

Farmaceutyczne aspekty biotechnologii roślin. Część I. Wprowadzenie – metodyka i główne kierunki badawcze

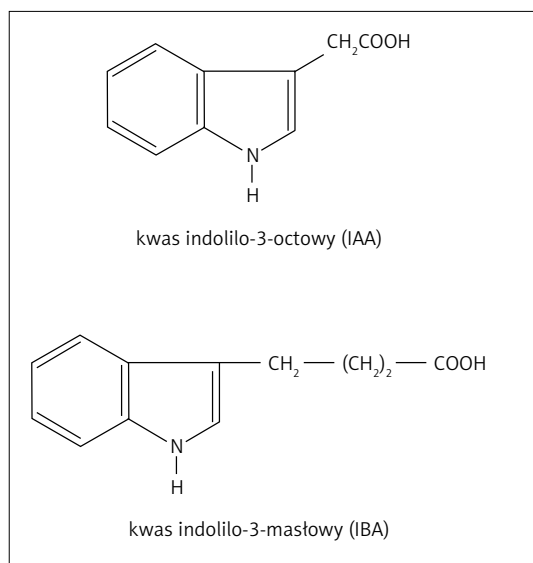
Halina Ekiert

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej CM UJ w Krakowie

Biotekhnologia roślin to jeden z działów biotechnologii, dynamicznie rozwijającej się interdyscyplinarnej nauki i techniki, w której ramach w różny sposób zmierza się do wykorzystania organizmów żywych w celach praktycznych.

W ramach biotechnologii roślin badania zmierzają do wykorzystania zarówno potencjału biochemicznego, jak i morfologicznego komórek roślinnych [1, 2]. Podstawowym etapem w pracach z tego zakresu jest założenie roślinnej kultury *in vitro*. Kultury roślin *in vitro*, to prowadzone w warunkach sterylnych kultury protoplastów, pojedynczych komórek, tkanek, organów, fragmentów roślin lub całych roślin [2].

Nieograniczony wzrost tkanki roślinnej udało się uzyskać w 1939 r. Sukces należał do trzech badaczy – White’a, który otrzymał tkankę kalusową z fragmentów prokambium łodyg mieszańca tytoniu – *Nicotiana langsdorfii* x *Nicotiana glauca* oraz Gauthiereta i Nobécourta, którzy niezależnie od siebie,



Rycina 1. Naturalne związki z grupy auksyn

Pharmaceutical aspects of plant biotechnology. Part 1. Introduction – methods and main research directions

This article presents research methodology used in plant biotechnology (among others composition of culture media, groups of plant growth and development regulators, types of plant *in vitro* cultures). Moreover, main research directions in plant biotechnology: endogenous *in vitro* production of secondary metabolites, biotransformation processes, genetic engineering and plant micropropagation, were characterized with emphasis on their pharmaceutical significance. Practical applications of this research was presented based on classical and some new examples. The article underlines that therapeutically important compounds can be obtained from *in vitro* cultures at marked quantities by endogenous accumulation (e.g. shikonin, rosmarinic acid, berberine, ginsenosides, paclitaxel) or by biotransformation of exogenously supplemented precursors (e.g. cardiac glycosides, phenolic glycosides). Metabolites accumulating in roots of medicinal plants can be obtained with high yield by genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* in the cultures of transformed roots, so-called “hairy roots” cultures. Development of micropropagation methods of medicinal plant species warrants quick supply of high quality medicinal raw materials among others from exotic, endangered and rare species. In addition, the article presents the newest research direction of genetic engineering, namely the possibility of the production of so-called “plant vaccines” and other biopharmaceuticals in transformed plants.

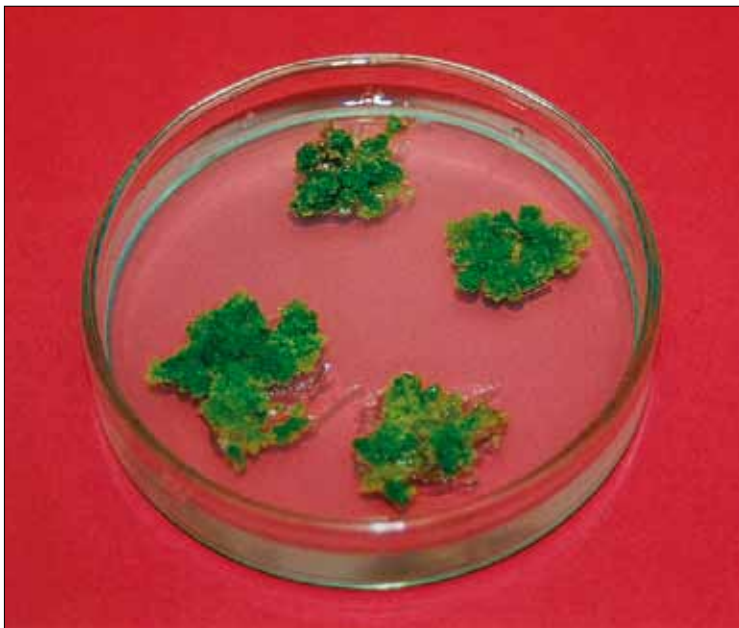
Keywords: plant *in vitro* cultures, endogenic production of metabolites, biotransformation processes, genetic engineering, plant micropropagation.

uzyskali hodowle z fragmentów korzeni *Daucus carota* zawierających kambium. Powodzenie tych eksperymentów było możliwe m.in. dzięki zastosowaniu odkrytego w 1934 r. przez Kögla naturalnego hormonu roślinnego z grupy auksyn, kwasu indolilo-3-octowego (IAA) (**rycina 1**).

Od tego czasu rozpoczął się gwałtowny rozwój badań nad kulturami roślin *in vitro*.



Rycina 2. Kalusujące fragmenty liści *Ginkgo biloba*. Podłoże M-S, BAP – 0,5 mg/l, 2,4-D – 2 mg/l (autor zdjęcia: dr A. Szewczyk, Katedra Botaniki Farmaceutycznej CM UJ)



Rycina 3. Kultury kalusowe *Ginkgo biloba*. Podłoże M-S, BAP – 2 mg/l, pikloram – 4 mg/l (autor zdjęcia: dr A. Szewczyk, Katedra Botaniki Farmaceutycznej CM UJ)

Metoda roślinnych kultur *in vitro* została wprowadzona i rozpropagowana w Polsce przez prof. J. Czosnowskiego i jego współpracowników. Pierwsze prace z tej dziedziny autorstwa prof. J. Czosnowskiego ukazały się na przełomie lat 40. i 50. XX wieku [2]. Aktualnie w Polsce problematyką badawczą z tego zakresu zajmują się liczne placówki o profilu ogólnobiologicznym, botanicznym, biochemicznym, genetycznym, farmaceutycznym, ogrodniczym, rolniczym

i biotechnologicznym. Są to zarówno placówki akademickie, jak i instytuty naukowe.

