

**A rozmaring (*Salvia rosmarinus* L. syn: *Rosmarinus Officinalis* L.)
kematípusai, *in vitro* szaporítása, valamint az illóolaj biokémiai
és antimikrobiális tulajdonságai**

KOLESNYK ANGÉLA ¹, KRYVTSOVA MARYNA ¹, SALAMON IVAN ²,
KOLESNYK ALEXANDRA ¹, CSABAI JUDIT ³

¹Ungvári Nemzeti Egyetem, Genetikai, Növényélettani és Mikrobiológiai Tanszék,
3 Narodna tér, Ungvár, 88000 Ukrajna

²Eperjesi Egyetem, Bölcsészettudományi és Természettudományi Kar, Ökológiai Tanszék,
November 1. utca. SK-081 16 Presov, Szlovákia

³Nyíregyházi Egyetem, Műszaki és Agrártudományi Intézet, Nyíregyháza,
4400. Sóstói út 31/b., Magyarország

E-mail: csabai.judit@nye.hu

Összefoglaló

A rozmaring (*Salvia rosmarinus* L.) régóta alkalmazott gyógynövény, illóolájának számos jótékony hatása miatt. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv két, a nemzetközi szakirodalom több mint 13 különböző kematípusát különbözteti meg. Az Ungvári Nemzeti Egyetem Botanikus Kertjének gyűjteményéből gyűjtött növényekből nyert illóolaj jelentős mennyiségű α -pineolt, cineolt, p-cimolt és kámfort tartalmaz, ami alapján a 4. kematípusba soroltuk. A VIII. Magyar gyógyszerkönyv kategóriái alapján, inkább spanyol típusú illóolaj, kiugró p-cimol tartalommal. Az antimikrobiális vizsgálatok a növény, illetve az illóolaj mérsékelt antibiotikus hatását bizonyították. *In vitro* kultúrába történő sikeres beviteléhez célszerű kiindulásként, kb. 1 cm-es, apikális és laterális rügyekkel rendelkező explantátumot előkészíteni. 3 %-os nátrium-hipoklorit-oldat és 1 %-os ezüst-nitrát 10 percig tartó alkalmazása, hatékony, több mint 80 %-os eredést eredményezett. A vizsgált sterilizálási módok közül, a fokozatos sterilizálás (előzetes 30-40 másodperces áztatás 70%-os etanolban, majd a sterilizáló reagensbe való átöntés és az ezt követő háromszori mosás steril desztillált vízben) bizonyult a leghatékonyabb technikának. Az *in vitro* tenyésztési szakaszban a hormonmentes Murashige-Skoog (MS) táptalaj bizonyult a leghatékonyabbnak. A kalluszképződés indukciójának optimális feltételeit pedig MS táptalajon, 0,5 mg/l BAP és 0,1 mg/l IAA hozzáadásával, fény nélküli termosztátban történő termesztés mellett teremtettük meg.

Kulcsszavak: *Salvia rosmarinus*, illóolaj, *in vitro* szaporítás, antibiotikus hatás

**Development of *in vitro* cultivation technology,
and study of biochemical and antimicrobial properties of the essential oil
of promising chemotypes of *Salvia rosmarinus* L.**

ANGÉLA KOLESNYK¹, MARYNA KRYVTSOVA¹, IVAN SALAMON²,
OLEKSANDRA KOLESNYK¹, JUDIT CSABAI³

¹Uzhhorod National University. Department of Genetics, Plant Physiology and Microbiology,
3 Narodna Square, Uzhhorod, 88000 Ukraine

²University of Presov. Department of Ecology, Faculty of Humanities and Natural Sciences,
01, 17th November Str., SK-081 16 Presov, Slovakia

³University of Nyíregyháza, Institute of Engineering and Agricultural Sciences,
4400 Nyíregyháza, Sóstói Str. 31/b.

E-mail: csabai.judit@nye.hu

Summary

Rosemary (*Salvia rosmarinus* L.) has long been known due to many beneficial properties of its essential oil. Nowadays, over 13 different chemotypes of the plant are known, depending on the qualitative and quantitative composition of rosemary essential oils. For successful *in vitro* establishment, it is advisable to take stem segments as initial explants fragments (about 1 cm in size stem with apical and lateral buds). An effective disinfection (over 80 %) was achieved by isolating them in the spring season and using either 3 % sodium hypochlorite solution or 1 % silver nitrate for 10 min. Stepwise sterilisation has proved as the most efficient technique. The basic hormone-free MS medium has been ascertained to be the best at the *in vitro* cultivation stage. Optimal conditions for induction of callus formation were created on MS medium with the addition of 0.5 mg/l of BAP and 0.1 mg/l of IAA, and in darkness. The essential oil obtained from plants collected from the Uzhhorod National University's Botanical Gardens collection contained a significant amount of α -pinene, cineole, p-cymene, and camphor, which gave us grounds to assign it to chemotype 4. It exhibited moderate antimycotic activity, has pronounced aromatic and deodorising properties, and can therefore be included as a component to cosmetic products with antifungal effect.

Keywords: *Salvia rosmarinus*, essential oil, *in vitro* propagation, antibiotic effect

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A rozmaryng (*Salvia rosmarinus* L., syn: *Rosmarinus officinalis* L.) a *Lamiaceae* családba tartozó, régóta kutatott gyógy- és aromanövény, amelynek átfogó tanulmányozása azonban nem veszítette el aktualitását, számos hasznos tulajdonsága miatt (Gorban et al. 2004). A növényt dísznövénykertészeti célokra is termesztik, használják a gasztronómiában, mint fűszernövényt, továbbá a gyógyszeripar értékes alapanyaga. A növény drogja számos ország gyógyszerkönyvében hivatalosan is megtalálható (Zaouali et al. 2010; El-Zefzafy et al. 2016; Villegas-Sánchez et al. 2021). A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben (Ph. Hg. VIII.) levele *Rosmarini folium* és illóolaja *Rosmarini aetheroleum* néven szerepel. A rozmaryngot a népgyógyászat belsőleg emésztési zavarok, fejfájás, ideggyengeség, alacsony vérnyomás kezelésére használja. Epe-, vizelet- és szélhajtó, étvágygerjesztő teakeverékekben is szerepel. Külsőleg bedörzsölő szerként izületi és reumás panaszok enyhítésére alkalmazzák. További hagyományos felhasználási területei közé tartozik a sebek és az ekcéma kezelése, valamint antiszeptikus hatásának kihasználása (de Araujo et al. 2017; Csupor és Szendrei 2012). Másodlagos metabolitjai (karnoszol és karnozinsav, rozmarinsav, urzolsav, oleanolsav) vírusellenes, gyulladáscsökkentő, sebgyógyító, fájdalomcsillapító és gombaellenes hatásúak és felhasználhatók az UV sugárzás elleni védelemre (Farag et al. 1989; Tada et al. 1994; Baricevic et al. 2001; de Macedo et al. 2020). A pandémia alatt, vírusellenes hatásának vizsgálat újra középpontba került. Az eredmények azt mutatják, hogy a karnoszol a COVID-19 Mpro gátlójaként is hatékony (Villegas-Sánchez et al. 2021). A rozmaryngolajat a hús tartósítására is alkalmazzák (Estevez et al. 2006; Doolaege et al. 2012; Sánchez-Muniz et al., 2012; Rozman et al. 2009; Tutulescu et al. 2019). Az EU a rozmaryngkivonatot (E392) biztonságos és hatékony természetes antioxidánsként hagyta jóvá az élelmiszerek tartósítására (Andrade 2018).

