

ZNAČILNOSTI RAZMNOŽEVANJA ZDRAVILNIH IN AROMATIČNIH RASTLIN

Dea BARIČEVIČ¹, Alenka ZUPANČIČ² i T. BARTOL¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija
Faculty of Biotechnology University of Ljubljana, Slovenia

² M-KŽK Kmetijstvo Kranj, Slovenia

IZVLEČEK

Najpomembnejši kriteriji za izbiro načina razmnoževanja predstavljajo pri zdravilnih in aromatičnih rastlinah stopnja razmnoževanja, pridelek biomase in pridelek aktivnih (uporabnih) sestavin, ki določajo kemijsko kakovost rastlinskih drog. Predstavljeni so bistveni parametri kakovostnega semena (vigor, vitalnost) in nekatere izkušnje na področju generativnega in/ali vegetativnega razmnoževanja zdravilnih in aromatičnih rastlin. Neselekcioniirani/nežlahtnjeni semenski material v večini primerov daje neizenačene potomke v pogledu pridelane biomase, izenačenosti razvoja in kakovosti surovin. Zato je v fazi uvajanja pridelovanja pri nekaterih vrstah priporočljivo vegetativno razmnoževanje, še posebej v primeru počasne ali nizke kalivosti semen.

UVOD

Poleg višine pridelka, ki je neposredno povezan z ekonomičnostjo pridelovanja je za uspešen plasma zdravilnih in aromatičnih rastlin na ciljne trge pomembna tudi njihova kemijska kakovost, ki jo izkazuje rastlinski material po sušenju in dodelavi. Kemijsko kakovost rastlinskih drog določa njihova predvidena uporaba. Tako je poleg splošnih zahtev/priporočil o kakovosti rastlinske droge (ustrezna provenienca, taksonomska opredelitev, vsebnost vode, suha snov, tuje primesi,...) pomembna tudi vsebnost učinkovin (v farmacevtski industriji) oz. vsebnost drugih, za uporabo pomembnih sekundarnih metabolitov (npr. antioksidantov in drugih aditivov v živilsko predelovalni industriji, eteričnih olj ali njihovih sestavin pri začimbah ali v kozmetični industriji...).

Način razmnoževanja in ustrezen izbor kakovostnega semenskega/sadilnega materiala štejejo poleg ekoloških razmer pridelovanja (rodovitnost in vlažnost tal, temperatura, fotoperioda...) med najpomembnejše dejavnike, ki

* Rad je izložen na Mednarodnem znanstvenom Simpoziju "Kvalitetnim sjemenom i kultivarom u Evropu IV" održanom od 15. do 20. veljače 1998. u Opatiji.

vplivajo na začetni razvoj rastline, na biološke/genetske in patološke značilnosti ter s tem na višino pridelka in kakovost pridelane zdravilne ali aromatične rastline. V nadaljevanju so podane nekatere izkušnje na področju generativnega ali vegetativnega razmnoževanja in predstavljene prednosti/pomanjkljivosti ter možnosti, ki jih ponujajo sodobni načini razmnoževanja v selekciji in žlahtnenju zdravilnih in aromatičnih rastlin v prihodnosti.

