



Transformowane korzenie jako źródło wtórnych metabolitów

Olga Olszowska

Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Akademia Medyczna, Warszawa

Transformed Roots as a Source of Secondary Metabolites

Summary

In the recent years a lot of attention has been paid to hairy root culture as a promising strategy to produce a variety of secondary metabolites including pharmaceuticals, pigments and also fragrances. Hairy roots are tumorous outgrowth developing at the site of infection of wounded plant parts with gram-negative soil bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. During the infection process a part of root-inducing (Ri) plasmid from bacteria is transferred to the plant cell where it integrates into the genome. An increasing number of hairy root cultures is known to produce secondary metabolites in quantities comparable with those in intact plant roots. Some secondary metabolites occurring only in the aerial parts of the intact plants were also found in the hairy roots of some species. So far, production of secondary metabolites in hairy root cultures of about 100 dicotyledonous species and some gymnosperms has been reported. The suitability of hairy root cultures for bioprocessing can be attributed to their genetic and biochemical stability and rapid growth in hormone-free media. Hairy root cultures of medicinal plants and factors influencing their productivity will be reviewed.

Key words:

transformed roots, hairy roots, medicinal plants, *rol* genes.

Adres do korespondencji

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

biotechnologia

2 (49) 54-63 2000

Jednym z celów prowadzenia kultur roślinnych *in vitro* jest otrzymywanie substancji chemicznych mających zastosowanie w leczeniu bądź w innych dziedzinach życia (1). Wiele spośród tych związków jest tzw. wtórnymi metabolitami, czyli substan-

cjami będącymi wytworami wyspecjalizowanej przemiany materii; ich występowanie jest ograniczone do niektórych grup systematycznych świata roślinnego (2). Biosynteza wielu metabolitów wtórnych zachodzi w określonych komórkach i tkankach i jest związana z różnicowaniem, a także z rozwojem roślin (3). Stwierdzono w wielu przypadkach, że w warunkach *in vitro* wtórne metabolity były wytwarzane z większą wydajnością w kulturach organów niż w nie zróżnicowanych kulturach komórkowych. Te obserwacje spowodowały wzrost zainteresowania kulturami organów, spośród których najbardziej intensywnie badane są kultury transformowanych korzeni.

Transformowane korzenie, zwane też korzeniami włosznicowatymi (*hairy roots*) powstają w wyniku zakażenia komórek roślinnych bakteriami *Agrobacterium rhizogenes* (4). Do genomu komórki roślinnej wbudowuje się T-DNA z plazmidu Ri (*root inducing*) bakterii. W wyniku ekspresji genów znajdujących się w T-DNA zmienia się metabolizm komórki, w następstwie czego powstają korzenie, które mają charakter tumorowy i rosną na pożywkach bez regulatorów wzrostu. Jako potencjalne źródło określonych substancji chemicznych korzenie transformowane mają kilka istotnych cech:

- 1) w określonych warunkach wydajność kultur transformowanych korzeni utrzymuje się na stałym poziomie przez długi czas,
- 2) zawartość wielu substancji w korzeniach transformowanych jest porównywalna, bądź wyższa niż w korzeniach roślin rosnących w gruncie,
- 3) szybkość wzrostu korzeni transformowanych jest zwykle kilkakrotnie wyższa niż szybkość wzrostu korzeni normalnych rosnących *in vitro*. Czas podwojenia masy w szybko rosnącej kulturze może wynosić od 1,2 do 2,2 dni (5).

Wysoka i stabilna wydajność kultur transformowanych korzeni różni je od wielu zawiesinowych kultur komórkowych, których produktywność zwykle obniża się w miarę kolejnych pasażów, co powoduje konieczność ciągłej selekcji wydajnych linii komórkowych.

Każdy korzeń włosznicowaty powstający w wyniku zakażenia eksplantatu roślinnego *A. rhizogenes* daje początek jednemu klonowi. Klony mogą różnić się m.in. szybkością wzrostu, morfologią, zdolnością wytwarzania chlorofilu, zawartością wtórnych metabolitów oraz ich składem jakościowym i ilościowym, a także zdolnością wydzielania wtórnych metabolitów do pożywki. Pierwszym doniesieniem, w którym na podstawie analizy bogatego materiału porównawczego, wykazano istnienie różnic między klonami była praca Mano i in. (1986) (6). Stwierdzono, że 29 klonów korzeni włosznicowatych otrzymanych w wyniku zakażenia jednej rośliny *Scopolia japonica* bakteriami jednego szczepu *A. rhizogenes* różniło się szybkością wzrostu oraz jakościowym i ilościowym składem wytwarzanych alkaloidów tropanowych. Przymuszczalnie przyczyną różnic między klonami jest różna liczba i wielkość fragmentów bakteryjnego T-DNA oraz miejsce ich wbudowania się do genomu komórki roślinnej (6,7). W toku późniejszych badań istnienie różnic między klonami transformowanych korzeni wykazano dla wielu gatunków roślin wytwarzających

