



Kultury korzeni transformowanych *Arnica montana* L. – izolacja metabolitów wtórnych

Izabela Weremczuk-Jeżyna, Halina Wysokińska

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Transformed root cultures of *Arnica montana* L. – of secondary metabolites isolation

Summary

The hairy roots of *A. montana* were obtained by the infection of sterile leaves with *Agrobacterium rhizogenes* (strain LBA 9402). The transformation was confirmed by opim and PCR analysis. In the investigation, the optimum contitions of hairy roots growth were characterized. The best results were achieved in liquid Gamborg medium which included half-strenght macro- and microelements (1/2B5) and 50 g/l sucrose. Phytochemical analysis showed that hairy roots of *A. montana* produced arnifolin and chlorogenic acid.

Key words:

Arnica montana, hairy root culture, transformation, chlorogenic acid, arnifolin.

1. Wstęp

Arnika górska – *Arnica montana* L. nazywana również kupalnikiem górskim należy do rodziny astrowatych (*Asteraceae*). Jest to roślina wieloletnia spotykana na górskich łąkach środkowej Europy, Azji oraz Ameryki Północnej. Niekiedy rośnie na niżu, m.in. na Litwie i Białorusi. W Polsce występuje dość rzadko w Sudetach i Karpatach oraz na Mazurach, Suwalszczyźnie i w Puszczy Białowieńskiej; objęta jest ścisłą ochroną. Arnika górska jest interesującą rośliną leczniczą, jej właściwości były wykorzystywane przez medycynę już w średniowieczu, a w XVIII w. roślina ta została wprowadzona do medycyny oficjalnej (1). W *Farmakopei Polskiej* V podaje się,

Adres do korespondencji

Izabela
Weremczuk-Jeżyna,
Zakład Biologii i Botaniki
Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź.

biotechnologia

2 (65) 54–60 2004

że surowcem leczniczym są koszyczki arniki (*Arniceae anthodium*), a w *Farmakopei Hiszpańskiej* i *Włoskiej* jako surowiec wymienia się również kłącze (*Arniceae rhizoma*) (2). Działanie lecznicze rośliny warunkują związki chemiczne takie jak: laktony seskwiterpenowe typu gwajanolidów (m.in. helenalina, dihydrohelenalina), flawonoidy (izokwercytyna, astragalina, luteolina), olejek eteryczny (zawierający m.in. tymol, eter metylowy tymolu, ester izomasłowy tymolu i seskwiterpeny), kwasy organiczne (cynamonowy, chlorogenowy, kawowy i in.).

Arnika górską jest trudna w uprawie, wymaga gleby mineralno-próchnicznej o odpowiednim zakwaszeniu. Ze względu na wykorzystanie przez arnikę zjawiska mikoryzy, konieczne jest zapewnienie jej właściwego symbionta-grzyba glebowego. Arnikę rozmnaża się przez wysiew nasion, a bardzo rzadko z rozłogów. Nasiona kiełkują dobrze, jednak siewki zwykle obumierają w ciągu pierwszego roku wegetacji. Rośliny rozwijają się bardzo wolno, a surowiec można zbierać dopiero po 3-4 latach (3). Trudności te sprawiają, że podejmowane są badania nad uzyskaniem biomasy bogatej w metabolity wtórne metodami biotechnologicznymi. Atrakcyjnym modelem dla produkcji metabolitów wtórnych są kultury korzeni transformowanych.

Celem pracy było uzyskanie korzeni włośnikowatych *A. montana*, opracowanie optymalnych warunków oraz scharakteryzowanie dynamiki ich wzrostu. Korzenie transformowane badano na obecność metabolitów wtórnych (seskwiterpeny, kwasy fenolowe). W badaniach fitochemicznych wykorzystano klony rosnące na świetle i w ciemności.

2. Materiał i metody

2.1. Kultury korzeni transformowanych

Korzenie transformowane *A. montana* uzyskano w wyniku zakażenia liści bakteriami *Agrobacterium rhizogenes* (szczep LBA 9402). Liście pochodziły z wyhodowanych *in vitro* 4-tygodniowych roślin. Liście zakażano wzdłuż nerwu oraz w ogonek liściowy, po czym umieszczano je w probówkach, na stałym podłożu MS bez regulatorów wzrostu. Probówki trzymano w ciemności. Po 4 tygodniach hodowli, powstałe w miejscu zakażenia korzenie odcinano i przenoszono do płynnej pożywki wg Gamborga (4) ze zredukowaną do połowy ilością makro- i mikroelementów (1/2B5) i z ampicyliną 500 mg/l; antybiotyk wyeliminowano z podłoża po czterech 7-dniowych pasażach. Uzyskano 6 klonów korzeni, które pasażowano w odstępach 4-tygodniowych. Do dalszych badań wybrano klon K6 hodowany w ciemności i klon K5 hodowany na świetle. Fakt transformacji korzeni potwierdzono wykonując analizę opin (obecność mannopiny) (5,6) i stosując metodę PCR (7).