A rozmaryng antibakteriális tulajdonságait jelentősen befolyásolja a növény illóolaj tartalma (Bozin et al. 2007; Zaouali et al. 2010; El-Zefzafy et al. 2016). A legfontosabb hatóanyagokat figyelembe véve, a nemzetközi szakirodalom legalább 13 rozmaryng kemotípust különböztet meg (Abdo et al. 2018; Satyal et al. 2017).

Az 5 leggyakoribb, szakkikkekben említett kemotípus:

1. kemotípus: α -pinén 1,8-cineol. A domináns vegyület az α -pinén.
2. kemotípus: verbenon, α -pinén, kámfor és 1,8-cineol. A domináns vegyület a verbenon.
3. kemotípus: mircén, 1,8-cineol és kámfor. A domináns vegyület a mircén.
4. kemotípus: 1,8-cineol, kámfor és α -pinén. A domináns vegyület az 1,8-cineol.
5. kemotípus: α -pinén, β -pinén és kámfor. A domináns vegyület a β -pinén.

(Satyal et al. 2017; Abdo et al. 2018; Hamid 2020).

A Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadása két fő rozmaryngolaj típust különböztet meg. A spanyol, valamint a marokkói/tunéziai típusút. A két különböző olaj hatóanyagainak százalékos arányában láthatók az eltérések, amelyek standardként szerepelnek a gyógyszerkönyvben. A spanyol típusúnak az α -pinén és a cineol a fő hatóanyaga, ezeket hasonló arányban tartalmazza az olaj, míg a marokkói/tunéziai típusú olajban kiemelkedő, akár 55% arányú is lehet a cineol tartalom (Ph. Hg. VIII.).

A tudományos irodalomban számos cikk igazolja a rozmaryngolaj antibakteriális és gombaellenes hatását (van Vuuren et al. 2009; Jiang et al. 2011; Khosravi et al. 2013; Hussain et al. 2010;

Prabuseenivasan et al. 2006). A származási helytől függően, a rozmaringból készített olajokkal végzett összehasonlító elemzések eredményei jelentős szórást mutatnak. Ezek az eltérések több olyan tényezőnek tulajdoníthatók, amelyek befolyásolhatják az illóolaj összetételét, mint például a termesztés földrajzi területe (Salamon et al. 2023; Kryvtsova et al. 2019; Jordán et al. 2013), a fenológiai stádium (Jordán et al. 2013; Lakušić et al. 2013) és az olajkivonás módszere (Hosni et al. 2013). Korreláció áll fenn, a kemotípus és az antibiotikus hatás tekintetében is, valamint a vizsgálatára használt módszer is befolyásolhatja az eredményeket (Barreto et al. 2014; Akrouit et al. 2010; Hammer et al. 1999). Daferera et al. (2003) szerint az antimikrobiális hatás az illóolajok fő komponenseinek, és az egyes összetevők között fellépő szinergizmusnak köszönhető.

Bosnić és társai (2006) különböző illóolajok (zsálya, levendula, citromfű, eukaliptusz, kakukkfű), köztük a rozmaringolaj mikroorganizmusokra gyakorolt hatását vizsgálták. A kutatásukban használt tesztorganizmusok, a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) voltak. A rozmaring bizonyult a leghatékonyabbnak két vizsgált baktérium ellen. A *B. subtilis* elleni hatása megközelítette a kontrollként alkalmazott erythromycin gátló hatását, míg az *E. coli* esetében a kontrollként alkalmazott gentamicin hatását közelítette meg. Jelentős hatékonyságot mutatott a *S. aureus* és a *P. aeruginosa* baktériumok ellen is, de ezekben az esetekben a kakukkfűolaj bizonyult hatékonyabbnak (Bosnić 2006). Vasile és társai (2017) is hasonló eredményre jutottak, miközben illóolajok (kakukkfű, szegfűszeg, rozmaring, teafa) antibiotikus hatását vizsgálták. A leghatékonyabb gátló hatása a kakukkfűolajnak volt, de a rozmaring az *S. aureus* baktériumra és az *E. coli*-ra is jelentős gátló hatással bírt.

Három különböző kemotípus antibiotikus hatását vizsgáló kísérlet megállapította, hogy az I. és II. kemotípus antibakteriális hatása jelentősen felülmúlja a III. kemotípusét (Akrouit et al. 2010). Más kísérletekben, öt kemotípus hatóanyagösszetételét, valamint a kemotípusok hatását vizsgálták négy baktérium fajra, és arra a következtetésre jutottak, hogy a kemotípusok között jelentős eltérés tapasztalható az antibiotikus hatásban. A képet tovább árnyalja, hogy a különböző olajok különböző baktériumokra voltak hatásosak (Jordán et al. 2013).

A rozmaringot többféleképpen lehet szaporítani. Generatív szaporítása üzemi körülmények között nem javasolt, mivel lassan csírázik (3-4 hét) és a csírázási arány 10-20%-os (Kiuru et al. 2015). A leggyakoribb és legeredményesebb szaporítási mód a félfás dugványozás (Bernáth 2000). Ha azonban vadon termő, egyedi karakterű példányokat génmegőrzési céllal, vagy speciális hatóanyagtartalmú kemotípusokat szeretnénk megőrizni, hatékony eljárás lehet az *in vitro* szaporítás (Chaturvedi et al. 1984; Kostas 2022). Az *in vitro* szaporítás a gyógyászati célokra értékes, jó minőségű, egészséges gyógynövények tömeges szaporítására is alkalmas hatékony technológia. Nagyon fontos a növények termesztése és az illóolajok gyártása során a standardizálás, melynek szintén eszköze lehet a mikroszaporítás technológiájának alkalmazása. Ezzel a technológiával viszonylag kis mennyiségű alapanyagból nagy mennyiségű egészséges és homogén növényállomány állítható elő akár egy év alatt, hiszen a termesztést az éghajlati tényezőkből következő szezonális hatás nem befolyásolja (Belokurova 2010; Maslova et al. 2021; Shelepova et al. 2021).

Az *in vitro* szaporítás első és egyben meghatározó lépése az explantátumok fertőtlenítése és táptalajra helyezése. Sakr és társai (2018) nátrium-hipokloritot (NaOCl 0,5%) és hidrogén-

peroxidot (H_2O_2 30%-os) valamint ezüst-nitrátot (AgNO_3) alkalmaztak sterilizáló szerként. A sterilizálás öblítése során frissen facsart citromlevet is használtak. Ezzel az eljárással kemotípustól függően 90-100%-os tisztaságot és túlélési rátát értek el. Al- Masoody és társai (2015) etanolt ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), higany-kloridot (HgCl_2) és nátrium-hipokloritot (NaOCl) alkalmaztak különböző koncentrációban és sterilizálási idővel rozmaring levelek fertőtlenítésére. Az eredmények azt mutatták, hogy a nátrium-hipoklorit 0,75%-os koncentrációban, 15 percen keresztül történő alkalmazása volt a leghatékonyabb. A több sikeres sterilizálási eredmény ellenére, a különböző kemotípusok és vadon előforduló egyedek megőrzése érdekében, érdemes tovább vizsgálni a sterilizáló szereket, azok koncentrációját és a behatási időt.

