



## Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach korzeni transformowanych

Halina Wysokińska

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej  
Akademia Medyczna, Łódź

### Secondary metabolites from transformed root cultures

#### Summary

Transformed roots in axenic culture would prove to be a good model for the study of the aspects of secondary metabolism. They are morphologically differentiated and have the advantage of high growth in the liquid standard media without growth regulators. Hairy root cultures can express root-specific pathways and have stable production of alkaloids, polyacetylenes, sesquiterpenes, naphthoquinones and other natural products. They can also convert xenobiotics into bioactive metabolites. Thus, new compounds not found in the parent plants could be obtained. Despite encouraging results, no commercial application of hairy root cultures for production of secondary metabolites have been developed, so far. A lot of further work is required to optimize bioreactor design for differentiated plant organ and to improve productivity of hairy roots

#### Key words:

transformed roots, secondary metabolites, biosynthesis, biotransformation.

#### Adres do korespondencji

Halina Wysokińska,  
Zakład Biologii i Botaniki  
Farmaceutycznej,  
Akademia Medyczna,  
ul. Muszyńskiego 1,  
90-151 Łódź.

#### biotechnologia

4 (51) 32-39 2000

### 1. Wstęp

Roślinne kultury *in vitro* są wykorzystywane m.in. do badań nad wytwarzaniem metabolitów wtórnych stosowanych jako leki, środki zapachowe, naturalne barwniki lub pestycydy. Biosynteza tych związków często wymaga zróżnicowanych i wyspecjalizowanych komórek, których brak w kulturach zawiesinowych. Dlatego do tego celu wykorzystuje się kultury organów, głównie korzeni transformowanych, zwanych również włóśnikowatymi.

W pracy przedstawiono możliwości i problemy związane z wykorzystaniem kultur korzeni transformowanych do biosyntezy metabolitów roślinnych. Zamieszczono również dane o biotransformacji egzogennych związków chemicznych w tych kulturach.

## 2. Otrzymywanie i charakterystyka korzeni transformowanych

Korzenie transformowane otrzymuje się po zakażeniu całych roślin, ich części lub roślinnych kultur *in vitro* (kalus, zawiesina) bakteriami glebowymi *Agrobacterium rhizogenes*. Po połączeniu bakterii z komórkami roślinnymi następuje wbudowanie do genomu komórki roślinnej fragmentu DNA (T-DNA) z bakteryjnego plazmidu Ri (*root inducing plasmid*). W wyniku ekspresji genów obecnych na T-DNA, transformowane komórki zmieniają swój metabolizm i wytwarzają w miejscach zranienia liczne korzenie przybyszowe. Cechą charakterystyczną tych korzeni jest m.in. synteza specyficznych aminokwasów, zwanych opinami. Opiny nie są syntetyzowane w normalnych komórkach roślinnych, dlatego mogą służyć jako marker transformacji. W zależności od rodzaju syntetyzowanych opin szczepy *A. rhizogenes* można podzielić na agropinowe, mannopinowe, kukumipinowe i mikimopinowe. W szczepach typu agropiny, T-DNA podzielony jest na dwa fragmenty, lewy (TL-DNA) i prawy (TR-DNA), dzięki czemu szczepy te charakteryzują się wysoką wirulencją. Oba fragmenty T-DNA przenoszone są i ulegają integracji z genomem komórki roślinnej niezależnie od siebie. Na TR-DNA zlokalizowane są geny dla biosyntezy auksyn (*aux* geny) i opin. Natomiast TL-DNA zawiera tzw. *rol* geny *a*, *b*, *c*, i *d*, które są odpowiedzialne za indukcję korzeni i ich fenotyp. W szczepach *A. rhizogenes* typu mannopiny i kukumopiny, region T-DNA składa się z pojedynczego fragmentu, który zawiera sekwencje homologiczne do TL-DNA szczepów agropinowych. Utworzone w wyniku infekcji *A. rhizogenes* korzenie, po oddzieleniu od eksplantatu i wyeliminowaniu bakterii, mogą rosnąć w aseptycznej kulturze, w płynnych podłożach bez regulatorów wzrostu. Ich wzrost jest szybki (czas podwojenia biomasy wynosi zwykle 2-4 dni), znacznie szybszy niż korzeni nietransformowanych, a osiągnięte przyrosty biomasy są porównywalne z kulturami zawiesinowymi. W kulturze *in vitro* korzenie transformowane charakteryzują się specyficzną morfologią, mają liczne odgałęzienia boczne, wykazują brak geotropizmu i plagiotropizmu.