Kultury korzeni prowadzono w kolbach Erlenmeyera o objętości 300 ml, zawierających po 80 ml płynnego podłoża; średnia masa *inoculum* wynosiła ok. 150-200 mg.

Korzenie rosły w fitotronie (temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$), na wytrząsarce rotacyjnej (100 obr/min), przy wilgotności powietrza 80-90%.

Aby wybrać optymalną dla wzrostu korzeni pożywkę, klon K6 po 14 pasażach przenoszono do płynnych podłoży B5, WP (Woody Plant) (8) i MS (Murashige i Skoog) (9). W badaniach zastosowano również warianty tych podłoży, w których ilość makro- i mikroelementów zmniejszono do połowy (1/2B5, 1/2WP, 1/2MS), do jednej trzeciej (1/3B5) lub do jednej czwartej (1/4B5, 1/4WP, 1/4MS). Określono również wpływ sacharozy na wzrost korzeni włośnikowatych *A. montana* (klon K6). W badaniach tych wykorzystano podłoże 1/2B5 zawierające 20, 30, 50, 70 lub 100 g/l sacharozy. Wzrost korzeni (świeża i sucha masa), określano w trzydziestym piątym dniu hodowli; świeżą i suchą masę korzeni wyrażono w g/kolbę oraz, po przeliczeniu, w g/l kultury. Oznaczenia wykonano trzykrotnie, każdorazowo wykorzystano 3-5 kolb. Wyniki przedstawione w tabelach 1 i 2 są średnią \pm odchylenie standardowe.

Po ustaleniu optymalnych warunków hodowli scharakteryzowano dynamikę wzrostu korzeni hodowanych na świetle i w ciemności (klon K5 i K6). Wzrost korzeni określano w odstępach 5-dniowych na podstawie świeżej i suchej masy. Świeżą i suchą masę korzeni wyrażono w g/kolbę. Oznaczenia wykonywano w ciągu 55-dniowego cyklu hodowlanego. Każdorazowo do oznaczenia świeżej i suchej masy wykorzystano 3-5 kolb. Oznaczenia powtarzano trzykrotnie.

2.2. Badania fitochemiczne

2.2.1. Izolacja laktonów seskwiterpenowych

Ze wstępnych badań fitochemicznych wynikało, że laktony seskwiterpenowe wytwarzają tylko korzenie transformowane *A. montana* rosnące na świetle. Dlatego dalszym badaniom na obecność tych związków poddano tylko klon K5. Wysuszone i sproszkowane korzenie (50 g) ekstrahowano chloroformem (3×300 ml) w temp. wrzenia. Ekstrakt chloroformowy zagęszczano i wymywano wodą (3×150 ml). Po oddestylowaniu wody otrzymano 160 mg osadu, który rozdzielano na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelalem krzemionkowym. Jako eluent stosowano mieszaninę toluen-octan etylu (9:1 1:1 v/v). W wyniku rozdziału otrzymano 7 frakcji, które sprawdzano metodą TLC (na płytkach aluminiowych pokrytych żelalem krzemionkowym, w układzie toluen-octan etylu (8:2 v/v); chromatogramy wywoływano odczynnikami anyżowym (firma Ubichem). Na podstawie TLC do dalszych badań wybrano frakcję 4. Frakcję tę rozdzielano na preparatywnej HPLC (Gold firma Beckam, detekcja przy długości $\lambda = 240$ nm; rozdział prowadzono na kolumnie ODS; fazę ruchomą stanowiła mieszanina MeOH:H₂O 91:1 v/v); szybkość przepływu wynosiła 1 cm/min). W wyniku rozdziału uzyskano 5 mg czystego związku, który zidentyfiko-

wano jako arnifolinę. Wyniki analizy spektralnej ($^1\text{H-NMR}$) były zgodne z danymi literaturowymi (10).

