinic acid content	[43]
	Shoot	<i>Pancreatium maritimum</i>	Haemanthamine	9.00×10^{-1} for ITR 15/12	1.03×10^{-1} for ITR 15/12	Effects of immersion frequency on biomass and alkaloids content	[105]
			Lycorine	8.00×10^{-1} for ITR 15/12	9.45×10^{-2} for ITR 15/12		
	Shoot	<i>Rhododendron tomentosum</i>	Essential oil p-cymene Alloaromadendrene Shyobunone Ledene oxide (II)	5.00×10^{-3d} for total essential oil	3.57×10^{-3d} for total essential oil	Effects of culture conditions and bioreactor construction on the growth and volatile oil production	[60]

(continued)

Table 4 (continued)

Bio-reactor type	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°Cz]	Timespan (TS) [days]	Immersion time ratio (ITR) [min/h]
RITA	200	SH	–	2iP 5.0	16/8	40	24 ± 2	28	5/1.5
RITA	NS	MS	30	–	16/8	75	23	28	5/3
RITA	200	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	88 ± 8	24 ± 1	30; 60	5/1.5
RITA	200	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	90 ± 2	24 ± 1	30; 60	NS

Plant culture							Ref
Immobilization and Constructions details	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	
	Shoot	<i>Rhododendron tomentosum</i>	Essential oil p-cymene Alloaromadendrene Shyobunone Ledene oxide (II)	5.67×10^{-3d} for total essential oil with aphid extract elicitation	3.93×10^{-3d} for total essential oil with aphid extract elicitation	Effects of biotic and abiotic elicitation on the production of essential oil	[61]
	Plantlets	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Baicalin	2.75×10^{-3}	NA	Effect of different bioreactor system on biomass production and accumulation of bioactive metabolites	[40]
			Baicalein	2.10×10^{-3}	NA		
			Wogonin	1.05×10^{-4}	NA		
	Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Schisandrin	7.86×10^{-1} for TS 30 d	1.94×10^{-1} for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of schisandra lignans	[46]
			Deoxyschisandrin	5.03×10^{-1} for TS 30 d	1.24×10^{-1} for TS 30 d		
			Gomisin A	5.27×10^{-1} for TS 30 d	1.30×10^{-1} for TS 30 d		
	Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Total phenolics	3.27×10^{-1} for TS 30 d	8.15×10^{-2} for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems and cultivation mode on biomass production and accumulation of phenolic acids and flavonoids	[44]
			Chlorogenic acid	2.32×10^{-2} for TS 30 d	5.79×10^{-3} for TS 30 d		
			Gallic acid	8.87×10^{-2} for TS 30 d	2.21×10^{-2} for TS 30 d		
			Protocatechuic acid	9.87×10^{-2} for TS 30 d	2.46×10^{-2} for TS 30 d		
			Salicylic acid	5.27×10^{-2} for TS 30 d	2.46×10^{-2} for TS 30 d		
			Total flavonoids	2.13×10^{-1} for TS 30 d	5.31×10^{-2} for TS 30 d		
			Quercitrin	1.85×10^{-1} for TS 30 d	4.62×10^{-2} for TS 30 d		

(continued)

Table 4 (continued)

Bio-reactor type	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°Cz]	Timespan (TS) [days]	Immersion time ratio (ITR) [min/h]
RITA	200	MS; ½MS	30	BA 1.5; NAA 0.5	16/8	15	23 ± 2	3; 6; 12; 18	3/6
RITA	300	½MS	30	–	16/8	32.5	25 ± 2	60	15/24
Plantform	NS	SH	–	2iP 5.0	16/8	40	24 ± 2	28	5/1.5
Plantform	500	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	88 ± 8	24 ± 1	30; 60	5/1.5

Plant culture							Ref
Immobilization and Constructions details	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	
–	Shoot	<i>Thapsia garganica</i>	Thapsigargin	3.37 for ½ MS and MeJa elicitation	NA	Effect of biotic and abiotic elicitation and reduced nutrient supply on the production of thapsigargin	[125]
			Nortrilobolide	2.15 × 10 ¹ for ½ MS and MeJa elicitation	NA		
	Shoot	<i>Zeltnera beyrichii</i>	Swertiamarin	1.31 × 10 ¹ for fructose addition	NA	Experiments on the accumulation of xanthenes and secoiridoid glycosides in bioreactor grown shoots	[126]
			Gentiopicrin	2.18 × 10 ¹ for fructose addition	NA		
			Sweroside	1.22 × 10 ¹ for fructose addition	NA		
	Shoot	<i>Rhododendron tomentosum</i>	Essential oil p-cymene Alloaromadendrene Shyobunone Ledene oxide (II)	1.91 × 10 ^{-3d} for total essential oil	NA	Effects of culture conditions and bioreactor construction on the growth and volatile oil production	[60]
	Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Schisandrin	1.18 for TS 30 d	2.45 × 10 ⁻¹ for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of schisandra lignans	[46]

(continued)

Table 4 (continued)

Bio-reactor type	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°Cz]	Timespan (TS) [days]	Immersion time ratio (ITR) [min/h]
Plantform	500	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	90 ± 2	24 ± 1	30; 60	NS
Plantform	500	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	24/0	12.6	25 ± 2	30	5/1.5
Silicone tubing bioreactor	NS	MS	30	–	16/8	75	23	28	60/1

Plant culture							
Immobilization and Constructions details	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
			Deoxyschisandrin	7.77×10^{-1} for TS 30 d	1.60×10^{-1} for TS 30 d		
			Gomisin A	6.79×10^{-1} for TS 30 d	1.40×10^{-1} for TS 30 d		
	Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Total phenolics	3.46×10^{-1} for TS 30 d	7.18×10^{-2} for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems and cultivation mode on biomass production and accumulation of phenolic acids and flavonoids	[44]
			Chlorogenic acid	2.98×10^{-2} for TS 30 d	6.19×10^{-3} for TS 30 d		
			Gallic acid	7.45×10^{-2} for TS 30 d	1.53×10^{-2} for TS 30 d		
			Protocatechuic acid	1.09×10^{-2} for TS 30 d	2.26×10^{-2} for TS 30 d		
			Salicylic acid	5.84×10^{-2} for TS 30 d	1.21×10^{-2} for TS 30 d		
			Total flavonoids	2.05×10^{-1} for TS 30 d	4.25×10^{-2} for TS 30 d		
			Quercitrin	1.75×10^{-1} for TS 30 d	3.64×10^{-2} for TS 30 d		
	Shoot	<i>Schisandra chinensis</i> cultivar Sadova	Schisandrin	1.44 for yeast extract elicitation	NA	Effect of yeast extract on secondary metabolite production	[48]
			Angeloylgomisin Q	2.23×10^{-1} for yeast extract elicitation	NA		
			Gomisin A	4.26×10^{-1} for yeast extract elicitation	NA		
			Angeloylgomisin H	4.51×10^{-1} for yeast extract elicitation	NA		
Bubble free aeration of the medium through silicone tube	Plantlets	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Baicalin	1.53×10^{-3}	NA	Effect of different bioreactor system on biomass production and accumulation of bioactive metabolites	[40]
			Baicalin	4.00×10^{-4}	NA		
			Wogonin	6.36×10^{-5}	NA		

(continued)

Table 4 (continued)

Bio-reactor type	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°Cz]	Timespan (TS) [days]	Immersion time ratio (ITR) [min/h]
Custom-made	NS	SH	–	2iP 5.0	16/8	40	24 ± 2	28	5/90
Custom-made	500	MS	30	BA 2.0; NAA 0.15	16/8	30	24 ± 2	56	5/4
Custom-made	200	MS	30	IAA 2.00; BA 4.00 6.00 8.00	24/0	42	25 ± 2	28	5/3; 15/12
Custom-made	250	MS	30	BA 1.0; IAA 0.1	16/8	125–150	27 ± 2	28	2/2; 2/4; 2/6; 2/12
Custom-made	250	MS	30	BA 1.0; IAA 0.1	16/8	125–150	27 ± 2	28	2/4