## 3. Wytwarzanie metabolitów wtórnych i czynniki wpływające na ich biosyntezę

Głównym kierunkiem badań nad korzeniami transformowanymi jest ich wykorzystanie do biosyntezy biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych. Bajaj i Ishimaru (1) wymieniają ok. 75 gatunków roślin, z których otrzymano kultury korzeni

transformowanych syntetyzujące metabolity wtórne. Wytwarzane produkty należą do różnych grup chemicznych. Są wśród nich różnego typu alkaloidy, poliacetyleny, naftochinony, saponiny, fenylopropanoidy, związki terpenowe i inne. Najwięcej uwagi poświęcono wytwarzaniu alkaloidów tropanowych w korzeniach włośnikowatych różnych przedstawicieli rodziny Solanaceae (*Atropa belladonna*, *Hyoscyamus albus*, *H. niger*, *H. muticus*, *Datura innoxia*, *D. candida*, *D. stramonium*, *Duboisia hybryd*). W kulturach tych wykryto m.in. hioscyjaminaę, 6 $\beta$ -hydroksyhioscyjaminaę, 7 $\beta$ -hydroksyhioscyjaminaę i szczególnie cenną dla lecznictwa skopolaminaę. Alkaloidy indolowe wytwarzane są w kulturach korzeni włośnikowatych roślin z rodziny Apocynaceae: *Catharanthus roseus*, *C. trichophyllus*, *Rauwolfia serpentina* i *Amsonia elliptica*. W kulturach *C. roseus* syntetyzowane są głównie monomeryczne alkaloidy indolowe, takie jak serpentyna, katarantyna, ajmalicyna. Dużo prac dotyczy wytwarzania poliacetylenów w kulturach korzeni transformowanych. Te alifatyczne związki z kilkoma potrójnymi wiązaniami typu acetyleny ( $-C \equiv C-$ ) zostały znalezione w kulturach korzeni roślin z rodziny Asteraceae (rodzaj *Bidens*, *Tagetes*), Lobeliaceae (*Lobelia cardinalis*, *L. chinensis*, *L. inflata*, *L. sessilifolia*) i Campanulaceae (*Campanula medium*, *C. glomerata*, *Platycodon grandiflorum*).

Korzenie transformowane mogą czasami wytwarzać nowe związki, nie występujące w roślinie macierzystej. Związkami takimi są np. waldiat, diester irydooidowy wykryty w korzeniach włośnikowatych *Valeriana officinalis* (2), alkaloid piperydynowy – hialbidon w *Hyoscyamus albus* (3) i dwa nowe glukozydy fenolowe w kulturze korzeni *Swertia japonica* (4).

