

Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych

Halina Wysokińska, Aleksander Chmiel
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny, Łódź

Secondary metabolites production in cultures of transformed plant organs

Summary

Plant cell cultures *in vitro* produce secondary metabolites with varied effectiveness. Despite industrial application of only few cell suspension cultures, considerable progress in research on plant cell biotechnology has been made over the last few years. Transformed organ cultures, especially hairy roots, seem to be an interesting model for stable production of plant metabolites with high yield. In this paper, cultures of hairy roots of *Salvia sclarea*, *S. officinalis*, *S. miltiorrhiza*, *S. przewalskii*, and *Centaurium erythraea*, as well as transformed shoots and plants of *C. erythraea* are presented. Also, production of secondary metabolites in these cultures is discussed.

Key words:

plant cultures, transformed shoots, transformed roots, secondary metabolite production.

Adres do korespondencji

Halina Wysokińska,
Katedra Biologii
i Biotechnologii
Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź;
e-mail:
botanika@pharm.am.lodz.pl

1. Wstęp

Roślinne metabolity wtórne są szeroko wykorzystywane jako farmaceutyki, substancje zapachowe i aromatyzujące, barwniki, biopestycydy i dodatki do żywności. Szacuje się, że 25% leków stosowanych w krajach uprzemysłowionych zawiera związki, które bezpośrednio lub pośrednio (semisynteza) pochodzą z roślin (1). Metabolity wtórne są niskocząsteczkowymi związkami organicznymi o bardzo różnorodnej strukturze chemicznej. Nie

odgrywają one istotnej roli w podstawowych procesach życiowych roślin (wzrost, różnicowanie, rozmnażanie), ale mogą spełniać inne ważne funkcje, np. w interakcji roślina – środowisko. Liczba roślinnych metabolitów wtórnych szacowana jest na 100 000 (2) do 200 000 (3). Każdego roku wykrywa się około 1600 nowych związków (4), co jest zrozumiałe zważywszy, że znanych jest około 400 000 gatunków roślin wyższych, a dotychczas jedynie około 10% z nich zbadano fitochemicznie. Jeden tylko gatunek *Arabidopsis thaliana* może wytwarzać 5000 różnego typu metabolitów (5,6). Dla porównania, liczba poznanych metabolitów wtórnych syntetyzowanych przez drobnoustroje oceniana jest na ponad 20 000, a przez zwierzęta na około 2500 (7,8).

Metabolity roślinne pozyskiwane są najczęściej przez ekstrakcję z surowca roślinnego pochodzącego z uprawy. Jednak zawartość tych związków w roślinach jest zazwyczaj niska (często poniżej 1% suchej masy) i zmienna, uzależniona od warunków środowiska. Niedogodnością może być także ograniczona dostępność surowca roślinnego; w wielu przypadkach cenne związki pochodzą z roślin rzadko występujących, chronionych lub rosnących tylko w określonych warunkach klimatycznych. W konsekwencji może to prowadzić do niedoboru ważnych dla lecznictwa związków, takich jak np. artemizyna – substancja o działaniu przeciwmalarycznym wytwarzana przez *Artemisia annua* (bylica roczna) (9). Wszystkie te fakty przemawiają za wykorzystaniem do wytwarzania cennych metabolitów roślinnych metod biotechnologicznych. Do zalet tych metod należą m.in. kontrolowane warunki hodowli umożliwiające otrzymanie jednorodnego materiału roślinnego, uniezależnienie się od stref klimatycznych i pór roku, a także możliwość znacznego zwiększenia produktywności przez selekcję wysoko wydajnych linii lub elicytację. Nie bez znaczenia jest fakt, że kultury *in vitro* mogą syntetyzować nowe związki, nie wykryte dotychczas w świecie roślin. Gräther i Schneider (10) podają, że do połowy 1999 r. z kultur *in vitro* wyizolowano i określono strukturę 322 nowych związków, z których większość należy do terpenoidów (100), alkaloidów (72) i fenoli (144). Siedemnaście nowych taksanów wykryto w wyniku intensywnych badań fitochemicznych kultur *in vitro* roślin z rodzaju *Taxus* (10). Najwięcej nowych związków znaleziono w kulturach zawieszinowych, które są najczęściej wykorzystywanym modelem badawczym. Około 100 nowych związków wykryto w tkankach kalusowych, 30 w kulturach korzeni nietransformowanych, a 20 w kulturach korzeni transformowanych.