GENERATIVNO RAZMNOŽEVANJE

Že tisočletja je pri razmnoževanju kmetijskih rastlin poznan pojem vitalnosti semena, ki je pri prazgodovinskih kmečkih civilizacijah pomenil najpomembnejši znak kakovosti semena (1). Vitalnost (kvantitativno izražena v % vzklilih semen) je lastnost semena, ki omogoča njegovo kalitev v razmerah, ki so za kalitev ugodna, pri čemer je eventualna dormanca semena odstranjena pred preizkušanjem kalivosti po standardnih metodah (ISTA 1976, AOSA 1983). Zagotovitev visoke kalivosti in vigorja semena (ki je prvenstveno odvisen od zdravstvenega stanja rastline med reproduktivno rastjo, predvsem med razvojem semena) sta osnova enotne zasnove sadilnih mest, ki omogočajo doseganje optimalnih pridelkov v danih ekoloških razmerah med rastjo (2). Tekom zgodnjega razvoja semen (po opraitvi) se semenske celice začno deliti in diferencirati. V tem razvojnem obdobju se namreč postopoma oblikujejo/akumulirajo biokemijski elementi/strukture, ki so bistvene za močno celično aktivnost na lokalnem nivoju in za končno kalivost semena na makro nivoju (mitohondriji, Golgijev aparat, DNA, RNA in razni metabolični proteini...). Zunanji vplivi (sušni stres, stres zaradi patogenov...), ki inhibirajo rast rastlin v fazi zasnove semen lahko v končni fazi močno reducirajo vigor semena. Za proizvodnjo kakovostnega semena je pravitako pomemben optimalni čas žetve, ki je določen s fiziološko zrelostjo. Madžarski raziskovalci (3) poročajo o svojih izkušnjah v zvezi s kaljivostjo semen/plodov, požetih v različnih stopnjah zrelosti (nezrelo, pol-zrelo, zrelo) v okviru razvoja tehnologij genske banke za zdravilne rastline. Stopnja zrelosti semen/plodov močno vpliva na hitrost in odstotek kalivosti. Pri preizkušanju kalivosti po standardnih (ISTA, AOSA) so bile pri zrelih plodovih *Foeniculum vulgare* posamezne faze kalitve za 2-3 dni zgodnejše kot pri manj zrelih plodovih. Plodovi *Foeniculum vulgare* L. in *Carum carvi* L. so požeti v času voščene zrelosti izkazovali značilno povečanje (30%) stopnje kalivosti med 6-12 mesečnim shranjevanjem. Podobne rezultate so dobili pri preizkušanju kalivosti nezrelih, pol-zrelih in fiziološko zrelih semen, ki vsebujejo maščobna olja (kardobenedikta - *Cnicus benedictus* L., boraga - *Borago officinalis* L.), ki so odstotek kalivosti podvojili v času 3 mesečnega shranjevanja. Tudi pri kristavcu (*Datura stramonium* L.) so pol-zrela semena močno povečala kalivost po 12 mesečnem shranjevanju. Pri nobeni od proučevanih vrst v času žetve nezadostno zrelo seme ni doseglo stopnje

kalivosti fiziološko zrelega semena. Poseben problem predstavlja pri proizvodnji kakovostnega semena neizenačeno dozorevanje cvetov (4).

Čeprav so rezultati raziskav o vlogi velikosti semena pogosto kontradiktorni, lahko na podlagi izkušenj preliminarno določimo kakovost semena z vizuelnim ocenjevanjem (velikost, izgled - značilna oblika in barva: v primerjavi z debelimi in značilnimi rjastorjavimi semeni sabljastega triplata - *Trigonella foenum graecum* L. je kalivost drobnih in umazano sivorjavih semen bistveno zmanjšana) in z določanjem specifične teže (npr. ahene artičoke - *Cynara scolymus* L. se potopijo v vodi, če so fertile). Med dejavnike, ki pri posameznih rastlinskih vrstah izboljšajo vitalnost semena sodijo svetloba (okroglostna meta - *Mentha rotundifolia* L.), GA (encijan - *Gentiana lutea* L., sivka - *Lavandula angustifolia* Mill.), shranjevanje sveže požetih semen pri visoki (*Melissa officinalis* L.) oz. pri nizki relativni vlažnosti zraka (*Nepeta cataria* L.) (5). V nasprotju s tem so sveža semena diploidnega in tetraploidnega kultivarja kamilice (*Chamomilla recutita* Rausch.) kalila pod 1%, močno pa se kalivost povečala (do 80-100%) s staranjem (hranjena 200-300 dni, pri 10oC in 30% rel. vlažnosti) (6). Nekatera semena (kakavovec - *Theobroma cacao* L., kavovec - *Coffea arabica* L., muškato orešek - *Myristica fragrans* Houtt.) hitro izgubijo sposobnost kalivosti (7), zato so se dežele proizvajalke usmerile v vegetativne načine razmnoževanja. Zaradi genetske heterogenosti pravega janeža (*Pimpinella anisum* L.), ki je posledica tujeprašnosti in se kaže v nestalni vsebnosti anetola so se ameriški raziskovalci zatekli k proučevanju načina pridobitve klonov z biotehnološkimi metodami (8). Razlog za uvajanje vegetativnega razmnoževanja je bil v primeru morske čebulice (*Urginea maritima* (L.) Baker) majhna količina dosegljivega semena (9).