Dla celów biotechnologicznych bardzo istotną cechą korzeni transformowanych jest ich genetyczna stabilność i zachowanie zdolności do biosyntezy metabolitów nawet podczas długotrwałej hodowli. Zawartość metabolitów wtórnych w kulturach korzeni włośnikowatych jest zbliżona lub wyższa od zawartości tych związków w korzeniach roślin macierzystych. Ten ostatni fakt dotyczy np. biosyntezy naftochinonów w korzeniach transformowanych *Sesamum indicum* (ich poziom był 50 razy wyższy niż w korzeniach roślin rosnących w gruncie) (5), alkaloidów: serpentyny, katarantyny (odpowiednio, 21 i 7 razy więcej niż w liściach) i ajmalicyny (3 razy więcej niż w korzeniach) w kulturach korzeni *Catharanthus roseus* (6), poliacetylenów w kulturach korzeni *Lobelia sessilifolia* (20 razy więcej niż w całych roślinach) (7), walepatriatów w korzeniach transformowanych *Valeriana officinalis* (10 razy więcej w porównaniu z korzeniami roślin rosnących w gruncie) (8) i ginsenozydów w kulturze *Panax ginseng* (2 razy więcej niż w korzeniach rośliny macierzystej) (9). Kultury korzeni transformowanych *Ajuga reptans* wytwarzają 0,15% (w przeliczeniu na suchą masę) 20-hydroksyekdysonu (potencjalny pestycyd), podczas gdy w korzeniach roślin nie-transformowanych znaleziono jedynie 0,05% tego związku (10). W korzeniach transformowanych *Paulownia tomentosa* wykryto znaczne ilości (ok. 8% suchej masy) werbaskozydu (11). W liściach drzewa zawartość tego fenyloetanoidu wynosiła zaledwie 0,3% (sucha masa) (Wysokińska i Różga, dane nie opublikowane). Do wysoko produktywnych należą również kultury korzeni włośnikowatych *Hyssopus officinalis*,

które syntetyzują kwas rozmarynowy w ilości ok. 6% suchej masy, tj. dwukrotnie więcej niż pędy jednorocznych, rosnących w gruncie roślin (12). Jeszcze wyższe ilości tego metabolitu (ok. 14% suchej masy) znaleziono w korzeniach transformowanych *Ocimum basilicum*. Korzenie te wytwarzały również kwas litospermowy (1,7% suchej masy) i litospermowy B (0,17% suchej masy) (13). Osiągnięcie wysokich wydajności w przedstawionych kulturach, możliwe było dopiero po przeprowadzeniu selekcji klonów oraz doborze odpowiedniego podłoża i warunków hodowli (temperatura, pH, oświetlenie). Zazwyczaj, w miejscu zakażenia eksplantatu pojawia się wiele korzeni. Każdy z nich może dać początek jednemu klonowi. Poszczególne klony różnią się wielkością i lokalizacją fragmentów bakteryjnego DNA w chromosomach roślinnych. To z kolei może prowadzić do różnic w morfologii (intensywność odgałęzień, tendencja do dediferencjacji), szybkości wzrostu, a także w jakościowym i ilościowym składzie metabolitów. Pomimo wielu badań przyczyny różnic w produktywności klonów nie zostały dotychczas w pełni wyjaśnione. Według Sevona i wsp. (14) istotną rolę odgrywa tu zmienność somaklonalna, która może wywołać zmiany genetyczne i wpływać na ekspresję genów funkcjonujących na szlakach wtórnego metabolizmu. Z drugiej strony procesy prowadzące do syntezy i przemian metabolitów wtórnych są regulowane przez czynniki zewnętrzne, takie jak skład podłoża czy warunki hodowli; odpowiedź uzależniona jest również od stadium rozwojowego komórek korzeni. Do czynników mających wpływ na biosyntezę produktów w korzeniach włośnikowatych zaliczane są także genotyp rośliny, rodzaj szczepu bakteryjnego i poziom ekspresji genów zlokalizowanych na T-DNA. Ekspresja tych genów może być różna w poszczególnych klonach, ponieważ zależy od liczby kopii (do genomu roślinnego mogą włączać się wielokrotne kopie T-DNA), wielkości i miejsca lokalizacji (efekt pozycji) T-DNA w chromosomach roślinnych. Z danych literaturowych wynika, że w kulturach transformowanych korzeni istnieje zależność między ekspresją *rol* genu *c* a wytwarzaniem alkaloidów tropanowych (15), indolowych (16) i ginsenozydów (17). Takiej korelacji nie obserwowano w przypadku *rol* genów *a* i *b*.