Możliwości farmaceutycznego wykorzystania biotechnologii roślin są obiektem zainteresowań niemal wszystkich katedr o profilu botanicznym (botanika farmaceutyczna) i farmakognostycznym na wydziałach farmaceutycznych w Polsce. Szczególnie dotyczy to ośrodków w Warszawie, Łodzi, Poznaniu, Krakowie, również w Gdańsku. Długie tradycje badawcze ma także Zakład Fitochemii Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. W ostatnich latach znaczną aktywnością badawczą może poszczycić się też Zakład Ochrony Roślin i Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku.

Zakładanie roślinnych kultur *in vitro*

Kultury *in vitro* zakłada się najczęściej z fragmentów sterylnych siewek (*plantlets*) otrzymanych po wykiełkowaniu nasion. Organy siewek (listki, ogonki liściowe, łodyżki, korzenie) celowo tną się na kawałki, które umieszcza się na podłożu o określonym składzie (tzw. podłoże inicjujące), prowokując powstanie w miejscu cięcia, tkanki przyrannej zwanej tkanką kalusową [2]. Niekiedy z fragmentów organów siewek wyrastają liczne, drobne zawiązki pędów (rzadziej korzeni), dając początek kulturze pędowej (lub rzadziej korzeniowej).

Część podliścienna (hypokotyl) siewek ma wyraźną zdolność tworzenia tkanki kalusowej. W początkowym okresie badań biotechnologicznych większość kultur miała takie pochodzenie. Już od wielu lat za bardziej wartościowy materiał badawczy uważa się kultury o sprecyzowanym pochodzeniu – a więc kultury pochodzenia liściowego, łodygowego, czy korzeniowego.

Kultury można założyć teoretycznie z każdego organu dojrzałego okazu rośliny. Z tej możliwości korzysta się, gdy pojawiają się kłopoty ze zdobyciem nasion lub gdy np. występują trudności z ich kiełkowaniem. Pocięte, wysterylizowane fragmenty organów rośliny położone na podłożu inicjującym również tworzą tkankę kalusową lub zawiązki organów (**ryciny 2 i 3**) [2].

Po udanym założeniu kultury *in vitro* uzyskaną biomasę przenosi się na właściwe podłoże hodowlane, w pierwszym etapie takie, które będzie sprzyjało przyrostom biomasy.

Podłoża hodowlane

Roślinne kultury *in vitro* prowadzi się na sztucznych podłożach, zawierających niezbędne do rozwoju komórek składniki – wodę z rozpuszczonymi w niej makro- (N, S, P, K, Na, Ca, Cl) i mikroelementami (B, Cu, Mn, Mo, Zn, Co, J, Al, Ni), źródło węgla

(najczęściej sacharoza lub glukoza), witaminy, regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Pożywki wzbogaca się niekiedy dodatkiem aminokwasów. Spośród regulatorów wzrostu i rozwoju roślin stosuje się przede wszystkim auksyny i cytokininy, rzadziej gibereliny. Jakościowy dobór i ilościowa zawartość regulatorów wzrostu i rozwoju roślin w podłożu decyduje o stopniu zróżnicowania biomasy i jej makroskopowym wyglądzie (**ryciny 1, 4 i 5, tabele 1 i 2**) [1–3].

Wymagania kultur pochodzących z różnych gatunków roślin są bardzo zróżnicowane. Dla optymalnego wzrostu biomasy należy dobrać m.in. odpowiedni skład podłoża, jego kwasowość, konsystencję (podłoże płynne lub zestalone agarą), także właściwą temperaturę, oświetlenie i wilgotność powietrza w pomieszczeniach hodowlanych.

W pierwszym okresie rozwoju roślinnych kultur *in vitro* pracowano z mało zróżnicowanymi tkankami o dużych zdolnościach proliferacji (tkanki merystematyczne i tumorowe). Opracowanie składu chemicznego licznych podłoży hodowlanych (m.in. pożywki White'a, Hellera, Gauthiereta, Wooda, Nitscha-Nitscha, Murashige'a-Skooga, Linsmaiera-Skooga, Gamborga, Scenka-Hildebrandta) pozwoliło na uzyskanie różnych rodzajów kultur, niemal z wszystkich fragmentów roślin i wszystkich tkanek (**tabela 1**) [1, 2].

Typy roślinnych kultur *in vitro*

Do najczęściej stosowanych w pierwszym, wstępnym etapie badań roślinnych kultur *in vitro* należą **kultury kalusowe** (*callus cultures*) (**rycina 3**). Tkanka kalusowa jest zespołem niezróżnicowanych komórek parenchymatycznych, mającym wygląd bezpostaciowej masy. W naturze występuje ona jako tkanka przyrzanna.

Z kultur kalusowych można wyprowadzić inne rodzaje kultur *in vitro*, takie jak kultury zawieszinowe komórek lub ich agregatów, a także po doprowadzeniu do regeneracji organów lub całych roślin, prowadzić ich hodowlę. Kultury kalusowe są prowadzone głównie jako powierzchniowe kultury agarowe. Kultury te prowadzi się najczęściej na szalkach Petriego, w kolbach Erlenmayera lub w specjalnych naczyniach hodowlanych oferowanych przez firmy biotechnologiczne (**rycina 3**) [1, 2].