2.2.2. Izolacja kwasu chlorogenowego

Korzenie transformowane arniki rosnące w ciemności (klon K6) badano na obecność kwasów fenolowych. Wysuszone i sproszkowane korzenie (75 g) ekstrahowano metanolem (3×300 ml) przez 48 godz. w temp. pokojowej. Otrzymano 18,4 g ekstraktu, który po zagęszczeniu rozpuszczano w wodzie (300 ml). Roztwór wodny ekstrahowano eterem dietylowym (3×150 ml). Z ekstraktu wodnego powstałego po wyekstrahowaniu eterem uzyskano 9 g żółtego osadu. Osad ten rozpuszczono w metanolu i rozdzielano za pomocą chromatografii preparatywnej na płytkach szklanych (20×20 cm) pokrytych żelazem krzemionkowym o grubości 2 mm (Kieselgel 60 F₂₅₄₊₃₆₆-Merck). Chromatogramy rozwijano w układzie: benzen-mrówczan etylu-kwas mrówkowy (1:7:1 v/v/v; detekcja w 366 nm). Widoczne w świetle UV brunatne pasmo zeszkrobywano i wymywano metanolem (3×30 ml) przez 3 godz. w temp. pokojowej. Otrzymano 836 mg białozółtej substancji, którą oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej (Lipophilic Sephadex 2H-20, Sigma); fazę wymywającą stanowił metanol. Otrzymano 20 mg związku, który zidentyfikowano za pomocą analizy spektralnej $^1\text{H-NMR}$ i MS. Uzyskane dane są zgodne z wynikami jakie uzyskali Baumer i Ruppel dla kwasu chlorogenowego wyizolowanego z rośliny *Galactites tomentosa* (11).

3. Wyniki i dyskusja

Z przeprowadzonych badań wynika, że korzenie włósnikowate *A. montana* słabo rosły w podłożach z pełną zawartością makro- i mikroelementów (MS, B5, WP) (tab. 1). Również nieodpowiednie okazały się podłoża, w których zawartość makro- i mikroelementów obniżono do 1/3 i 1/4 (1/3B5, 1/4B5, 1/4WP, 1/4MS). Najwyższe przyrosty biomasy uzyskano w pożywkach, w których zawartość składników mineralnych zredukowano do połowy (1/2MS, 1/2B5, 1/2WP). Optymalnym dla wzrostu korzeni okazało się podłoże 1/2B5; na pożywce tej świeża masa przyrastała ok. 14-krotnie, a sucha masa ok. 26-krotnie. Podłoże to zawierało 20 g/l sacharozy. Dla osiągnięcia dalszych przyrostów biomasy w podłożu 1/2B5 zmieniono zawartość sacharozy (tab. 2). Najlepsze wyniki uzyskano w obecności 50 g/l sacharozy (51,12 g/l świeżej masy i 6,5 g/l suchej masy). Pożywkę 1/2B5 z sacharozą 50 g/l wykorzystano dla wyznaczenia krzywej wzrostu korzeni transformowanych *A. montana* (rys.). Cykl wzrostu trwał 40 dni. W wykonanych po tym czasie pomiarach biomasy wykazano 25-krotny przyrost świeżej masy i 37-krotny przyrost suchej masy dla korzeni hodowanych w obecności światła (klon K5); dla korzeni rosnących w ciemności (klon K6)

przyrosty świeżej masy były 46-krotne, a suchej masy 38-krotne. Porównując te dane stwierdzono, że korzenie transformowane hodowane w ciemności rosną lepiej niż te prowadzone na świetle. Warunki hodowli (światło/ciemność) wpływały również na morfologię korzeni *A. montana*. Korzenie prowadzone na świetle miały barwę zieloną (produkcja chlorofilu), były długie z nielicznymi odgałęzieniami. Korzenie hodowane w ciemności odznaczały się żółtym zabarwieniem oraz większą liczbą długich i cienkich odgałęzień.

Tabela 1

Wzrost korzeni transformowanych *Arnica montana* hodowanych w ciemności (klon K6). W płynnych podłożach z sacharozą 30 g/l. Okres hodowli 5 tygodni