Plant culture							
Immobilization and Constructions details	Type	Species	Metabolite	Max. content [mg g ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
	Shoot	<i>Rhododendron tomentosum</i>	Essential oil p-cymene Alloaromadendrene Shyobunone Ledene oxide (II)	2.92×10^{-3} for essential oil content	NA	Effects of culture conditions and bioreactor construction on the growth and volatile oil production	[60]
	Shoot	<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine	6.00×10^{-2}	1.44×10^{-3}	Effects of different types of bioreactors and inoculum weight on the production of the biomass and galanthamine content	[69]
	Shoot	<i>Gynura procumbens</i>	Total flavonoid content	3.07×10^1 for ITR 15/12 and MS medium IAA 2.0 and BA 8.00	2.74×10^{-1} for ITR 15/12 and MS medium IAA 2.0 and BA 8.00	Effects of growth regulators and immersion frequency on production of biomass and flavonoid compounds	[127]
	Shoot	<i>Digitalis purpurea</i>	Digitoxin	3.25×10^{-2} for ITR 2/2	9.57×10^{-3} for ITR 2/2	The effect of immersion frequencies on biomass and cardenolides accumulation	[79]
Digoxin			2.06×10^{-2} for ITR 2/4	1.71×10^{-2} for ITR 2/4			
Lanatoside C			ND	ND			
	Shoot	<i>Digitalis lanata</i>	Lanatoside C	3.16×10^{-1} for Chitoplant elicitation	1.53×10^{-1} for Chitoplant elicitation	Effect of elicitation with Chitoplant, Silioplant, and methyl jasmonate on biomass and cardenolides accumulation	[80]
Digoxin			2.84×10^{-2} for Chitoplant elicitation	1.71×10^{-2} for Chitoplant elicitation			
Digitoxin			ND	ND			

(continued)

Table 4 (continued)

Bio-reactor type	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°Cz]	Timespan (TS) [days]	Immersion time ratio (ITR) [min/h]
Custom-made	1000	MS	30	KIN 0.2; BA 0.3	20/4	NS	14 ± 1	14	3/4
Custom-made	2000	½ MS	20	NAA 1.0; GA ₃ 1.0	16/8	50	26	56	5/4
Custom-made	2000	MS	30	BA 0.3	16/8	50	26	56	5/4
Custom-made	2000	MS	30	BA 1.0	16/8	50	26	56	5/4
Custom-made	2000	MS	30	BA 1.0	16/8	50	26	56	5/4

Plant culture							
Immobilization and Constructions details	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
	Plantlets	<i>Deschampsia antarctica</i>	Shikimic acid	1.71 for UV-B	NA	Effects of UV-B elicitation on phenolic metabolites production	[128]
			Vanillic acid	3.97×10^{-1} for UV-B + B	NA		
			Chlorogenic acid	6.49 for UV-B + B	NA		
			Scopoletin	7.81 for UV-B + B	NA		
			Rutin	1.40 for UV-B + B	NA		
			Gallic acid	2.01 for UV-B + B	NA		
			Isoquercitrin	3.15×10^{-1} for UV-B + B	NA		
	Shoot	<i>Fabiana imbricata</i>	Oleanolic acid	1.00×10^{-2}	NA	Effects of different culture systems on the oleanolic acid content	[111]
	Shoot	<i>Cymbopogon citratus</i>	α - citral	3.50×10^{-1}	NA	Effects of different culture systems on the α - citral and β -citrals contents	[111]
			β -citrals	5.40×10^{-1}	NA		
	Shoot	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin	1.80×10^{-1}	NA	Effects of different culture systems on the hypericin content	[111]
	Shoot	<i>Lavandula officinalis</i>	Rosmarinic acid	5.70	NA	Effects of different culture systems on the rosmarinic acid and essential oil contents	[111]

(continued)

Table 4 (continued)

Bio-reactor type	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L^{-1}]	PGR [mg L^{-1}]	Photo period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [$^{\circ}\text{Cz}$]	Timespan (TS) [days]	Immersion time ratio (ITR) [min/h]
Custom-made	2500	MS	30	BA 0.3	16/8	50	26	42; 56	5/4
Custom-made	300	SH	15	IBA 1.0	24/0	88	24 ± 1	32; 60	45/0.75
Custom-made	2000	MS	30	GA ₃ 4.0	16/8	35	25	42	30/6
Custom-made (the “Dual-Vessel System”)	200; 400	MS	30	BA 30	16/8	60	25 ± 1	28; 56	1/3; 1/6

Plant culture							
Immobilization and Constructions details	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
	Shoot	<i>Cymbopogon citratus</i>	Total phenolics	9.7 for 5 L vessel and TS 42 d ^b	NA	Effects of gassing with CO ₂ -enriched air, reduced immersion frequency, vessel size and culture time on total phenolic and flavonoid content	[129]
			Total flavonoids	5.10 for reduced ITR ^c	NA		
			Caffeic acid	1.65 × 10 ¹ for 10 L vessel and TS 42 d	NA		
			Chlorogenic acid	1.94 × 10 ² for reduced ITR	NA		
			Neochlorogenic acid	1.19 × 10 ² for reduced ITR	NA		
			p-hydroxybenzoic acid	9.90 × 10 ¹ for 10 L vessel and TS 42 d	NA		
	Shoot	<i>Cyclopia genistoides</i>	Mangiferin	2.62 × 10 ¹ for TS 60 d	5.48 for TS 60 d	Effects of different liquid culture systems on accumulation of phenolic secondary metabolites	[41]
			Isomangiferin	7.55 for TS 60 d	1.58 for TS 60 d		
			Iriflophenone 3-C-b-glucoside	6.50 for TS 32 d	3.04 for TS 32 d		
	Somatic embryos	<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	Total Eleutherosides	1.48 × 10 ⁻¹ for germinated embryo	NA	Effect of different bioreactor systems on biomass growth and eleutherosides production	[119]
			Chlorogenic acid	3.40 × 10 ⁻² for germinated embryo	NA		
			Total flavonoids	1.84 × 10 ¹ for germinated embryo	NA		
			Total phenolics	1.67 × 10 ¹ for germinated embryo	NA		
	Shoot	<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptothecin	2.12 for ITR 1/3 and TS 56 d	NA	Effects of different culture systems on camptothecin and 10-hydro camptothecin contents	[66]

(continued)

Table 4 (continued)

Bio-reactor type	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°Cz]	Timespan (TS) [days]	Immersion time ratio (ITR) [min/h]
Custom-made, balloon-type bioreactor	1000	MS	–	–	16/8	60	24 ± 1	56	NS
	1000	MS	–	–	16/8	60	24 ± 1	56	NS
Custom-made, large-mouth glass culture vessel 5 L	NS	MS	–	–	16/8	40	24 ± 2	90	60/1
Custom-made, glass culture vessel 2 L	NS	MS	–	–	16/8	40	24 ± 2	90	60/1
CIB-BB	NS	MS	30	BA 2.0; NAA 0.15	16/8	30	24 ± 2	56	60/1
CIB-SAB	500	MS	30	BA 2.0; NAA 0.15	16/8	30	24 ± 2	56	60/1

NA data not available, NS data not specified, ND not detected

^aUnit conversion in accordance with Sager and McFarlane [112]

^bExpressed as a gallic acid equivalents [mg GAE g⁻¹ DW or mg GAE L⁻¹ d⁻¹]

^cExpressed as a quercetin equivalents [mg CE g⁻¹ DW or mg CE L⁻¹ d⁻¹]