wtórne metabolity należące do różnych grup chemicznych. Warunkiem otrzymania wydajnych kultur jest zatem selekcja klonów korzeni oraz optymalizacja warunków kultury.

Nowy kierunek badań, jak się wydaje, wyznaczają autorzy w niedawno opublikowanych pracach, w których wykazują, że stymulacja produkcji wtórnych metabolitów w transformowanych tkankach może być bezpośrednio związana z obecnością pewnych genów (np. *rolC*) z T-DNA *Agrobacterium rhizogenes* niezależnie od zjawiska organogenezy (8,9).

Transformacja komórek roślinnych przez bakterie *A. rhizogenes* uwarunkowana jest genami znajdującymi się w chromosomie bakteryjnym oraz w plazmidzie Ri (4,10). Wprowadzone do genomu komórki roślinnej T-DNA zawiera onkogeny oraz geny warunkujące syntezę opin i wydzielanie ich na zewnątrz przez transformowane komórki. Opiny są pochodnymi aminokwasów i są katabolizowane przez bakterie *A. rhizogenes*. Szczepy *A. rhizogenes* w zależności od wytwarzanych przez nie opin dzieli się na szczepy typu agropiny, mannopiny, kukumopiny i mikimopiny (11,12). Plazmidy Ri *Agrobacterium rhizogenes* mogą zawierać od jednego do kilku T-DNA. Plazmid mannopinowego szczepu 8196 zawiera tylko jeden fragment T-DNA. Najlepiej poznanym plazmidem jest plazmid pRiA4. Jest to plazmid agropinowy, zawierający dwa fragmenty T-DNA określane jako TR i TL. Fragment TR zawiera geny homologiczne z genami biosyntezy auksyn *iaaM* i *iaaH* bakterii *A. tumefaciens* oraz geny biosyntezy mannopiny i agropiny. Fragment TL jest w pewnym stopniu homologiczny z T-DNA plazmidu 8196, który nie zawiera genów biosyntezy auksyn. TL-DNA zdolny jest do wywołania powstawania transformowanych korzeni. Jednak szczepy agropinowe, zawierające TL i TR-DNA, są często bardziej wirulentne i liczba gatunków wrażliwych na zakażenie nimi jest większa. W TL-DNA zidentyfikowano 18 otwartych ramek odczytu. Czterem z nich odpowiadają geny *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*. Ekspresja tych genów, a w szczególności genu *rolB* warunkuje powstanie transformowanych korzeni. Izolowane są białka kodowane przez geny *rol* i ich funkcja jest przedmiotem badań, których przegląd przedstawili Nilsson i Olsson (1997)(4); stwierdzono m.in., że produkt genu *rolB* ma aktywność fosfatazy tyrozynowej. Lemcke i Schmuelling (1998) stwierdzili istnienie trzech innych loci w TL-DNA, które mogą mieć istotne znaczenie dla patogenności *A. rhizogenes* (13). Uważa się, że każdy korzeń włósnikowaty wyrastający z zakażonego *A. rhizogenes* eksplantatu roślinnego pochodzi prawdopodobnie z jednej komórki (4). Jednak Sevón i in. (1998) stwierdzili różnice między klonami transformowanych korzeni *Hyoscyamus muticus* otrzymanych z protoplastów uzyskanych bezpośrednio z kultury zapoczątkowanej z jednego korzenia (14). Porównywane klony różniły się morfologią, szybkością wzrostu i produkcją hioscyjminy, ale cechy te były stabilne w trakcie doświadczenia obejmującego 50 kolejnych pasażów. Korzenie transformowane uzyskano dla ponad stu gatunków roślin dwuliściennych, a także kilku gatunków roślin nagozalążkowych (12,15-18).