Biotechnologicznym wymogiem jest homogenność kultur komórkowych. Wymóg ten w mniejszym lub większym stopniu spełniają **kultury zawieszinowe** (*suspension cultures*). Kultury te prowadzi się w kolbach Erlenmayera. Na większą skalę kultury te prowadzone są w bioreaktorach o dużych pojemnościach (nawet kilkadziesiąt tysięcy dm³), stanowiąc źródło półprzemysłowego lub przemysłowego wykorzystania ich do produkcji biomasy i metabolitów wtórnych. Wykorzystywane w biotechnologii roślin bioreaktory posiadają różne techniczne rozwiązania. Mogą to

Tabela 1. Skład chemiczny wybranych podłoży hodowlanych wykorzystywanych w prowadzeniu roślinnych kultur *in vitro* [1, 2]

Składniki [mg/dm ³]	Podłoża hodowlane			
	Linsmaiera – Skooga (L-S) (1965)	Murashige'a – Skooga (M-S) (1962)	Gamborga (B5) (1988)	Schenka – Hildebrandta (SH) (1972)
KNO ₃	1900,00		2500,00	2500,00
NH ₄ NO ₃	1650,00		–	–
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,00		150,00	200,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,00		250,00	400,00
KH ₂ PO ₄	170,00		–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	sole mineralne	134,00	–
NH ₄ H ₂ PO ₄	–	jak w podłożu		300,00
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	–	L-S	150,00	–
Na ₂ EDTA	37,30		37,30	20,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,80		27,80	15,00
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,30		–	–
MnSO ₄ ·H ₂ O			10,00	10,00
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60		2,00	1,00
KI	0,83		0,75	1,00
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25		0,25	0,10
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025		0,025	0,20
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025		0,025	0,10
Witaminy i aminokwasy				
kwas nikotynowy	–	0,50	1,00	5,00
pirydoksyna-HCl	–	0,50	1,00	0,50
tiamina-HCl	0,40	0,10	10,00	5,00
glicyna	–	2,00	–	–
Węglowodany				
sacharoza	30.000,00	30.000,00	20.000,00	25.000,00
mezoinozytol	100,00	100,00	100,00	1.000,00

Regulatory wzrostu i rozwoju roślin – różne ilości auksyn, cytokinin, giberelin

być głównie bioreaktory typu *airlift* z cyrkulacją wewnętrzną, z mieszadłem mechanicznym, ze złożem upakowanym lub fluidalnym [1].

Kultury organów (*organ cultures*) – pędów, korzeni można prowadzić na stałym (agarowym) podłożu na szalkach Petriego, w kolbach Erlenmayera lub w specjalnych firmowych naczyniach typu *Twist*. Kultury te można prowadzić też jako płynne stacjonarne na szalkach Petriego zawierających mostki z bibuły filtracyjnej, podtrzymujące hodowaną biomasę (**rycina 6**). Często kultury te prowadzi się jako wytrąsane w kolbach Erlenmayera (**rycina 7**).

Ostatnio podejmuje się też próby hodowli organów w bioreaktorach, głównie kultur korzeni transformowanych. Są to bioreaktory o specjalnej konstrukcji, tzw. rozpyłowe [1].

Ciekawym nowatorskim rozwiązaniem jest też prowadzenie tzw. **ko-kultur** (*co-cultures*), w których w jednym naczyniu hodowlanym rosną kultury dwóch

Tabela 2. Główne grupy regulatorów wzrostu i rozwoju roślin stosowane w prowadzeniu roślinnych kultur *in vitro* [3]

Nazwa chemiczna lub zwyczajowa	Skrót nazwy angielskiej*
cytokiny	
Zeatina	ZEA**
6-(γ , γ -dimetyloaliloaminopuryna)	2 i P**
6-benzylaminopuryna	BAP
Kinetyna (6-furfuryloaminopuryna)	KIN
Tidiazuron	TDZ
auksyny	
Kwas indolilo-3-octowy	IAA**
Kwas indolilo-3-masłowy	IBA**
Kwas naftylo-1-octowy	NAA
Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy	2,4-D
Kwas 2-metoksy-3,6-dichlorobenzoesowy	Dicamba
Kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy	Picloram
gibereliny	
Kwas giberelowy	GA ₃ **

* skróty nazw angielskich przyjęte w międzynarodowej i polskiej nomenklaturze biotechnologicznej

** związki pochodzenia naturalnego, pozostałe związki – syntetyczne

gatunków roślin lub dwóch typów kultur jednego gatunku. Metabolity jednej z kultur mogą w takim systemie stanowić substraty dla biosyntezy metabolitów przez drugą kulturę. Taki model, składający się z kultur korzeni transformowanych i kultur pędów, został zaproponowany przez dwa ośrodki badawcze z Gdańska [4, 5].

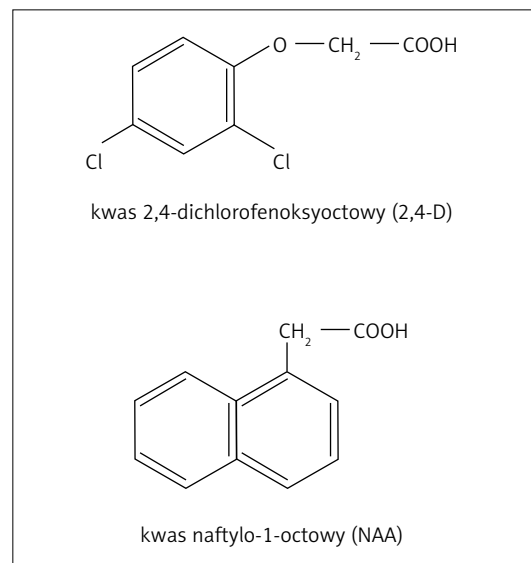
Jeszcze innym ciekawym nowym rozwiązaniem jest prowadzenie kultur pędów czasowo zraszanych pożywką (tzw. *temporary immersion system*). Takie rozwiązanie jest m.in. wykorzystywane przez niemiecką firmę biotechnologiczną BioPlanta z siedzibą w Lipsku [6].

Główne kierunki badawcze biotechnologii roślin

Badania z zakresu biotechnologii roślin są bardzo zróżnicowane. Można w nich wyróżnić następujące główne kierunki badawcze o szczególnym znaczeniu farmaceutycznym: badania dotyczące endogennej produkcji ważnych terapeutycznie związków w kulturach *in vitro*, procesy biotransformacyjne inżynierii genetycznej i mikrorozmnażanie roślin [7].