^dExpressed as [μg^{-1} DW or μL^{-1} d⁻¹]

^eExpressed as mg of (+)-catechin equivalent [mg g⁻¹ DW or mg L⁻¹ d⁻¹]

Plant culture							
Immobilization and Constructions details	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
	Shoot	<i>Rosa rugosa</i>	Total phenolics	2.38×10^{1b}	3.14^b	Effects of different bioreactor systems on biomass production and the production of total phenolics and flavonoids	[37]
			Total flavonoids	8.00^e	1.04^e		
Bioreactor with net	Shoot	<i>Rosa rugosa</i>	Total phenolics	2.58×10^{1b}	9.64×10^{-1b}		
			Total flavonoid	1.10×10^{1e}	3.93×10^{-1e}		
	Shoot	<i>Ruta graveolens</i>	Furanocoumarins Bergapten Psoralen Xanthotoxin	2.25×10^1 for total furanocoumarins	NA	Scale-up in liquid culture system	[123]
	Shoot	<i>Ruta graveolens</i>	Furanocoumarins Bergapten Psoralen Xanthotoxin	8.67 for total furanocoumarins	NA		
Gassing four times per day for 5 min	Shoot	<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine	7.20×10^{-1}	2.89×10^{-2}	Scale-up of biomass and galanthamine production	[69]
Bioreactor aerated 12 times daily for 5 min	Shoot	<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine	2.40	2.15×10^{-1}	Effects of different types of bioreactors and inoculum weight biomass production and galanthamine content	[69]

Table 5 Secondary metabolite production in shoot cultures grown in gas phase bioreactors

Immobilization and constructions details	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Misting cycle (MC)ON/OFF [min/min]
Ultrasonic mist generator; bioreactor with a stainless steel mesh support	1000	Gamborgs B5	30	–	16/8	100	25 ± 2	28	10/50
Ultrasonic mist generator; bioreactor with clay stones support	1000	Gamborgs B5	30	–	16/8	100	25 ± 2	28	10/50
Ultrasonic mist generator; bioreactor with three-tier stainless mesh support	400	MS	30	NAA 0.05; BA 0.5	16/8	42	25 ± 1	25	3/90
Hydraulic “Multiplate radius-flow bioreactor”; constant medium circulation without misting, three-tier plate support	400	MS	30	NAA 0.05; BA 0.5	16/8	42	25 ± 1	25	–
Ultrasonic mist generator; “Modified inner-loop ultrasonic nutrient mist bioreactor” with three-tier stainless steel mesh support	400	MS	30	NAA 0.05; BA 0.5	12/12	42	25 ± 1	5 10 15 20 25 30	3/30; 3/60; 3/90; 3/120; 3/150; 3/180
Bioreactor with hydraulic nozzle; medium circulation supplied with peristaltic pump	NS	MS	30	IAA 0.1; BA 1.0	24/0	40	26 ± 2	21; 28	40/1.5

Plant culture							
Liquid flow rate [ml/min]	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
2.0	Shoot	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	3.00×10^{-1b}	NA	Effect of different mist bioreactor systems on biomass production and accumulation of artemisinin	[82]
2.0	Shoot	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	3.60×10^{-1b}	NA		
NS	Shoot	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	3.60×10^{-1b}	1.89	Effect of different bioreactor systems on in vitro biomass production and accumulation of artemisinin	[54]
2.0	Shoot	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	3.20×10^{-1b}	1.38		
NS	Shoot	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	3.20×10^{-1b} for TS 25 d and MC 3/90	1.88 for TS 25 d and MC 3/90	Effect of misting cycle on growth and artemisinin accumulation	[52]
112	Shoot	<i>Centaureum erythraea</i>	Gentiopicroside	2.20×10^1 for TS 21 d	9.67 for TS 21 d	Effect of mist bioreactor system on the production of biomass and biologically active secoiridoid glucosides	[84]
			Sweroside	8.00 for TS 21 d	3.48 for TS 21 d		
			Swertiamarin	6.00 for TS 28d	2.5 for TS 28 d		

(continued)

Table 5 (continued)

Immobilization and constructions details	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Misting cycle (MC)ON/OFF [min/min]
Atomizer mist generator; glass fermenters with two stainless steel meshes	12,000	MS	20	–	NS	NS	25	60	60/60
Atomizer mist generator; glass fermenters with two stainless steel meshes	12,000	MS	40	–	NS	NS	25	60	60/60
Bioreactor with hydraulic nozzle, medium circulation by peristaltic pump	1000	MS	–	BA 1.0; IAA 0.1	16/8	40	26 ± 2	28	0.67/3
Bioreactor with hydraulic nozzle, medium circulation by peristaltic pump	NS	SH	–	2iP 2.0	16/8	40	24 ± 2	28	5/85
Bioreactor with hydraulic nozzle, medium circulation by peristaltic pump	1000	MS	–	IAA 0.1; BA 0.45	16/8	40	26 ± 2	21	0.67/0.83
Bioreactor supplied with hydraulic nozzle, medium circulation by peristaltic pump	500	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	60	24 ± 1	30; 60	0.5/10

Plant culture							Ref
Liquid flow rate [ml/min]	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	
200	Transformed shoot	<i>Mentha citrata</i>	Linalool	3.80×10^{-3}	5.28×10^{-3}	Effects of temperature, light intensity and medium composition on the growth and the production of monoterpenes	[59]
			Linalyl acetate	6.91×10^{-2}	2.43×10^{-1}		
200	Transformed shoot	<i>Mentha piperita</i>	Pulegone	2.34×10^{-1}	1.13		
			Menthofuran	6.78×10^{-2}	3.21×10^{-1}		
90	Shoot	<i>Rehmannia glutinosa</i>	Total phenolic content	5.87×10^{1c}	NA	Effects of culture conditions and bioreactor construction on the growth and volatile oil production	[35]
			Total flavonoid content	1.94×10^{1d}	NA		
100	Shoot	<i>Rhododendron tomentosum</i>	Essential oil p-cymene Alloaromadendrene Shyobunone Ledene oxide (II)	5.30×10^{-3} (total essential oil content)	NA	Effects of culture conditions and bioreactor construction on the growth and volatile oil production	[60]
105	Shoot	<i>Salvia officinalis</i>	Rosmarinic acid	2.62×10^1	2.81	Effect of the nutrient sprinkle bioreactor system on rosmarinic acid and diterpenes accumulation	[131]
			Carnosic acid	1.74	1.87×10^{-1}		
			Carnosol	1.34	1.44×10^{-1}		
100	Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Schisandrin	8.52×10^{-1} for TS 30 d	2.19×10^{-1} for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems on biomass production and accumulation of schisandra lignans	[46]
			Deoxyschisandrin	5.79×10^{-1} for TS 30 d	1.49×10^{-1} for TS 30 d		
			Gomisin A	5.25×10^{-1} for TS 30 d	1.35×10^{-1} for TS 30 d		

(continued)

Table 5 (continued)

Immobilization and constructions details	Medium				Experiment parameters				
	Volume [ml]	Salts	Sucrose [g L ⁻¹]	PGR [mg L ⁻¹]	Photo-period [h light/h dark]	Light intensity ^a [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] ^a	Temperature (T) [°C]	Timespan (TS) [days]	Misting cycle (MC)ON/OFF [min/min]
Bioreactor supplied with hydraulic nozzle, medium circulation by peristaltic pump	500	MS	–	BA 3.0; NAA 1.0	16/8	90 ± 2	24 ± 2	30; 60	0.5/10
Bioreactor supplied with hydraulic nozzle, medium circulation by peristaltic pump	NS	MS	30	IAA 0.1; BA 0.5	16/8	40	26 ± 2	35	0.67/2
Ultrasonic mist generator	400	MS	30	–	12/12	40	25 ± 1	25	3/90