Początkowo badano przede wszystkim produkcję wtórnych metabolitów w transformowanych korzeniach roślin, w których miejscem powstawania i/lub gromadze-

nia się tych substancji są korzenie. Były to m.in. alkaloidy tropanowe w gatunkach z rodziny *Solanaceae* oraz poliacetyleny w gatunkach z rodziny *Compositae*. W ostatnich latach obiektem badań coraz częściej są korzenie włośnikowate gatunków roślin, których organy nadziemne są cennym źródłem wtórnych metabolitów. Metabolitami tymi są m.in. substancje o działaniu cytostatycznym, alkaloidy, a wśród nich skopolamina, związki o różnej budowie chemicznej mające zdolność wychwytywania wolnych rodników, substancje przeciwutleniające, którym obecnie przypisuje się coraz większą rolę w zachowaniu zdrowia. Niektóre z tych związków powstają i występują tylko w nadziemnych częściach roślin. W większości jednak przypadków brak jest danych na temat miejsca biosyntezy tych substancji oraz ich występowania w korzeniach roślin rosnących w gruncie. Obiektem badań w kulturach *in vitro* od około trzydziestu lat jest *Catharanthus roseus*, gatunek będący źródłem dimerycznych alkaloidów indolowych winkrystyny i winblastyny, stosowanych w leczeniu nowotworów. Związki te występują w pędach (liście) w bardzo małych ilościach (łącznie 0,001%). Opracowano metody ich otrzymywania na drodze syntezy z roślinnych prekursorów: katarantyny i windoliny. W licznych kulturach transformowanych korzeni *C. roseus* stwierdzono obecność katarantyny w ilościach większych niż w roślinach z gruntu, natomiast windolina nie była wytwarzana w warunkach *in vitro*. W badaniach biosyntezy windoliny w roślinach dowiedziono, że tworzy się ona w liściach i proces ten jest stymulowany przez światło (19). Tak zatem stwierdzenie występowania windoliny w kulturach zawiesinowych transformowanych komórek *C. roseus* uzyskanych przy użyciu szczepu BO542 *A. tumefaciens* i szczepu K599 *A. rhizogenes* (8) oraz w kulturach transformowanych korzeni (20), jak się wydaje, stanowi przełom w badaniach *C. roseus in vitro*. Liu i in. (1997) uzyskali wydajne kultury transformowanych korzeni *Artemisia annua* wytwarzające lakton seskwiterpenowy artemisyninę działający przeciwmalarycznie, również na oporne na chlorochinę szczepy *Plasmodium falciparum* (21,22). Dotychczasowym komercyjnym źródłem artemisyniny są liście i kwitnące szczyty pędów.

Nasiona *Cassia obtusifolia* są stosowane w tradycyjnej medycynie chińskiej i zawierają antrachinony. W transformowanych korzeniach tego gatunku zawartość antrachinonów wynosiła 1,6 mg/g SM i była trzykrotnie większa niż w nasionach (23). Naftochinon lawson, substancja barwiąca charakterystyczna dla liści drzewiastej rośliny *Lawsonia inermis*, powstawała w transformowanych korzeniach, chociaż nie stwierdzono jej w korzeniach roślin rosnących w gruncie, ani w korzeniach normalnych w kulturach *in vitro* (24). Transformowane korzenie tego gatunku wytwarzały również garbniki (25). Na uwagę zasługują coraz liczniejsze publikacje dotyczące wytwarzania flawonoidów w transformowanych korzeniach różnych gatunków roślin (26,27), a w szczególności *Scutellaria baicalensis* (28-31).

W wielu ośrodkach naukowych kontynuowane są badania transformowanych korzeni gatunków z rodziny *Solanaceae* wytwarzających alkaloidy tropanowe: hioscyjaminę i skopolaminę (5,32-36) i prace te są źródłem największej liczby informacji o różnorodnych czynnikach wpływających na wydajność kultur. Zawartość wtór-

nych metabolitów w transformowanych korzeniach niektórych gatunków podano w tabeli 1.

