

## 1. Wprowadzenie

Poszukiwania nowych, wydajnych źródeł związków chemicznych o cennych właściwościach leczniczych doprowadziły w ostatnich latach do rozwoju badań nad kulturami *in vitro* korzeni transformowanych. Z punktu widzenia otrzymywania związków chemicznych korzenie te mają dwie istotne właściwości: charakteryzują się szybkim przyrostem biomasy i utrzymującą się na stałym poziomie syntezą metabolitów wtórnych. Cechy te różnią kultury korzeni transformowanych od większości kultur komórkowych, w których wydajność wytwarzania pożądaných substancji ulega w wyniku zmian genetycznych i epigenetycznych, znacznym wahaniom i zmniejsza się w miarę pasażowania.

Korzenie transformowane, zwane – z powodu swego wyglądu – korzeniami włośnikowatymi, rozwijają się w wyniku zakażenia roślin lub ich fragmentów bakteriami gatunku *Agrobacterium rhizogenes*. Do genomu komórki roślinnej trwale wbudowuje się fragment DNA (T-DNA) z bakteryjnego plazmidu Ri (*root inducing plasmid*). Wskutek tej integracji zmianie ulega metabolizm komórki, co prowadzi do rozwoju korzeni włośnikowatych, które *in vitro* rosną na pożywkach bez regulatorów wzrostu. Budowa plazmidu Ri i funkcja występujących w nim genów były przedmiotem licznych badań, które przedstawili Zambryski i in. (1) oraz Gelvin (2). Otrzymano kultury korzeni włośnikowatych wielu gatunków roślin dwuliściennych (3,4) i badano w nich wytwarzanie wtórnych metabolitów należących do różnych grup chemicznych (tab. 1). W przypadku roślin leczniczych najwięcej prac dotyczyło tworzenia się alkaloidów tropanowych w transfor-

Tabela 1

Wtórne metabolity w transformowanych korzeniach roślin leczniczych i innych

Rodzina	Gatunek	Główne metabolity wtórne	Literatura
1	2	3	4
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i>	ajmalicyna, serpentyna, windolina, katarantyna	(12)
	<i>C. roseus</i>	–	(38)
	<i>C. roseus</i>	ajmalicyna, katarantyna	(39)
	<i>C. trichophyllus</i>	zespół 17 alkaloidów	(29)
Araliaceae	<i>Panax ginseng</i>	ginsenozydy	(40)
Boraginaceae	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	szikonina	(28)
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	betacyjanina, betaksantyna	(27)
Compositae	<i>Ambrosia</i> sp.	poliacetyleny	(4)
	<i>Bidens</i> sp.	poliacetyleny	(4)
	<i>Carthamus</i> sp.	poliacetyleny	(4)
	<i>Chaenactis douglasii</i>	tiarubryna	(20)
	<i>Echinacea purpurea</i>	alkaminy	(10)

cd. tab. 1

1	2	3	4
Compositae	<i>Rudbeckia</i> sp.	poliacetyleny	(4)
	<i>Tagetes</i> sp.	poliacetyleny	(4)
	<i>T. patula</i>	$\alpha$ -tertienyl	(41)
	<i>T. patula</i>	tiofeny	(31)
Convolvulaceae	<i>Calystegia sepium</i>	kuskohygryna	(18)
Gentianaceae	<i>Swertia japonica</i>	pochodne ksantonu, sekoirydoidy	(42)
Lobeliaceae	<i>Lobelia inflata</i>	lobelina	(43)
Papilionaceae	<i>Astragalus</i> sp.	polisacharydy	(44)
Polygonaceae	<i>Polygonum aviculare</i>	-	(3)
	<i>Polygonum hydropiper</i>	-	(3)
	<i>Rheum palmatum</i>	-	(3)
Rubiaceae	<i>Cinchona ledgeriana</i>	alkaloidy chinolinowe	(17)
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i>	-	(45)
Solaneaceae	<i>Atropa belladonna</i>	atropina	(14)
	<i>A. belladonna</i>	atropina, hioscyjamina	(18)
	<i>Datura candida</i>	skopolamina	(13,46)
	<i>D. innoxia</i>	hioscyjamina, skopolamina	(47)
	<i>D. innoxia</i>	-	(21)
	<i>D. stramonium</i>	hioscyjamina	(11)
	<i>D. stramonium</i>	skopolamina	(25)
	<i>Duboisia leichhardtii</i>	skopolamina, hioscyjamina	(15)
	<i>D. myoporoides</i>	hioscyjamina, skopolamina	(19)
	<i>D. myoporoides</i>	skopolamina	(26)
	<i>Hyoscyamus muticus</i>	hioscyjamina	(48)
	<i>Hyoscyamus niger</i>	hioscyjamina	(25)
	<i>Nicotiana africana</i>	nikotyna	(23)
	<i>N. cavicola</i>	nornikotyna, nikotyna	(23)
	<i>N. hesperis</i>	nikotyna	(23)
	<i>N. rustica</i>	nikotyna	(23)
	<i>N. rustica</i>	nikotyna	(27)
	<i>N. rustica</i>	nikotyna	(49)
	<i>N. tabacum</i>	nikotyna	(23)
	<i>N. umbratica</i>	nikotyna, nornikotyna	(23)
	<i>N. velutina</i>	nornikotyna, nikotyna	(23)
	<i>Scopolia anomala</i>	-	(4)
	<i>Scopolia japonica</i>	skopolamina, hioscyjamina	(24)
<i>Solanum laciniatum</i>	alkaloidy steroidowe	(17)	
Umbelliferae	<i>Coriandrum sativum</i>	-	(3)
	<i>Foeniculum vulgare</i>	-	(3)
	<i>Pimpinella anisum</i>	-	(3)
Verbenaceae	<i>Lippia dulcis</i>	hernandulcyna, monoterpeny	(22)