NA data not available, NS data not specified

^aUnit conversion in accordance with Sager and McFarlane [112]

^bExpressed in %

^cExpressed as a gallic acid equivalents [mg GAE g⁻¹ DW or mg GAE L⁻¹ d⁻¹]

^dExpressed as a quercetin equivalents [mg CE g⁻¹ DW or mg CE L⁻¹ d⁻¹]

Plant culture							
Liquid flow rate [ml/min]	Type	Species	Metabolite	Max. content [mgg ⁻¹ DW]	Productivity [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	Parameters studied	Ref
100	Shoot	<i>Schisandra chinensis</i>	Total phenolics acid	3.96×10^{-1} for TS 30 d	1.02×10^{-1} for TS 30 d	Effects of different bioreactor systems and cultivation mode on biomass production and accumulation of phenolic acids and flavonoids	[44]
			Chlorogenic acid	3.75×10^{-2} for TS 30 d	9.70×10^{-3} for TS 30 d		
			Gallic acid	8.87×10^{-2} for TS 30 d	2.29×10^{-2} for TS 30 d		
			Protocatechuic acid	1.22×10^{-1} for TS 30 d	3.16×10^{-2} for TS 30 d		
			Salicylic acid	6.74×10^{-2} for TS 30 d	1.74×10^{-2} for TS 30 d		
			Total flavonoids	2.90×10^{-1} for TS 30 d	7.51×10^{-2} for TS 30 d		
			Quercitrin	2.10×10^{-1} for TS 30 d	5.43×10^{-2} for TS 30 d		
90	Shoot	<i>Scutellaria alpina</i>	Baicalin	1.52×10^1	7.11×10^{-1}	Effects of liquid systems for shoot multiplication, secondary metabolite production and plant regeneration	[132]
			Verbascoside	6.95	3.23×10^{-1}		
			Wogonoside	4.08	1.91×10^{-1}		
			Luteolin	5.15	2.41×10^{-1}		
			Luteolin-7-glucoside	1.45	6.86×10^{-2}		
500	Shoot	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	3.5×10^{-1b}	1.88	Effect of novel mist bioreactor system on biomass production and accumulation of artemisinin	[53]

or droplet bioreactors. The details of the so far conducted experiments concerning secondary metabolite production in GPB-grown shoots are presented in Table 5.

The major disadvantage of GPBs is that they are relatively more complex as compared to pneumatically driven or temporary immersion systems, and thus more prone to defects. However, the mist bioreactors have been improved over the years by using more reliable ultrasonic transducers [104]. Contrary to TIBs, the gas phase systems employed in the studies are usually custom made. The low-cost GPBs, such as the 50 l LCMB (Low-Cost Mist Bioreactor) by Rootec, Germany [6, 25, 31], have been designed, but they have not been used for shoot cultivation. As in the case of other types of bioreactors, the scale-up of gas phase systems is problematic because of poor illumination of the biomass. This phenomenon was already noticeable in relatively small (14 l) fermenters used to grow transformed shoots of *Mentha* sp.: the limited access to light resulted in altered composition of the essential oil, as compared to small-scale studies [59]. Another problem associated with GPBs is an inefficient use of the reactor volume: in most instances, the growing biomass was distributed on a single shelf [35, 46, 60, 84, 131, 132]. The multitier systems can be used but their inoculation is time consuming [52, 54]. The hybrid bubble column-gas phase bioreactors enable more effective use of reactor's space. First, the system is run in the BCB mode and the inoculum is evenly dispersed onto multiple anchor points during the BCB-phase. The medium is drained afterwards and the bioreactor is switched into the GPB mode. The pilot-scale (500 l) system of this type was originally devised by Wilson for the cultivation of *Datura stramonium* hairy roots [6, 25, 28] and more recently applied in smaller scale for transformed root cultures of *Hyoscyamus niger* [133]. Given that the shoot inoculum often tends to float on the medium surface, the above-described system would likely not work for shoot cultures. In order to reduce production cost and save floor space, Fei and Weathers [134, 135] came up with the design of vertically oriented, low-cost GPB. The inoculum (*Daucus carota* cells or *Artemisia annua* leaf fragments) was immobilized on polylysine-coated polypropylene strips hanging inside the bioreactor. The forming plantlets were then grown using the misting system [134, 135].

On rare occasions, the non-misting systems with hydraulic medium circulation (hydraulic bioreactor, HB) were applied. The example is the “multiplate radius-flow” bioreactor employed for the cultivation of *Artemisia annua* shoots [54].

5 Comparative Studies on Bioreactor Performance

The studies on secondary metabolite production in shoots often employed different types of bioreactors, in order to select the system providing the highest yields of the desired compounds. The examples include experiments on shoot cultures of *Artemisia annua* [54] *Scutellaria baicalensis* [40], *Hypericum perforatum* [50], *Rosa rugosa* [37], *Leucosium aestivum* [69], *Schisandra chinensis* [44, 46] and *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) [60]. In the above mentioned studies, in vitro shoot cultures were maintained using different reactor configurations and examined

for biomass growth and secondary metabolite content. The results of comparative research are summarized in Table 6.

Pneumatically agitated bioreactors and temporary immersion systems have been the most commonly used, followed by gas-phase bioreactors. In most cases, the available data enabled to calculate the volumetric productivity of the system (Table 6). The conducted experiments provided mixed results, and none of the bioreactor types can be considered as unequivocally superior in terms of secondary metabolite accumulation. Moreover, general conclusions cannot be drawn since the comparative studies on shoot cultures of a specific plant species are all single reports which have not been reproduced by other research groups. Another problem with data interpretation is caused by the fact that the tested systems were not necessarily

Table 6 Comparative studies on secondary metabolite production in shoot cultures grown indifferent types of bioreactors

Plant name	Compound	Parameter	Relative performance of the tested systems ^a	Reference
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	Productivity (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	GPB (1.89) > HB (1.38) > ALB (0.58)	[54]
<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin	Productivity (µg l ⁻¹ d ⁻¹)	BB (4.51) > TIB (2.33–3.57)	[50]
<i>Hypericum perforatum</i>	Hyperforin	Productivity (µg l ⁻¹ d ⁻¹)	BB (543.9) > TIB (151.8–256.1)	[50]
<i>Leucojum aestivum</i>	Galanthamine	Productivity (µg l ⁻¹ d ⁻¹)	BB (40.81) > CIB-SAB (6.86–18.86) > TIB (1.44)	[69]
<i>Ocimum basilicum</i>	Rosmarinic acid	Productivity (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	SAB (0.88–1.07) > TIB (0.82–1.05)	[43]
<i>Rhododendron tomentosum</i>	Essential oil	Productivity (µl l ⁻¹ d ⁻¹)	GPB (3.67) > TIB (1.16–3.57)	[60]
<i>Rosa rugosa</i>	Total phenolics	Productivity (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	BB (9.93–17.00) > TIB (0.96–3.14)	[37]
<i>Rosa rugosa</i>	Total flavonoids	Productivity (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	BB (3.34–5.75) > TIB (0.39–1.04)	[37]
<i>Schisandra chinensis</i>	Total lignans	Productivity (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	TIB (0.94–1.20) > GPB (1.03–1.06) > SAB (0.44–0.91) > BB (0.53–0.60)	[46]
<i>Schisandra chinensis</i>	Total phenolic acids	Productivity (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	BB (0.10–0.11) > GPB (0.08–0.10) > TIB (0.07–0.08) > SAB (0.05–0.08)	[44]
<i>Schisandra chinensis</i>	Total flavonoids	Productivity (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	GPB (0.05–0.08) > SAB (0.03–0.06) > BB (0.05) > TIB (0.04–0.05)	[44]
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Total flavones	Content (µg g ⁻¹)	TIB (4.96) > SAB (2.05) > CIB (2.00) > BB (1.85)	[40]

^aReported/calculated values in parentheses, bioreactor nomenclature according to list of abbreviations

run using the optimal settings. Parameters such as aeration rate in pneumatically mixed bioreactors and immersion or spraying frequency in temporary immersion and gas phase installations are crucial for system's performance [3, 28, 102–105]. However, in comparative studies these parameters are usually not optimized for individual bioreactor types. Given the above, in order to maximize and scale-up secondary metabolite production in shoot cultures of a specific plant, the suitable bioreactor still has to be selected empirically.