Tabela 1

Zawartość wtórnych metabolitów w transformowanych korzeniach niektórych gatunków roślin

Gatunek	Szczep <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Substancja	Zawartość	Czas kultury (dni)	Literatura
<i>Artemisia annua</i>	brak danych	artemisynina	2% SM	24	21, 22
<i>Beta vulgaris</i>	brak danych	β-alainy (β-ksantyny + β-cyaniny)	1,08-1,64 mg/g SM	12	51
<i>Cassia obtusifolia</i>	LBA 9402	antrachinony	1,6 mg/g SM	35	23
<i>Catbaranthus roseus</i>	LBA 9402	ajmalicyna	1,80 mg/g SM	28	52
		johimbina	0,84 mg/l SM		
		katarantyna	1,52 mg/g SM		
<i>Catbaranthus roseus</i>		windolina	0,11-0,78 mg/g SM	42	20
		ajmalicyna	0,42-2,10 mg/g SM		
		katarantyna	0,33-2,86 mg/g SM		
<i>Digitalis lanata</i>	liczne szczepy	kardenolidy	nie występowały		53
<i>Hyssopus officinalis</i>	ATCC 15834	kwask rozmarynowy	8,03% SM	49	39
		kwask litospermowy B	3,89% SM		
<i>Ocimum basilicum</i>	ATCC 15834	kwask rozmarynowy	14,1% SM	56	40
	MAFF 03-01724	kwask litospermowy A	1,70% SM		
<i>Lactuca virosa</i>	LBA 9402	laktony seskwiterpenowe		21	54
<i>P. ginseng x P. quinquefolium</i>	ATCC 15834	ginsenozydy	2,88% SM	64	38
<i>Paulownia tomentosa</i>	LBA 9402	werbaskozyd	9,5% SM	35	55
<i>Scutellaria baicalensis</i>	LBA 9402	baikaleina	10% SM	21	
<i>Sesamum indicum</i>	ATCC 15834	naftochinony	0,060-0,810 mg/g sm		44
		antrachiny			
<i>Tanacetum parthenium</i>	LBA 9402	acetyleny	0,14 – 0,51% SM	21	56
<i>Taxus x media Hicksii</i>	LBA 9402	paklitaksel	0,075 mg/g SM	49	18
<i>Valeriana wallichii</i>	A4, LBA 9402	walepotriaty	5,1-8,5% SM	140	57
<i>Withania somnifera</i>	LBA 9402	witanolid D	0,3 mg/g SM	30	58
	LBA 9402, ATCC 15834	witanolid D			59

SM – sucha masa, śm – świeża masa

Na szybkość wzrostu oraz produkcję metabolitów w danej kulturze mogą wpływać: jakościowy i ilościowy skład pożywki podstawowej, rodzaj i stężenie cukru, pH pożywki, rodzaj i stężenie regulatorów wzrostu, dodatek prekursorów, dodatek elicytorów, warunki oświetlenia, napowietrzenie kultury, temperatura. Wpływ posz-

czególnych czynników na wzrost biomasy i na zawartość w niej określonych substancji może być przeciwny. Dlatego też obecnie często podawanym wskaźnikiem określającym wydajność kultury jest ilość produktu uzyskiwanego w określonym czasie w jednostce objętości kultury.

Z przeglądu literatury wynika, że zwykle w początkowym etapie badań konieczne jest przetestowanie kilku pożywek podstawowych w różnych stężeniach. Transformowane korzenie *Platycodon grandiflorum* rosnące w pożywce B5 produkowały 3,5 raza więcej poliacetylenów niż na pożywkach MS i WP w różnych rozcieńczeniach. Procentowa zawartość tych związków była 40 razy większa niż w korzeniach rosnących w gruncie roślin, z których pobrano eksplantaty do zapoczątkowania kultury (37). Stosując pożywkę B5 uzyskano również wydajne kultury *Panax ginseng* x *P. quinquefolium* (38). Natomiast dobry wzrost transformowanych korzeni *Hyssopus officinalis* i wysoką zawartość fenolokwasów: kwasu rozmarynowego (8,03% SM) i kwasu litospermowego (3,89% SM) zapewniała pożywka WP (39). Klony transformowanych korzeni *Ocimum basilicum* rosły nieco lepiej na pożywce MS niż na pożywkach B5 i WP (40). Kultury rosnące w pożywce WP najwcześniej osiągały fazę stacjonarną. Lawson syntetyzowany był w transformowanych korzeniach *Lawsonia inermis* tylko, wtedy gdy rosły one w pożywce MS lub $\frac{1}{2}$ MS (24). Włośnikowate korzenie *Lithospermum erythrorhizon* rosnące w pożywce MS wydzielają związek typu chinonu, rizonon, o silnych właściwościach przeciwgrzybiczych. Substancja ta była wytwarzana w mniejszych ilościach w pożywce MS bez jonów amonowych, stymulującej syntezę szikoniny (41). Dzięki optymalizacji warunków kultury klonu transformowanych korzeni *Artemisia annua*, obejmującej poziom azotu, fosforu, sacharozy, benzyloaminopuryny, kwasu gibberelinowego w pożywce oraz dawki elicytora, uzyskano dobrą wydajność artemisyniny (548,9 mg/l/24 dni) (21,22). Pożywka zawierała m.in. 70 g/l sacharozy. Stopień indukcji syntezy wtórnych metabolitów zależy od rodzaju, dawki i czasu działania elicytora. W kulturze transformowanych korzeni *Datura stramonium* największy wzrost zawartości alkaloidów tropanowych nastąpił pod wpływem jasmonianu metylu, przy czym związek ten stymulował selektywnie biosyntezę tropiny i nie wpływał na poziom kwasu fenylomlekowego, będącego drugim prekursorem (36). Jasmonian metylu stymulował również syntezę paklitakselu w transformowanych korzeniach *Taxus x media* Hicksii (18).