Kutatásunk célja egyrészt az Ungvári Botanikus Kertből gyűjtött rozmaring illóolajának tipizálása, akár a nemzetközi irodalomban meghatározott kemotípusok, akár a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv kategóriái szerint. Az egyedi hatóanyagösszetétel okán vizsgáltuk az antimikrobiális aktivitást, majd génmegőrzés céljából *in vitro* kultúrába helyezés lehetőségét.

Anyag és módszer

A vizsgálatunk tárgyát képező növény, a rozmaring (*Salvia rosmarinus* L.) az ajakosvirágúak családjába (*Lamiaceae* L.) tartozó örökzöld félcserje volt. A kutatásra szánt növényeket az Ungvári Nemzeti Egyetem Botanikus Kertjének gyűjteményéből gyűjtöttük (EOV: szélesség 48.62013, hosszúság: 22.30476) 2020 nyarán 12 óra körüli időpontban, amikor feltételeztük, hogy a legmagasabb a hatóanyagtartalom a növényben. A rozmaring herbát három fő anyanövényről szedtük. A herbát desztillált vízben háromszor megmostuk, majd megszáritottuk. Az esszenciális olaj kinyeréséhez gőzdesztillációt alkalmaztunk.

Az esszenciális illóolaj (EO) GC/MS analízisét Varian 450-GC-vel összekapcsolt Varian 220-MS-szel végeztük. Az elválasztás kapilláris oszlop segítségével történt: BPX-5MS (50 m × 0,25 mm méret, 0,25 μm filmvastagság). Az 1177-es típusú injektort 220 °C-ra fűtöttük. Héliumot (He_2) használtunk vivőgázként 1,2 ml/perc állandó oszlopáramlási sebesség mellett. Az oszlop hőmérsékletét programoztuk: a kezdeti hőmérséklet 10 percig 50 °C volt, majd 3 °C/perc sebességgel 100 °C-ra emeltük, 5 percig izotermikus maradt, majd 10 °C/perc sebességgel 150 °C-ra emelkedett. Az egyes minták elemzésének teljes ideje 54,97 perc volt. A komponenseket a NIST 14-ben (szoftverkönyvtár) tárolt tömegspektrumokkal, illetve az irodalomból származó tömegspektrumokkal való összehasonlításával azonosítottuk (Hudaib et al. 2002). Az elemzéshez a NIST 14 (2014-es verziójú) tömegspektrum-könyvtárat használtuk. A mintaelemzés során Kovats-mintákat (C-5 és C-22 alkánok keveréke) injektáltunk, és a Kovats-indexeket a retenciós időből számoltuk ki harmadrendű polinom segítségével. Negyven autentikus referencia vegyületet (Extrasynthese, Merck, Fulka, Sigma és Roth) vásároltunk. A vegyületek koncentrációját (%-os tartalomként) a megfelelő kromatográfiás csúcs integrálásával számoltuk ki (Adams, 1995).

Az esszenciális olajok (EOs) antimikrobiális aktivitását agar diffúziós teszttel határoztuk meg (Rhos és Reico 2005; Balouiri M. et al. 2016). A baktérium inokulumokat 100 μL fiziológiás oldatban 0,5 McFarland standardnak megfelelő értékre állítottuk be, és egyenletesen szét-

terítettük a Muller-Hinton agar felületén (37 ± 2 °C-on inkubáltuk 24 órán keresztül); az élesztőket SDA agarra terítettük (35 ± 2 °C-on inkubáltuk 48 órán keresztül). A 20 µL kivonatokat 6 mm átmérőjű lyukakba juttattuk. A gátlási zónák átmérőjét, beleértve a lyuk átmérőjét is, milliméterben mértük. Minden antimikrobiális vizsgálatot legalább háromszor végeztünk el.

Teszttenyészetekként a következő baktériumokat és élesztőket használtuk az Amerikai Típuskultúra Gyűjteményből (the American Type Culture Collection): *Candida albicans* ATCC 885-653, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 és *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. A felső légutak gyulladással megbetegedéseiben szenvedő betegek kóros fertőzési gócpontjából izolált klinikai baktérium- és élesztőtörzseket (*S. aureus*, *E. coli*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *C. albicans*) is használtunk.

A rozmaryn explantátumok *in vitro* kultúrába vonásához és felszaporításához a növényben már meglévő merisztémák aktiválásának módszerét alkalmaztuk (Kalinin 1980). A primer explantátumok egyéves, kb. 4-8 cm hosszú hajtások voltak, amelyeket ötéves anyanövényekről szedtünk 2020 kora tavaszán, virágzás előtti fenológiai állapotban.

A felszíni sterilizálás vizsgálata során megállapítottuk, hogy az oldal- és csúcsrügyek, amelyek szárrészeteket (átlagos mérete legfeljebb 1 cm) tartalmaztak, nagyobb regenerációs képességgel rendelkeztek, mint az izolált rügyek, ezért az izolált rügyekről indított tenyészeteket kiszeleztünk, és a kísérletből kizártuk. Jelen cikkben csak a szárrésszel rendelkező explantátumok eredményeit dolgoztuk fel.

A **sterilizálás** a kiválasztott hajtások alapos mosószeres mosásával kezdődött, esetünkben fertőtlenítő hatású folyékony HSoap folyékony szappannal. Kétféle sterilizálási technikát alkalmaztunk: a hagyományos eljárás során az anyagot mosás után azonnal a sterilizáló reagensbe helyeztük, míg a fokozatos (lépcsőzetes) sterilizálási technika esetében, az anyagot először 30-40 másodpercig 70%-os etanolban tartottuk, és csak ezután helyeztük át a sterilizáló reagensbe. Kezelésként 30-30 explantátumot vizsgáltunk.

A sterilizáló kezelések a következők voltak:

- 3%-os nátrium-hipoklorit - NaClO (10 és 20 perc),
- 1%-os ezüst-nitrát – AgNO₃ (10 és 20 perc),
- 0,1%-os higany-klorid - HgCl₂ (5 és 10 perc),
- 50%-os hidrogén-peroxid - H₂O₂ (15 perc) (Kushnir és Sarnatska 2005).

A fertőtlenített explantátumokat Murashige és Skoog (MS) hormonmentes, 0,7% agar-agar tartalmú táptalajra helyeztük (Murashige és Skoog 1962), ezenkívül szacharózt (0,3%) és mezo-inozitot (100 mg/l) adtunk hozzá. A táptalaj pH-ja 5,7-5,8 volt. Annak érdekében, hogy bipolárisan regenerálódó növényeket és kalluszokat kapjunk, módosított MS táptalajt használtunk, amelyet auxin (2,4-indolecetsav (IAA) - 0,1-1,0 mg/l) és citokinin (6-benzilaminopurin (BAP) - 0,5-2,5 mg/l) típusú fitohormonokkal egészítettünk ki. Az explantátumokat tartalmazó kémcsöveket 3000-4000 lux, 24 ± 2 °C léghőmérséklet, ~70%-os páratartalom és 16 órás fotoperiódus mellett tenyésztettük. A kalluszok indukciójához és szaporodásához az explantátumokat Petri-csészékben, TS-80 termosztátban (T = 25 ± 1 °C), megvilágítás nélkül, 25 ± 1 °C hőmérsékleten és kb. 70-75%-os relatív páratartalom mellett tenyésztettük.