Rodzaj podłoża	Świeża masa		Sucha masa	
	g/kolbę	g/l	g/kolbę	g/l
MS	0,72 ± 0,1	8,97 ± 1,38	0,01 ± 0,002	0,16 ± 0,03
1/2MS	0,76 ± 0,41	9,54 ± 5,13	0,09 ± 0,05	1,15 ± 0,63
1/4MS	0,39 ± 0,08	4,88 ± 1,0	0,05 ± 0,01	0,67 ± 0,13
B5	0,22 ± 0,07	2,72 ± 0,88	0,03 ± 0,01	0,41 ± 0,13
1/2B5	1,03 ± 0,58	15,09 ± 7,26	0,16 ± 0,07	1,99 ± 0,88
1/3B5	0,76 ± 0,67	9,55 ± 8,38	0,14 ± 0,12	1,74 ± 1,5
1/4B5	0,91 ± 0,27	11,36 ± 3,38	0,13 ± 0,04	1,62 ± 0,5
WP	0,71 ± 0,19	8,89 ± 2,38	0,09 ± 0,02	1,22 ± 0,25
1/2WP	1,02 ± 0,47	13,09 ± 5,88	0,12 ± 0,05	1,48 ± 0,625
1/4WP	1,02 ± 0,42	12,77 ± 5,25	0,19 ± 0,08	2,43 ± 1,0

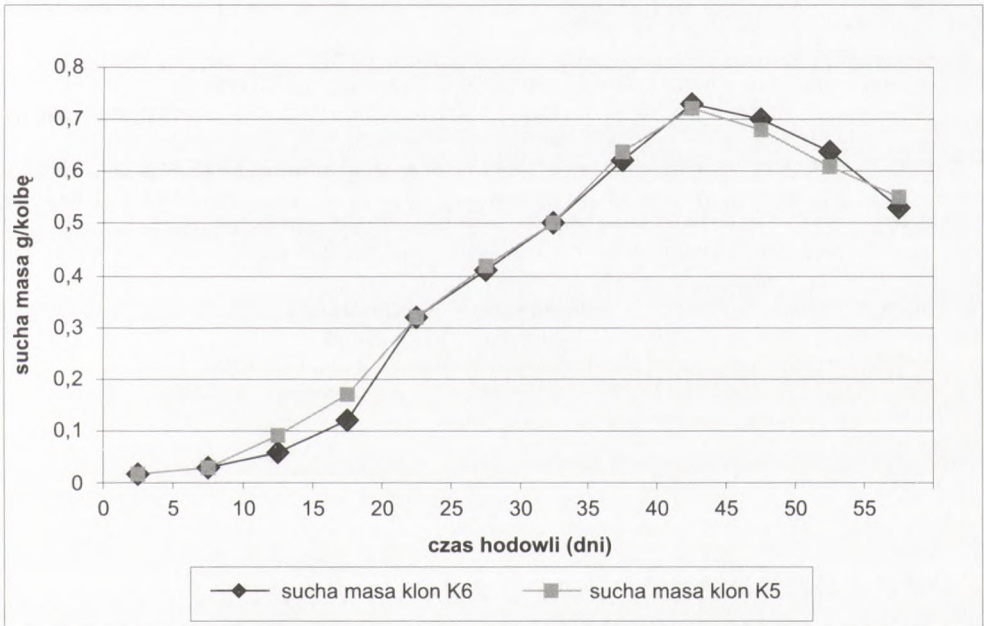
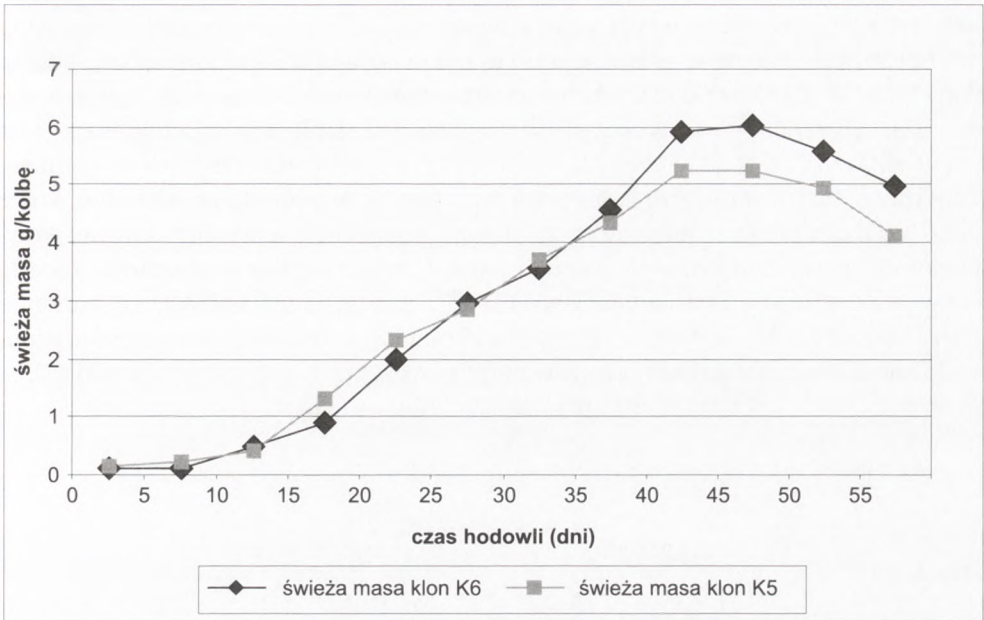
Wyniki są średnią z trzech oznaczeń ± – odchylenie standardowe. Do każdego oznaczenia wykorzystano 3-5 kolb.