- badania wtórnych metabolitów nie były prowadzone.

mowanych korzeniach roślin z rodziny *Solanaceae*, w której korzenie są głównym miejscem syntezy tych związków (5). Okazały się one także dogodnym materiałem w badaniach biosyntezy alkaloidów (6,7,8). Otrzymano kultury korzeni włośnikowatych licznych gatunków z rodziny *Compositae*, w których badano przede wszystkim tworzenie się poliacetylenów. Niektóre z tych związków wykazują silne działanie przeciw bakteriom, grzybom oraz nicieniom (4).

## 2. Wytwarzanie i rozwój korzeni transformowanych

W celu otrzymania kultury korzeni włośnikowatych zakaża się różne części roślin zawieszoną bakterii. Jako eksplantaty stosowane są wysterylizowane liście, ogonki liściowe, fragmenty łodyg pobrane z roślin rosnących w gruncie lub części roślin wyrosłych z nasion w warunkach sterylnych. Można również zakażać protoplasty i komórki w hodowli zawiesinowej oraz kalus. Korzenie wyrastają zwykle w ciągu 1–4 tygodni, bezpośrednio w miejscu zakażenia. Pojawienie się korzeni może być poprzedzone rozwojem kalusa. W celu usunięcia bakterii wytworzone korzenie oddziela się od eksplantatu i kilkakrotnie pasażuje na pożywkę z antybiotykiem. Najczęściej stosuje się ampicylinę, cefotaksym i karbenicylinę. Kultury korzeni transformowanych prowadzone są na pożywkach stałych lub płynnych w kolbach umieszczanych na wstrząsarkach, bądź w fermentorach.

Zdolność wytwarzania korzeni włośnikowatych zależy od gatunku, wieku rośliny i eksplantatu, stopnia zróżnicowania tkanek oraz użytego szczepu *A. rhizogenes*. W młodych roślinach *Nicotiana tabacum*, np. wszystkie tkanki pędu zdolne były do wytwarzania transformowanych korzeni. Natomiast, w przypadku roślin dorosłych, korzenie te rozwijały się tylko z komórek miążgi (9). Transformowane korzenie *Echinacea purpurea* otrzymywano jedynie w wyniku zakażenia hypokotyli młodych, etiolowanych siewek. Próby zakażenia starszych roślin nie powiodły się (10).

W kulturze *in vitro* korzenie transformowane rosną zwykle znacznie szybciej niż korzenie normalne. Na przykład włośnikowate korzenie *Datura stramonium* rosły 15 razy szybciej niż korzenie normalne i ich masa zwiększała się 55-krotnie w ciągu miesiąca (11). W kulturach transformowanych korzeni *Catharanthus roseus* i *Datura candida* w ciągu miesiąca następował 20-krotny przyrost masy (12,13). W kulturach *Atropa belladonna* i *Duboisia leichhardtii* (14,15) wskaźnik ten wynosił około 60. Bardzo szybko rosły transformowane korzenie *Hyoscyamus muticus*. Ich masa zwiększała się 2500–5000 razy w ciągu trzech tygodni (16). Na szybkość wzrostu korzeni transformowanych wpływa wiele czynników: rodzaj eksplantatu, szczep *A. rhizogenes*, skład i pH pożywki, wielkość początkowego inokulum, szybkość wstrząsania i napowietrzanie pożywki (11,12,15,17,18). Korzenie transformowane rosną bez dodatku regulatorów wzrostu, ale ich dodanie może w różny sposób wpływać na rozwój hodowli; przyspieszać lub hamować wzrost korzeni lub powodować rozwój tkanki kalusowej (19,20,21,22).