Eredmények

Az eredmények összevetését a nemzetközi irodalommal megnehezíti, hogy a kutatott hatóanyagok és azok antibiotikus hatása számos összetevőtől függ. A rozmaring kemotípusa, a környezeti viszonyok, az olaj koncentrációja a fenológiai fázis mind módosító tényező. Továbbá az antibiotikus hatást jelentősen befolyásolhatja az adott mikroorganizmus különböző törzseinek eltérő érzékenysége vagy rezisztenciája is.

Az analitikai vizsgálatok eredményei

A vizsgált mintában a legnagyobb részarányban, a cineol (25,0±1,0%), az α -pinén (19,0±1,0%), a p-cimol (17,0±1,0%) és a kámfor (19,0±1,0%) voltak jelen. A kámfén, β -pinén, bornil-acetát, α -terpineol és borneol kisebb mennyiségben volt megtalálható (1. táblázat). A β -mircén (a 3. kemotípusra jellemző) és a verbenon (a 2. kemotípusra jellemző) egyáltalán nem volt kimutatható a mintában. Az illóolaj minőségi és mennyiségi összetétele alapján a vizsgálatba vont rozmaring egyedek kísérleti illóolaj mintái a négyes, Napoli és társai (2010) által cineoliferumnak nevezett kemotípusba sorolhatók, amelyre leginkább a gombaölő hatás jellemző (Satyal et al. 2017). A jelenleg hatályos VIII. Magyar Gyógyszerkönyv alapján a mintánkat, a spanyol típusú illóolaj kategóriába sorolhatjuk, kiemelkedő p-cimol tartalommal (1. táblázat).

1. táblázat. Az illóolaj minta biokémiai elemzésének eredményei összehasonlítva a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv által meghatározott hatóanyagösszetétellel

| KI | Aktív komponens | Összehasonlító adatok spanyol típusú rozmaringolaj (Ph. Hg. VIII.) (%) | Összehasonlító adatok marokkói/tunéziai típusú rozmaringolaj (Ph. Hg. VIII.) (%) | Jelen kutatás eredményei (%) |
|------|---------------------|--|--|------------------------------|
| 932 | α -pinén | 18,0-26,0 | 9,0-14,0 | 19,0 |
| 946 | kámfén | 8,0-12,0 | 2,5-6,0 | 9,0 |
| 974 | β -pinén | 2,0-6,0 | 4,0-9,0 | 5,0 |
| 991 | β -mircén | 1,5-5,0 | 1,0-2,0 | - |
| 1030 | limonén | 2,5-5,0 | 1,5-4,0 | - |
| 1031 | cineol | 15,0-25,0 | 38,0-55,0 | 25,0 |
| 1038 | p-cimol | 1,0-2,2 | 0,8-2,5 | 17,0 |
| 1145 | verbenon | 0,7-2,5 | legfeljebb 0,4 | - |
| 1151 | kámfor | 13,0-21,0 | 5,0-15,0 | 19,0 |
| 1168 | borneol | 2,0-4,5 | 1,5-5,0 | 2,0 |
| 1191 | α -terpineol | 1,0-3,5 | 1,0-2,6 | 2,5 |
| 1258 | bornil-acetát | 0,5-2,5 | 0,1-1,5 | 2,0% kisebb |

Jelmagyarázat: KI: Kováts index a C5-C22 n-alkánokhoz viszonyítva

Table 1. The results of the biochemical analysis of the essential oil sample compared to the composition of the active ingredients as defined in the VIII Hungarian Pharmacopoeia

Meg kell említenünk, hogy a kimagasló p-cimol tartalom, amelyet a mintánkban mértünk, a nemzetközi szakirodalomban is egyedülálló. Az 2. táblázat nemzetközi szakirodalmi áttekintést tartalmaz, különböző országokban, különböző növényi alapanyagból, és eljárással kivont illóolajok, p-cimol tartalmát mutatja be. Láthatjuk, hogy az adatok jelentősen szórnak. A p-cimol tartalom a legtöbb mérésnél jellemzően alacsony, 1-5%-os, egy- két esetben éri el a 10 % közeli értéket (Polat et al. 2011; Barak et al. 2023). Még ezek az eredmények sem közelítik meg az általunk mért 17%-os p-cimol tartalmat, mely megközelíti a kakukkfű timol típusú (19%), p-cimol típusú (32%) és karvakrol típusú (27%) kemotípusainak p-cimol tartalmát (Kaloustian 2005). A p-cimol egy fontos monoterpén, amely több mint 100 gyógyászati célokra használt növényfajban található meg. Számos biológiai aktivitást mutat, beleértve az antioxidáns, gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító, szorongásoldó, rákellenes és antimikrobiális hatásokat. Ez utóbbi tulajdonságát széles körben vizsgálják, mivel sürgősen szükség van a fertőző betegségek kezelésére felhasználható új anyagokra, amelyek elterjedését a globalizáció és az antimikrobiális rezisztencia fejlődése elősegítette (Marchese et al. 2017). Eredményeink éppen ezért fontos, új lehetőséget nyitnak meg. Az Ungvári Egyetemi Botanikus Kertjének rozmaring anyatelepéről származó és onnan felszaporított növények kivonatainak további vizsgálata, a rozmaringolaj egy újabb, hatóanyagösszetételében az eddigi vizsgált olajoktól jelentős eltérést mutató, új gyógyászati alapanyag lehet (Asja és Stappen 2018).

Az antibiotikus vizsgálatok eredményei

A rozmaring illóolaj antimikotikus és antibiotikus tulajdonságainak vizsgálatának eredményei (3. táblázat) mérsékelt aktivitást mutattak. A Típuskultúra Gyűjteményből származó törzsek mellett, a kísérletben a mikroorganizmusok klinikai tenyésztet is felhasználtuk. A *C. albicans* ATCC és klinikai minta növekedés gátlása $12,3 \pm 0,3$, illetve $15,0 \pm 0,5$ mm volt. Az elemzéshez használt többi mintához hasonlóan az illóolaj gyenge antimikrobiális hatást mutatott. Az értékek $7,0 \pm 0,1$ (*E. faecalis*) és $8,5 \pm 0,3$ (*E. coli* ATCC 25922) között mozogtak.

Összehasonlítva a nemzetközi szakirodalom eredményeit (6. táblázat), az általunk vizsgált minta, jellemzően alacsonyabb antibakteriális hatást mutatott, viszont az antimikotikus hatása igen magas, a nemzetközi mérésekkel megegyező vagy azt túlszárnyaló.

Az *in vitro* szaporítás eredményei

Az aseptikusan életképes kultúrák sikeres előállításának fontos feltétele a mikroszövetek hatékony sterilizálási módszereinek helyes megválasztása. A kísérleti vizsgálatok során (4. táblázat) kiderült, hogy nem célszerű olyan sterilizáló szereket használni, mint a higany-klorid és a hidrogén-peroxid, mivel az életképes explantátumok száma ezekben a kísérleti változatokban volt a legalacsonyabb. A hidrogén-peroxid túl gyenge volt, és a kémcsövek bepenészedtek, míg a higany-klorid károsította a burjánzó sejteket, és a hajtások elvesztették regeneráló képességüket. Az exogén mikroflóra sikeres semlegesítéséhez a legmegfelelőbb oldatok a 3%-os nátrium-hipoklorit oldat és az 1%-os ezüst-nitrát oldat voltak (expozíciós idő - 10 perc). Ebben az esetben a legjobb eredményt a fokozatos sterilizálási módszerrel (előzetes 30-40 másodperces áztatás 70%-os etanolban, majd a sterilizáló reagensbe való átöntés és az ezt követő háromszori mosás steril desztillált vízben) értük el.