Endogenna produkcja ważnych terapeutycznie związków w kulturach *in vitro*

Z farmaceutycznego punktu widzenia, głównym kierunkiem badawczym biotechnologii roślin są badania nad endogenną produkcją biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych. W światowym dorobku



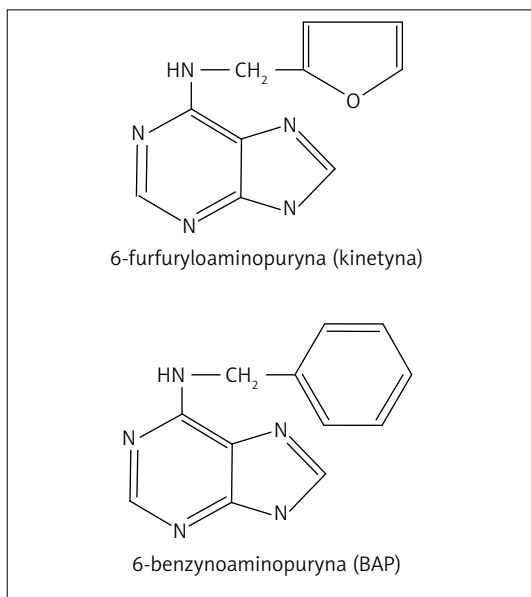
Rycina 4. Syntetyczne auksyny – przykłady związków

naukowym mamy kilka produktów, które można uzyskać na skalę pozalaboratoryjną z roślinnych kultur *in vitro*. Klasycznymi przykładami są m.in. szikoniina, kwas rozmarynowy, berberyna, ginsenozydy, paklitaksel. Związki te można pozyskać odpowiednio z kultur *in vitro*: *Lithospermum erythrorhizon*, *Coleus blumei*, *Coptis japonica*, *Panax ginseng* i *Taxus sp.* Producentami związków otrzymywanych z kultur roślin *in vitro* są firmy japońskie (Kanebo, Mitsui, Nitto-Denki, Toyobo), niemieckie (BioPlanta, Boehringer Mannheim, Diversa, Natterman, Phytion), amerykańska (Escagenetics) a ostatnio również firma koreańska Sam Yang Genex Corp. [7–12].

W laboratoriach biotechnologicznych, również krajowych, prowadzone były i są kontynuowane niezwykle istotne badania m. in. nad możliwością uzyskania paklitakselu (kultury *Taxus sp.*) i innych cytostatyków, kamptotecyny i jej pochodnych (kultury *Camptotheca acuminata*), alkaloidów indolowych – winkrystyny i winblastyny w kulturach *in vitro* i w zregenerowanych roślinach *Catharanthus roseus* [7, 13–15].

Aby uzyskać znaczną zawartość metabolitów wtórnych w hodowanej *in vitro* biomacie należy przyjąć określoną strategię postępowania [16]. Jednym z warunków powodzenia jest **przeprowadzenie selekcji wysokowydajnych linii komórkowych**. W wyniku selekcji udało się znacznie zwiększyć m. in. zawartość berberyny w biomacie *Coptis japonica* hodowanej *in vitro* do ponad 13 g%. Wynik ten jest bardzo dużym osiągnięciem, gdy porówna się uzyskaną zawartość z przeciętną zawartością berberyny w roślinach rosnących w warunkach naturalnych, równą ok. 5 g%. Jest to klasyczny w biotechnologii roślin przykład efektów selekcji [8].

W ramach strategii zmierzającej do uzyskania wysokiej zawartości metabolitów roślinnych, po udanej selekcji należy **zoptymalizować warunki**



Rycina 5. Syntetyczne cytokiny – przykłady związków

prowadzenia kultury in vitro. Optymalizacja obejmuje zarówno skład podłoża hodowlanego, jak i warunki świetlne, temperaturę, stopień wilgotności powietrza w pomieszczeniach hodowlanych. Należy też przetestować różne typy kultur (m. in. kalusowe, wytrząsane, zawieszinowe), aby wybrać typ kultury najbardziej sprzyjający przyrostom biomasy, ale też biosyntezie i akumulacji związków czynnych.

Zwykle szybkemu przyrostowi biomasy towarzyszy niski stopień akumulacji metabolitów wtórnych. Często zatem należy ustalić oddzielnie skład podłoża wzrostowego i podłoża produkcyjnego. Po uzyskaniu zadowolających przyrostów biomasy, zwykle przenosi się ją na podłoże produkcyjne. Podłoże produkcyjne często wzbogaca się dodatkami prekursorów biosyntezy skomplikowanych strukturalnie metabolitów wtórnych oczekując, że będą one wykorzystane przez komórki w produkcji związków czynnych.

Dobrym przykładem wagi badań dotyczących wpływu typu kultur na akumulację metabolitów mogą być kultury *in vitro* *Podophyllum peltatum*. W kulturach kalusowych tego gatunku uzyskano około 2-krotnie większe zawartości podofilotoksyny w porównaniu z kulturami zawieszinowymi. Podobnie typ prowadzonych kultur *Ruta graveolens* był istotny dla akumulacji linearnych furanokumaryn. Większą zawartość tych metabolitów, głównie bergaptenu i ksantotoksyny uzyskano w płynnych kulturach stacjonarnych, niż w kulturach wytrząsanych (ryciny 6 i 7) [17].

Kumulacji metabolitów wtórnych sprzyja też **wysoki stopień organogenezy**. W kulturach organów – pędów, korzeni, można spodziewać się uzyskania znacznej zawartości związków [18]. Zależność tę wykazano dla różnych grup metabolitów, m.in. dla alkaloidów tropanowych, alkaloidów indolowych,



Rycina 6. Kultury płynne stacjonarne pędów *Ruta graveolens*. Podłoże L-S, BAP – 2 mg/l, NAA – 2 mg/l (autor zdjęcia: T. Pobożniak, firma Kodak)



Rycina 7. Kultury wytrząsane pędów *Ruta graveolens*. Podłoże L-S, BAP – 0.1 mg/l, NAA – 0.1 mg/l (autor zdjęcia: T. Pobożniak, firma Kodak)

połączeń kumarynowych. W kulturach korzeni *Atropa belladonna* uzyskano znaczne zawartości L-hioscyjminy, skopolaminy i apoatropiny, porównywalne z zawartością w korzeniach roślin. W kulturach pędowych *Catharanthus roseus* otrzymano 1–8-krotnie wyższe zawartości ajmaliny w porównaniu z jej zawartością w całej roślinie [18]. Również w kulturach pędów *Ruta graveolens* uzyskane

W ramach strategii zmierzającej do uzyskania wysokiej zawartości metabolitów roślinnych, po udanej selekcji należy zoptymalizować warunki prowadzenia kultury *in vitro*. Optymalizacja obejmuje zarówno skład podłoża hodowlanego, jak i warunki świetlne, temperaturę, stopień wilgotności powietrza w pomieszczeniach hodowlanych

zawartości linearnych furanokumaryn były znaczne, porównywalne lub wyższe niż w analizowanych częściach nadziemnych roślin pochodzących z różnych stanowisk [17].