Dotychczas niewielki jest udział roślinnych kultur *in vitro* w produkcji metabolitów wtórnych na skalę przemysłową. Przykładem są podjęte pod koniec lat 80. XX w. przez japońską firmę Nitto Denko Corporation, próby otrzymywania ginsenydów z kultur zawieszinowych *Panax ginseng*, które doprowadziły do opracowania technologii realizowanej w bioreaktorach o pojemności 2 m³, a następnie 20 m³ (11). Innym przykładem jest przemysłowa produkcja paklitakselu w kulturach *Taxus* spp. W niemieckiej firmie Phytion Gesellschaft für Biotechnik mbH prowadzone były próby w bioreaktorach o pojemności 75 m³ (12). Brak jest potwierdzenia realizacji tej technologii. Tymczasem od kilku lat koreańska firma SamYang Genex Corp. ofe-

ruje jako produkt handlowy lek Genexol, zawierający paklitaksel z bioreaktorowych kultur zawiesinowych *Taxus* sp. (13).

Niewielkie wykorzystanie kultur *in vitro* do produkcji metabolitów wtórnych wynika m.in. z nie zawsze jeszcze wystarczającej ich wydajności, małej stabilności genetycznej i biochemicznej, co wymaga ciągłej selekcji i zwiększa koszty wytwarzania produktu. Na koszty procesu niekorzystnie wpływa również fakt, że komórki zwykle nie wydzielają pożądaných substancji do podłoża, lecz gromadzą je w wakuolach czy innych organellach, w wyniku czego potrzebne jest poddanie uzyskanej biomasy procesowi ekstrakcji (14). Niska wydajność lub brak zdolności do biosyntezy niektórych metabolitów w kulturach zawiesinowych ma często związek z brakiem zróżnicowanych struktur. Ten problem można wyeliminować stosując kultury organów.

Znaczny postęp w wykorzystaniu metod biotechnologicznych do wytwarzania metabolitów stał się możliwy pod koniec lat 80. XX w., kiedy otrzymano kultury genetycznie transformowanych organów. Kultury takie rosną szybciej i pozwalają osiągać znacznie wyższe przyrosty biomasy niż kultury organów nietransformowanych. Kultury organów transformowanych obejmują kultury pędów tzw. teratomy pędowe i kultury korzeni transformowanych, zwanych również włóśnikowatymi lub transgenicznymi.

2. Kultury transformowanych pędów

Kultury transformowanych pędów otrzymuje się w wyniku transformacji tkanek roślinnych niektórymi szczepami *Agrobacterium tumefaciens*. Najczęściej wykorzystywane są oktopinowe i nopalinowe szczepy z genem izopentylotransferazy (*gen ipt*) (15). Produkt tego genu zmienia w komórkach stosunek auksyn do cytokinin, w wyniku czego na eksplantatach powstaje tkanka tumorowa, z której regenerują się pędy. Ich morfologia jest zmieniona w porównaniu z pędami normalnymi; określa się je często mianem teratom pędowych. Dotychczas teratomy pędowe otrzymano dla niewielkiej liczby roślin; należą do nich m.in. przedstawiciele rodziny Solanaceae: *Atropa belladonna* i *Duboisia leichnardhi* x *D. myoporoides*. Obie kultury mają zdolność biokonwersji hioscyjminy w skopolaminę (16). Teratomy pędowe otrzymano również z *Pimpinella anisum* (17), *Mentha citrata*, *Coleus forskohlii*, *Nicotiana tabacum* (18) i *Artemisia annua* (19). Biosynteza metabolitów wtórnych w tych kulturach jest zróżnicowana. Teratomy pędowe *Solanum dulcamara* syntetyzują glikoalkaloidy w ilości 1% suchej masy, tj. 5 razy więcej niż roślina macierzysta (20).

W kulturze transformowanych pędów *A. annua* (19) wykryto ponad 0,06% artemizyny w przeliczeniu na suchą masę, podczas gdy hodowane *in vitro* pędy nietransformowane wytwarzają zaledwie 0,02% tego izoprenoidu. Jednakże obie te ilości są znacznie niższe niż w liściach rośliny macierzystej, które zawierają prawie 1% artemizyny (21).