6 Conclusions

The collected data indicate that bioreactor-grown shoots can be employed as a source of variety of secondary metabolites including alkaloids, phenolics, and volatiles. Studies demonstrated that *in vitro* shoot cultures can be successfully maintained in different types of bioreactors; however, scaling-up of these systems presents substantial challenge. Light requirements and poor growth of shoots in fully submerged, dense cultures limit practical size of a single unit to 10–20 l and impose horizontal distribution of the biomass. Given this, production scale-up can be more effectively achieved by employing multiple small-size vessels. This approach also requires single units to be cheap, stackable, and easy to operate which favors temporary immersion systems. Besides pneumatically agitated and gas phase bioreactors, TIBs have been often employed in secondary metabolite studies. Several systems of this type are available commercially and research on developing low-cost, disposable TIBs is ongoing.

As far as secondary metabolite yields are concerned, bioreactor-grown shoot cultures accumulate relatively low amounts of compounds. So far, *in vitro* shoots are not commercially viable as a source of chemicals. However, they offer a stable platform for the production of certain constituents which can be exploited in the case of shortage of natural resources.

Acknowledgments The study was supported by the project POWR.03.02.00-00-I014/17-00 co-financed by the European Union through the European Social Fund under the Operational Programme Knowledge Education Development 2014–2020

References

1. Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1:13–25. <https://doi.org/10.1023/A:1015871916833>
2. Ramachandra Rao S, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20:101–153. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)
3. Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81:287–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6648-z>
4. Gerth A, Schmidt D, Wilken D (2007) The production of plant secondary metabolites using bioreactors. *Acta Hort* 764:95–103. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.764.11>

5. Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111:187–228. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-70536-9>
6. Eibl R, Eibl D (2008) Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochem Rev* 7:593–598. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9083-z>
7. Georgiev MI, Weber J, Macluk A (2009) Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:809–823. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2049-x>
8. Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 118:1–16. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>
9. Wu J, Zhong JJ (1999) Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects. *J Biotechnol* 68:89–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00195-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00195-3)
10. Tabata H (2004) Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 87:1–23. <https://doi.org/10.1007/b13538>
11. Zhao J, Verpoorte R (2007) Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. *Phytochem Rev* 6:435–457. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9050-0>
12. Georgiev MI, Eibl R, Zhong J-J (2013) Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3787–3800. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4817-x>
13. Malik S, Cusidó RM, Mirjalili MH et al (2011) Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochem* 46:23–34. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.004>
14. Malik S, Bhushan S, Sharma M, Ahuja PS (2016) Biotechnological approaches to the production of shikonins: a critical review with recent updates. *Crit Rev Biotechnol* 36:327–340. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.961003>
15. Doran PM (1993) Design of reactors for plant cells and organs. In: *Bioprocess design and control*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp 115–168
16. Eibl R, Eibl D (2009) Plant cell-based bioprocessing. In: *Cell and tissue reaction engineering: with a contribution by Martin Fussenegger and Wilfried Weber*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp 315–356
17. Zhong JJ (2002) Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *J Biosci Bioeng* 94:591–599. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80200-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80200-6)
18. Frense D (2007) Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1233–1240. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0711-0>
19. Barbacka K, Baer-Dubowska W (2011) Searching for artemisinin production improvement in plants and microorganisms. *Curr Pharm Biotechnol* 12:1743–1751. <https://doi.org/10.2174/138920111798376923>
20. Murthy HN, Kim YS, Park SY, Paek KY (2014) Hypericins: biotechnological production from cell and organ cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9187–9198. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6119-3>
21. Scragg AH (2007) The production of flavours by plant cell cultures. *Flavours Fragrances Chem Bioprocess Sustain* 55:599–614. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_25
22. Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2008) Adventitious roots and secondary metabolism. *Chin J Biotechnol* 24:711–716. [https://doi.org/10.1016/S1872-2075\(08\)60035-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2075(08)60035-7)
23. Baque MA, Moh SH, Lee EJ et al (2012) Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnol Adv* 30:1255–1267. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.004>
24. Murthy HN, Dandin VS, Paek KY (2016) Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. *Phytochem Rev* 15:129–145. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9391-z>

25. Mishra BN, Ranjan R (2008) Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. *Biotechnol Appl Biochem* 49:1–10. <https://doi.org/10.1042/ba20070103>
26. Georgiev MI, Pavlov AI, Bley T (2007) Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1175–1185. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5>
27. Pistelli L, Giovannini A, Ruffoni B et al (2010) Hairy root cultures for secondary metabolites production. *Adv Exp Med Biol* 698:167–184. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_13
28. Steingroewer J, Bley T, Georgiev V et al (2013) Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems. *Eng Life Sci* 13:26–38. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100226>
29. Park SY, Paek KY (2014) Bioreactor culture of shoots and somatic embryos of medicinal plants for production of bioactive compounds. In: *Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 337–368
30. Dörnenburg H, Knorr D (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzym Microb Technol* 17:674–684. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00108-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00108-4)
31. Wink M, Alfermann AW, Franke R et al (2005) Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. *Plant Genet Resour* 3:90–100. <https://doi.org/10.1079/PGR200575>
32. Weathers PJ, Towler MJ, Xu J (2010) Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1339–1351. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2354-4>
33. Matkowski A (2008) Plant in vitro culture for the production of antioxidants – a review. *Biotechnol Adv* 26:548–560. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>
34. Jain N, Sharma V, Ramawat KG (2012) Shoot culture of *Bacopa monnieri*: standardization of explant, vessels and bioreactor for growth and antioxidant capacity. *Physiol Mol Biol Plants* 18:185–190. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0103-0>
35. Piąteczak E, Grzegorzczak-Karolak I, Wysokińska H (2014) Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch.: production of phenolics and flavonoids and evaluation of antioxidant activity. *Acta Physiol Plant* 36:1693–1702. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1544-6>
36. Valdez-Tapia R, Capataz-Tafur J, López-Laredo AR et al (2014) Effect of immersion cycles on growth, phenolics content, and antioxidant properties of *Castilleja tenuiflora* shoots. *Vitr Cell Dev Biol – Plant* 50:471–477. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9621-5>
37. Jang HR, Lee HJ, Shohael AM et al (2016) Production of biomass and bioactive compounds from shoot cultures of *Rosa rugosa* using a bioreactor culture system. *Hortic Environ Biotechnol* 57:79–87. <https://doi.org/10.1007/s13580-016-0111-z>
38. Łuczkiwicz M, Kokotkiewicz A (2005) Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. *Plant Sci* 169:862–871. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.06.005>
39. Sharma V, Goyal S, Ramawat KG (2011) Increased puerarin biosynthesis during in vitro shoot formation in *Pueraria tuberosa* grown in growtek bioreactor with aeration. *Physiol Mol Biol Plants* 17:87–92. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0049-7>
40. Zobayed SMA, Murch SJ, Rupasinghe HPV et al (2004) Optimized system for biomass production, chemical characterization and evaluation of chemo-preventive properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Plant Sci* 167:439–446. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.022>
41. Kokotkiewicz A, Bucinski A, Łuczkiwicz M (2015) Xanthone, benzophenone and bioflavonoid accumulation in *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. (honeybush) shoot cultures grown on membrane rafts and in a temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 120:373–378. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0586-1>
42. Jones AMP, Saxena PK, Murch SJ (2009) Elicitation of secondary metabolism in *Echinacea purpurea* L. by gibberellic acid and triazoles. *Eng Life Sci* 9:205–210. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800104>