2. táblázat. A rozmaringolaj aktív komponenseit vizsgáló nemzetközi szakirodalmakban előforduló p-cimol értékek

| p-cimol tartalom (%) | Kísérlet helyszíne | A kísérlet speciális részletei | Hivatkozás |
|----------------------|------------------------|---|-------------------------|
| 3,9 | Törökország, Isztambul | Kereskedelmi forgalomban kapható olajat vizsgáltak. | Demirci et al. 2022 |
| 10,7 | Törökország | - | Polat et al. 2011 |
| 1,3 | Románia | Kereskedelmi forgalomban található olajat vizsgáltak | Vasile et al. 2017 |
| 0,4-1,6 | Alabama, USA. | 6 mintavételi területről-3 kemotípust határoztak meg a vizsgált olajok alapján | Satyal et al. 2017 |
| 1,28 | Szaúd-Arábia | - | Guetat et al. 2014 |
| 1.15- 1.89 | Tunézia | 6 élőhelyről szedett mintán végeztek mérést | Abada et al. 2020 |
| 0,2-1,9 | Szerbia | Különböző fenofázisban, különböző növényi részekből szedett mintákat vizsgáltak | Lakušić 2012 |
| 6,23 | India | - | Jeevalatha et al. 2022 |
| 7,8 | Algéria | <i>Rosmarinus tunefortii</i> fajt vizsgáltak | Beneddouch et al. 2011 |
| 2,42-3,11 | Tunézia | 3 élőhelyről gyűjtött mintákat vizsgáltak | Hcini et al. 2013 |
| 0,9 | USA | Kereskedelmi forgalomban kapható illóolajat vizsgáltak | Miresmailli et al. 2006 |
| 4,73 | Románia | A növény gyűjtési helye nincs meghatározva | Popescu et al. 2018 |
| 1.22–4.18 | Marokkó | Vadon nőtt és termesztett növényekről, különböző eljárással előállított olajat vizsgáltak | Sakar et al. 2023 |
| 1,62-9,51 | Törökország | 15 különböző kereskedelmi forgalomban kapható illóolaj hatóanyagtartalmát vizsgálták | Barak et al. 2023 |
| 1,46-8,39 | Argentína | Az egyetem különböző területein gyűjtött rozmaring növények olaját vizsgálták | Oliva et al. 2023 |
| 17,0 | Ukrajna | Botanikus kertből szedett növényekről szedett mintát vizsgáltunk | saját eredmények |

Table 2. p-Cymene values in the international literature on the active components of rosemary oil

3. táblázat. *S. rosmarinus* antimikotikus és antibiotikus aktivitása klinikai és ATCC törzsekkel szemben (mm, n = 3, x ± SD)

| A vizsgálatba vont mikroorganizmusok | A gátlási zóna átmérője (mm) | Nemzetközi összehasonlító adatok |
|---|------------------------------|--|
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 8,3±0,3 | 12,8 ± 4.3 (Vasile et al. 2017) 26,6±5,94–44,7±2,25 (5 különböző kemotípus) (Jordán et al. 2013) |
| <i>S. aureus</i> | 8,4±0,3 | |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 8,5±0,3 | 15,1 ± 0,5 (Vasile et al. 2017) 13,0 (Bosnić 2006). |
| <i>E. coli</i> | 8,0±0,1 | 15,9 ± 6,39 – 21.2 ±7.23 (Jordán et al. 2013) 5 különböző kemotípust vizsgálva. |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | 7,8±0,4 | |
| <i>E. faecalis</i> | 7,0±0,1 | 14.7-15.6 (Akrou, et al. 2010) |
| <i>S. pyogenes</i> ATCC 19615 | 8,3±0,3 | |
| <i>S. pyogenes</i> | 7,3±0,3 | 10,0 –12,0 ± 0,0 (Mangena és Muyima 1999) Az illóolajokat különböző koncentrációban vizsgálva. |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 885-653 | 12,3 ± 0,3 | |
| <i>Candida albicans</i> | 15,0 ± 0,5 | 8.3 (±0.57) –12.3 (±2.51) (Devkatte 2005) 4 különböző <i>Candida</i> törzset vizsgálva. |

Table 3. Antibiotic and antimicrobial activities of the *S. rosmarinus* against clinical and typical strains (mm, n = 3, x ± SD)

NaClO és AgNO₃ 20 perces expozíciója esetén a sterilizálás hatékonysága jelentősen csökkent a reagenseknek az élő szövetekre gyakorolt toxikus hatása miatt, ami a szövetek osztódásának csökkenését eredményezte. Eredményeink részben tükrözik a nemzetközi szakirodalmat a nátrium-hipoklorit eredményes alkalmazását illetően (Sakr et al. 2018; Al- Masoody et al. 2015)

Az *in vitro* termesztés első szakaszaiban, a sterilizálás utáni stressz leküzdése és a jobb alkalmazkodás érdekében, célszerű az explantátumokat hormonmentes MS táptalajon nevelni. Esetünkben a tenyésztés hatékonyságát a 5. táblázat mutatja.

4. táblázat. A *S. rosmarinus* explantátumok sterilizálásának hatékonysága a vizsgált sterilizáló reagens hatására (NaClO: nátrium-hipoklorit; AgNO₃: ezüst-nitrát; HgCl₂: higany (II)-klorid; H₂O₂: Hidrogén-peroxid)

| Sterilizálószer | Expozíciós idő (perc) | Az életképes explantátumok aránya (%) hagyományos sterilizálási módszer | Az életképes explantátumok aránya (%) fokozatos sterilizálási módszer |
|-------------------------------|-----------------------|---|---|
| NaClO | 10 | 60,2±0,3 | 80,3±4,5 |
| | 20 | 16,4±1,2 | 45,1±1,3 |
| AgNO ₃ | 10 | 32,4±1,1 | 85,4±5,1 |
| | 20 | 11,5±0,6 | 33,8±2,8 |
| HgCl ₂ | 5 | 0 | 3,5±1,1 |
| | 10 | 0 | 0 |
| H ₂ O ₂ | 15 | 1,1±0,3 | 24,7±4,8 |

Table 4. Efficiency of surface sterilisation of *S. rosmarinus* explants with the applied disinfectants ((NaClO: nátrium-hipoklorit; AgNO₃: ezüst-nitrát; HgCl₂: higany (II)-klorid; H₂O₂: Hidrogén-peroxid)

A 5. táblázatban láthatjuk, hogy a hormonok alkalmazása a táptalajban, a regeneráció intenzitásának lelassulásához vezetett, ami nyilvánvalóan elsősorban a növény normális válaszreakciója (Salekjalali et al. 2012), jelezve, hogy nem igényel további stimulációt a termesztés kezdeti szakaszában. A jövőben azonban meg kell határozni a citokininek és az auxinok optimális egyensúlyát a táptalajban a morfogenezis folyamatainak (közvetlen, közvetett vagy vegyes típusú) hatékony és optimális szabályozásához.