VEGETATIVNO RAZMNOŽEVANJE

Vegetativno razmnoževanje ima pri pridelovanju zdravilnih in aromatičnih rastlin pomembno vlogo in je uveljavljeno pri melisi (*Melissa officinalis* L.), meti (*Mentha* spp.), dobri misli (*Origanum* spp.), rožmarinu (*Rosmarinus officinalis* L.), žajblju (*Salvia officinalis* L.), timijanu (*Thymus* spp.) i dr. Glavna prednost pred generativnim razmnoževanjem je homogenost klona. Čeprav se rastline (tudi znotraj iste vrste) močno razlikujejo po njihovi sposobnosti za razmnoževanje, lahko v sorazmerno kratkem času pridobimo veliko število potomk z željenimi agronomskimi in kemijskimi/biološkimi lastnostmi. Med tehnikami vegetativnega razmnoževanja so najbolj razširjene ukoreninjenje potaknjencev (*Lamiaceae*, *Artemisia dracunculus* L., *Ruta graveolens* L.), deljenjem podzemnih organov (*Cynara scolymus* L., *Gentiana lutea* L.) in v zadnjem času in vitro razmnoževanje sterilnih izsečkov (eksplantatov). Enotnost v velikosti, barvi, okusu, obliki, vsebnosti eteričnega olja ali drugih

sestavin rastlinskega materiala, ki je določena z genom matične rastline je v industrijski predelavi kakovostnih izdelkov nepogrešljiva. Generativno raznoženi potomci heterozigotnega genotipa so pogosto, še posebej pri nežlahtnenih zdravilnih in aromatičnih rastlinah, zelo heterogeni v rasti in drugih proizvodno pomembnih lastnostih (10). Čeprav metod hibridizacije pri zdravilnih rastlinah v preteklosti niso pogosto uporabljali, je poznana hibridna narava številnih zdravilnih rastlin (7). V mnogih primerih takih biotipov zdravilnih ali aromatičnih rastlin ne moremo razmnoževati s semeni. Klasičen primer medvrstne hibridizacije je poprova meta (*Mentha piperita* cv' Mitcham). Vzrok sterilnosti poprove mete je njena večkratna (4 kratna) hibridna narava. Nastala je s spontanim, naravnim križanjem različnih vrst rodu *Mentha* (*Mentha rotundifolia* x *Mentha silvestris* = *M. viridis* (*M. spicata*); *Mentha viridis* x *Mentha aquatica*) (11). Podobno se obnaša hibrid lavandin (vsebuje v eteričnem olju 15 % linalool v obliki estrov), ki so ga vzgojili po medvrstni hibridizaciji med *Lavandula angustifolia* Mill. (35-55% linalool v obliki estrov) in *Lavandula spica* DC. (2-10% linalool v obliki estrov). Ingver (*Zingiber officinale* Rosc.) v razmerah, ko je prenešen iz naravnega habitata običajno ne tvori semen, zato je potrebno njegovo vegetativno razmnoževanje (10). Pri vrstah kot so sivka (*Lavandula* spp.), rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), dobra misel (*Origanum* spp.) in pri drugih počasi rastočih večletnicah je vegetativno razmnoževanje hitrejše in cenejše od generativnega, encijan (*Gentiana lutea* L.).

Slaba stran vegetativnega razmnoževanja je predvsem možnost popolne izgube pridelka, saj so potomci enako občutljivi na morebitne okoliške strese (pozeba, škodljivci, bolezni - razširitev virusov) in nimajo izražene genetske variabilnosti kot sejanci. Poznani problem vegetativnega razmnoževanja je pravitko staranje klona, ki je posledica akumulacije različnih intercelularnih patogenov. Te lahko danes očistimo z rutinskimi in vitro tehnikami.