Zwykle kultury korzeni prowadzone są w ciemności. Światło jednak może wpływać na szybkość wzrostu transformowanych korzeni i produkcję wtórnych metabolitów. Niektóre klony rosnące na świetle mają zdolność do zielenienia. Rosnące przy oświetleniu 12h/dobę korzenie transformowane *C. roseus* wytwarzały więcej alkaloidów: ajmalicyny, serpentyny i tabersoniny, niż korzenie rosnące w ciemności. Nie stwierdzono obecności windoliny (42). Światło, a także dodatek benzyloaminopuryny do pożywki wpływał korzystnie na wytwarzanie antocyjanów i rutyny w transformowanych korzeniach *Campanula glomerata*. Ponieważ jednak wpływ oświetlenia był niekorzystny dla wzrostu kultury, zastosowano proces dwustopniowy: kulturę w ciemności (3 tygodnie), a następnie przy ciągłym oświetleniu (43). Za-

wartość rutyny w używanych korzeniach wynosiła 1,35% SM i była 70 razy większa niż w korzeniach roślin rosnących w gruncie, 100 razy większa niż w mące gryczanej (*Fagopyrum esculentum*) i 6 razy większa niż w transformowanych korzeniach *F. esculentum*.

W czasie trwania jednego pasażu jakościowy i ilościowy skład wtórnych metabolitów może się zmieniać (44). Produkcja wtórnych metabolitów może być związana lub nie ze wzrostem korzeni (45). Tak np. równolegle ze wzrostem biomasy rosła zawartość forskolinu w kulturze włósnikowatych korzeni *Coleus forskohlii* (46). Natomiast w kulturze *Datura stramonium* zawartość alkaloidów tropanowych zwiększała się dopiero po ustaniu wzrostu, gdy indeks mitotyczny był bliski 0% (33). Również wytwarzanie serpentyny i ajmalicyny w kulturze transformowanych korzeni *Catharanthus roseus* prowadzonej przy oświetleniu 12 h/dobę nie było związane ze wzrostem (42). Zawartość obu związków rosła w czasie trwania fazy stacjonarnej kultury. Więcej alkaloidów było w starszych, bardziej zielonych korzeniach niż we fragmentach długości 0-2 cm składających się z merystemu i strefy wydłużeniowej.

Z biotechnologicznego punktu widzenia korzystne jest, gdy wtórne metabolity wydzielane są do pożywki. Metody stosowane w celu zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej (zmiana pH, temperatury, dodatek rozpuszczalników organicznych, dodatek elicytorów) mogą źle wpływać na żywotność komórek (35), ale czasami wywołują one korzystny efekt. Dodatek Tweenu 20 w ilości 2% powodował, wydzielane do pożywki 80% skopolaminy powstającej w transformowanych korzeniach *D. metel* (5), a także wpływał korzystnie na wzrost kultury. Kultury do których dodawano Tween 20 wytwarzały więcej skopolaminy niż kultury kontrolne.

W przypadku *Tagetes filifolia* transformowane korzenie wyselekcjonowanego klonu wydzielaly 80% wytwarzanych tiofenów do pożywki (47).

W tabeli 2 podano wydajność niektórych kultur transformowanych korzeni. Zawartość ginsenozydów w transformowanych korzeniach *Panax ginseng* x *P. quinquefolium* po ośmiu tygodniach kultury wynosiła 2,88% SM i była porównywalna z zawartością tych związków w korzeniach 5-letnich roślin rosnących w gruncie. Podobny był również skład jakościowy i ilościowy ginsenozydów w obu rodzajach korzeni (38).