3. Kultury transformowanych korzeni

Znacznie częściej niż teratomy pędowe dla wytwarzania metabolitów wtórnych wykorzystywane są kultury korzeni włośnikowatych. Korzenie te otrzymuje się w wyniku transformacji genetycznej szczepami *Agrobacterium rhizogenes*. Integracja z genomem komórki rośliny fragmentu plazmidu Ri (T-DNA) z komórki bakteryjnej i ekspresja zawartych w tym fragmencie DNA genów (m.in. rol genów a, b, c, d) prowadzi do powstania na eksplancie, w miejscu zakażenia, korzeni przybyszowych. Korzenie te po oddzieleniu od eksplantatu i eliminacji bakterii mogą rosnąć w kolbach lub różnego typu bioreaktorach, na stałym lub w płynnym podłożu bez dodatku regulatorów wzrostu. W przeciwieństwie do kultur komórkowych, kultury korzeni włośnikowych charakteryzują się znaczną stabilnością i mogą utrzymywać wydajną biosyntezę metabolitów podczas długotrwałego pasażowania (22). Produkcja metabolitów w tych kulturach jest zbliżona lub wyższa niż w korzeniach rośliny macierzystej. W tabeli 1 przedstawiono zebrane z ostatnich dziesięciu lat przykłady kultur korzeni transformowanych produkujących znaczne ilości metabolitów wtórnych.

Tabela 1

Przykłady wysoko produktywnych kultur korzeni transformowanych

Roślina	Szczep <i>A. rhizogenes</i>	Metabolity	Literatura
<i>Linum flavum</i>	LBA 9402, TR 105	koniferyna, 58 mg/g s.m.	(23)
<i>Lupinus mutabilis</i>	AR1601	izoflawony, 2× więcej niż korzenie nietransformowane	(24)
<i>Camptolbeca acuminata</i>	ATCC 15834, R-100	kamtotecyna, 1 mg/g s.m. hyroksykamtotecyna, 0,15 mg/g s.m.	(25)
<i>Solanum mauritanum</i>	LBA 9402	solasodyna, 184 µg/g s.m. 6× więcej niż korzenie rośliny macierzystej	(26)
<i>Pueraria phasoloides</i>	ATCC 15834	pueraryna, 1,19 mg/g s.m. (w kolbach) i 5,57 mg/g s.m. (w bioreaktorze) 5× więcej niż w korzeniach nietransformowanych	(27) (28)
<i>Tylophora indica</i>	A4	tyloforyna 2× więcej niż w korzeniach roślin nietransformowanych	(29)
<i>Physalis minima</i>	ATCC 15834	glukozyd solasodyny, 9,11 µg/ g s.m., 20× więcej niż korzenie i 3× więcej niż liście	(30)
<i>Ocimum basilicum</i>	MAFF 03-01724	kwas rozmarynowy, 14% s.m. 3,5× więcej niż liście	(31)
<i>Valerianella lacustris</i>	A4, ATCC 15834	walepotriaty (po elicytacji MeJA), 50× więcej niż w roślinie	(32)
<i>Ambrosia maritima</i>	ATCC 15834	poliacetyleny, 9,6× więcej niż w kulturze zawieszinowej	(33)

4. Prace własne

Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach korzeni transformowanych jest również przedmiotem badań w naszej Katedrze. Spośród otrzymanych dotychczas kultur (tab. 2) omówione zostaną kultury badane w ostatnich latach.

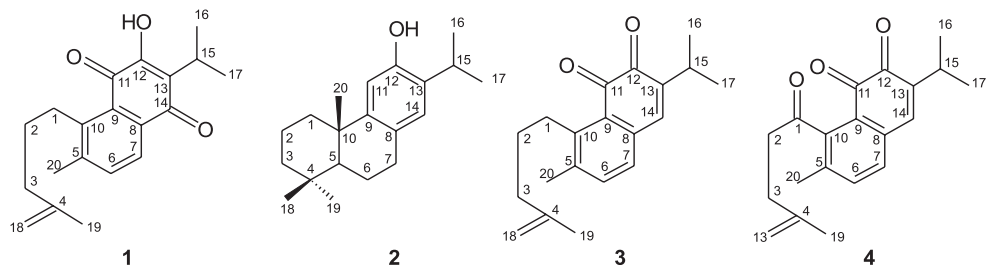
Tabela 2

Kultury korzeni transformowanych otrzymane w Katedrze Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej

Gatunek	Rodzina	Szczep <i>A. rhizogenes</i>	Metabolity
<i>Catalpa ovata</i>	Bignoniaceae	LBA 9402	werbaskozyd, izowerbaskozyd
<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	LBA 9402	kwask rozmarynowy
<i>Paulownia tomentosa</i>	Bignoniaceae	LBA 9402	werbaskozyd
<i>Arnica montana</i>	Asteraceae	LBA 9402	pochodne tymolu, olejek eteryczny, kwas chlorogenowy
<i>Salvia sclarea</i>	Lamiaceae	LBA 9402	diterpeny, triterpeny, sterole, kwas rozmarynowy, tanszinony
<i>S. officinalis</i>	Lamiaceae	A4, ATCC 15834	
<i>S. multiorbiza</i>	Lamiaceae	A4	
<i>S. przewalskii</i>	Lamiaceae	A4	
<i>Centaurium erythraea</i>	Gentianaceae	LBA 9402	glikozydy sekoirydoidowe