ŽLAHTNENJE ZDRAVILNIH IN AROMATIČNIH RASTLIN

Zakoni dednosti so v evoluciji omogočili nastanek boljših rastlin prek izboljšanja jakosti in hitrosti rasti, povečanja odpornosti na bolezni in sušo, in izboljšanja pridelka aktivnih učinkovin. Vzgoja in vzdrževanje novega ali izboljšane biotipa rastlinske vrste je možna prek kontrole naravnih procesov opraševanja in ob uporabi dedne variabilnosti, mutacij in dostopnih tehnik križanja. Mutacije se lahko pojavijo spontano, ali jih induciramo s kemikalijami kot je kolhicin, z obsevanjem z X-žarki, UV-, α - in β -žarki, ki so bili preizkušeni na več zdravilnih rastlinah (7). Laboratorijska sinteza artemisina, ki mu pripisujejo antimalarijsko delovanje je kompleksna in zelo draga. Ekonomično pridobivanje artemisina je mogoče le iz kultiviranega rastlinskega materiala. Največ artemisina vsebujejo kitajski kultivarji enoletnega pelina (*Artemisia annua* L.)(0.5%), ostali le 0.01 do 0.21 (12). Ker kitajski kultivar v razmerah zmernega podnebne območja ne cveti in nima plodov, so poizkušali pridobiti

križance, ki bi jim s pomočjo kitajskih kultivarjev zvečali vsebnost artemisinina. Kitajski kultivar so razmnožili z "in vitro" tehniko in ga do cvetenja gojili v kontroliranih rastnih razmerah, nato pa ga oplodili z evropskimi kultivarji in s samooplodnjo. Pri samooplodnji je vsebnost artemisina dobra, vendar je pridelek suhe mase manjši. Povečano vsebnost so dosegli tudi pri križancih. V drugem poskusu so klon z povečano vsebnostjo artemisinske kisline (0.8%) iz rastline *Artemisia annua* cv' Asha pridobili z masovno selekcijo in jo nato razmnoževali z mikropropagacijo. Skupna koncentracija artemisina, artemisinske kisline in artemisina B v klonu je bila 1.35% (13). Pri baziliki (*Ocimum basilicum* var. *glabrum*) so proučevali tri kemotipe - iz Francije, Zahodne Afrike in Indije. Posamezni kemotipi se niso razlikovali morfološko, pač pa po vsebnosti eteričnih olj. Križanje med kultivarji poteka prosto. Čiste linije so pridobili s 4 letnim samoopraševanjem. Kot kriterij selekcije so določili: pridelek herbe, % eteričnega olja in vsebnost njegovih glavnih sestavin (estragol, eugenol in kafra). Čiste linije so nato recipročno križali: estragol x eugenol, eugenol x kafra, estragol x kafra. Po štirih letih samooplodnje so rastline vsebovale le še določeno eterično olje - prek samooplodnje vzgojeni homozigoti na določeno kemično spojino. Aplikacija naravnega karvona iz eteričnega olja kumine (*Carum carvi* L.), kot aktivne sestavine v novem pripravku proti kaljenju krompirja bo verjetno povečala potrebo po semenu kumine. Zato so začeli žžlahenje za pridobitev kultivarjev z višjo vsebnostjo karvona (15). Najboljše rezultate je dalo križanje med zimsko kumino cv' Bleija in letno cv' Karzo - pridobili so populacijo z približno 20% večjo produktivnostjo karvona kot jo ima standard cv' Karzo. Klon so razmnožili z in vitro propagacijo ob uporabi mladih kobilčkov za explant.