43. Kiferle C, Lucchesini M, Maggini R et al (2014) In vitro culture of sweet basil: gas exchanges, growth, and rosmarinic acid production. *Biol Plant* 58:601–610. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0434-5>
44. Szopa A, Kokotkiewicz A, Bednarz M et al (2019) Bioreactor type affects the accumulation of phenolic acids and flavonoids in microshoot cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 139:199–206. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01676-6>
45. Szopa A, Kokotkiewicz A, Król A et al (2018) Improved production of dibenzocyclooctadiene lignans in the elicited microshoot cultures of *Schisandra chinensis* (Chinese magnolia vine). *Appl Microbiol Biotechnol* 102:945–959. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8640-7>
46. Szopa A, Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Ekiert H (2017) *Schisandra* lignans production regulated by different bioreactor type. *J Biotechnol* 247:11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.007>
47. Arroo RRJ, Alfermann AW, Medarde M et al (2002) Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. *Phytochem Rev* 1:27–35. <https://doi.org/10.1023/A:1015824000904>
48. Szopa A, Klimek-Szczykutowicz M, Kokotkiewicz A et al (2018) Phytochemical and biotechnological studies on *Schisandra chinensis* cultivar Sadova No. 1 – a high utility medicinal plant. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:5105–5120. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8981-x>
49. Zobayed SMA, Murch SJ, Rupasinghe HPV, Saxena PK (2003) Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 75:143–149. <https://doi.org/10.1023/A:1025053427371>
50. Zobayed SMA, Murch SJ, Rupasinghe HPV, Saxena PK (2004) In vitro production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). *Plant Sci* 166:333–340. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.005>
51. Karppinen K, György Z, Kauppinen M et al (2006) In vitro propagation of hypericum perforatum L. and accumulation of hypericins, pseudohypericins and phlotoglucinols. *Propag Ornament Plants* 6:170–179
52. Liu CZ, Wang YC, Guo C et al (1998) Production of artemisinin by shoot cultures of *Artemisia annua* L. in a modified inner-loop mist bioreactor. *Plant Sci* 135:211–217. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00086-7)
53. Liu CZ, Wang YC, Kang XZ et al (1999) Artemisinin production by adventitious shoots of *Artemisia annua* in a novel mist bioreactor. *Acta Bot Sin* 41:524–527
54. Liu CZ, Guo C, Wang YC, Ouyang F (2003) Comparison of various bioreactors on growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. shoot cultures. *Process Biochem* 39:45–49. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00294-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00294-7)
55. Liu C, Zhao Y, Wang Y (2006) Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:11–20. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0452-0>
56. Grech-Baran M, Pietrosiuk A (2012) *Artemisia* species in vitro cultures for production of biologically active secondary metabolites. *Biotechnologia* 4:371–380. <https://doi.org/10.5114/bta.2012.46591>
57. Scragg AH (1997) The production of aromas by plant cell cultures. In: Berger RG et al. (eds) *Biotechnology of Aroma Compounds*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 55. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 239–263. <https://doi.org/10.1007/BFb0102068>
58. Gounaris Y (2010) Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. *Flavour Fragr J* 25:367–386. <https://doi.org/10.1002/ffj.1996>
59. Hilton MG, Jay A, Rhodes MJC, Wilson PDG (1995) Growth and monoterpene production by transformed shoot cultures of *Mentha citrata* and *Mentha piperita* in flasks and fermenters. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:452–459. <https://doi.org/10.1007/BF00218448>
60. Jesionek A, Kokotkiewicz A, Wlodarska P et al (2017) Bioreactor shoot cultures of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) for a large-scale production of bioactive volatile compounds. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 131:51–64. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1261-0>

61. Jesionek A, Kokotkiewicz A, Krolicka A et al (2018) Elicitation strategies for the improvement of essential oil content in *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) bioreactor-grown microshoots. *Ind Crop Prod* 123:461–469. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.013>
62. Moreno PRH, van der Heijden R, Verpoorte R (1995) Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: a literature survey. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 42:1–25. <https://doi.org/10.1007/BF00037677>
63. Pietrosiuk A, Furmanowa M, Łata B (2007) *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochem Rev* 6:459–473. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9049-6>
64. Van Der Heijden R, Verpoorte R, Ten Hoopen HJG (1989) Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 18:231–280. <https://doi.org/10.1007/BF00043397>
65. Yingjin Y, Zongding H (1994) Bioreactor for two-stage multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. *Chinese J Chem Eng* 2:92–97
66. Sankar-Thomas YD, Lieberei R (2011) Camptothecin accumulation in various organ cultures of *Camptotheca acuminata* Decne grown in different culture systems. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106:445–454. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9942-6>
67. Berkov S, Ivanov I, Georgiev V et al (2014) Galanthamine biosynthesis in plant in vitro systems. *Eng Life Sci* 14:643–650. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300159>
68. Ivanov I, Georgiev V, Georgiev M et al (2011) Galanthamine and related alkaloids production by *Leucojum aestivum* L. shoot culture using a temporary immersion technology. *Appl Biochem Biotechnol* 163:268–277. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9036-7>
69. Schumann A, Berkov S, Claus D et al (2012) Production of galanthamine by *Leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems. *Appl Biochem Biotechnol* 167:1907–1920. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9743-3>
70. Georgiev V, Ivanov I, Berkov S et al (2012) Galanthamine production by *Leucojum aestivum* l. shoot culture in a modified bubble column bioreactor with internal sections. *Eng Life Sci* 12:534–543. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100177>
71. Ivanov I, Georgiev V, Berkov S, Pavlov A (2012) Alkaloid patterns in *Leucojum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *J Plant Physiol* 169:206–211. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.09.010>
72. Raj D, Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M (2014) Production of therapeutically relevant indolizidine alkaloids in *Securinega suffruticosa* in vitro shoots maintained in liquid culture systems. *Appl Biochem Biotechnol* 175:1576–1587. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1386-0>
73. Subroto MA, Hamill JD, Doran PM (1996) Development of shooty teratomas from several solanaceous plants: growth kinetics, stoichiometry and alkaloid production. *J Biotechnol* 45:45–57. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00142-5](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00142-5)
74. Mahagamasekera MGP, Doran PM (1998) Intergeneric co-culture of genetically transformed organs for the production of scopolamine. *Phytochemistry* 47:17–25. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00551-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00551-7)
75. Subroto MA, Kwok KH, Hamill JD, Doran PM (1996) Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites. *Biotechnol Bioeng* 49:481–494. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960305\)49:5<481::AID-BIT1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960305)49:5<481::AID-BIT1>3.0.CO;2-F)
76. Verma SK, Das AK, Cingoz GS, Gurel E (2016) In vitro culture of *Digitalis* L. (Foxglove) and the production of cardenolides: an up-to-date review. *Ind Crop Prod* 94:20–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.031>
77. Kreis W (2017) The foxgloves (*Digitalis*) revisited. *Planta Med* 83:962–976. <https://doi.org/10.1055/s-0043-111240>
78. Weisse AB (2010) A fond farewell to the foxglove? The decline in the use of *Digitalis*. *J Card Fail* 16:45–48. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.08.001>