Jeszcze innym elementem strategii jest stworzenie rosnącym *in vitro* komórkom **warunków stresu** [19]. Czynniki stresujące, określane jako **elicitory**, to czynniki fizykochemiczne (tzw. elicitory abiotyczne), całe

żywe organizmy lub ich części (tzw. elicitory biotyczne). Często rolę elicitorów abiotycznych pełnią dodane do kultur związki chemiczne, takie jak np. jasmonian metylu, alginiany wapnia, sodu. Znanymi elicitorami biotycznymi są np. lizaty bakteryjne, hodowle grzybów (np. *Phytophthora megasperma sp. glycinica* = tzw. Pmg – elicitor, czy *Althernaria carthami* = tzw. Ac – elicitor) [19].

W wyniku takich zabiegów np. w kulturach *Ruta graveolens* po elicytacji za pomocą *Rhodotorula rubra* uzyskano nawet 300-krotny wzrost zawartości alkaloidów akrydynowych [20]. W kulturach *Ginkgo biloba* prowadzonych w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej CM UJ dodatek jasmonianu metylu powodował znaczny wzrost zawartości kwasów fenolowych [21].

Jeszcze innym sposobem uzyskania znacznej zawartości metabolitów wtórnych jest **transformacja genetyczna roślin** z wykorzystaniem bakterii, głównie *Agrobacterium rhizogenes* [22]. Tę możliwość przedstawiono szerzej w dalszej części artykułu.

W kulturach *in vitro* ze względu na sztuczność warunków mogą powstawać także nowe, nieznanne wcześniej w danych taksonach związki lub nawet zupełnie nowe w świecie roślin połączenia [23].

Pierwsze nowe związki wykryto w kulturach *in vitro* w 1968 r. Były to laktony seskwiterpenowe, które nazwano panikulidami. Pod koniec lat 80. XX wieku oszacowano liczbę nowych związków na ok. 90. Wśród nich najliczniej reprezentowane były połączenia chinoidowe, kolejno alkaloidy i terpeny. W połowie 1999 r. oszacowano liczbę nowych związków już na ponad 320. Klasycznym przykładem ogromnego bogactwa enzymatycznego są kultury *Ruta graveolens*, w których spośród 103 związków wykrytych *in vitro*, aż 52 związki, to nowe połączenia [24].

Fakt powstawania nowych związków w kulturach *in vitro* stanowi nową ciekawą farmaceutyczną perspektywę otrzymywania związków z aktywnością biologiczną. Dla wielu z nich udowodniono różne kierunki działania biologicznego. Dobrymi i znanymi przykładami mogą być podoweryny – biflawonoidy z kultur *Podophyllum versipelle* o właściwościach przeciwpalnych, czy perycyna – indolowy alkaloid z kultur *Picralima nitida* o właściwościach analgetycznych [23].

Problematyka dotycząca endogennej produkcji związków o walorach terapeutycznych zostanie dokładniej omówiona w części II artykułu.

Procesy biotransformacyjne

Odmiernym kierunkiem badawczym, również istotnym z farmaceutycznego punktu widzenia są **procesy biotransformacyjne** [24, 25]. Z udziałem enzymów z komórek roślinnych kultur *in vitro* mogą zachodzić różne reakcje, m.in. reakcje utleniania, redukcji, syntezy. Komórki roślin są zdolne do przekształcania podanych egzogenicznie substratów w oczekiwane produkty.

Prowadzone w tym zakresie badania są bardzo istotne ze względu na regio- i stereospecyficzność reakcji przeprowadzanych przez enzymy roślinnych komórek. W badaniach tego typu wykorzystuje się też odmienność potencjału enzymatycznego roślin w porównaniu z mikroorganizmami (bakterie, grzyby niższe). Stosunkowo łatwo zachodzą z udziałem roślinnych komórek reakcje glikozytacji.

Klasycznym przykładem ważnego procesu biotransformacji jest transformacja glikozydów nasercowych – przekształcanie β -metylodigitoksyny w produkt o lepszych parametrach farmakokinetycznych, β -metylodigoksynę z udziałem komórek z kultur *in vitro* *Digitalis lanata*. Jest to przykład regio- i stereospecyficznej reakcji – 12- β -hydroksylacji [8].

Kolejnym ciekawym klasycznym też przykładem może być reakcja β -D-glikozytacji hydrochinonu w arbutynę, cenny w terapii i kosmetyce glikozyd fenolowy. W badaniach prowadzonych w tym kierunku wykorzystuje się kultury *in vitro* licznych gatunków roślin, które w naturalnych warunkach nie syntetyzują arbutyny. Są to przedstawiciele bardzo różnych taksonów. Możliwość taka wynika z powszechności występowania enzymów z grupy β -glikozylaz w świecie roślin oraz braku specyficzności substratowej tych enzymów [26–28]. Reakcja ta zachodzi z bardzo dużą wydajnością m.in. w kulturach *Rauwolfia serpentina*, *Datura innoxia* i *Catharanthus roseus*. W Katedrze Botaniki Farmaceutycznej UJCM wykazano zdolność m.in. komórek z kultur *in vitro* *Ruta graveolens* i podgatunku *R. g. ssp. divaricata* do przeprowadzania tej reakcji [27, 28].

Nowym ciekawym przykładem reakcji biotransformacji może być produkcja salidrozydu i rozawiny w kulturach *Rhodiola rosea* [7].

Zagadnienia dotyczące procesów biotransformacji z udziałem roślinnych kultur *in vitro* zostaną szerzej przedstawione w części II artykułu.

Badania z zakresu inżynierii genetycznej

Jeszcze inny kierunek badawczy, najbardziej dynamicznie rozwijający się w ostatnim okresie, to badania z zakresu **inżynierii genetycznej**, dotyczące transformacji genetycznej roślin [22, 29–33].