4.1. Korzenie transformowane *S. sclarea*

Korzenie transformowane *S. sclarea* (szałwia muszkatołowa) otrzymano po zakażeniu wyhodowanych *in vitro* pędów szczepem *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 (34). Kultury prowadzono w płynnym podłożu 1/2B5 (podłoże wg Gamborga, ze zmniejszoną do połowy zawartością makro- i mikroelementów) uzupełnionym sacharozą (30 g/l), w kolbach Erlenmeyera, w ciemności i na świetle (40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Z tych kultur wyizolowano cztery abitanowe diterpeny, które zidentyfikowano jako: salwipison, ferruginol, etiopinon i 1-ketoetiopinon (rys. 1). Wykazano, że kultury korzeni prowadzone na świetle wytwarzają 2,4 razy więcej diterpenów (25,37 mg/g s.m.) niż korzenie hodowane w ciemności (10,9 mg/g s. m.). W tych pierwszych zawartość diterpenów była 11-krotnie wyższa niż w kulturach korzeni nietransformowanych i 8 razy wyższa niż w korzeniach rośliny macierzystej. Dodatkowo korzenie włośnikowate hodowane na świetle osiągają maksymalny poziom diterpenów 30. dnia cyklu wzrostu, czyli o 5 dni szybciej niż korzenie prowadzone w ciemności (34).



Rys. 1. Diterpeny w kulturze korzeni transformowanych *S. sclarea*: 1) salwipison (12-hydroksy-4,5-seko-5,10-friedo-4(18),5(10),6,8,12-abietapentaen-11,14-dion), 2) ferruginol (12-hydroksyabietapentaen-8,11,13-trien), 3) etiopinon (4,5-seko-5,10-friedo-abieta-4(18),5,6,8,13-pentaen-11,12-dion), 4) 1-keto-etioopinon (1-keto-4,5-seko-5,10-friedo-abieta-4(18),5,6,8,13-pentaen-11,12-dion).

Wpływ światła na produkcję metabolitów w kulturach korzeni transformowanych był obserwowany przez wielu badaczy. Światło stymulowało np. wytwarzanie steroidowych saponin (akuleatyzydu A i B) w kulturach korzeni włośnikowatych *Solanum aculeatissimum* (35) i zwiększało produkcję solasodyny (aglikon glikoalkaloidów wykorzystywany do półsyntezy hormonów płciowych i kortykosteroidów) w kulturach korzeni transformowanych *Solanum khasianum* (36). Jednakże Argolo i wsp. (37) stwierdzili, że rosnące w ciemności kultury korzeni włośnikowatych *Solanum aviculare* akumulują 4,2 razy więcej solasodyny w porównaniu z kulturami hodowanymi na świetle. Wysoka produkcja diterpenów w prowadzonych na świetle korzeniach włośnikowatych *S. sclarea* ma prawdopodobnie związek z obecnością chloroplastów, które przez wielu autorów proponowane są jako miejsce biosyntezy tego typu związków (38). Dominującym diterpenem w korzeniach transformowanych *S. sclarea* jest etiopinon, którego zawartość w kulturach prowadzonych na świetle i w ciemności stanowi, odpowiednio, 45 i 37% sumy diterpenów. Jest to ważne biorąc pod uwagę wyniki badań biologicznych, na podstawie których wykazano, że etiopinon charakteryzuje się znaczną aktywnością przeciwbakteryjną (39,40) i udowodnioną w badaniach *in vitro* aktywnością cytotoksyczną (40) oraz zdolnością do indukcji apoptozy (41). Inny diterpen o działaniu bakteriostatycznym i bakteriobójczym wobec niektórych bakterii gramdodatnich – salwipison (39), wytwarzany jest w kulturach korzeni transformowanych w znacznie niższych ilościach (3,1 mg/g s. m. w korzeniach hodowanych na świetle i 2,5 mg/g s. m. w kulturach rosnących w ciemności).

