



## Kultury korzeni transformowanych *Centaurium erythraea* Rafn

Ewelina Piątczak<sup>1</sup>, Marzena Wielanek<sup>2</sup>, Aleksandra Królicka<sup>3</sup>,  
Ewa Łojkowska<sup>3</sup>, Halina Wysokińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny,  
Łódź

<sup>2</sup>Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, Łódź

<sup>3</sup>Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna, Gdańsk

### Hairy root culture of *Centaurium erythraea* Rafn

#### Summary

In this study, the transformed root culture of *Centaurium erythraea* was established, as a result of infection of leaves with agropine strain of *Agrobacterium rhizogenes* (LBA 9402). The frequency of root formation depended on the kind of explants and the presence of acetosyringone in the bacteria medium. The transformation was confirmed according to the analysis of opines and RAPD-PCR. As a result of transformation, 30 clones of hairy roots were obtained. These clones were grown in liquid Woody Plant (WPM) medium without growth regulators. The curve of growth indicates that fresh weight of roots increased almost 17 times, and dry weight increased 12 times during 55 days. Hairy roots of *C. erythraea* were able to produce secoiridoid glycosides (sweroside, gentiopicroside, swertiamarine).

#### Key words:

*Centaurium erythraea* Rafn, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy roots, secoiridoids.

#### Adres do korespondencji

Ewelina Piątczak,  
Zakład Biologii i Botaniki  
Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Medyczny,  
ul. Muszyńskiego 1,  
90-151 Łódź.

### 1. Wstęp

*Centaurium erythraea* Rafn (tysiącchnik pospolity) z rodziny *Gentianaceae* jest dwuletnią lub jednoroczną rośliną występującą w stanie naturalnym w całej Europie aż po północną Skandynawię, w Azji oraz w Ameryce Północnej. Ziele tysiącznika (*Centaurii*

*herba*) jest surowcem leczniczym znajdującym się w farmakopeach wielu krajów. Nadziemne części tyśiącznika są stosowane w zaburzeniach żołądkowych, jako środek tonizujący oraz przeciwozbaczy (1). Za lecznicze działanie surowca odpowiadają glikozydy sekoirydoidowe (m.in. gencjopikrozyd, swerozyd, swertiamaryna) (2) oraz ksantony (3). Ze względu na duże zapotrzebowanie na ten surowiec, naturalne stanowiska występowania tyśiącznika zostały znacznie zubożone. W wielu krajach roślina ta jest wpisana na „Czerwoną Listę” gatunków zagrożonych wyginięciem (4). W Polsce gatunek ten znajduje się pod częściov ochron.

W pracy zostały podjęte próby transformacji *C. erythraea* za pomocą glebowej bakterii *Agrobacterium rhizogenes*. Zakażenie roślin dwuliściovnych *A. rhizogenes* prowadzi zwykle do powstania w miejscu zranienia korzeni włośnikowatych. Korzenie te tworzą się w wyniku przeniesienia fragmentu DNA z plazmidu Ri z bakterii do komórek roślinnych (5). Kultury korzeni transformowanych charakteryzują się stabilną i wysoką produkcj metabolitów wtórnych. W pracy sprawdzono, czy korzenie włośnikowate *C. erythraea* produkują glikozydy sekoirydoidowe, metabolity charakterystyczne dla tego gatunku. Zbadano również wpływ rodzaju eksplantatu i dodatku acetosyringonu (AS) na efektywność transformacji *C. erythraea*. W dalszym etapie pracy opracowano optymalne warunki dla uzyskania stabilnych kultur korzeni transformowanych. W dwóch najlepiej rosnących klonach oznaczono zawartość glikozydów sekoirydoidowych (gencjopikrozydu, swertiamaryny i swerozydu).