THE IMPORTANCE OF PROPAGATION METHOD FOR MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS

ABSTRACT

In selection of optimal propagation method for medicinal and aromatic plants the most relevant criteria are the propagation rate, biomass production and net production of active (useful) compounds, that determine the chemical quality of the drug plants. Essential parameters of seed quality (vigor, viability) as well as some experiences on generative and/or vegetative propagation are reviewed. The seed material, that has not been complied to selection/breeding mostly issues non-homogenous descendants as regards biomass production, developmental homogeneity and raw materials' quality. This is the reason why in the introduction of cultivation of medicinal and aromatic plants the vegetative propagation of plants is recommended, especially at species with slow and low germination rate

LITERATURA - REFERENCES

1. R. N. Basu (1995). Seed Viability. V: Seed Quality. Basic Mechanisms and Agricultural Implications. (A.S. Basra, Ed.) The Haworth Press, Inc. 1995, NY, 1-44.
2. Dornbos D.L. (1995). Seed Vigor Seed Quality. V: Seed Quality. Basic Mechanisms and Agricultural Implications. (A.S. Basra, Ed.) The Haworth Press, Inc. 1995, NY 45-80.
3. Tóth E., Németh É. Recent results in the development of Genebank Technologies specialized for medicinal plants. V: Proceedings of International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic plants, June 30-July 4, 1996 (Pank F., Ed.), Quedlinburg, Germany, 72-75
4. Grozdanič Đ., Šilješ I. Stanje, problemi i mogućnosti proizvodnje sjemena ljekovitog bilja.- Sjemenarstvo 9 (92) 1, 33-37.
5. Takano T. Palevitch D. Simon J. E. Mathe A. (1993). Proceedings of the First world congress on medicinal and aromatic plants for human welfare (WOCMAP), Maastricht, Netherlands, 19-25 July 1992.- Acta Horticulturae, 331, 275-286.
6. Carle R., Seidel F., Franz C. (1991). Investigation into seed germination of Chamomilla recutita (L.)Rauschert.- Angewandte Botanik, 65, 1-2, 1-8.
7. Shafik I. Balbaa (1983). Satisfying the requirements of Medicinal plant cultivation.- V: Third International Symposium on spice and medicinal plants, Acta Horticulturae, 132, 75-84.
8. Bela J. S., Shetty K., Craker L. E. (1996) In vitro developmental response of anise to growth regulators and establishment of a clonal propagation system. Proceeding of the International symposium on medicinal and aromatic plants, Amherst, Massachusetts, USA, 27-30 Aug, 1995. V: Acta Horticulturae, 426, 483-487.
9. Binek E. (1991). Trials on propagating the sea onion *Urginea maritima* (L.) Baker in greenhouse conditions).- Acta Agrobotanica, 44, 1-2, 73-80.
10. Raviv M., Putievsky E. (1987). Vegetative Propagation of Aromatic plants of the Mediterranean Region.- Herbs, Spices and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology. Vol.2 (L. E. Craker, J. E. Simon, Eds.) The Oryx Press AZ 1987, 159-181.
11. Baričević D. (1996). Priročnik za ciklus predavanj Pridelovanje zdravilnih rastlin I. del. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana 1996, 78.
12. Delabays N. (1993). Selection and breeding for high artemisinin (qinghaosu) yielding strains of *Artemisia Annu*a.- Acta Horticulturae 330, 203-207.
13. Gupta S. C. (1996). Isolation of high artemisimic acid containig plant of *Artemisia annua*.- Planta Medica, 62 (3), 280-281.
14. Gupta S. C. (1994). Genetic Analyses of some chemotypes in *Ocimum basilicum* var. *glabrum*.- Plant Breeding 112, 135-140.
15. Toxopeus H., Lubbertus J.H., Neervoort W., Folkers W., Huisjes G. (1995). Breeding research and in vitro propagation to improve carvone production of caraway (*Carum carvi* L.)- Industrial Crops and Products 4 (1), 33-38.

Adrese autora – Author's addresses:

Dea Baričević,
Tomaž Bartol
Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Jamnikarjeva 101
1111 Ljubljana - SL

Alenka Zupančič,
M-KŽK Kmetijstvo Kranj, LFVB
Begunjska 5
4000 Kranj - SL

Primljeno – Received:

15. 02. 1998.