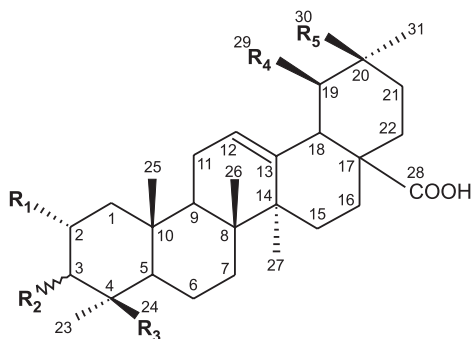
Kultury korzeni transformowanych *S. sclarea* prowadzono również w 10-litrowym bioreaktorze aeroponicznym (fot. 1). Po 30. dniach hodowli obserwowano 16-krotny przyrost świeżej i 14-krotny suchej masy w stosunku do inokulatu. Okazało się jednak, że te warunki nie sprzyjają wytwarzaniu diterpenów, których zawartość była 2,2 raza niższa niż w korzeniach rosnących w kolbach Erlenmeyera.

Z korzeni transformowanych *S. sclarea* oprócz diterpenów wyizolowano jeszcze dwa pentacykliczne triterpeny, di- i trihydroksypochodne kwasu ursolowego: kwas



Fot. 1. Korzenie transformowane *S. sclarea* w bioreaktorze.

2α , 3α -dihydroksyursolowy i kwas 2α , 3α , 24-trihydroksyursolowy (rys. 2). Pierwszy z nich wyizolowano z korzeni hodowanych na świetle, drugi produkują korzenie prowadzone w ciemności. W obu kulturach, metodą GC-MS, wykryto kwas ursolowy i kwas oleanolowy oraz trzy sterole (β -sitosterol, stigmasterol i kampesterol (34).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	H	βOH	CH ₃	CH ₃	H
2	H	βOH	CH ₃	H	CH ₃
3	αOH	αOH	CH ₃	CH ₃	H
4	αOH	αOH	CH ₂ OH	CH ₃	H

Rys. 2. Metabolity triterpenowe w kulturze korzeni transformowanych *S. sclarea*: 1) kwas ursolowy, 2) kwas oleanolowy, 3) kwas 2α,3α-dihydrokso-urs-12-en-28-owy, 4) kwas 2α,3α,24-trihydrokso-urs-12-en-28-owy.

4.2. Korzenie transformowane *S. miltiorrhiza* i *S. przewalskii*

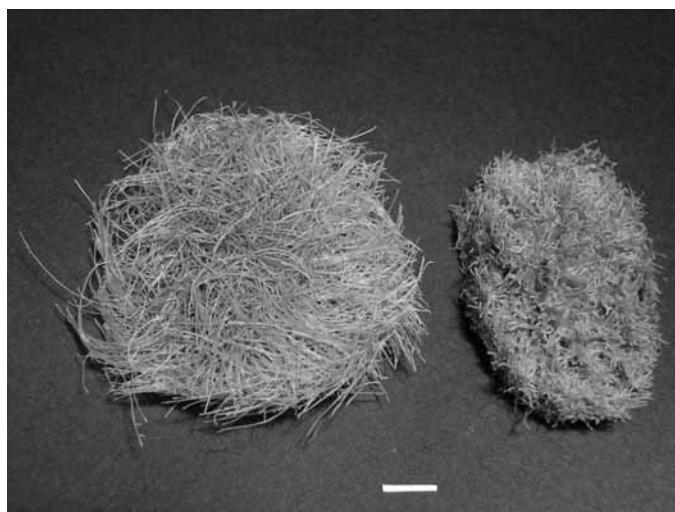
Salvia miltiorrhiza (szałwia czerwonekorzeniowa) jest ważną rośliną leczniczą wykorzystywaną głównie w Azji. Surowcem są korzenie tej rośliny, a głównymi składnikami diterpeny, typu abietanu, z ugrupowaniem fantrenochinonowym, zwane tanszynonami. Diterpeny te stosowane są głównie w chorobach układu krążenia. Stwierdzono, że korzenie szalwii czerwonekorzeniowej transformowane szczepem *A. rhizogenes* A4, i hodowane w ciemności, w płynnym podłożu 1/2B5 wytwarzają cztery tanszinony: tanszinon I, tanszinon IIA, kryptotanszinon i dihydrokryptotanszinon. Suma tych diterpenów wynosiła prawie 18 mg w przeliczeniu na gram suchej masy i była zbliżona do zawartości tych związków w korzeniach 2-letnich roślin rosnących w gruncie (16,2 mg/g s.m.) i aż 5-krotnie wyższa niż w kulturze korzeni nietransformowanych (3,7 mg/g s.m.), hodowanych również w podłożu 1/2B5, ale z dodatkiem auksyny (IAA 0,1 mg/l). W kulturze korzeni transformowanych *S. miltiorrhiza* dominował kryptotanszinon, którego zawartość wynosiła 5,8 mg/g s.m., czyli była dwukrotnie wyższa od zawartości tego diterpeny w korzeniach rośliny macierzystej (2,6 mg/g s.m.).

Tanszinony wytwarzane są również w korzeniach roślin z gatunku *S. przewalskii* (szałwia przewalskiego). Jest to endemit występujący w południowo-wschodnich Chinach. Jednakże otrzymane po transformacji szczepem *A. rhizogenes* A4, korzenie włóśnikowate tej rośliny wytwarzają jedynie niewielkie ilości diterpenów; suma tanszinonu IA, tanszinonu IIA, kryptotanszinonu i dihydrotanszinonu wynosiła ok.

4 mg/g s.m. i była prawie 4-krotnie niższa niż w korzeniach 2-letnich roślin rosnących w gruncie. Niska zawartość diterpenów może mieć związek z morfologią i stadium rozwojowym hodowanych *in vitro* korzeni; były one cienkie, żółtawe o budowie pierwotnej. Natomiast na podstawie obserwacji z korzeniami zebranymi z roślin hodowanych w gruncie wykazano, że miejscem akumulacji tanszynonów jest głównie zewnętrzna skorkowiała część korowa korzenia.

4.3. Korzenie transformowane *S. officinalis*

Korzenie transformowane *S. officinalis* (szałwia lekarska) otrzymano w wyniku zakażenia pędów bakteriami *A. rhizogenes* A4 i ATCC15834. Uzyskano ok. 10 klonów, które charakteryzowały się szybkim wzrostem w podłożu Lloyd'a i McCowna. Stwierdzono, że korzenie te są dobrym źródłem kwasu rozmarynowego (depsyd kwasu kawowego i α -hydroksydihydrokawowego), związku o działaniu przeciwutleniającym, przeciwzapalnym i antywirusowym. Produkcja kwasu rozmarynowego wahała się od 16 do 33 mg/g suchej masy. Najbardziej produktywny klon wytwarzał dwa razy więcej tego związku niż kultury korzeni nietransformowanych (19 mg/g s.m.). Zawartość kwasu rozmarynowego zależała od szczepu *Agrobacterium* użytego do transformacji i analizowanego klonu (42). Stwierdzono, że klony uzyskane w wyniku transformacji szczepem ATCC 15834 wytwarzają więcej kwasu rozmarynowego niż klony transformowane szczepem A4. Rodzaj użytego szczepu wpływał również na wzrost i morfologię korzeni (fot. 2).



ATCC

A4

Fot. 2. Wygląd korzeni włóknistych *S. officinalis*, otrzymanych po transformacji szczepami *A. rhizogenes* ATCC15834 i A4; skala = 1 cm.

Zależność między produkcją metabolitów wtórnych a rodzajem szczepu bakteryjnego była już wcześniej obserwowana w kulturach korzeni transformowanych *Hyoscyamus albus* (43). W naszych badaniach wykazano również różnice w biosyntezie kwasu rozmarynowego między klonami zapoczątkowanymi tym samym szczepem *Agrobacterium*. Mogą one wynikać z różnic w wielkości i lokalizacji fragmentów T-DNA zintegrowanych z genomem komórki roślinnej (44,45). Nie zaobserwowano natomiast istotnego wpływu warunków hodowli (światło, ciemność) na wytwarzanie kwasu rozmarynowego w kulturach korzeni transformowanych *S. officinalis*.

4.4. Korzenie i pędy transformowane *C. erythraea*

Centaureum erythraea (tysiącchnik pospolity) jest znany z biosyntezy m.in. glikozydów sekoirydoidowych, głównie gentiopikrozydu, swerozydu i swertiamaryny. Związki te wykazują działanie przeciwrzybowe, przeciwbakteryjne, żółciopędne i hepatochronne (46). Stosowane są również w przemyśle spożywczym, jako składniki likierów i napojów energetyzujących. W korzeniach transformowanych *C. erythraea* rosnących w ciągu 4 tygodni w płynnym podłożu Lloyd'a i McCowna (z sacharozą 30g/l) znaleziono 10-14 mg/g s.m. gentiopikrozydu, swerozydu i swertiamaryny (47). Wśród nich dominował gentiopikrozyd, który stanowił 80% sumy wykrytych sekoirydoidów. W porównaniu z korzeniami roślin rosnących w gruncie zawartość sekoirydoidów w kulturach korzeni włośnikowatych była 2-krotnie wyższa, ale znacznie niższa niż w pędach rośliny, które są głównym miejscem akumulacji tego typu związków. W preparacie handlowym *Centaurii herba*, który zawierał kwitnące pędy tysiącznika wykryto ok. 37 mg glikozydów sekoirydoidowych w przeliczeniu na 1 g suchego surowca.