79. Pérez-Alonso N, Wilken D, Gerth A et al (2009) Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 99:151–156. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9587-x>
80. Pérez-Alonso N, Capote A, Gerth A, Jiménez E (2012) Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 110:153–162. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0139-4>
81. Luczkiewicz M, Kokotkiewicz A (2012) Elicitation and permeabilisation affect the accumulation and storage profile of phytoestrogens in high productive suspension cultures of *Genista tinctoria*. *Acta Physiol Plant* 34:1–16. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0799-4>
82. Sharaf-Eldin M, Elkholy S (2009) Artemisinin production from different shoot culture systems of *Artemisia annua* L. *Aust J Basic Appl Sci* 3:2212–2216
83. Lorence A, Nessler CL (2004) Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry* 65:2735–2749. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.09.001>
84. Piatczak E, Chmiel A, Wysokinska H (2005) Mist trickling bioreactor for *Centaurium erythraea* Rafn growth of shoots and production of secoiridoids. *Biotechnol Lett* 27:721–724. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-5189-9>
85. Aberham A, Pieri V, Croom EM et al (2011) Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 54:517–525. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.030>
86. Joubert E, Otto F, Grüner S, Weinreich B (2003) Reversed-phase HPLC determination of mangiferin, isomangiferin and hesperidin in Cyclopia and the effect of harvesting date on the phenolic composition of *C. genistoides*. *Eur Food Res Technol* 216:270–273. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0644-5>
87. Brugidou C, Jacques M, Cosson L, Ogerau T (1988) Growth and digoxin content in *Digitalis lanata* in controlled conditions and natural environment. *Planta Med* 54:262–265
88. Pellati F, Bruni R, Bellardi MG et al (2009) Optimization and validation of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of cardiac glycosides in *Digitalis lanata*. *J Chromatogr A* 1216:3260–3269. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.042>
89. Fujii Y, Fujii H, Yamazaki M (1983) Separation and determination of cardiac glycosides in *digitalis purpurea* leaves by micro high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 258:147–153. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96406-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96406-9)
90. Fujii Y, Ikeda Y, Yamazaki M (1989) High-performance liquid chromatographic determination of secondary cardiac glycosides in *digitalis purpurea* leaves. *J Chromatogr A* 479:319–325. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83346-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83346-X)
91. Łuczkiwicz M, Glód D, Baczek T, Buciński A (2004) LC-DAD UV and LC-MS for the analysis of isoflavones and flavones from in vitro and in vivo biomass of *Genista tinctoria* L. *Chromatographia* 60:179–185. <https://doi.org/10.1365/s10337-004-0357-y>
92. Kanthaliya B, Joshi A, Arora J (2019) Evaluation of isoflavonoid content in context to tuber size and seed biology study of *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex. Willd.) DC: a vulnerable medicinal plant. *Vegetos* 32:247–253. <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00042-3>
93. Lee HJ, Kim CY (2010) Simultaneous determination of nine lignans using pressurized liquid extraction and HPLC-DAD in the fruits of *Schisandra chinensis*. *Food Chem* 120:1224–1228. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.068>
94. Sun D, Li Q, Li H et al (2014) Quantitative analysis of six lignans in fruits with different colours of *Schisandra chinensis* by HPLC. *Nat Prod Res* 28:581–585. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.881365>
95. Tani T, Katsuki T, Kubo M, Arichi S (1985) Histochemistry. VII. Flavones in *Scutellariae radix*. *Chem Pharm Bull* 33:4894–4900. <https://doi.org/10.1248/cpb.33.4894>
96. Zgórká G, Hajnos A (2003) The application of solid-phase extraction and reversed phase high-performance liquid chromatography for simultaneous isolation and determination of plant flavonoids and phenolic acids. *Chromatographia* 57:77–80. <https://doi.org/10.1007/BF02492087>

97. Raj D, Łuczkiwicz M (2008) *Securinega suffruticosa*. Fitoterapia 79:419–427. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.02.011>
98. Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A (2003) Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. Plant Sci 165:845–850. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00283-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00283-8)
99. Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A (2002) Features of development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of Steviol glycosides. Planta Med 68:759–762. <https://doi.org/10.1055/s-2002-33809>
100. Goyal SK, Samsher, Goyal RK (2010) Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. Int J Food Sci Nutr 61:1–10. <https://doi.org/10.3109/09637480903193049>
101. Takayama S, Akita M (1994) The types of bioreactors used for shoots and embryos. Plant Cell Tissue Organ Cult 39:147–156. <https://doi.org/10.1007/BF00033922>
102. Paek K-Y, Hahn EJ, Son S-H (2001) Application of bioreactors for large-scale micro-propagation systems of plants. In Vitro Cell Dev Biol – Plant 37:149–157. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0027-9>
103. Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Cult 69:215–231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
104. Towler MJ, Kim Y, Wyslouzil BE et al (2007) Design, development, and applications of mist bioreactors for micropropagation and hairy root culture. Plan Tissue Cult Eng 119–134. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_7
105. Georgiev V, Ivanov I, Berkov S, Pavlov A (2014) Temporary immersion systems for Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis by *Pancreatium maritimum* L. shoot culture. J Plant Biochem Biotechnol 23:389–398. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0222-x>
106. Valdiani A, Hansen OK, Nielsen UB et al (2019) Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects. Crit Rev Biotechnol 39:20–34. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1489778>
107. Kawamura M, Shigeoka T, Akita M, Kabayashi Y (1996) Newly developed apparatus for inoculating plant organs into large-scale fermentor. J Ferment Bioeng 82:618–619. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)81266-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)81266-4)
108. Steward FC, Caplin SM, Millar FK (1952) Investigations on growth and metabolism of plant cells. Ann Bot 16:57–79. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083303>
109. Adelberg J, Fári M (2010) Applied physiology and practical bioreactors for plant propagation. Propag Ornament Plants 10:205–219
110. Hagimori M, Mikami Y, Matsumoto T (1984) Jar fermenter culture of shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. using a revised medium. Agric Biol Chem 48:965–970. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.48.965>
111. Hvoslef-Eide AK, Preil W (2005) Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation. Springer Netherlands, Dordrecht
112. Sager JC, McFarlane JC (1997) Radiation. In: Langhans RW, Tibbitts TW (eds) Growth chamber handbook. Agriculture and Home Economics Experiment Station, Iowa State University, Ames, pp 1–30
113. Akita M, Shigeoka T, Koizumi Y, Michio K (1994) Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. Plant Cell Rep 13:180–183. <https://doi.org/10.1007/BF00239888>
114. Ducos JP, Terrier B, Courtois D (2009) Disposable Bioreactors for Plant Micropropagation and Mass Plant Cell Culture. In: Eibl R, Eibl D (eds) Disposable Bioreactors: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 115. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 89–115. https://doi.org/10.1007/10_2008_28
115. Jeong JH, Jung SJ, Murthy HN et al (2005) Production of eleutherosides in in vitro regenerated embryos and plantlets of *Eleutherococcus chiisanensis*. Biotechnol Lett 27:701–704. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4693-2>