Innym przykładem wydajnej kultury jest kultura transformowanych korzeni *Datura metel* (5). Po 4 tygodniach kultury zawartość skopolaminy wynosiła 2,6% SM i była wyższa niż w liściach wysokowydajnych, jednorocznych roślin rosnących w gruncie.

Oprócz badań wpływu warunków kultury na wzrost i produkcję wtórnych metabolitów podejmowane są próby wyjaśnienia związku między genami *rol* i ich ekspresją a morfologią i innymi właściwościami transformowanych korzeni. Produkty tych genów mogą w niejednakowy sposób funkcjonować w różnych gatunkach roślin (13).

Tabela 2

Wydajność kultur transformowanych korzeni niektórych gatunków roślin

Gatunek	Substancja	Wydajność	Literatura
<i>Artemisia annua</i>	artemisynina	536 mg/l/20 dni	21, 22
<i>Catharanthus roseus</i>	ajmalicyna	3,9 -11,6 mg/l/70 dni	42
	serpentyina	6,5-34,0 mg/l/70 dni	
	tabersonina	1,3-6,9 mg/l/70 dni	
<i>Hyssopus officinalis</i>	kwaz rozmarynowy	642 mg/l/49 dni	39
	kwaz litospermowy B	284 mg/l/49 dni	
	kwaz rozmarynowy	900 mg/l/35 dni	60
<i>Panax ginseng</i> x <i>P. quinquefolium</i>	ginsenozydy	38,5 mg/l/64 dni	38
<i>Paulownia tomentosa</i>	werbaskozyd	1000 mg/l/35 dni	61
<i>Beta vulgaris</i>	betalainy	5,1-9,9 mg/l/12dni	51
<i>Withania somnifera</i>	witanolid D	5,43 mg/l/30 dni	58

Wykazano, że gen *rolC* miał wpływ na wtórny metabolizm transformowanych korzeni *Datura stramonium* i tytoniu, stymulując wytwarzanie hioscyjminy i nikotyny (48,49). Także w kulturach transformowanych korzeni *Catharanthus roseus* istniała korelacja między ekspresją genu *rolC* i syntezą alkaloidów (20). Wśród klonów korzeni rosnących na pożywce stałej wyróżniono klony różniące się fenotypowo grubością korzenia centralnego: klony „grube” o średnicy ponad 3 mm i „cienkie” o średnicy poniżej 1 mm. W „cienkich” korzeniach powstawało więcej produktu genu *rolC*, rosły one wolniej, ale wytwarzały więcej alkaloidów, a mniej etylenu w porównaniu z szybciej rosnącymi „grubymi” korzeniami.

Bulgakow i in. (1998) wykazali, że poszczególne geny *rol* wprowadzone do genu komórki mogą wpływać na produkcję wtórnych metabolitów (9). Transformowali oni tkankę kalusową *Panax ginseng* szczepami *Agrobacterium* zawierającymi pojedyncze geny *rol* z plazmidu Ri szczepu A4 *A. rhizogenes*. W transformowanych kulturach z wprowadzonym genem *rolA* ginsenozydy były wytwarzane początkowo w ilościach śladowych, a potem wcale. W kulturach z genem *rolB* produkcja ginsenozydów była pięciokrotnie niższa niż w tkance nie transformowanej. Natomiast zawartość ginsenozydów w kulturach z genem *rolC* wynosiła 13,2–21,7 mg/g SM i była wyższa niż w tkance nie transformowanej (5,1–8,9 mg/l SM). Stopień zróżnicowania kultur z genem *rolC* nie miał wpływu na zawartość ginsenozydów. Wskazywać to może na bezpośredni wpływ genu *rolC* na wytwarzanie ginsenozydów, niezależnie od zjawiska ryzogenezы.

W wyniku transformacji *Scutellaria baicalensis* szczepem A13 *A. rhizogenes* z wprowadzonym genem β -glukuronidazy (GUS) uzyskano włośnikowate korzenie o zmienionym jakościowo składzie flawonoidów w porównaniu z korzeniami normalnymi. Obserwowano obniżenie poziomu glukuronidów (29).

Z przedstawionego przeglądu wynika, że dzięki selekcji klonów i opracowaniu warunków hodowli można uzyskać kultury korzeni włośnikowatych, wytwarzające określone związki z dobrą wydajnością. Prowadzenie takich kultur na dużą skalę związane jest z konstrukcją odpowiednich fermentorów (21,50,51). Kultury transformowanych korzeni przyczyniają się również do poznania dróg biosyntezy wtórnych metabolitów; mogą być źródłem nowych substancji o cennych właściwościach farmakologicznych, a także mogą być przydatne w badaniach wpływu transformacji na metabolizm komórek roślinnych.

Literatura

1. Hoopen H. H. J. G. ten, Verpoorte R., (1997), *Biotechnologia*, 2(37), 15-28.
2. Kohlmuenzer, (1998), *Farmakognozja*, PZWL, Warszawa.
3. Wink M., (1992), *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, Eds. Charlwood B. V., Rhodes M. J. C., 23-41, Clarendon Press, Oxford.
4. Nilsson O., Olsson O., (1997), *Physiologia Plantarum*, 100, 463-473.
5. Cusido R. M., Palazón J., Piñol M. T., Bonfill M., Morales C., (1999), *Planta Medica*, 65, 144-148.
6. Mano J., Nabeshima S., Matsui C., Ohkawa H., (1996), *Agric. Biol. Cem.*, 50, 2715-2722.
7. Mano J., Ohkawa H., Yamada J., (1989), *Plant Science*, 59, 191-201.
8. O'Keefe B. R., Mahady G. B., Gills J. J., Beecher C. W. W., (1997), *J. Nat. Prod.*, 60, 261-264.
9. Bulgakov V. P., Khodadakovskaya M. V., Labetskaya N. V., Chernoded G. K., Zhuravlev Y. N., (1998), *Phytochemistry*, 49, 1929-1934.
10. Tinland B., (1996), *Trends in Plant Science*, 1, 178-184.
11. Tanaka N., Ikeda T., Oka K., (1994), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 548-551.
12. Wysokińska H., (1996), *Wybrane zagadnienia biotechnologii roślin*, red. Wypijewski K., 11-23, Wyd. Nauk. UAM, Poznań.
13. Lemcke K., Schmuelling T., (1998), *Plant Journal*, 15, 423-433.
14. Sevón N., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K.-M., (1998), *Planta Medica*, 64, 37-41.
15. Loyola-Vargas V. M., Miranda-Ham M. L., (1995), *Recent Advances in Phytochemistry*, vol. 29, *Phytochemistry of Medicinal Plants*, Ed. Aranson J. T., Mata R., Romeo J. T., 217-248, Plenum Press, New York.
16. Olszowska O., (1996), *Wybrane zagadnienia biotechnologii roślin*, red. Wypijewski K., 25-37, Wyd. Nauk. UAM, Poznań.
17. Doran P., (1997), *Hairy root culture and applications*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
18. Furmanowa M., Sykłowska-Baranek K., (1999), *I Krajowy Kongres Biotechnologii*, Wrocław, streszczenia posterów.
19. St-Pierre B., Laflamme P., Alarco A.-M., de Luca V., (1998), *Plant Journal*, 14, 703-713.
20. Palazón J., Cusido R. M., Gonzalo J., Bonfill M., Morales C., Piñol M. T. J., (1998), *Plant Physiol.*, 153, 712-718.
21. Liu C. Z., Wang Y. C., Ouyang F., Ye H. C., Li G. F., (1997), *Biotechnology Letters*, 19, 927-929.
22. Liu C. Z., Wang Y. C., Ouyang F., Ye H. C., Li G. F., (1998), *Biotechnology Letters*, 20, 265-268.
23. Guo H., Chang Z., Yang R., Guo D., Zheng J., (1998), *Phytochemistry*, 49, 1623-1625.
24. Bakkali A.-T., Jaziri M., Foriers A., Heyden Y. V., Vanhaelen M., Homes J., (1997), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 83-87.
25. Bakkali A.-T., Jaziri M., Ishimaru K., Tanaka N., Shimomura K., Yoshimatsu K., Homes Vanhaelen M., (1997), *J. Plant Physiol.*, 151, 505-508.
26. Li W., Asada Y., Yoshikawa T., (1998), *Planta Medica*, 64, 746-747.
27. Tanaka N., Matsuura E., Terahara N., Ishimaru K., (1999), *J. Plant Physiol.*, 155, 251-254.
28. Zhou Y., Hirotsani M., Yoshikawa T., Furuya T., (1997), *Phytochemistry*, 44, 83-87.
29. Nishikawa K., Ishimaru K., (1997), *J. Plant Physiol.*, 151, 633-636.

30. Hirotani M., Kuroda R., Suzuki H., Yoshikawa T., (1998), *IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*, Abstracts, 153.
31. Malarz et al., (1998), *46th Annual Congress Society for Medicinal Plant Research*, Abstracts of Plenary Lectures, Short Lectures and Posters, C21.
32. Vanhala L., Eeva M., Lapinjoki S., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K.-M., (1998), *J. Plant Physiol.*, 153, 475-481.
33. Baiza A. M., Quiroz A., Ruiz J. A., Maldonado-Mendoza I., Loyola-Vargas M., (1998), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54, 123-130.
34. Zehra M., Banerjee S., Naqvi A. A., Kumar S., (1998), *Plant Science*, 136, 93-99.
35. Lee K. T., Yamakawa T., Kodama, Shimomura K., (1998), *Phytochemistry*, 49, 2343-2347.
36. Zabetakis I., Edwards R., O'Hagan D., (1999), *Phytochemistry*, 50, 53-56.
37. Ahn J. C., Hwang B., Tada H., Ishimaru K., Sasaki K., Shimomura K., (1996), *Phytochemistry*, 69-72.
38. Washida D., Shimomura K., Nakajima Y., Takido M., Kitanaka S., (1998), *Phytochemistry*, 49, 2331-2335.
39. Murakami Y., Omoto T., Asai I., Shimomura K., Yoshihira K., Ishimaru K., (1998), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53, 75-78.
40. Tada H., Murakami Y., Omoto T., Shimomura K., Ishimaru K., (1996), *Phytochemistry*, 42, 431-434.
41. Fukui H., Hasan A. F. M. F., Kyo M., (1999), *Phytochemistry*, 51, 511-515.
42. Bhadra R., Morgan J. A., Shanks J. V., (1998), *Biotechnology and Bioengineering*, 60, 670-678.
43. Tanaka N., Matsuura E., Terahara N., Ishimaru K., (1999), *J. Plant Physiol.*, 155, 251-254.
44. Ogasawara T., Chiba K., Tada M., (1998), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 41, *Medicinal and Aromatic Plants X*, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 366-390.
45. Payne G., Bringi V., Prince C., Shuler M., (1992), *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Hanser Publishers, Munich, Vienna, New York, Barcelona.
46. Sasaki K., Udagawa A., Ishimaru H., Hayashi T., Alfermann A. W., Nakanishi F., Shimomura K., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 457-459.
47. Massera P. E., Talou J. R., Giuliotti A. M., (1998), *Biotechnology Letters*, 20, 573-577.
48. Pinõl M. T., Palazón J., Cusidó R. M., Serrano M., (1996), *Bot. Acta*, 109, 133-138.
49. Palazón J., Cisido R. M., Roig C., Pinõl M. T., (1998), *Plant Cell Reports*, 17, 384-390.
50. Wysokińska H., Chmiel A., (1996), *Acta Biotechnol.*, 17, 131-159.
51. Mukudan U., Carvalho E., Curtis W. R., (1998), *Biotechnology Letters*, 20, 469-474.
52. Pietrosiuk A., *Wybrane alkaloidy indolowe w różnych organach i tkankach Catharanthus roseus (L.) G. Don otrzymanych w hodowli in vitro*, praca doktorska, Akademia Medyczna, Warszawa.
53. Pradel H., Dumke-Lehmann U., Dietrich B., Luckner M., (1997), *J. Plant Physiol.*, 151, 209-215.
54. Kisiel W., Stojakowska A., Malarz J., Kohlmuenzer S., (1995), *Phytochemistry*, 40, 1139-1140.
55. Wysokińska H., Różga M., (1998), *J. Plant Physiol.*, 152, 78-83.
56. Stojakowska A., Kisiel W., (1997), *Polish J. Chem.*, 71, 509-512.
57. Banerjee S., Rahman L., Uniyal G. C., Ahuja P. S., (1998), *Plant Science*, 131, 203-208.
58. Ray S., Ghosh B., Sen S., Jha S., (1996), *Planta Medica*, 62, 571-573.
59. Furmanowa M., Gajdzis-Kuls D., Starościk B., Stefańska J., (1998), *Herba Polonica*, 44, 265-269.
60. Grabias B., Kochan E., Wysokińska H., Chmiel A., (1998), *46th Annual Congress Society for Medicinal Plant Research*, Abstracts of Plenary Lectures, Short Lectures and Posters, C22.
61. Wysokińska H., Różga M., (1998), *J. Plant Physiol.*, 152, 78-83.