Zdolność korzeni włośnikowatych *C. erythraea* do organogenezy i regeneracji pąków wykorzystano aby otrzymać kultury transgenicznych pędów. Kultury tych pędów hodowane na stałym lub w płynnym podłożu Murashige i Skooga uzupełnionym IAA (0,1 mg/l) i BAP (1 mg/l) wytwarzały 34-48 mg/g s.m. gentiopikrozydu, swerozydu i swertiamaryny. Podobnie jak w korzeniach, przeważał gentiopikrozyd (65% sumy sekoirydoidów), chociaż w pędach rosnących *in vivo* zawsze dominuje swertiamaryna. Dalsze zwiększenie zawartości sekoirydoidów otrzymano po regeneracji całych transgenicznych roślin. Rośliny te różniły się morfologicznie od roślin nie-transformowanych (syndrom włośnikowatości). Różnice dotyczyły liczby rozgałęzień pędu, morfologii liści i systemu korzeniowego oraz budowy kwiatostanów (krótsze, bardziej rozgałęzione, z większą liczbą pąków kwiatowych). Najwięcej sekoirydoidów wytwarzają 10-tygodniowe rośliny rosnące w doniczkach (tab. 3). Wykryto w nich 280 mg/g s.m. gentiopikrozydu, swerozydu i swertiamaryny, czyli ponad 7-krotnie więcej niż w surowcu *Centaurii herba*.

Tabela 3

Zawartość sekoirydoidów w kulturach transgenicznych organów i zregenerowanych z nich roślinach *Centaurium erythraea*

Materiał roślinny	Zawartość sekoirydoidów (mg/g s.m.)			
	gentiopikoryzyd	swerozyd	swetiamaryna	suma
kultury korzeni*:				
K4M	6,2	śląd	2,5	8,7
K18	11,6	śląd	2,5	14,1
kultury pędów**:				
na podłożu stałym	31,0	12,0	5,5	48,5
w podłożu płynnym	25,5	5,5	2,7	33,7
rośliny***:				
pędy 10-tygodniowe	51,5	31,3	107,3	190,1
pędy 20-tygodniowe	7,6	1,1	26,1	34,8
korzenie 10-tygodniowe	79,1	6,5	4,8	90,4
Preparat handlowy****	4,4	2,4	30,7	37,4

* korzenie hodowano w ciągu 4 tygodni w płynnym podłożu Lloyda i McCowna w ciemności,

** pędy hodowano w ciągu 4 tygodni w podłożu Murashige i Skooga uzupełnionym IAA (0,1 mg/l) i BAP (1 mg/l),

*** transformowane rośliny rosły w glebie w warunkach szklarniowych,

**** wysuszone ziele *Centaurii herba*.

W pędach roślin transgenicznych, podobnie jak w pędach roślin nietransformowanych rosnących w gruncie przeważała swetiamaryna. Istotne różnice w poziomie sekoirydoidów zaobserwowano między korzeniami roślin transformowanych rosnących w glebie a korzeniami transformowanymi hodowanymi w warunkach *in vitro*. Te pierwsze wytwarzają 6-9-krotnie więcej sekoirydoidów niż te drugie (tab. 3). Na podstawie przedstawionych wyników dowodzi się, że transformacja za pomocą *A. rhizogenes* zwiększa biosyntezę glikozydów sekoirydoidowych, natomiast nie wywołuje zmian w ilościowym stosunku poszczególnych sekoirydoidów. W korzeniach roślin transformowanych i nietransformowanych dominuje gentiopikrozyd, a w pędach swetiamaryna.

Praca wykonana w ramach zamawianego projektu badawczego PBZ-KBN-092/PO5/2003.

Literatura

1. Payne G. F., Bringi V., Prince C., Shuler M. L., (1991), *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System*, Eds. S Payne G. F., Bringi V., Prince C., Shuler M. L., 1-10, Hasner.
2. Oksman-Caldentey K. M., Inze D., (2004), *Trends Plant Sci.*, 9, 433-440.
3. Dixon R. A., Strack D., (2003), *Phytochemistry*, 62, 815-816.
4. Sajc L., Grubisic D., Novakovic G. V., (2000), *Biochem. Eng. J.*, 4, 89-99.