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Uzyskanie korzeni transformowanych

Jako eksplantatów do transformacji użyto liści, połówek liści (przeciętych w poprzek nerwu głównego) oraz szczytowych części pędów (dł. ok. 1 cm). Eksplantaty otrzymano z czterotygodniowych pędów *C. erythraea* rosnących na agarowym (0,7%) podłożu Murashige i Skooga (MS) (6) bez regulatorów wzrostu. Eksplantaty zakażano agropinowym szczepem *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 z plazmidem pRi 1855. Przed zakażaniem szczep inkubowano na agarowym podłożu LB (7) z dodatkiem AS (20 mg/l) lub bez dodatku tego związku, w temperaturze 26°C, przez 48 godzin, w ciemności. Eksplantaty zakażano poprzez nakłucie sterylną igł zanurzon w zawieszynie bakteryjnej i umieszczano na agarowym podłożu MS bez regulatorów wzrostu. Jako kontroli użyto eksplantatów nakłutych sterylną igł. Eksperyment powtórzono 4 razy. Liczba eksplantatów wynosiła łącznie 30-40. Po 7 dniach zakażone i kontrolne eksplantaty przenoszono na świeżą pożywkę MS uzupełnioną ampicylin (0,5 g/l) w celu eliminacji bakterii. W odstępach 7-dniowych określano tworzenie się korzeni na eksplantatach w miejscu zakażenia. Po 56 dniach korzenie odcinano i umieszczano w 300 ml kolbach Erlenmayera zawierających 80 ml plynego



podłoża  $\frac{1}{2}$  B<sub>5</sub> (8) uzupełnionego sacharozą (20 g/l) lub WPM (9) zawierającego 30 lub 50 g/l sacharozy. Do podłoży dodawano ampicylinę (od 0,5 do 0,25 g/l). Po 11 pasażach (co 7 dni każdy) antybiotyk usunięto z podłoża. Od tego czasu każdy pasaż trwał 4 tygodnie. Kultury prowadzono w ciemności w temperaturze 26°C.

## 2.2. Potwierdzenie transformacji

W celu potwierdzenia faktu transformacji komórek *C. erythraea* przeprowadzono analizę obecności mannopiny i reakcję łańcuchową polimerazy z arbitralnie dobranymi starterami (RAPD). Badania przeprowadzono na dwóch najlepiej rosnących klonach korzeni włośnikowatych (K4M i K18). Próbę kontrolną stanowiły korzenie *C. erythraea* pochodzące z roślin hodowanych *in vitro*.

Korzenie homogenizowano w próbówce i odwirowano (14 000 obr/min). Supernatanty (15  $\mu$ l) nanoszono pasmowo na paski bibuły Whatman 3 MM. Na oddzielny pasek nanoszono wzorzec mannopiny (2  $\mu$ l). Elektroforezę przeprowadzono metodą opisaną przez Petit i wsp. (10), a elektroforogram wywoływano wg metody opisanej przez Thron i wsp. (11). Obecność mannopiny w ekstraktach z tkanki korzeni transformowanych stwierdzano na podstawie obecności charakterystycznej dla wzorca plamy na elektroforogramie.

Do izolacji DNA z korzeni *C. erythraea* zastosowano metodę CTAB/PVP (12). W celu potwierdzenia transformacji wykonywano „fingerprinting” genomowego DNA metodą RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*) z 3 starterami firmy Operon Co. o następujących sekwencjach: OPA-03 5` AGTCAGCCAC 3`; OPA-17 5` GACCGCTTGT 3`; OPA-18 5` AGGTGACCGT 3`.