5. táblázat. A *S. rosmarinus* explantátumok regenerációs folyamatainak dinamikája a különböző hormontartalmú MS táptalajokon (MS: Murashige és Skoog; IAA: Indol-3-ecetsav; BAP: 6-benzilaminopurin)

| Táptalaj összetétele | Az első életképes jelek, az apikális rügyek növekedésének kezdete (napok száma) | Az oldalrügyek regenerálódása (napok száma) | A gyökérképződés kezdete (napok száma) |
|--------------------------------------|---|---|--|
| MS táptalaj, hormonmentes | 8-10 | 11-18 | 20-25 |
| MS + IAA (1,0 mg/l) | 18-22 | 20-25 | 28-42 |
| MS+BAP – 2,5 mg/l) | 13-18 | 15-20 | 23-27 |
| MS + IAA (1,0 mg/l) + BAP (2.5 mg/l) | 15-19 | 18-22 | 25-30 |

Table 5. Regeneration dynamics of *S. rosmarinus* explants on MS media supplemented with different plant growth regulators (MS: Murashige and Skoog; IAA: Indole-3-acetic acid; BAP: 6-benzylaminopurine)

A második kísérleti szakaszban különböző mennyiségű hormonokat alkalmaztunk a különböző típusú *in vitro* morfogenezisek tanulmányozására (6. táblázat). A kalluszképződés leggyorsabb indukcióját és intenzitását a 0,5 mg/l BAP és 0,1 mg/l IAA-t tartalmazó táptalajváltozatban figyeltük meg. A nem morfogenetikus kalluszsejtek homogén színűek (világossárga) és lazák voltak. 45 napos tenyésztés után a kalluszsövet az öregedés jeleit kezdte mutatni, sötétbarna színű lett, átoltás nélkül a kísérlet végére elhalt. A kallusztenyésztet vizuális elemzése nem mutatott jelentős különbségeket a morfológiájában az öt átoltás során. 2,5 mg/l BAP és 1,0 mg/l IAA tartalmú táptalaj alkalmazása mellett 20 napos tenyésztés után megfigyelhető volt a nem morfogén kultúra differenciálódott sejtsomókból álló kultúrává való átalakulása, megkezdődött a hajtás és levélképződés. Kísérletünk eredményei alapján megállapítható, hogy ezt az átmenetet a táptalaj citokinin koncentrációjának növelése indukálta. A mikrohajtások száma és mérete a tenyésztési ciklus időtartamától függött. 70 nap után el kell végezni az átoltást, mert utána rohamosan romlik a növények egészségi állapota. A kiválasztott tenyésztési körülmények biztosították a mikrohajtások regenerálódását öt átoltás során. A hormonmentes táptalajon 35 napos tenyésztés után a növekedés csökkenését figyeltük meg, a növények elvesztették rugalmasságukat, feszességüket, megsárgultak és elhaltak.

6. táblázat. *S. rosmarinus* mikrohajtások termesztése különböző hormontartalmú MS táptalajon (MS: Murashige és Skoog; IAA: Indol-3-ecetsav; BAP: 6-benzilaminopurin)

| A táptalaj összetétele | A nevelés időtartama (nap) | A morfogenezis típusa |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| MS hormonok nélkül | 40-45 | Direkt |
| MS 0,5 mg/l of BAP, 0,1 mg/l of IAA | 40-45 | Indirekt |
| MS 2.5 mg/l of BAP, 1,0 mg/l of IAA | 75-80 | Vegyes |

Table 6. Cultivation of *S. rosmarinus* microshoots on MS medium supplemented with different plant growth regulators (MS: Murashige and Skoog; IAA: Indole-3-acetic acid; BAP: 6-benzylaminopurine)

Összefoglalás

1. Kísérletünkben sikerült kidolgozni a *S. rosmarinus* (Syn: *Rosmarinus officinalis*) *in vitro* kultúrába vonásának egy lehetséges módszerét, amelyhez csúcs- és oldalrügyeket tartalmazó hajtásdarabokat használtuk kiindulási explantátumként. A növényi hajtásdarabok hatékony (több mint 80 %) felszíni sterilizását úgy értük el, hogy a tavaszi szezonban szedett hajtásokat 10 percig 3 %-os nátrium-hipoklorit-oldattal, vagy 1%-os ezüst-nitráttal fertőtlenítettük. A fokozatos sterilizálási módszer (előzetes 30-40 másodperces áztatás 70%-os etanolban, majd a sterilizáló reagensbe való átöntés és az ezt követő háromszori mosás steril desztillált vízben) bizonyult az optimálisabb technikának. Az *in vitro* tenyésztésbe való bevezetés szakaszában a hormonmentes MS táptalaj bizonyult a legoptimálisabbnak, amely lehetővé tette az explantátumok regenerálását.

2. A kalluszképződés indukciójához optimális feltételt biztosított az MS táptalaj, 0,5 mg/l BAP és 0,1 mg/l IAA hozzáadásával, megvilágítás nélküli termosztátban történő termesztése. A kalluszsövet öregedésének jeleit 45 napos tenyésztés után figyeltük meg. Amikor hormontartalmú táptalajt alkalmaztunk (2,5 mg/l BAP és 1,0 mg/l IAA) 20 napos tenyésztés után a sejtek differenciálódtak.

3. Az eredmények azt mutatják, hogy a mintaként alkalmazott rozmaring illóolaja a 4. kemotípusba tartozik és jelentős mennyiségben tartalmaz α -pineolt (19,0 \pm 1,0%), cineolt (25,0 \pm 1,0%), p-cimént (17,0 \pm 1,0%) és kámfort (19,0 \pm 1,0%). A VIII. Magyar gyógyszerkönyv kategóriái alapján inkább spanyol típusú illóolaj, kiugró p-cimol tartalommal.

Kísérletünk eredményeinek újszerűségét az adja, hogy habár a nemzetközi szakirodalmak foglalkoznak a különböző kemotípusok antibiotikus hatásának vizsgálatával, azonban ezek egyike sem a IV. kemotípus, így a vizsgálatunk hiányt tölt be az antibiotikus vizsgálatok palettáján. Kísérletünkben megállapítottuk, hogy a IV. kemotípusú rozmaring olaja mérsékelt antibakteriális és jelentős antimikotikus aktivitást mutat.