Rośliny można poddawać transformacji genetycznej, wykorzystując bakterie z rodzaju *Agrobacterium* – *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes*. Bakterie te w warunkach naturalnych są odpowiedzialne za powstawanie chorób nowotworowych u roślin. Po zainfekowaniu rośliny *A. tumefaciens* w miejscu zakażenia powstaje tumorowa narośl określana jako *crown gall*, po zakażeniu drugim gatunkiem – *A. rhizogenes*, w miejscu infekcji powstają liczne korzenie określane jako *hairy roots*. Za powstawanie tych morfologicznie różnych tumorów roślin odpowiedzialne są plazmidy bakteryjne. Fragmenty plazmidów włączają się do genomu zainfekowanej rośliny [22].

W celu uzyskania wysokiej zawartości metabolitów wtórnych o znaczeniu farmaceutycznym celowo zakaża się rośliny, ich fragmenty (np. liście, łodygi) *A. rhizogenes*, aby otrzymać kultury *hairy roots*. W kulturach tych można uzyskać znaczne zawartości metabolitów wtórnych, głównie tych, które w warunkach naturalnych transformowane rośliny gromadzą w swych korzeniach. Uzyskane zawartości metabolitów mogą być nawet 10–50-krotnie wyższe niż w korzeniach roślin transformowanych. [29–32].

Najłatwiej transformacji genetycznej ulega gatunki roślin z rodzaju *Solanaceae*. Największe trudności występują przy próbach z roślinami jednoliściennymi. Charakterystyczną cechą tego modelu badawczego są ekstremalnie wysokie, nawet do 60 razy, przyrosty biomasy w czasie 3–4 tygodni. Kultury te charakteryzują się ponadto genetyczną stabilnością. W kulturach *hairy roots* różnych gatunków roślin uzyskano m.in. wysokie zawartości walepatriatów (10,3 g% s.m. – kultury *Valeriana officinalis*, var. *sambucifolia*), glicyryzyny (4,7 g% s.m. – kultury *Glycyrrhiza uralensis*), alkaloidów tropanowych (1,32 g% – kultury *Atropa belladonna*) [29–31].

W Polsce tą tematyką badawczą zajmują się głównie ośrodki badawcze w Łodzi, Warszawie, Krakowie, Gdańsku.

W ośrodku łódzkim badano m.in. zdolności biosyntetyczne kultur *Hyssopus officinalis*, uzyskując w nich interesujące zawartości kwasu rozmarynowego. Ostatnio obiektem badań były m. in. kultury *hairy roots* czterech różnych gatunków *Salvia*, w których wykazano obecność głównie związków terpenowych (z grupy di- i triterpenów) oraz kwasu rozmarynowego. Ponadto obiektem badań były kultury *Arnica montana* i *Centaurium umbellatum* [32].

W ośrodku warszawskim badano m.in. kultury *hairy roots* *Coluria geoides*, a ostatnio *Lithospermum canescens*. W Krakowie bardzo ciekawe wyniki uzyskano m.in. w badanych kulturach różnych gatunków z rodziny *Asteraceae*. W ośrodku gdańskim w kulturach *hairy roots* *Ammi majus* poszukiwano linearnych furanokumaryn.

Drugi gatunek *Agrobacterium* – *A. tumefaciens* wykorzystuje się najczęściej jako wektor w zabiegach

z zakresu inżynierii genetycznej. W integrujący z genomem rośliny fragment plazmidu bakteryjnego można wprowadzić gen odpowiedzialny za ważną cechę (np. gen odporności na owady, herbicydy, zasolenie) i oczekiwać jego ekspresji, co ma ogromne znaczenie w uprawach roślin, m. in. gatunków o walorach równocześnie przemysłowych, spożywczych, jak i farmaceutycznych, takich jak np. *Gossypium sp.*, czy *Glycine soja* [1, 22, 33, 34].

W stransformowanych roślinach można uzyskać, korzystając też najczęściej z *A. tumefaciens* jako wektora, ludzkie białka (np. hemoglobinę, przeciwciała monoklonalne). Można również za pomocą tego systemu wprowadzić do roślin antygen bakteryjny, czy wirusowy i uzyskać szczepionki roślinne. Udało się to już m.in. dla szczepionek przeciwko *Vibrio cholerae* i *Helicobacter pylori*, oraz wirusom HIV i HBV [1, 33, 34].

Tematyka badawcza z zakresu inżynierii genetycznej zostanie szerzej przedstawiona w części III artykułu.

Mikrorozmnażanie roślin leczniczych

Niezwykle ważne są prace dotyczące mikrorozmnażania roślin, czyli rozmnażania z wykorzystaniem kultur *in vitro*. Szczególnie istotne jest opracowanie takich metod mnożenia roślin dla gatunków leczniczych z innych stref klimatycznych, dla gatunków zagrożonych z powodu zanieczyszczeń środowiska naturalnego, czy też atakowanych przez patogeny [35, 36].

Mnożenie jest możliwe dzięki zdolności fragmentów roślin do regeneracji w warunkach *in vitro*. Regeneracja następuje z istniejących na eksplantatach merystemów (= zawiązków tkanki twórczej) lub też z wytworzonych przez eksplantaty merystemów przybyszowych. Merystemy przybyszowe mogą powstać bezpośrednio na eksplantacie lub pośrednio poprzez etap tkanki kalusowej. Merystemy istniejące to merystemy pączka boczne-go, wierzchołka pędu, czy merystemy zarodka. Merystemy przybyszowe natomiast, to np. wierzchołek pędu lub somatyczny zarodek (=embroid).

Dla licznych gatunków roślin leczniczych opracowano metody mikrorozmnażania. Już w 1988 r. podano listę 137 gatunków mnożonych *in vitro*. Spośród ok. 80 gatunków roślin farmakopealnych figurujących w wydaniu V Farmakopei Polskiej, już w 1992 r. dla 40 gatunków były opracowane metody mikrorozmnażania [35, 36]. Współcześnie brak podobnego zbiorczego opracowania przedstawiającego aktualny stan badań w tym zakresie.