## 2.3. Ekstrakcja i oznaczanie zawartości sekoirydoidów za pomocą HPLC

W badaniach tych wykorzystano 2 klony korzeni transformowanych (K4M i K18) otrzymanych po 12-14 pasażach, po 4 tygodniach hodowli w płynnym podłożu WPM oraz korzenie nie transformowane pochodzące ze zregenerowanych *in vitro* roślin po 10 tygodniach wzrostu w glebie (korzenie kontrolne). Wysuszone i sproszkowane korzenie w ilości 0,3-0,6 g ekstrahowano trzykrotnie metanolem (MeOH) w ciągu 30 minut. Połączone metanolowe ekstrakty odparowywano do sucha na wyparce próżniowej, a suchą pozostałość zalewano gorącą wodą o temperaturze 60°C. Po 24 godzinach odsączano zanieczyszczenia, a filtrat odparowywano do sucha. Oczyszczanie przeprowadzano na mikrokolumnach z Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1,5 g, Merck). Frakcje zawierające sekoirydoidy wmywane z kolumny wodą w ciągu 30 minut połączone i odparowano do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczano w 1 ml MeOH. Oznaczenia prowadzono przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). 20  $\mu$ l z każdej próbki nanoszono na kolumnę Hypersil ODS C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (250  $\times$  4 mm, Hewlett

Packard); prędkość przepływu 0,8 ml/min; długość fali 260 nm. Próbkę eluowano w gradiencie stężeń układem acetonitryl: 3% kwas octowy (95:5 → 0:100). Identyfikację sekoirydoidów przeprowadzono na podstawie porównania czasów retencji i widma UV substancji badanych i wzorcowych glikozydów (gencjopikrozyd, swerozyd i swertiamaryna). Ilościową zawartość określano na podstawie porównania pól powierzchni wzorców gencjopikrozydu, swerozydu i swertiamaryny z polami powierzchni pików badanych próbek. Wyniki są średnią z trzech prób  $\pm$  błąd standardowy.

### 3. Wyniki i dyskusja

W wyniku transformacji otrzymano 30 klonów korzeni. Intensywność tworzenia korzeni zależała od typu eksplantatu i od obecności AS w podłożu, na którym hodowano bakterie. Najlepszymi eksplantatami do transformacji okazały się wierzchołkowe części pędów. Spośród tego rodzaju eksplantatów, 52% wytwarzało korzenie włóśnikowate po infekcji szczepem LBA 9402 *A. rhizogenes* hodowanym na podłożu bez AS. Korzenie wyrastały bezpośrednio z eksplantatów o długości ok. 1 cm. Liczba korzeni wytworzonych na eksplantacie wahała się od 1 do 5 (średnio 3). Mniej podatnymi na transformację okazały się eksplantaty z blaszki liściowej. Korzenie powstały tylko w przypadku 10-15% całych blaszek i 0-6,6% połówek blaszek liściowych (tab. 1). Korzenie tworzyły się również na niektórych eksplantatach kontrolnych (nie infekowanych przez *A. rhizogenes*), jednak po przeniesieniu do płynnego podłoża nie obserwowano ich wzrostu. W literaturze jest jedno doniesienie o transformacji *C. erythraea* (4). Janković i wsp. (4) podają, że najwyższą efektywność transformacji (92%) uzyskali stosując szczytowe części pędów i szczep bakteryjny A4M70GUS.

Tabela 1

Wpływ acetosyringonu i rodzaju eksplantatu na wytwarzanie korzeni włóśnikowatych *C. erythraea* Rafn

Rodzaj eksplantatu	Liczba eksplantatów	Eksplantaty tworzące korzenie (%)	
		szczep LBA - Ac	szczep LBA + Ac
połowa blaszki liściowej:			
ze szczytem	40	5	5
z nasadą	30	6,6	0
cała blaszka liściowa	40	15	10
szczytowa część pędu	40	52	30

Podłoże MS bez regulatorów wzrostu zestalone agarem. Obserwacji dokonywano po 8 tygodniach kultury; +AS – bakterie inkubowano na podłożu wzbogaconym w acetosyringon (20 mg/l), -AS – bakterie inkubowano na podłożu bez acetosyringonu.