116. Fulzele DP, Heble M, Rao P (1995) Production of terpenoid from *Artemisia annua* L. plantlet cultures in bioreactor. J Biotechnol 40:139–143. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00034-N](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00034-N)
117. Karpainen K, Hohtola A, Tolonen A et al (2006) Comparison of growth and secondary metabolite accumulation in cultures of compact callus aggregates and shoots of *Hypericum perforatum* L. in shake flasks and in a bubble column bioreactor. Acta Hort 725:605–612. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.84>
118. Wu RZ, Baque MA, Paek KY (2010) Establishment of a large-scale micropropagation system for *Anoectochilus formosanus* in bioreactors. Acta Hort 878:167–174. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.878.18>
119. Shohaël AM, Chakrabarty D, Yu KW et al (2005) Application of bioreactor system for large-scale production of *Eleutherococcus sessiliflorus* somatic embryos in an air-lift bioreactor and production of eleutherosides. J Biotechnol 120:228–236. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.010>
120. Ducos JP, Terrier B, Courtois D, Pétiard V (2008) Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. Phytochem Rev 7:607–613. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9089-1>
121. Watt MP (2012) The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. Afr J Biotechnol 11:14025–14035. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1693>
122. Welander M, Persson J, Asp H, Zhu LH (2014) Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. Sci Hort (Amsterdam) 179:227–232. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.035>
123. Diwan R, Malpathak N (2008) Novel technique for scaling up of micropropagated *Ruta graveolens* shoots using liquid culture systems: a step towards commercialization. New Biotechnol 25:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.02.002>
124. Cortes-Morales JA, López-Laredo AR, Zamilpa A et al (2018) Morphogenesis and secondary metabolites production in the medicinal plant *Castilleja tenuiflora* benth. under nitrogen deficiency and starvation stress in a temporary immersion system. Rev Mex Ing Quim 17:229–242. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Cortes>
125. López CQ, Corral P, Lorrain-Lorrette B et al (2018) Use of a temporary immersion bioreactor system for the sustainable production of thapsigargin in shoot cultures of *Thapsia garganica*. Plant Methods 14:1–17. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0346-z>
126. Radović M, Šiler B, Nestorović Živković J et al (2013) Bioreactor cultivation of *Zeltnera beyrichii* (Torr. & A. Gray) Mans.: a novel source of biologically active compounds. Rec Nat Prod 7:266–280
127. Pramita AD, Kristanti AN, Sugiharto KAN et al (2018) Production of biomass and flavonoid of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system. J Genet Eng Biotechnol 16:639–643. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.007>
128. Sequeira Á, Tapia E, Ortega M et al (2012) Production of phenolic metabolites by *Deschampsia antarctica* shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor. Electron J Biotechnol 15. <https://doi.org/10.2225/vol15-issue4-fulltext-7>
129. Tapia A, Cheel J, Theoduloz C et al (2007) Free radical scavengers from *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf plants cultivated in bioreactors by the temporary immersion (TIS) principle. Z Naturforsch – Sect C J Biosci 62:447–457. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-5-620>
130. Liu CZ, Wang YC, Zhao B et al (1999) Development of a nutrient mist bioreactor for growth of hairy roots. Vitro Cell Dev Biol – Plant 35:271–274. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0091-0>
131. Grzegorzczak I, Wysokińska H (2010) Antioxidant compounds in *Salvia officinalis* L. shoot and hairy root cultures in the nutrient sprinkle bioreactor. Acta Soc Bot Pol 79:7–10. <https://doi.org/10.5586/asbp.2010.001>
132. Grzegorzczak-Karolak I, Rytczak P, Bielecki S, Wysokińska H (2017) The influence of liquid systems for shoot multiplication, secondary metabolite production and plant regeneration of

- Scutellaria alpina*. Plant Cell Tissue Organ Cult 128:479–486. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1126-y>
133. Jaremicz Z, Luczkiewicz M, Kokotkiewicz A et al (2014) Production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors. Biotechnol Lett 36:843–853. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1426-9>
134. Fei L, Weathers PJ (2014) From cells to embryos to rooted plantlets in a mist bioreactor. Plant Cell Tissue Organ Cult 116:37–46. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0380-5>
135. Fei L, Weathers P (2016) From leaf explants to hanging rooted plantlets in a mist reactor. Plant Cell Tissue Organ Cult 124:265–274. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0890-4>

Kraków, dnia 03.04.2024.

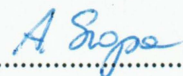
prof. dr hab. Agnieszka Szopa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production”, opublikowanym w książce: *Ramawat K., Ekiert H., Goyal S. (red.) "Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites"* (DOI: 10.1007/978-3-030-11253-0_34-1), oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: określenie koncepcji pracy oraz korekta pracy przed złożeniem do druku. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr farm. Agatę Król jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr farm. Agaty Król przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....
(podpis współautora)

Kraków, dnia 03.04.2024

prof. dr hab. Halina Ekiert

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production”, opublikowanym w książce: *Ramawat K., Ekiert H., Goyal S. (red.) "Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites"* (DOI: 10.1007/978-3-030-11253-0_34-1), oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: określenie koncepcji pracy oraz korekta pracy przed złożeniem do druku. Mój udział procentowy szacuję na 2%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr farm. Agatę Król jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr farm. Agaty Król przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Katedra i Zakład
Botaniki Farmaceutycznej UJ CM

H Ekiert
prof. dr hab. Halina Ekiert

.....
(podpis współautora)

Gdańsk, dnia 03.04.2024.

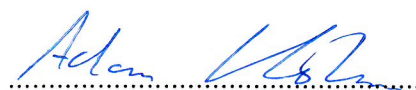
dr n. farm. Adam Kokotkiewicz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production”, opublikowanym w książce: *Ramawat K., Ekiert H., Goyal S. (red.) "Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites"* (DOI: 10.1007/978-3-030-11253-0_34-1), oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: określenie koncepcji pracy, nadzór merytoryczny oraz korektę pracy przed złożeniem do druku oraz podczas procesu ewaluacji publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr farm. Agatę Król jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr farm. Agaty Król przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



(podpis współautora)

Gdańsk, dnia 03.04.2024.

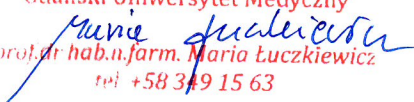
prof. dr hab. n. farm. Maria Łuczkiwicz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Bioreactor-Grown Shoot Cultures for the Secondary Metabolite Production”, opublikowanym w książce: *Ramawat K., Ekiert H., Goyal S. (red.) "Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites"* (DOI: 10.1007/978-3-030-11253-0_34-1), oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: określenie koncepcji pracy, nadzór merytoryczny oraz korektę pracy przed złożeniem do druku oraz podczas procesu ewaluacji publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr farm. Agatę Król jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr farm. Agaty Król przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Katedra i Zakład Farmakognozji
z Ogrodem Roślin Leczniczych
Gdański Uniwersytet Medyczny

prof. dr hab. n. farm. Maria Łuczkiwicz
tel. +58 349 15 63

.....
(podpis współautora)

Gdańsk, dnia 03.04.2024

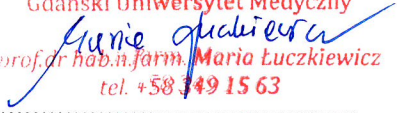
prof. dr hab. n. farm. Maria Łuczkiwicz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „White Sage (*Salvia apiana*) - a Ritual and Medicinal Plant of the Chaparral: Plant Characteristics in Comparison with Other *Salvia* Species”, opublikowanym w czasopiśmie *Planta Medica* (DOI: 10.1055/a-1453-0964), oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: określenie koncepcji pracy, nadzór merytoryczny oraz korektę pracy przed złożeniem do druku oraz podczas procesu ewaluacji publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr farm. Agatę Król jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr farm. Agaty Król przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Katedra i Zakład Farmakognozji
z Ogrodem Roślin Leczniczych
Gdański Uniwersytet Medyczny

prof. dr hab. n. farm. Maria Łuczkiwicz
tel. +58 349 15 63

.....
(podpis współautora)

Gdańsk, dnia 03.04.2024

dr n. farm. Adam Kokotkiewicz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „White Sage (*Salvia apiana*) - a Ritual and Medicinal Plant of the Chaparral: Plant Characteristics in Comparison with Other *Salvia* Species”, opublikowanym w czasopiśmie *Planta Medica* (DOI: 10.1055/a-1453-0964), oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: określenie koncepcji pracy, nadzór merytoryczny oraz korektę pracy przed złożeniem do druku oraz podczas procesu ewaluacji publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr farm. Agatę Król jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr farm. Agaty Król przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



(podpis współautora)