Najwydajniejszą metodą mikrorozmnażania roślin jest metoda wykorzystująca zjawisko powstawania

Metoda roślinnych kultur *in vitro* została wprowadzona i rozpropagowana w Polsce przez prof. J. Czosnowskiego i jego współpracowników. Pierwsze prace z tej dziedziny autorstwa prof. J. Czosnowskiego ukazały się na przełomie lat 40. i 50. XX wieku

Niezwykle ważne są prace dotyczące mikrorozmnażania roślin, czyli rozmnażania z wykorzystaniem kultur *in vitro*. Szczególnie istotne jest opracowanie takich metod mnożenia roślin dla gatunków leczniczych z innych stref klimatycznych, dla gatunków zagrożonych z powodu zanieczyszczeń środowiska naturalnego, czy też atakowanych przez patogenny.

somatycznych zarodków, czyli zjawisko somatycznej embriogenezy. Z kilku gramów embriogenicznej tkanki można uzyskać ponad 1 mln zarodków. Metodę mnożenia roślin z wykorzystaniem tego zjawiska opracowano już dla ok. 150 gatunków roślin [7]. Zjawisko to jest charakterystyczne głównie dla roślin z rodzin

Apiaceae, *Solanaceae*, *Brassicaceae*, w których liczni reprezentanci to ważne gatunki roślin leczniczych.

W Polsce badania dotyczące mikrorozmnażania prowadzone są w ośrodkach w Warszawie, Poznaniu, Łodzi, Krakowie, Gdańsku. W ośrodku warszawskim opracowano metody mikrorozmnażania zarówno roślin z innych stref klimatycznych, m.in. *Catharanthus roseus*, *Dioscorea deltoidea*, *Bergenia sp.*, jak i rosnących w Polsce w sztucznych kolekcjach uprawowych, ale atakowanych np. przez szkodniki – m.in. *Carum carvi* [36].

Ważnym przykładem mnożenia roślin z wykorzystaniem kultur *in vitro* może być metoda opracowana w ośrodku krakowskim dla *Scilla maritima* [37]. Dobrym przykładem nowszych badań może być metoda mnożenia 3 gatunków *Drosera sp.* opracowana w Gdańsku, czy też *Pueraria lobata* zaproponowana przez ośrodek poznański [38, 39].

Zakończone powodzeniem próby opracowania metody mikrorozmnażania podjęto także w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej CM UJ. Dotyczyły one mikrorozmnażania *Leucosium vernum*, gatunku będącego źródłem ważnych w terapii alkaloidów – galantaminy i likoryny. Dla wymienionego gatunku opracowano protokoły mikrorozmnażania zarówno na drodze organogenezy, jak i somatycznej embriogenezy [40].

Dokładniej zagadnienia dotyczące tego kierunku badawczego w biotechnologii roślin zostaną przedstawione w części IV artykułu.

Inne ważne kierunki badawcze

Bardzo istotnym z farmaceutycznego punktu widzenia kierunkiem badawczym biotechnologii roślin są też prace z zakresu biochemii, biologii molekularnej i równocześnie enzymologii, zmierzające do ustalenia szlaków biogenetycznych prowadzących do powstania ważnych terapeutycznie związków pochodzenia roślinnego. Poznanie enzymów uczestniczących w biogenezie metabolitów, izolacja enzymów, ich charakterystyka fizykochemiczna, ma nie tylko ogromne znaczenie poznawcze. Wyizolowane enzymy można wykorzystać w celach praktycznych, w produkcji metabolitów wtórnych. Same enzymy też mogą być oczekiwanym produktem o cennych właściwościach biologicznych. Wymienione badania

prowadzone są w ramach kierunku określanego jako inżynieria enzymatyczna.

Nowe spojrzenie na biotechnologię roślin

Unia Europejska oraz Organization for Economic Cooperation and Development przyjęły klasyfikację wszystkich badań biotechnologicznych określaną różnymi kolorami. Problematyka badawcza obejmująca biotechnologię roślin (aspekty rolnicze), to według tej klasyfikacji tzw. biotechnologia zielona. Biotechnologię wykorzystywaną w ochronie zdrowia przyjęto określać jako biotechnologię czerwoną. Wyróżnia się ponadto biotechnologię białą i niebieską. W ramach biotechnologii białej prowadzi się prace wykorzystujące organizmy żywe w ochronie środowiska i produkcji przemysłowej. Biotechnologia niebieska bazuje na wykorzystywaniu organizmów morskich, głównie glonów.

Biotechnologia roślin, to tradycyjnie biotechnologia zielona. Uwzględniając jednak zasygnalizowane powyżej możliwości wykorzystania metod biotechnologii roślin w produkcji metabolitów wtórnych o walorach terapeutycznych, a szczególnie transformowanych roślin w produkcji biofarmaceutyków (m.in. szczepionek, przeciwciał monoklonalnych), należy uznać, że już dziś stanowi integralną część biotechnologii czerwonej, a pozycja ta z pewnością umocni się jeszcze bardziej w najbliższej przyszłości.

Piśmiennictwo (wybór)

1. Malepszy S. (red.): Biotechnologia roślin. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001. s. 608, ISBN 83-01-13566-2.
2. Zentkeler M. (red.): Hodowla komórek i tkanek roślinnych. Warszawa: PWN, 1984. s. 480, ISBN 83-01-04944-8.
3. Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M., Thorpe T.A.: Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In: *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – Plant. 1996. 32 (4), s. 272-289.
4. Sidwa-Gorycka M., Królicka A., Kozyra M., Głowniak K., Bourgaud F., Łojkowska E.: Establishment of a co-culture of Ammi majus L. and Ruta graveolens L. for the synthesis of furanocoumarins. *Plant Sci.* 2003. 165(6), s. 1315-1319.
5. Łuczkiwicz M., Kokotkiewicz A.: Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. *Plant Sci.* 2005. 169(5), s. 862-871.
6. Wilken D., González E.J., Hohe A. i wsp.: Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. In: Hvoslef-Eide A.K., Preil W. (ed.) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Netherlands: Springer Verlag, 2005. s. 525-537.
7. Pietrosiuk A., Furmanowa M.: Biotechnologia roślin w ochronie zdrowia człowieka. *Biotechnologia.* 2006. 4 (75), s. 116-123.
8. Chmiel A.: Biotechnologia komórek roślinnych. *Biotechnologia*, 1992. 4(19), s. 5-16.
9. Chmiel A.: Biotechnologia farmaceutyczna: dokonania wieku XX i oczekiwania wieku XXI. *Biotechnologia*, 2002. 4 (59), s. 56-78.
10. Chmiel A.: Przemysłowa biotechnologia leku roślinnego. *Farm. Pol.*, 2002. 58 (3), s. 103-110.
11. Ramawat K.G. (red.): *Biotechnology of Medicinal Plants. Vitalizer and Therapeutic*. Enfield (NH), USA, Plymouth, UK, Science Publishers, Inc., 2004. s. 302, ISBN 1-57808-338-9.
12. Ramawat K.G., Merillon J.M. (ed.): *Biotechnology – Secondary Metabolites. Plants and Microbes*. Enfield (NH), USA, Science Publishers Inc., 2007. s. 565, ISBN 978-1-57808-428-9.