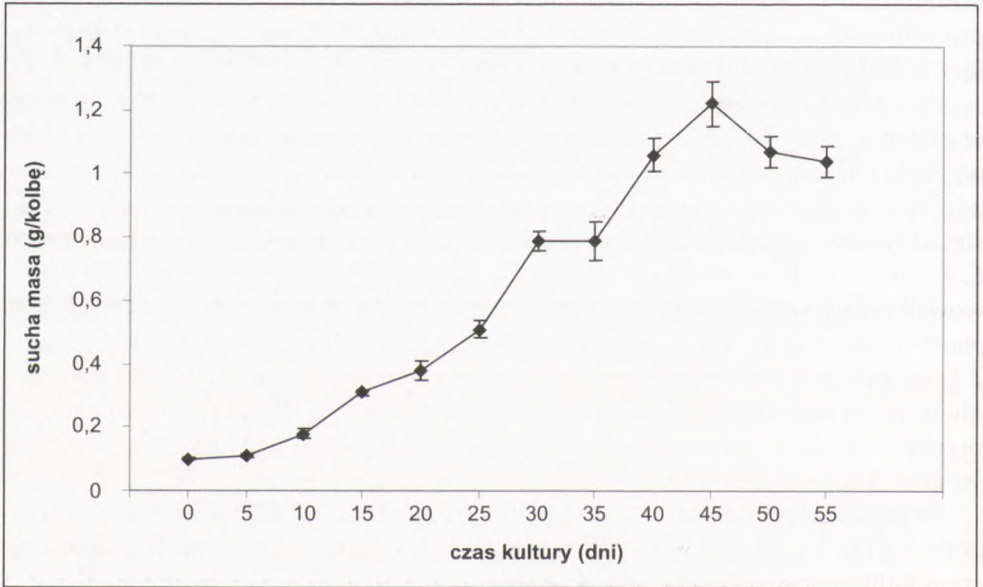
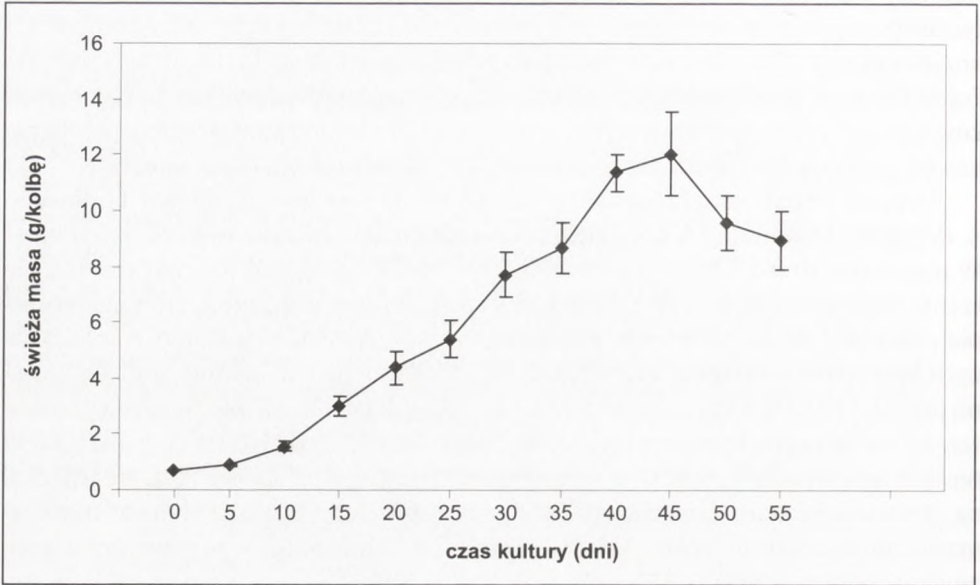


Transformację potwierdzano poprzez stwierdzenie obecności mannopiny w ekstraktach z korzeni włośnikowatych oraz przez porównanie obrazów elektroforetycznych uzyskanych w wyniku analizy produktów RAPD uzyskanych po zastosowaniu jako matrycy DNA izolowanego z korzeni włośnikowatych i korzeni kontrolnych. Polimorfizm w porównywanych elektroforogramach (pojawianie się nowych prążków lub brak prążków charakterystycznych dla prób kontrolnych) świadczył o włączeniu do genomu *C. erythraea* fragmentów DNA *A. rhizogenes* bakteryjnego.

W pracy tej stwierdzono, że obecność AS w pożywce na której hodowano *A. rhizogenes* hamowała lub opóźniała tworzenie korzeni włośnikowatych *C. erythraea*. W obecności 20 mg/l AS w pożywce maksimum 30% eksplantatów wytworzyło korzenie włośnikowate w czasie 8 tygodni (tab. 1). W tym przypadku pierwsze korzenie pojawiały się po 14 dniach, podczas gdy w przypadku eksplantatów infekowanych bakteriami rosnącymi na pożywce bez AS korzenie włośnikowate obserwowano już po 7 dniach od momentu zakażenia. Efekt działania AS, jak się wydaje, może zależeć od gatunku transformowanej rośliny; dodatek tego związku zwiększał efektywność transformacji, np. *Salvia miltiorrhiza* (13) i *Atropa belladonna* (14); nie wpływał na efektywność transformacji, np. *Hyoscyamus muticus* (15) oraz hamował transformację, np. *Nicotiana tabacum* i *Antirrhinum majus* (16). Być może ma to również związek ze sposobem stosowania AS (dodawanie do podłoża na którym rosną bakterie lub do podłoża, w którym są umieszczane zakażone eksplantaty). Tkanki *C. erythraea* prawdopodobnie wytwarzają związki fenolowe typu AS na poziomie wystarczającym do indukcji ekspresji genów *vir*.

Korzenie *C. erythraea* po oddzieleniu od eksplantatów najintensywniej rosły w płynnym podłożu WPM (30 g/l sacharozy); spośród uzyskanych linii klonalnych wyselekcjonowano 8 klonów korzeni włośnikowatych. Niektóre klony wykazywały zdolność do spontanicznego wytwarzania pędów przybyszowych, z których udało się zregenerować całe rośliny. Regenerację pędów na korzeniach transformowanych *C. erythraea* zaobserwowali także Janković i wsp. (4). Vinterhalter i wsp. (17) obserwowali powstawanie pędów przybyszowych na korzeniach włośnikowatych *Gentiana punctata*, ale dopiero po wzbogaceniu podłoża w odpowiednie regulatory wzrostu. Z kolei korzenie transformowane *Antirrhinum majus* wytwarzały pędy po wzbogaceniu pożywki w herbicyd bialafos (18). Znane są również przypadki tworzenia pędów przybyszowych po przeniesieniu kultur korzeni włośnikowatych z ciemności na światło (19).

W przypadku wyselekcjonowanych klonów korzeni włośnikowatych *C. erythraea* (K4M i K18), dla których fakt transformacji został potwierdzony analizą opin i testem RAPD, wyznaczono krzywą wzrostu kultur korzeni i przeprowadzono badania fitochemiczne. Cykl wzrostu korzeni klonu K18 trwał około 45 dni (rys.). Po tym czasie zanotowano 17-krotny przyrost świeżej masy (12,03 g/kolbę) i 12-krotny przyrost suchej masy (1,22 g/kolbę). Wyników tych nie można porównać z danymi piśmiennictwa, bowiem Janković i wsp. (4) nie podają parametrów wzrostu dla otrzymanych korzeni transformowanych *C. erythraea*.



Rys. Krzywa wzrostu korzeni transformowanych (klon K18) *C. erythraea*. Korzenie inkubowano w ciemności w płynnym podłożu WPM bez regulatorów wzrostu (30 g/l sacharozy). Wyniki są średnią z 3 powtórzeń  $\pm$ SE.



### 3.1. Wytwarzanie glikozydów sekoirydoidowych

Wykazano, że korzenie transformowane *C. erythraea* są zdolne do produkcji sekoirydoidów (gencjopikrozydu, swerozydu i swertiamaryny). Obydwa klony produkowały swerozyd i swertiamarynę na podobnym poziomie, natomiast różniły się zawartością gencjopikrozydu. Klon K18 produkował prawie dwukrotnie więcej tego związku niż klon K4M. Z porównania zawartości sekoirydoidów w korzeniach transformowanych i nie transformowanych wynika, że te ostatnie produkują trzykrotnie więcej badanych glikozydów (tab. 2). Trzeba jednak zaznaczyć, że korzenie nie transformowane nie pochodziły z kultury *in vitro*, ale ze zregenerowanych roślin rosnących w doniczkach przez 10 tygodni. Janković (4) zaobserwował, że korzenie transformowane *C. erythraea* w ogóle nie wytwarzały sekoirydoidów, a glikozydy te pojawiały się dopiero w pędach powstających na tych korzeniach.

Tabela 2

Zawartość glikozydów sekoirydoidowych w transformowanych i nie transformowanych korzeniach *C. erythraea*

Material	Zawartość glikozydów sekoirydoidowych (mg/g s.m.)		
	gencjopikrozyd	swerozyd	swertiamaryna
korzenie transformowane klon K4M	6,62 ± 0,43	0,67 ± 0,01	2,58 ± 0,34
korzenie transformowane klon K18	11,29 ± 0,77	0,54 ± 0,05	2,32 ± 0,23
korzenie roślin nie transformowanych	33,11 ± 10,14	1,54 ± 0,36	9,43 ± 0,9

Kultury korzeni transformowanych prowadzono w płynnym podłożu WPM (30 g/l sacharozy) w ciemności przez 4 tygodnie. Korzenie nie transformowane pochodziły z 10-tygodniowych roślin zregenerowanych *in vitro*. Wyniki są średnią z 3 prób ± błąd standardowy.

Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi w ramach działalności statutowej nr 503-312-1 oraz przez Uniwersytet Gdański w ramach projektu nr B051-5-0250-3.

### Literatura

1. Skrzypczak L., Wesołowska M., Skrzypczak E., (1993), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 21, Medicinal and Aromatic Plants IV., Ed. by Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 172-186.
2. van der Sluis W. G., (1985), Drukkerij Elinkwijk bv, Utrecht.
3. Mencović N., Fodulović K., Momčilović I., Grubišić D., (2000), *Planta Med.*, 66, 96-98.
4. Janković T., Krstić D., Šavikin-Fodulović K., Mencović N., Grubišić D., (2002), *Planta Med.*, 68, 944-946.

5. Chilton M. D., Tepfer D. A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., Tempe J., (1982), *Nature*, 295, 432-434.
6. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
7. Lloyd A. M., Barnason A. R., (1986), *Science*, 234, 465-466.
8. Gamborg O. L., Eveleigh D. E., (1968), *Can. J. Biochem.*, 46, 417-421.
9. Lloyd G. B., McCown B. H., (1980), *Inf. Plant Prop. Soc.*, 30, 421-427.
10. Petit A., David C., Dahl G. A., Ellis J. G., Guyon P., Casse-Delbart F., Tempe J., (1983), *Mol. Gen. Genet.*, 190, 204-214.
11. Thron U., Maresh L., Beiderbeck R., Reichling J., (1998), *Z. Naturforsch.*, 44c, 573-577.
12. Pirttilä A. M., Hirsikorpi M., Kämäräinen T., Jaakola L., Hohtola A., (2001), *Plant Mol. Boil. Rep.*, 19, 273a-f.
13. Hu S. Y., Alfermann A. W., (1993), *Phytochemistry*, 32, 669-703.
14. Mathews H., Bharathan N., Litz R. E., Narayan K. R., Rao P. S., Bhatia C. R., (1990), *J. Plant Physiol.*, 136, 404-409.
15. Vanhala L., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K. M., (1995), *Plant Cell Rep.*, 14, 236-240.
16. Godwin I., Todd G., Ford-Lloyd B., Newbury H. J., (1991), *Plant Cell Rep.*, 9, 671-675.
17. Vinterhalter B., Orbivič V., Vinterhalter D., (1999), *Acta Soc. Bot. Polon.*, 68, 275-280.
18. Hoshino Y., Mii M., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 256-261.
19. Nada T., Tanaka N., Nebeshima S., Ohkawa H., Matsuni C., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 283-286.