Korzenie transformowane w kulturach *in vitro* nie wymagają egzogennych regulatorów wzrostu. Jednak dodatek auksyny może zmieniać morfologię korzeni, ich wzrost i biosyntezę substancji czynnych. Efekty obserwowane w odpowiedzi na egzogenną auksynę zależą, jak się wydaje, od rodzaju użytego do transformacji szczepu *A. rhizogenes*, który przenosi do genomu roślinnego geny związane z biosyntezą tych fitohormonów. Ekspresja tych genów może zmieniać poziom auksyn w transformowanych korzeniach. Cardarelli i wsp. (18) podają, że transformacja mannopinowym szczepem *A. rhizogenes* nie prowadzi do podwyższenia poziomu endogennych auksyn. Wzrost stężenia auksyn obserwowano natomiast w korzeniach transformowanych szczepami agropinowymi (A4, LBA9402, ATCC1584), które mają plazmid z genami *aux* (bakteryjne geny kodujące biosyntezę auksyn) na TR-DNA.

Składniki odżywcze pożywki wpływają głównie na morfologię korzeni, ich grubość, długość, liczbę odgałęzień i skłonność do tworzenia kalusa. Pociąga to za

sobą zmiany w przyroście biomasy i w rezultacie zmienia produktywność kultury. Z reguły, korzenie lepiej rosną na płynnych, prostych podłożach, o niskiej sile jonowej. Dlatego do ich hodowli wykorzystuje się często pożywki z obniżoną (np. o połowę) zawartością makroelementów. Podłoża te są również korzystne dla biosyntezy metabolitów wtórnych (19). Z soli mineralnych największy wpływ na wytwarzanie metabolitów ma stężenie jonów amonowych. Z badań przeprowadzonych przez Saenz-Carbonella i Loyla-Vargas (20) wynika, że ważny jest stosunek jonów  $\text{NH}_4^+$  do jonów azotanowych ( $\text{NO}_3^-$ ). Istotnym składnikiem podłoża jest również rodzaj użytego cukru i jego stężenie. W zasadzie, wzrost stężenia sacharozy powoduje wyższą produkcję metabolitów wtórnych. Czasami, dla stymulacji biosyntezy można zastosować fruktozę, jako źródło węgla i energii.

Korzenie transformowane w odpowiedzi na stres, podobnie jak kultury zawieszonowe, mogą zwiększać biosyntezę niektórych metabolitów wtórnych. Dotyczy to niskocząsteczkowych związków z grupy fitoaleksyn. Czynniki stresowymi mogą być elicytory biotyczne (ekstrakty fitopatogennych grzybów) lub abiotyczne (sole metali np. miedzi lub kadmu, drastyczna zmiana temperatury lub pH pożywki).

Ostatnio, rozwijane są badania związane z wprowadzaniem do korzeni transformowanych jednego lub więcej genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę metabolitów wtórnych. Ekspresja tych genów może powodować wzrost biosyntezy dotychczasowych produktów (np. w wyniku zwiększonej dostępności prekursorów) lub prowadzić do biosyntezy nowych związków. Badania te mogą przyczynić się również do lepszego poznania dróg wtórnego metabolizmu.

#### 4. Biotransformacja

Kultury korzeni transformowanych mogą być również wykorzystywane do biokonwersji różnego typu egzogennych substratów w bardziej wartościowe produkty. Procesy biotransformacji z udziałem kultur roślinnych, w tym także kultur korzeni włośnikowatych, odznaczają się wieloma korzystnymi cechami, takimi jak wysoka wydajność i duża czystość produktu reakcji, regiospecyficzność (specyficzność dotycząca miejsca reakcji w cząsteczce substratu) oraz stereospecyficzność, szczególnie ważna w przypadku związków wykazujących izomerię przestrzenną.

W kulturach korzeni transformowanych najczęściej zachodzą reakcje glukozylacji. Przykładem są kultury korzeni *Brugmansia candida*, które przekształcają hydrochinon w monoglukozyd arbutynę (21). Kultury korzeni włośnikowatych *Panax ginseng* wykazują zdolność do glukozylacji i estryfikacji digitoksygeniny, prekursora związków kardenolidowych (22) oraz kwasu  $\beta$ -glicyrytynowego (23). Efektem biokonwersji tych związków było kilka nowych produktów nie znalezionych dotychczas w roślinach. Yamanaka i wsp. (24) wykorzystali korzenie transformowane *Lobelia sessilifolia* do biokonwersji związków fenolowych: (+) katechiny, (-) epikatechiny oraz kwasu protokatechowego i galusowego. W rezultacie uzyskano sześć pochod-

nych glukozydowych, w tym dwa nowe związki. Kwasy fenolowe (protokatechowy, galusowy, *trans*-cynamonowy, p-kumarowy i kawowy) były glukozyłowane również w kulturach korzeni włośnikowatych *Lobelia cardinalis*, *Campanula medium*, *Ocimum basilicum* i *Fagaria ananassa* (25).

## 5. Problemy i ograniczenia związane z wykorzystaniem kultur korzeni do wytwarzania metabolitów

Kultury korzeni włośnikowatych, pomimo niewątpliwych zalet mają kilka wad, które obecnie ograniczają ich wykorzystanie dla celów biotechnologicznych. Jedną z nich jest fakt, że syntetyzują one zwykle substancje charakterystyczne dla korzeni roślin macierzystych. Natomiast metabolity wytwarzane w nadziemnych częściach roślin, w kulturach korzeni są nieobecne lub występują w niewielkich ilościach. Alternatywą w tych przypadkach są kultury „zielonych korzeni”, tj. korzeni włośnikowatych rosnących na świetle i wytwarzających chlorofil.

Kolejne zagadnienie wiąże się z wrażliwością roślin na *A. rhizogenes*. Są rośliny z których bardzo trudno uzyskać korzenie transformowane. Dotyczy to roślin jednoliściennych (choć otrzymano już kultury korzeni żyta transformowane *A. rhizogenes*) i niektórych dwuliściennych. Za trudne do transformacji uważane są rośliny z rodziny Ranunculaceae i Papaveraceae. Nie powiodły się próby transformacji *Papaver somniferum* szczepami agropinowymi (A4, LBA9402 i ATCC15843) oraz szczepem mannopinowym (8186) *A. rhizogenes*. Jedynie przy użyciu szczepu MAFF-03-01724 (szczep mikimopinowy) uzyskano transformowaną tkankę kalusową, zdolną do embriogenezy. Trudne do transformacji *A. rhizogenes* są również rośliny z rodzaju *Cinchona*. Dotychczas, jedynie Hamill i wsp. (26), stosując szczep LBA9402 otrzymali korzenie transformowane *Cinchona officinalis* (*C. ledgeriana*), które mogą rosnąć w standardowych podłożach.

Korzenie włośnikowate niektórych roślin, zwłaszcza podczas długotrwałej hodowli, mogą wykazywać tendencję do dediferencjacji i tworzenia kalusa, co może prowadzić do obniżenia ich produktywności i stabilności genetycznej. Pitta-Alvarez i Giulietti próbowali ograniczyć tworzenie tkanki kalusowej na korzeniach *Brumansia candida* poprzez zmiany w składzie podłoża (obniżenie zawartości składników odżywczych i sacharozy, prowadzenie hodowli na stałych pożywkach) i dodatek antyauksyny (27).

Trudności napotyka się także przy prowadzeniu kultur korzeni transformowanych na dużą skalę, z powodu braku odpowiednich bioreaktorów. Zasadniczym problemem jest ochrona delikatnej struktury korzeni przed siłami ścinającymi, występującymi w bioreaktorach, a wynikającymi z mieszania i napowietrzania hodowli. Wykorzystanie korzeni włośnikowatych utrudnia również to, że większość produktów gromadzonych jest wewnątrz komórek i tylko nieliczne z nich są wydzielane do podłoża. Wydzielanie zależy od gatunku rośliny, rodzaju syntetyzowanego związku i warunków hodowli.

## 6. Podsumowanie

Przedstawione dane świadczą, że kultury korzeni transformowanych są atrakcyjnym modelem do badania biosyntezy metabolitów wtórnych i mogą być wykorzystane dla celów poznawczych (rozszerzenie wiedzy na temat dróg wtórnego metabolizmu i mechanizmów jego regulacji) lub praktycznych (produkcja określonych substancji na skalę przemysłową, w bioreaktorach). Praktyczne wykorzystanie kultur korzeni transformowanych wymaga jednak dalszego zwiększenia ich produktywności. Największe możliwości w tym zakresie stwarza modyfikowanie szlaków metabolicznych przez wprowadzanie do genomu komórek korzeni określonych genów. Metoda ta może prowadzić również do biosyntezy nowych, bardziej aktywnych produktów. Jednak kierunek ten został dopiero zapoczątkowany i jego realizacja wymaga dalszych badań z zakresu biochemii i biologii molekularnej roślin. Ważnym zagadnieniem jest również doskonalenie warunków technicznych, optymalnych dla wzrostu korzeni i przebiegu procesów biosyntezy lub biotransformacji. Konieczna jest także konstrukcja nowych typów bioreaktorów, odpowiednich dla kultur organów.

## Literatura

1. Bajaj Y. P. S., Ishimaru K., (1999), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 45, in: *Transgenic Medicinal Plants*, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1-29.
2. Gränicher F., Christen P., Kamalaprija P., Burger U., (1995), *Phytochemistry*, 38, 103-105.
3. Sauerwein M., Ishimaru K., Shimomura K., (1991), *Phytochemistry*, 30, 2977-2978.
4. Ishimaru K., Shimomura K., (1996), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 38, in: *Plant Protoplast and Genetic Engineering*, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 308-317.
5. Ogasawara T., Chiba K., Tada M., (1993), *Phytochemistry*, 33, 1095-1098.
6. Bhadra R., Vani S., Shanks J. V., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 581-592.
7. Ishimaru H., Arakawa H., Yamanaka M., Shimomura K., (1994), *Phytochemistry*, 35, 365-369.
8. Gränicher F., Christen P., Kapetanidis I., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 339-342.
9. Inomata S., Yokoyama M., Gozu Y., Shimizu T., Yanagi M., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 681-686.
10. Matsumoto T., Tanaka N., (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1019-1025.
11. Wysokińska H., Rózga M., (1998), *J. Plant Physiol.*, 152, 78-83.
12. Kochan E., Wysokińska H., Chmiel A., Grabias B., (1998), *Z. Naturforsch.*, 54c, 11-16.
13. Tada H., Murakami Y., Omoto T., Shimomura K., Ishimaru H., (1996), *Phytochemistry*, 42, 431-434.
14. Sevón N., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K-M., (1998), *Planta Med.*, 64, 37-41.
15. Pinol M. T., Palazon J., Cusido M., Serrano M., (1996), *Bot. Acta*, 109, 133-138.
16. Palazon J., Cusido R. M., Gonzalo J., Bonfill M., Morales C., Pinol M., (1998), *J. Plant Physiol.*, 712-718.
17. Bulgakov V. P., Khodakovskaya M. V., Labetskaya W. V., Chernoded G. K., Zhurodev Y. W., (1998), *Phytochemistry*, 49, 1929-1934.
18. Cardarelli M., Vitali G., Constantino P., (1985), *Plant Mol. Biol.*, 5, 385-391.
19. Cusido R. M., Palazon J., Pinol T., Bonfill M., Morales C., (1999), *Planta Med.*, 144-148.
20. Saenz-Carbonell L., Loyola-Vargas V. M., (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 61, 321-337.
21. Casas D., Pitta-Alvarez S. I., Giulietti A. M., (1998), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 69, 127-135.
22. Kawagushi K., Hirotsu M., Yoshikawa T., Furuya T., (1990), *Phytochemistry*, 29, 837-843.
23. Asada Y., Saito H., Yoshikawa T., Sakamoto K., Furuya T., (1993), *Phytochemistry*, 34, 1049-1052.

24. Yamanaka M., Shimomura K., Sasaki K., Yoshihira K., Ishimaru H., (1995), *Phytochemistry*, 40, 1149-1150.
25. Ishimaru H., Yamanaka M., Terahara N., Shimamura K., Okamoto D., Yoshihira K., (1996), *Jpn. J. Food Chem.*, 3, 38-42.
26. Hamill J. D., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1989), *Planta Med.*, 55, 354-357.
27. Pitta-Alvarez S. I., Giulietti A. M., (1995), *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 31, 215-220.