Felhasznált irodalom

1. Abada, M. B., Hamdi, S. H., Maseoud, C., Jroud, H., Boussih, E., Jemâa, J. M. B. 2020. Variations in chemotypes patterns of Tunisian *Rosmarinus officinalis* essential oils and applications for controlling the date moth *Ectomyelois ceratoniae* (Pyralidae). *South African Journal of Botany*, 128: 18-27.
2. Abdo, B. M., Asaminew, G., Mieso, B., Sisa, W. 2018. Chemotypic characterization and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* essential oil from Ethiopian Cultivars. *Medicinal and Aromatic Plants*, 7(6): 2167-0412.
3. Adams, R.P. 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation: Carol Steam, IL, USA.
4. Akrou, A., Hajlaoui, H., Mighri, H., Najjaa, H., Jani, H. E., Zaidi, S., Neffati, M. 2010. Chemical and biological characteristics of essential oil of *Rosmarinus officinalis* cultivated in Djerba. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(4): 398-411.
5. Andrade, J. M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., Rijo, P. 2018. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future science OA*, 4(4), FSO283.
6. Asja, S., Stappen, I. 2018. "Essential oils and their single compounds in cosmetics—A critical review." *Cosmetics* 5 (1): 11.
7. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S. K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6: 71–79.
8. Barak, T. H., Bölükbaş, E., Bardakci, H. 2023. Evaluation of marketed rosemary essential oils (*Rosmarinus officinalis* L.) in terms of European Pharmacopoeia 10.0 Criteria. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(4): 253.
9. Barreto, H. M., Silva Filho, E. C., Lima, E. D. O., Coutinho, H. D., Morais-Braga, M. F., Tavares, C. C., Tintinoc, S. R., Rego, J. V., de Abreu, A. P.L., Lustosa, G., de Carmo, M., Wallacy R., Oliveira, G., Citóf, A.M.G.L., Lopes, J. A. D. 2014. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 59: 290-294.
10. Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Zupancic, A. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 75: 125-132.

11. Belokurova, V.B. 2010. Metody biotekhnolohiyi v systemi zakhodiv zi zberezhennia bioriznomanittia roslyn. *Cytology & Genetic*. 44 (3): 58-72.
12. Bendeddouche, M. S., Benhassaini, H., Hazem, Z., Romane, A. 2011. Essential oil analysis and antibacterial activity of *Rosmarinus tournefortii* from Algeria. *Natural product communications*, 6(10). doi:1934578X1100601026.
13. Bernáth, J. 2000: Gyógy-és aromanövények. Mezőgazda Kiadó Budapest. 502-504.
14. Bosnić, T., Softić, D., & Grujić-Vasić, J. 2006. Antimicrobial activity of some essential oils and major constituents of essential oils. *Acta Medica Academica*, 35(1): 9-14.
15. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., & Jovin, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(19): 7879-7885.
16. Csupor, D., Szendrei K. 2012. Gyógynövénytár - Útmutató a korszerű gyógynövény-alkalmazáshoz. Medicina Könyvkiadó Zrt.
17. Chaturvedi, H. C., Misra, P., Sharma, M. 1984. *In vitro* multiplication of *Rosmarinus officinalis* L. *Zeitschr. Pflanzenphys.* 113: 301-304.
18. de Macedo, J. T., de Oliveira, P. F., Sá, P. S., Távora, N. P., Pinheiro, A. V., Trindade, T. B., Pinheiro, M. T. 2017. Effect of Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) on the Healing of Cutaneous Lesions in Mice. *J. Chem. Pharm. Res.* 9(5): 381-6.
19. de Macedo, L. M., Santos, É. M. D., Militão, L., Tundisi, L. L., Ataíde, J. A., Souto, E. B., Mazzola, P. G. 2020. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and its topical applications: A review. *Plants*, 9(5): 651.
20. Demirci, F., Karadağ, A. E., Biletkin, S. N., Demirci, B. 2022. *In vitro* ACE2 and 5-LOX inhibition of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil and its major component 1, 8-cineole. *Records of Natural Products*. Table 1. The composition of *R. officinalis* essential oil.
21. Devkatte, A. N., Zore, G. B., Karuppaiyl, S. M. 2005. Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS yeast research*, 5(9): 867-873.
22. Daferera, D., Basil, N., Ziogas, B. N., Moschos, G., Polissiou, M.G. 2003: The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* In. *Crop Protection* 22 (1): 39-44.
23. Doolaege, E. H., Vossen, E., Raes, K., De Meulenaer, B., Verhé, R., Paelinck, H., De Smet, S. 2012. Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidant concentrations, in reduced nitrite liver pâtés. *Meat Science*, 90(4): 925-931.
24. El-Zefzafy, M., Dawoud, G., Shahhat, I. 2016. Physiological and phytochemical responses of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) plant on *in vitro* callus formation. *Eur. J. Med. Plants*. 17: 1-16.
25. Estevez, M., Ventanasa, S., Cava, R. 2006. Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pate. *Meat Science*, 74: 369-403.
26. Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M., El-Baroty G.S.A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice oils. *J. Food Prot.* 52: 665-667
27. Gorban, A. T., Gorlacheva, S. S., Krivunenko, V. P. 2004. Lekarstvennyye rasteniya: vekovoi opyt izucheniya i vyzdelyvaniya (Medicinal plants: an age-long experience of study and cultivation) Poltava: Verstka. 232 p.
28. Guetat, A., Al-Ghamdi, F. A., Osman, A. K. 2014. 1, 8-Cineole, α -Pinene and Verbenone chemotype of essential oil of species *Rosmarinus officinalis* L. from Saudi Arabia. *Int. J. Herb. Med.* 2: 137-141.
29. Hamid, S. A. 2020. Chemotypic of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils from eastern side of Iraq. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 13.
30. Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6): 985-990.

31. Hcini, K., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J., Bouzid, S. 2013. Chemical composition of the essential oil of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) of Tunisian origin. *Asian Journal of Chemistry*, 25(5): 2601.
32. Hosni, K., Hassen, I., Chaâbane, H., Jemli, M., Dallali, S., Sebei, H., Casabianca, H. 2013. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, 47: 291-299.
33. Hussain, A. I., Anwar, F., Chatha, S. A. S., Jabbar, A., Mahboob, S., Nigam, P. S. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 1070-1078.
34. Jeevalatha, A., Kalaimathi, R. V., Basha, A. N., Kandeepan, C., Ramya, S., Loganathan, T., Jayakumararaj, R. 2022. Profile of bioactive compounds in *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 12(1): 114-122.
35. Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y. J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C. J., Zu, Y., Liu, X. L. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental toxicology and pharmacology*, 32(1): 63-68.
36. Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., Sotomayor, J. A. 2013. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products*, 48: 144-152.
37. Kalinin, F.L. 1980. *Metody kultury tkanei v fiziologii i biokhimii rasteniy [Tissue culture methods in plant physiology and biochemistry] / F.L. Kalinin, V.V. Sarnatskaya, V.Ye. Polishchuk. – Kyiv: Naukova Dumka Publshers. 488.*
38. Kaloustian, J., Abou, L., Mikail, C., Amiot, M. J., Portugal, H. 2005. Southern French thyme oils: chromatographic study of chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14): 2437-2444.
39. Khosravi, R. A., Shokri, H., Farahnejat, Z., Chalangari, R., Katalin, M. 2013. Antimycotic efficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained from patients with dermatophytosis. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(1): 43-48.
40. Kiuru, P., Muriuki, S. J. N., Wepukhulu, S. B., Muriuki, S. J. M. 2015. Influence of growth media and regulators on vegetative propagation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *East African Agricultural and Forestry Journal*, 81(2-4): 105-111.
41. Kostas, S., Kaplani, A., Koulaouzidou, E., Kotoula, A. A., Gklavakis, E., Tsoulpha, P., Economou, A. 2022. Sustainable Exploitation of Greek *Rosmarinus officinalis* L. Populations for Ornamental Use through Propagation by Shoot Cuttings and *In vitro* Cultures. *Sustainability*, 14(7): 4059.
42. Kryvtsova, M.V., Salamon I., Koscova J., Bucko D., Spivak M. 2019. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections. *Biosystem Diversity*, 27 (3): 270–275.
43. Kushnir, H.P. Sarnatska V.V. 2005. *Mikroklonalne rozmnozhenia roslyn (Microclonal plant propagation) Kyiv: Naukova Dumka, 272.*
44. Lakušić, D., Ristić, M., Slavkovska, V., Lakušić, B. 2013. Seasonal variations in the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae). *Natural Product Communications*, 8(1). doi: 1934578X1300800132.
45. Magyar Gyógyszerkönyv. VIII. kiadás. *Pharmacopoea Hungarica. Editio VIII., I, II, III (A, B), IV (A, B) kötet, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2003-2010.*
46. Mangena, T., Muyima, N. Y. O. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in applied microbiology*, 28(4): 291-296.
47. Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Silva, A. S., Nabavi, S. F., Tsetegho Sokeng, A. J., Izadi,

- M., Jafari, N. J., Suntar, I., Daglia M., Nabavi, S. M. 2017. Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. *Materials*, 10(8): 947.
48. Maslova, E., Gulya, N., Perelugina, T., Semykina, V., Kalashnikova, E. 2021. Introduction of *Hyssopus officinalis* L. into *in vitro* culture to optimize the conditions for obtaining callus tissues and microclonal propagation as a promising method of innovative agrobiotechnologies. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 30, p. 05006). EDP Sciences.
 49. Al-Masoody, M. M. M., Stanica, F. 2015. Effect of growth regulators on *in vitro* callus formation of rosemary plant (*Rosmarinus officinalis* L.). *Bulletin UASVM Horticulture*, 72(1): 131-137.
 50. Miresmailli, S., Bradbury, R., Isman, M. B. 2006. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(4): 366-371.
 51. Murashige, T., Skoog F.A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* (15): 473-497.
 52. Napoli, E. M., Curcuruto, G., Ruberto, G. (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4): 659-670.
 53. Oliva, M. D. L. M., Lorello, I., Baglio, C., Posadaz, A., Carezzano, M. E., Paletti Rovey, M. F., Huallpa, Carlos., Juliani, H. R. 2023. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of rosemary (*Salvia rosmarinus* Spenn.) essential oils from Argentina. *Journal of Medicinally Active Plants*, 12(3): 38-52.
 54. Polat, U., Yesilbag, D., Mustafa, E. R. E. N. 2011. Serum biochemical profile of broiler chickens fed diets containing rosemary and rosemary volatile oil. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 5(13).
 55. Popescu, M., Puiu, D., Raiciu, A. D. 2018. Comparative Study of α and β -pinene Content in Volatile Oils of *Abies alba*, *Pinus sylvestris*, *Juniperus communis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* and *Coriandrum sativum*. *Rev. Chim.* 69(9): 2338- 2342.
 56. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Comp. Altern. Med.* 6: 6–39.
 57. Rozman, T., Jersek, B. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 93(1): 51- 58.
 58. Rhos, J. L., Recio, M. C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2): 80-84.
 59. Sakar, E. H., Zeroual, A., Kasrati, A., Gharby, S. 2023. Combined effects of domestication and extraction technique on essential oil yield, chemical profiling, and antioxidant and antimicrobial activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 2023: 1-13. doi: 10.1155/2023/6308773.
 60. Sakr, S. S., Amin, A. Y., El-Mewafy, E. A., Eid, N. M. 2018. *In vitro* comparative study on *Rosmarinus officinalis* L. cultivars. *Middle East J. Agric. Res.* 7: 703-715.
 61. Salamon, I., Otepka P., Kryvtsova M., Kolesnyk O., Hrytsyna M. 2023. Selected Biotopes of *Juniperus communis* L. in Slovakia and Their Chemotype Determination. *Horticulturae*, 9(6): 686.
 62. Salekjalali, M. 2012. Phloroglucinol, BAP and NAA Enhance Axillary Shoot Proliferation and other Growth Indicators *in vitro* Culture of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) *Advances in Environmental Biology*, 6(7): 1944-1949
 63. Sánchez-Muniz, F.J., Olivero-David, R., Triki, M., Salcedo, L., González-Muñoz, M.J., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Benedi, J. 2012. Antioxidant activity of *Hypericum perforatum* L. extract in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage. *Food Research International* 48: 909-915.
 64. Satyal, P., Jones, T. H., Lopez, E. M., McFeeters, R. L., Ali, N. A. A., Mansi, I., Al-kaf, A.G.,

- Setzer, W. N. 2017. Chemotypic characterization and biological activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods*, 6(3), 20.
65. Shelepova, O. V., Dilovarova, T. A., Gulevich, A. A., Olekhovich, L. S., Shirokova, A. V., Ushakova, I. T., Zhuraleva, E.V., Konovalova, L.N., Baranova, E. N. 2021. Chemical components and biological activities of essential oils of *Mentha piperita* L. from field-grown and field-acclimated after *in vitro* propagation plants. *Agronomy*, 11(11), 2314.
66. Tada, M., Okuno K., Chiba K., Ohnishi E., Yoshii T. 1994. Antiviral diterpenes from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*. 35: 539-541.
67. Tutulescu, F., Boruzi A. I., Nour V. 2019. Antibacterial activity of walnut leaves and sweet cherry stems in cooked pork patties. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment*. 10 (2) 65-75.
68. Van Vuuren, S. F., Suliman, S., Viljoen, A. M. 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in applied microbiology*, 48(4), 440-446.
69. Vasile, C., Sivertsvik, M., Miteluș, A. C., Brebu, M. A., Stoleru, E., Rosnes, J. T., Tănase, E. E., Khan W., Pamfil D., Petruța Cornea C., Irimia A., Popa, M. E. (2017). Comparative analysis of the composition and active property evaluation of certain essential oils to assess their potential applications in active food packaging. *Materials*, 10(1), 45.
70. Villegas-Sánchez, E., Macías-Alonso, M., 2021. Osegueda-Robles, S., Herrera-Isidró, L., Nuñez-Paleniús, H., González-Marrero, J. *In Vitro* Culture of *Rosmarinus officinalis* L. in a Temporary Immersion System: Influence of Two Phytohormones on Plant Growth and Carnosol Production *Pharmaceuticals (Basel)*. 14(8): 747
71. Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem. Toxicol.* 48: 3144–3152.

Szerzők:

Csabai Judit (levelező szerző) – PhD, főiskolai docens, Nyíregyházi Egyetem. Műszaki és agrártudományi Intézet, 4400. Nyíregyháza, Sóstói út 31/b.

Angela Kolesnyk- PhD, egyetemi docens, Ungvári Nemzeti Egyetem, Genetikai, Növényélettani és Mikrobiológiai Tanszék 88000 Ungvár, Narodna tér 3.

Maryna Kryvtsova- PhD, egyetemi tanár, Ungvári Nemzeti Egyetem. Genetikai, Növényélettani és Mikrobiológiai Tanszék 88000. Ungvár. Narodna tér 3.

Ivan Salamon- PhD, egyetemi tanár, Ökológiai Intézet, Eperjesi Egyetem. Bölcsészettudományi és Természettudományi Kar, SK-081 16 Presov, Szlovákia, November 1. utca.

Oleksandra Kolesnyk- PhD hallgató, Ungvári Nemzeti Egyetem. Genetikai, Növényélettani és Mikrobiológiai Tanszék, 88000 Ungvár Narodna tér 3.