## 3. Biosynteza metabolitów wtórnych

Zawartość wtórnych metabolitów w korzeniach włośnikowatych jest zwykle porównywalna z zawartością tych związków w korzeniach roślin macierzystych, rosnących w gruncie, bywa jednak i tak, że występują różnice natury ilościowej i jakościowej (tab. 2). Eksplantaty do założenia kultury powinny pochodzić z wyselekcjonowanych roślin o wysokiej zawartości metabolitów wtórnych (20,23). Zakażając jedną roślinę można uzyskać wiele klonów korzeni transformowanych, wyprowadzonych z pojedynczych korzeni. Klony te mogą różnić się między sobą szybkością wzrostu, produkcją opin oraz składem jakościowym i ilościowym metabolitów wtórnych. Śśród 29 klonów *Scopolia japonica* wyselekcjonowano klon o wysokiej zawartości skopolaminy (0,5% suchej masy) i klon o wysokiej zawartości hioscyjminy (1,3% suchej masy) (24). Klony transformowanych korzeni *Datura stramonium* uzyskane w wyniku zakażenia jednej

siewki różniły się zawartością skopolaminy (ilości śladowe do 0,56%) (25). Mano i in. (15) badali 45 klonów transformowanych korzeni *Duboisia leichhardtii*. Wyselekcjonowali oni szybko rosnący klon, w którym zawartość skopolaminy wynosiła 1,8% i była dwukrotnie większa niż w liściach, które stanowią surowiec do izolacji tego związku. Autorzy (l.c.) przypuszczają, że przyczyną różnic między klonami może być różna liczba i wielkość fragmentów t-DNA i miejsce ich wbudowania się do genomu komórki roślinnej.

Tabela 2

**Porównanie zawartości wtórnych metabolitów w korzeniach roślin z gruntu oraz w korzeniach normalnych i transformowanych z kultur *in vitro***

Gatunek	Substancja	Zawartość substancji (%)			Literatura
		korzenie roślin z gruntu	korzenie normalne <i>in vitro</i>	korzenie transformowane <i>in vitro</i>	
<i>Atropa belladonna</i>	atropina	0,34	0,031	0,371	(14)
	skopolamina	0,008	ślady	0,024	
<i>Atropa belladonna</i>	suma alkaloidów	0,38	0,80	1,32	(18)
<i>Calystegia sepium</i>	suma alkaloidów	0,03	0,25	0,30	(18)
<i>Chaenactis douglasii</i>	tiarubryna A	0,0051	tak jak w korzeniach roślin z gruntu	0,0097	(20)
	tiarubryna B	0,0018		0,0050	
<i>Duboisia myoporoides</i>	skopolamina	–	0,70	0,15	(19)
	hioscyjamina		0,26	0,86	
<i>Lippia dulcis</i>	hernandulcyna	0	0	0,00025	(22)
<i>Panax ginseng</i>	ginsenozydy	0,4	0,91	0,95	(40)
<i>Tagetes patula</i>	$\alpha$ -tertienyl	0,0001	0,000016	0,001268	(41)

Na zawartość metabolitów wtórnych w korzeniach ma również wpływ skład pożywki podstawowej oraz dodatek prekursorów (15,26). Metabolity mogą gromadzić się w korzeniach lub wydzielać się do pożywki, jak na przykład alkaloidy *Nicotiana rustica* (27) oraz szikonina wytwarzana przez korzenie transformowane *Lithospermum erythrorhizon*, co umożliwiło otrzymanie tego związku w sposób ciągły w czasie 220 dni kultury w fermentorze o pojemności 2 l (28). W fermentorach różnej pojemności (2–30 l) prowadzono kultury korzeni włóknikowatych *Atropa belladonna*, *Calystegia sepium* (18), *Catharanthus trichophyllus* (29). Opisano również fermentor o pojemności 500 l przystosowany do kultury korzeni transformowanych (30).

Kultury korzeni transformowanych prowadzone są zwykle w ciemności. Okazało się, że korzenie te mogą rosnąć również na świetle (16). W komórkach warstw obwodowych powstają chloroplasty. Zmienia się metabolizm komórek, czego przejawem są również zmiany w wydajności wtórnych metabolitów. Światło stymuluje gromadzenie się tiofenów w kulturze transformowanych korzeni *Tagetes patula* (31). Zielone transformowane korzenie *Lippia dulcis* wytwarzały seskwiterpen hernandulcynę (0,25 mg/g suchej masy) oraz 20 innych mono- i seskwiterpenów (22). W kulturach korzeni normalnych – prowadzonych na świetle – oraz w korzeniach rośliny macierzystej, hernandulcyny nie stwierdzono. Związek ten jest jednym ze składników olejku otrzymywanego z części nadziemnych tej rośliny.