Tabela 2

Wpływ sacharozy na wzrost korzeni transformowanych *Arnica montana* (klon K6), hodowanych w płynnym podłożu 1/2B5. Okres hodowli 5 tygodni

Stężenie sacharozy (g/l)	Świeża masa		Sucha masa	
	g/kolbę	g/l	g/kolbę	g/l
20	2,21 ± 0,68	27,69 ± 8,5	0,15 ± 0,05	1,87 ± 0,63
30	3,13 ± 0,72	39,12 ± 9,0	0,34 ± 0,07	4,21 ± 0,88
50	4,09 ± 0,43	51,12 ± 5,38	0,52 ± 0,05	6,51 ± 0,63
70	3,93 ± 0,52	49,14 ± 6,5	0,65 ± 0,09	8,16 ± 1,13
100	3,88 ± 0,63	48,5 ± 7,88	0,79 ± 0,13	9,94 ± 1,63

Wyniki są średnią z trzech oznaczeń ± – odchylenie standardowe. Do każdego oznaczenia wykorzystano 3-5 kolb.



Rys. Krzywa wzrostu korzeni transformowanych *Arnica montana* hodowanych na świetle (klon K5) i w ciemności (klon K6). Wyniki są średnią z trzech oznaczeń, do każdego oznaczenia wykorzystano 3-5 kolb.

Z badań fitochemicznych wynika, że światło ma także wpływ na produkcję metabolitów wtórnych w korzeniach transformowanych *A. montana*. Korzenie hodowane na świetle (klon K5) mają zdolność do syntetyzowania arnifoliny. Być może synteza tego związku związana jest z obecnością chloroplastów. Z dotychczas przeprowadzonych przez innych autorów badań wynika, że arnifolina produkowana jest w kwiatach rośliny (12); nie została natomiast znaleziona w korzeniach *A. montana*. Z literatury znane są również kultury korzeni transformowanych innych roślin, które tylko podczas hodowli na świetle produkują pożądane metabolity wtórne. Przykładem są korzenie transformowane *Lippia dulcis*, które tylko w obecności światła wytwarzają terpenoid-hernandulcynę (13). Z naszych badań wynika, że korzenie transformowane *A. montana* hodowane w ciemności wytwarzają kwas chlorogenowy. Związek ten znaleziono już wcześniej w korzeniach gruntowych arniki (2).

Praca finansowana przez UM w Łodzi w ramach działalności statutowej nr 503-312-1.

Literatura

1. Hausen B. M., (1980), *Der. Hautarzt.*, 31/1, 10-17.
2. Rossetti V., Lombard A., Sancin P., Buffa M., Di Stefano R., (1984), *Inter. J. C. D. Resear.*, (22) 2, 53-60.
3. Kozłowski J., Buchwald W., Szczyglewska D., Forycha A., (2001), *Wiad. Ziel.*, 6, 19-21.
4. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., (1968), *Expt. Cell. Res.*, 50, 151-158.
5. Petit A., Dacid C., Dalul G. A., Ellis J. G., Guyon P., Casse-Delbart F., Tempe J., (1983), *Mol. Gen. Genet.*, 190, 204-214.
6. Thron U., Maresh L., Beiderbeck R., Reichling J., (1998), *Z. Naturforsch.*, 44c, 573-577.
7. Pirttila A. M., Hirsilarpi H., Kamarainen J., Jaakoala L., Haktola A., (2001), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 19, 27a-f.
8. Lloyd G., McCown B., (1980), *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, 30, 421-427.
9. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 50, 473-497.
10. Leven W., Willhn G., (1987), *J. Chromatography*, 410, 329-342.
11. Baumer D., Ruppel H. G., (1996), *Z. Naturforsch.*, 51c, 623-626.
12. Herman H. D., Willuhn G., Hausen B. M., (1978), *Planta Med.*, 33, 299-304.
13. Toya M., Sato H., Kino-Oka M., Tone S., (1994), *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 42-45.