13. Furmanowa M.: Znaczenie biotechnologii roślinnej w wytwarzaniu cytotstatyków. *Biotechnologia*, 1992. 4 (19), s. 27-36.
14. Sykłowska-Baranek K., Furmanowa M.: Taxane production in suspension culture of *Taxus x media* var. *Hicksii* carried out in flasks and bioreactor. *Biotechnology Lett.*, 2005. 27 (17), s. 1301-1304.
15. Pietrosiuk A., Furmanowa M.: Preliminary results of indole alkaloids production in different roots of *Catharanthus roseus* cultured *in vitro*. *Acta Soc. Bot. Polon.* 2001. 70 (4), s. 261-265.
16. Ramawat K.G., Meeta Mathur.: Factors affecting the production of secondary metabolites. [w] Ramawat K.G., Merillon J.M. (red.): *Biotechnology – Secondary Metabolites. Plants and Microbes*. Enfield (NH), USA, Science Publishers Inc., 2007. s. 59-102.
17. Ekiert H.: Accumulation of biologically active furanocoumarins within *in vitro* cultures of medicinal plants. In: Ramawat K.G. (red.): *Biotechnology of Medicinal Plants. Vitalizer and Therapeutic*. Enfield (NH) USA, Plymouth UK, Science Publishers Inc., 2004. s. 267-296.
18. Charwood B.V., Charwood K.A., Molina-Torres J.M.: Accumulation of secondary compounds by organized plant cultures. [w] Charwood B.V., Rhodes M.J.C. (ed.): *Secondary products from plant tissue cultures*. Oxford: Clarendon Press, 1990. s. 167-200.
19. Szpitter A., Królicka A.: Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. *Biotechnologia*, 2005. 4 (71), s. 82-108.
20. Eilert U.: Elicitor Induction of Secondary Metabolism In Dedifferentiated and Differentiated *In Vitro* Systems of *Ruta graveolens*. [w] Kurz W.G.W. (red.): *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1989. s. 219-228.
21. Szewczyk A.: Wpływ elicytacji jasmonianem metylu na akumulację kwasów fenolowych w kulturach zawieszonych *Ginkgo biloba* L. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 2008. z. 524, s. 419-423.
22. Saito K., Yamazaki M., Murakoshi I.: Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium* – mediated gene transfer and production of secondary metabolites. *J. Nat. Prod.* 1992. 55 (2), s. 149-162.
23. Ruyter C.M., Stöckigt J.: Neue Naturstoffe aus pflanzlichen Zell – und Gewebe – kulturen – eine Bestandsaufnahme. *GIT Fachz. Lab.* 1989. 33 (4), s. 283-293.
24. Petit-Paly G., Ramawat K.G., Chenieux J.C., Rideau M.: *Ruta graveolens*: *In vitro* production of alkaloids and medicinal compounds. [w] Bajaj Y.P.S. (red.): *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 7. Medicinal and Aromatic Plants II*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1986. s. 488-505.
25. Giri A., Dhingra V., Giri C.C. i wsp.: Biotransformations using plant cells organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 2001. 19 (3), s. 175-199.
26. Wysokińska H., Chmiel A.: Biotransformacje substancji czynnych. [w] Malepszy S. (red.): *Biotechnologia roślin*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001. s. 144-170.
27. Skrzypczak-Pietraszek E., Szewczyk A., Piekoszewska A., Ekiert H.: Biotransformation of hydroquinone to arbutin in plant *in vitro* cultures – preliminary results. *Acta Physiol. Plant.* 2005. 27 (1), s. 79-87.
28. Ekiert H., Czygan F.–Ch.: Secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. [w] Ramawat K.G., Merillon J.M. (ed.): *Biotechnology: secondary metabolites*. Enfield (NH), USA, Science Publishers Inc., 2007. s. 445-482.
29. Wysokińska H., Chmiel A.: Transformed Root Cultures for Biotechnology. *Acta Biotechnol.* 1997. 17 (2), s. 131-159.
30. Wysokińska H.: Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach korzeni transformowanych. *Biotechnologia*. 2000. 4 (51), s. 32-39.
31. Chmiel A., Wysokińska H.: *Biotechnologia korzeni włośnikowatych*. [w] Malepszy S. (red.): *Biotechnologia roślin*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001. s. 433-446.
32. Wysokińska H., Chmiel A.: Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych. *Biotechnologia*. 2006. 4 (75), s. 124-135.
33. Kohl Münzer S., Ekiert H.: Komórki i organizmy transgeniczne jako potencjalne źródło nowych leków. *Farmacja Polska*. 1999. 55 (15), s. 691-695.
34. Hammond J.: Overview: The Many Uses and Applications of Transgenic Plants. [w] Hammond J., Mc Garvey P., Yusibov V. (ed.): *Plant Biotechnology. New Products and Applications*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 2000. s. 1-19.
35. Bajaj Y.P.S., Furmanowa M., Olszowska O.: *Biotechnology of the Micropropagation of Medicinal and Aromatic Plants*. [w] Bajaj Y.P.S.: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 4. Medicinal and Aromatic Plants I*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1988. s. 60-103.
36. Furmanowa M.: Mikrorozmnażanie roślin leczniczych. *Biotechnologia*. 1992. 4 (19), s. 17-20.
37. Stojakowska A.: Micropropagation of *Urginea maritima* (L.) Baker. *Acta Soc. Bot. Polon.* 1993. 68 (1-2), s. 11-15.
38. Kawiak A., Królicka A., Łojkowska E.: Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003. 75 (2), s. 175-178.
39. Thiem B.: *In vitro* propagation of isoflavone – producing *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Plant Sci.* 2003. 165 (5), s. 1123-1128.
40. Ptak A., Cierniak O.: Regeneration of summer snowflake (*Leucjum aestivum* L.) in *in vitro* cultures. *Biotechnologia*. 2003. 4(63), s. 239-245.