Hodowla korzeni transformowanych – jak się wydaje – jest obiecująca w wypadku roślin olejkowych, w których olejek gromadzi się w organach podziemnych. Z dotychczasowych badań wynika, że w kulturach niezorganizowanych (zawiesina, kalus) można otrzymać tylko niektóre ze składników olejków (32). W Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej AM w Warszawie podjęto prace dotyczące otrzymywania kultur normalnych i transformowanych korzeni kolurii kuklikowej (*Coluria geoides*). Z korzeni roślin tego gatunku uzyskuje się do 1,8% olejku zawierającego 96% eugenolu. Badania dotyczące zawartości olejku i jego głównego składnika w korzeniach różnie otrzymywanych są w toku.

#### 4. Perspektywy wykorzystania korzeni włośnikowatych

Przedstawione wyniki wskazują na duże korzyści natury poznawczej i praktycznej, jakie mogą wyniknąć z hodowli korzeni transformowanych. Mogą być one źródłem cennych substancji z uwagi na swoje walory – głównie stabilność genetyczną i wysoką wydajność metabolitów wtórnych, która utrzymuje się na stałym poziomie przez dłuższy czas. Wskaźnik wzrostu oraz wydajność alkaloidów w kulturze korzeni transformowanych *Atropa belladonna* były stałe przez co najmniej rok (14), a w kulturze *Calystegia sepium* przez 6 lat (18). Wytwarzanie poliacetylenów w kulturach korzeni włośnikowatych gatunków z rodziny *Compositae* utrzymywało się na stałym poziomie przez 3 lata (4).

Hamill i in. (17) zwrócili uwagę na to, że w odróżnieniu od bogatej wiedzy na temat gromadzenia się różnych substancji w organach roślin, mniej znane są drogi i miejsca biosyntezy tych związków. Dlatego trudno jest z góry przewidzieć czy wszystkie możliwe do wytworzenia kultury korzeni włośnikowatych będą mogły być wykorzystane do otrzymywania określonych substancji.

Przenosząc transformowane korzenie na odpowiednie pożywki, można doprowadzić do regeneracji roślin. Wysoko wydajne transgeniczne rośliny mogłyby być przenoszone do gruntu. Tą metodą uzyskano np. rośliny *Solanum nigrum*, gatunku interesującego ze względu na zawartość glikoalkaloidów (33). Możliwość regeneracji roślin z korzeni włośnikowatych powoduje też, że coraz większe jest zainteresowanie wykorzystaniem *Agrobacterium rhizogenes* w inżynierii genetycznej do wektorowego transformowania roślin, w tym również roślin leczniczych (*Digitalis purpurea* (34), *Glycyrrhiza uralensis* (35)). Metody pracy w tym zakresie omówione zostały w podręcznikach (36,37).

#### Literatura

1. Zambryski P., Tempe J., Schell J., (1989), *Cell*, 56, 193–201.
2. Gelvin S. B., (1990), *Plant Physiol.*, 92, 281–285.
3. Mugnier J., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 9–12.
4. Signs M. W., Flores H. E., (1990), *BioEssays*, 12, 7–13.
5. Liebisch H. W., Schütte H. R., (1985), *Biochemistry of Alkaloids*, eds.: K. Mothes, H. R. Schütte, M. Luckner, 106–127, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
6. Parr A. J., Robins R. J., Hamill J. D., Rhodes M. J. C., (1990), *Planta Medica*, 56, 602.
7. Robins R. J., Parr A. J., Walton N. J., (1990), *Planta Medica*, 56, 603–604.
8. Robins R. J., Parr A. J., Walton N. J., Rhodes M. J. C., (1990), *Planta Medica*, 56, 604–605.
9. Chriqui D., David C., Adam S., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 111–114.
10. Trypsteen M., van Lijsebettens M., van Severen R., van Montagu M., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 85–89.
11. Payne J., Hamill J. D., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1987), *Planta Medica*, 53, 474–478.
12. Parr A. J., Peerless A. C. J., Hamill J. D., Walton N. J., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 309–312.
13. Christen P., Roberts M. F., Phillipson J. D., Evans W. C., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 75–77.
14. Kamada H., Okamura N., Satake M., Harada H., Shimomura K., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 239–242.