5. von Roepenack-Lahaye E., Degenkolb T., Zerjeski M., Franz M., Roth U., Wessjohann L., Schmidt J., Schell D., Clemens S., (2004), *Plant Physiol.*, 134, 548-559.
6. Facchini P. J., Bird D. A., St-Pierre B., (2004), *Trends Plant Sci.*, 9,116-122.
7. Berdy J., (2005), *J. Antibiol.*, 58, 1-26.
8. Oksman-Caldentey K. M., Saito K., (2005), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16, 174-179.
9. Cyranoski D., (2004), *Nature*, 432, 259.
10. Gräther O., Schneider B., (2001), *Progress in Botany*, 62, 266-304.
11. Vansree M., Chen-Yue L., Shu-Fung L., Satiish M., N., Chien Y., L., Hsin-Sheng T., (2004), *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 45, 1-22.
12. Doran P. M., (1993), *Adv. Biochem. Engin.*, 98, 115.
13. <http://www.genexol.com/eng/>
14. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gonteir E., (2001), *Plant Sci.*, 161, 839-851.
15. Floryanowicz-Czekalska K., Wysokińska H., (2000), *Acta Soc. Bot. Polon.*, 69, 131-136.
16. Subroto M. A., Hamill J. D., Doron P. M., (1996), *J. Biotechnol.*, 45, 45-57.
17. Salem K. M., Charlwood B. V., (1995), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 40, 209-215.
18. Jha S., (1995), *Proc. Indian. Natn. Sci. Acad.*, 61, 63-72.
19. Ghosh B., Mukherjee S., Jha S., (1997), *Plant Sci.*, 122, 193-199.
20. Ehmke A., Ohmstede D., Eilert U., (1995), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 43, 191-197.
21. Paniego W. B., Giulietti A. M., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 526-530.
22. Wysokińska H., Chmiel A., (1997), *Acta Biotechnol.*, 17, 131-159.
23. Lin H., Kwok K. H., Doran P. M., (2003), *Biotechnology Lett.*, 25, 521-525.
24. Babaoglu M., Davey M. R., Power J. B., Sporer F., Wink M., (2004), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 78, 29-36.
25. Lorence A., Medina-Bolivar F., Nessler C. L., (2004), *Plant Cell Rep.*, 22, 437-441.
26. Drews F. E., von Staden J., (1995), *Plant Growth Regulation*, 17, 27-31.
27. Shi H. P., Kintzios S., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 1103-1107.
28. Kintzios S., Makri O., Pistola E., Matakadiadis T., Shi H. P., Economou A., (2004), *Biotechnology Lett.*, 26, 1057-1059.
29. Chaudhuri K. N., Ghosh B., Tepfer D., Jha S., (2005), *Plant Cell Rep.*, 24, 25-35.
30. Putalin W., Prasarnsiwamai P., Tanaka H., Shoyama Y., (2004), *Biotechnology Lett.*, 26, 545-548.
31. Tada H., Murakami Y., Omoto T., Shimomura K., Ishimaru K., (1996), *Phytochemistry*, 42, 431-434.
32. Kittipongpatana N., Davis D. L., Potter J. R., (2002), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 71, 65-75.
33. Zid S. A., Orihara Y., (2005), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 81, 65-75.
34. Kuźma Ł., Skrzypek Z., Wysokińska H., (2006), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 84, 152-160.
35. Ikenaga T., Oyama T., Maranaka T., (1995), *Plant Cell Rep.*, 14, 413-417.
36. Jacob A., Malpathak W., (2004), *Current Science*, 87, 1442-1447.
37. Argolo A. C., Charlwood B. V., Pletsch M., (2000), *Planta Med.*, 66, 448-451.
38. McGarvey D. J., Croteau R., (1995), *Plant Cell*, 7, 1015-1026.
39. Kuźma Ł., Różalski M., Walencka E., Różalska B., Wysokińska H., (2006), *Phytomed.*, (w druku).
40. Hernandez-Perez M., Rabanal R. M., Arias A., de la Torre M. C., Rodriguez B., (1997), *Pharm. Biol.*, 37, 1-6.
41. Różalski M., Kuźma Ł., Krajewska U., Wysokińska H., (2006), *Z. Naturforsch.*, 61c, 483-488.
42. Grzegorzczak I., Królicka A., Wysokińska H., (2006), *Z. Naturforsch.*, 61c, 351-356.
43. Zehra M., Benerjee S., Sharma S., Kumor S., (1999), *Planta Med.*, 65, 60-63.
44. Mano Y., Nabeshima S., Matsui C., Ohkawa H., (1986), *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2715-2722.
45. Batra J., Dutta A., Singh D., Kumar S., Sen J., (2004), *Plant Cell Rep.*, 23, 148-154.
46. Kumarasamy Y., Nahar L., Cox P. J., Jaspars M., Saker S. D., (2003), *Phytomed.*, 10, 344-347.
47. Piątczak E., Królicka A., Wysokińska H., (2006), *Plant Cell Rep.*, (w druku).