15. Mano Y., Ohkawa H., Yamada Y., (1989), *Plant Science*, 59, 191–201.
16. Flores H. E., Hoy M., Pickard J. J., (1987), *Trends in Biotechnology*, 5, 64–69.
17. Hamill J. D., Parr A. J., Rhodes M. J. C., Robins R. J., Walton N. J., (1987), *Biotechnology*, 5, 800–804.
18. Jung G., Tepfer D., (1987), *Plant Science*; 50, 145–151.
19. Deno H., Yamagata T., Yoshioka T., Yamada Y., Fujita Y., (1987), *J. Plant Physiol.*, 131, 315–323.
20. Constabel C. P., Towers G. H. N., (1988), *J. Plant Physiol.*, 133, 67–72.
21. Ohkawa H., Kamada H., Sudo H., Harada H., (1989), *J. Plant Physiol.*, 134, 633–636.
22. Sauerwein M., Yamazaki T., Shimomura K., (1991), *Plant Cell Rep.*, 9, 579–581.
23. Parr A. J., Hamill J. D., (1987), *Phytochemistry*, 26, 3241–3245.
24. Mano Y., Nabeshima S., Matsui C., Ohkawa H., (1986), *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2715–2722.
25. Jaziri M., Legros M., Homes J., Vanhaelen M., (1988), *Phytochemistry*, 27, 419–420.
26. Yoshioka T., Yamagata H., Ithoh A., Deno H., Fujita Y., Yamada Y., (1989), *Planta Medica*, 55, 523–524.
27. Hamill J. D., Parr A. J., Robins J., Rhodes M. J. C., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 111–114.
28. Shimomura K., Sudo H., Saga H., Kamada H., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 282–285.
29. Davioud E., Kan C., Hamon J., Tempé J., Husson H-P., (1989), *Phytochemistry*, 28, 2675–2680.
30. van Bentem E., Wilson P., (1990), *Voedingsmiddelentechnologie*, 23, 32–33.
31. Mukundan U., Hjortso M. A., (1991), *J. Plant Physiol.*, 138, 252–255.
32. Mulder-Krieger T., Verpoorte R., Baerheim Svendsen A., Scheffer J. J. C., (1988), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 13, 85–154.
33. Wei Z-M., Kamada H., Harada H., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 93–96.
34. Saito K., Yamazaki M., Shimomura K., Yoshimatsu K., Murakoshi I., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 121–124.
35. Saito K., Kaneko H., Yamazaki M., Yoshida M., Murakoshi I., (1990), *Plant Cell Rep.*, 8, 718–721.
36. *Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual*, (1988), eds.: J. Draper, R. Scott, P. Armitage, R. Walden, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne.
37. Transformowanie i regeneracja roślin. Poradnik laboratoryjny, (1990), red. A. B. Legocki, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań.
38. Brillanceau M-H., David C., Tempé J., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 63–66.
39. Toivonen L., Belsevich J., Kurz W. G. W., (1989), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 18, 79–93.
40. Yoshikawa T., Furuya T., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 449–453.
41. Kyo M., Miyauchi Y., Fujimoto T., Mayama S., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 393–397.
42. Ishimaru K., Sudo H., Satake M., Matsunaga Y., Hasegawa Y., Takemoto S., Shimomura K., (1990), *Phytochemistry*, 29, 1563–1565.
43. Yonemitsu H., Shimomura K., Satake M., Mochida S., Tanaka M., Endo T., Kaji A., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 307–310.
44. Takashi I., (1990), *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 022, 200, 194 (90,200,194) cf Chemical Abstracts*, 113, 229729.
45. Kuzovkina U. H., (1988), dane nie opublikowane.
46. Christen P., Roberts M. F., Phillipsen J. P., Evans W. C., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 101–104.
47. Ionkova I., Witte L., Alfermann A. W., (1989), *Planta Medica*, 55, 229–230.
48. Oksman-Caldentey K-M., Laaksonen M-R., Hiltunen R., (1989), *Planta Medica*, 55, 229.
49. Furze J. M., Hamill J. D., Parr A. J., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1987), *J. Plant Physiol.*, 131, 237–246.

## Transformed roots of medicinal plants

### Summary

There is an increasing interest in rapidly growing, productive and genetically stable transformed root cultures obtained by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of plants. This paper is a review of current methods for the establishment and maintenance of hairy root cultures and factors affecting their productivity. A list of transformed root cultures of medicinal plants is given.

### Adres dla korespondencji:

Olga Olszowska, Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Akademia Medyczna, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa.