

Aktualny stan badań w zakresie biotechnologii roślin z rodzaju *Gentiana*

Anna Mikuła
Jan J. Rybczyński
Ogród Botaniczny CZRB PAN
Warszawa

1. Wstęp

Gatunki z rodzaju *Gentiana* są powszechnie znanymi roślinami o dekoracyjnych kwiatach. W stanie naturalnym występują głównie w górskich rejonach świata: w Himalajach, Alpach, Pirenejach oraz Tatrach. Aklimatyzowanie ich do innych warunków jest bardzo trudne, a często niemożliwe. Wszystkie występujące w Polsce w stanie naturalnym goryczki objęte są ochroną prawną. Niektóre gatunki są źródłem związków aktywnych biologicznie. Stosowane są zatem w fitoterapii oraz jako składniki ponad 100 specyfików ziołowych (1). Problemy związane z ograniczonym dostępem do surowca roślinnego, utrudnionym rozmnażaniem generatywnym i wegetatywnym oraz narastające zubażanie stanowisk naturalnych, z których się go w większości otrzymuje, skłaniają do zastosowania kultur *in vitro* do wegetatywnego rozmnażania tych roślin. Celem przedstawionego opracowania jest przybliżenie, na podstawie dostępnej literatury, problemów związanych z wykorzystaniem metod biotechnologicznych w ochronie puli genowej roślin należących do rodzaju *Gentiana*.

W kulturach *in vitro* goryczek zaobserwować można następujące nurty badań:

- 1) badania zmierzające do opisanie zdolności regeneracyjnych drogą organogenezy (2);
- 2) badania nad somatyczną embriogenezą prowadzone na bazie kultur agarowych oraz wieloletnich zawiesin komórkowych (3-5);
- 3) modyfikowanie genomu roślinnego za pomocą *Agrobacterium rhizogenes* w kierunku zwiększenia możliwości wykorzystania goryczek na kwiat cięty lub jako źródła metabolitów wtórnych (6-8);
- 4) badania nad obecnością związków aktywnych biologicznie w zregenerowanych roślinach, tkance kalusowej lub bezpośrednio w zawieszynie komórkowej (9-12).

Dzięki rozmnażaniu goryczek w kulturach *in vitro*, a także manipulowaniu ich genomem, być może uda się opracować nowe, alternatywne źródło metabolitów wtórnych lub materiału roślinnego dla przemysłu farmaceutycznego czy kwiaciarskiego, co przyczynić by się mogło jednocześnie do ochrony zasobów naturalnych roślin należących do rodzaju *Gentiana*.

2. Charakterystyka botaniczna i fitochemiczna goryczek

Rodzina *Gentianaceae* obejmuje około 45 rodzajów, z czego w Polsce występują trzy: *Centaurium* Hill., *Swertia* L. i *Gentiana* L. (13). W obrębie rodzaju *Gentiana* określono 361 gatunków. Większość, bo 312 pochodzi z Azji, 35 występuje w Ameryce Północnej i Środkowej, a tylko 29 gatunków w Europie (14). Rozprzestrzenione są głównie w górskich regionach świata, w dwóch centrach. Około 190 gatunków występuje w Himalajach, z czego 98 to endemity. Drugim skupiskiem tych roślin są Alpy i Pireneje, w których znajduje się 27 gatunków, wśród nich 17 stanowią endemity (15). Goryczki występują zwykle na wysokości powyżej 1000 m n.p.m., zdarzają się również gatunki rosnące w ekstremalnych warunkach powyżej 4000 do 6000 m n.p.m., np. *G. amoena* C.B. Clarke na Mont Everest czy *G. urnula* L. w Himalajach (14,16).

W Polsce w stanie naturalnym stwierdzono obecność 20 gatunków goryczek. Posiadają one szereg wspólnych cech. Kwiaty *Gentiana* są eutropowe, przystosowane do zapylania wyłącznie przez owady długotrąbkowe — trzmiele i motyle. Ich dzwonkowata, długa korona (średnio od 2 do 5 cm) uniemożliwia dostęp innym owadom. Położenie pręcików poniżej znamion słupków zapobiega samozapyleniu. Istnieje pogląd, że z powodu braku światła u niektórych gatunków, np. u *G. asclepiadea* L. i *G. clusii* Per & Song dochodzi do pseudoklejstogamii, paki kwiatowe nie otwierają się i następuje wówczas zapylenie własnym pyłkiem (17). Charakterystyczną cechą wielu goryczek jest szybka reakcja kwiatów na zmianę temperatury. Jej wahania w granicach 1°C, mogą przyczyniać się u pewnych gatunków do zamykania kwiatów. Goryczki reagują niejednakowo na temperaturę, przy której otwierają koronę, np. *G. clusii* Per & Song już przy 8,5°C, podczas gdy *G. cruciata* L. wymaga 20°C. Niektóre z nich reagują na wstrząsy sejsmiczne lub wiatry (16). Nasiona goryczek przechowywane na sucho zupełnie tracą zdolności do kiełkowania. Kiełkują tylko na świetle, chociaż, jak wykazano w badaniach, silne światło hamuje wzrost pewnych gatunków np. *G. punctata* L. (17). Przed wysianiem nasiona wszystkich gatunków wymagają stratyfikacji na mokro w niskiej temperaturze. W naturze często dochodzi do pęknięcia torebek i rozsiewania nasion już w ciągu zimy.

Goryczki u podstawy wyrastających pędów wykształcają sztywne, skórzaste rozety zimozielonych liści. Odporność na zimowe i wiosenne przymrozki prawdopodobnie zawdzięczają dużej ilości cukrów gromadzących się w komórkach liści (17). W części podziemnej goryczki tworzą grube, walcowate kłącza, z niewielką liczbą drobniejszych korzeni współżyjących symbiotycznie

z grzybami. Występujące zjawisko mikoryzy, duża wrażliwość roślin na pH gleby oraz przesuszenie, bardzo utrudniają uprawę goryczek poza środowiskiem naturalnym.

Lacińska nazwa goryczek pochodzi od ilyryjskiego króla Gentiusa, który odkrył ich leczniczą wartość (18), natomiast polska związana jest z niezwykle gorzkim smakiem tych roślin. Surowcem leczniczym są kłącza i korzenie pozyskiwane z następujących gatunków: *G. lutea* L. (goryczka żółta), *G. asclepiadea* L. (trojeściowa), *G. pannonica* Scop. (pannońska), *G. punctata* L. (kropkowana), *G. purpurea* L. (purpurowa) i *G. cruciata* L. (krzyżowa) (19-21). Najczęściej, jako składnik mieszanek ziołowych, wykorzystywana jest *G. lutea* (1). Związki występujące w goryczkach wykazują lecznicze właściwości w schorzeniach układu pokarmowego (20), a wyciągi z korzeni stosowane są również do wyrobu win i likierów (22).

W goryczkach występuje zespół związków o charakterze glikozydowym i alkaloidowym, należących do sekoirydoidów, tj. gencjopikrozyd i amarogentyna (23). Gencjopikrozyd (inaczej gencjopikryna C) ulegając hydrolizie tworzy silny związek grzybostatyczny — gencjogenol (24). Około 5000 razy bardziej gorzką substancją od gencjopikrozydu i 300 razy bardziej od chininy jest amarogentyna. Jest ona najbardziej gorzkim związkiem naturalnym z dotychczas poznanych. Wyczuwalna jest nawet w rozcieńczeniu 1:58 milionów (19). Ponadto w goryczkach występują związki o charakterze alkaloidów — gencjanina i gencjalutyna. Wykazują one działanie uspokajające i przeciwzapalne, hiper- lub hipotensyjne. Obok wymienionych związków w korzeniu goryczek znaleziono również ksantony: gentyzynę i izogentyzynę, substancje wpływające na ośrodkowy układ nerwowy (24), oraz inne związki np. pektyny, trójcukier gencjanozę, sacharozę, fitosterole oraz w niewielkiej ilości olejek lotny (19,24). Świątek i wsp. (25) stwierdzili obecność kwasu chinowego w przechowywanych kłączach *G. lutea* L.

Prace nad identyfikowaniem związków występujących w goryczkach, izolacją oraz opisaniem ich struktury prowadzone są bardzo intensywnie na całym świecie (25-27). Nowe glukozydy irydooidowe opisano u *G. alpina* Vill. (28), *G. campestris* L. (29), *G. depressa* L. (30), *G. pedicellata* L. (31), *G. scabra* Bunge (32) i *G. verna* L. (33). U *G. triflora* Pall. var. *japonica* Hara linii Yahaba badania nad enzymami związanymi z metabolizmem antocjanów prowadzone są również na poziomie molekularnym i biochemicznym (34).

W Polsce surowiec w postaci kłączy i korzeni goryczek pochodzi wyłącznie z importu. Podejmowane w latach osiemdziesiątych próby zakładania i prowadzenia plantacji, jak się okazało, były zawodne i nieopłacalne (35). Specyficzne wymagania siedliskowe i duże wilgotnościowe trudne są do odtworzenia w uprawach monokultury. Rośliny ponadto rozwijają się bardzo wolno, nawet przy zapewnieniu im troskliwej opieki. Zakwitają zwykle po kilku latach, a korzenie i kłącza nadają się do zbioru na surowiec leczniczy dopiero po 3-5, a czasami nawet 8-latach (36,37).

Wprowadzenie roślin do warunków kultur *in vitro* otwiera nową, bardziej wydajną drogę ich pozyskiwania. W przypadku goryczek pozwala ona na niezależnienie się od trudno dostępnego materiału roślinnego, od długo-

trwałego i zawodnego kiełkowania nasion oraz powolnego wzrostu siewek. Dostarcza w postaci regenerantów — materiału hodowlanego, a w postaci tkanki i regenerantów — metabolitów wtórnych. Stanowi również materiał do badań podstawowych.

3. Obecny stan badań nad roślinami z rodzaju *Gentiana* w kulturach *in vitro*

3.1. Rozmnażanie goryczek drogą organogenezy

Większość gatunków goryczek wprowadzonych do kultur *in vitro* rozmnażanych jest drogą organogenezy. Kontrola przebiegu różnicowania się organów, z których następnie uzyskuje się rośliny zależy od zespołu odpowiednio dobranych czynników, które decydują o drodze regeneracji, jak również o wydajności badanego procesu. Należą do nich rodzaj i wiek eksplantatu użytego do założenia doświadczenia, rodzaj i skład pożywki, zastosowane regulatory wzrostu, jak również warunki zewnętrzne kultury. Zdolności regeneracyjne w kulturach *in vitro* opracowanych do tej pory gatunków goryczek zestawiono w tabeli 1.

3.1.1. Stosowane eksplantaty

Eksplantaty mogą pochodzić praktycznie z dowolnego stadium ontogenetycznego rośliny. Pomimo że pobrany fragment tkanki traci kontakt z naturalnym układem interakcji komórkowych, a dalszy jego rozwój stymulowany jest sztucznymi warunkami kultury *in vitro*, różne eksplantaty wykazują odmienne zdolności morfogenetyczne. Zależą one od wieku i stopnia jego zróżnicowania. W kulturach dotychczas badanych gatunków goryczek, w przypadku większości stosowanych eksplantatów indukowano powstawanie pędów.

Hosokawa i wsp. (38) w badaniach prowadzonych na pięciu odmianach *G. triflora* Pall. var. *japonica* Hara linii Yahaba i trzech mieszańcach *G. triflora* x *G. scabra*, wykazali większe zdolności morfogenetyczne eksplantatów liści i pędów, w porównaniu z korzeniem. Z fragmentów liści i pędów otrzymywano średnio 10-11 zregenerowanych pędów, a z korzeni 4-5. Wykładając fragmenty pędów *G. kurroo* Royle na pożywki inicjalne Sharma i wsp. (39) otrzymywali średnio z jednego eksplantatu 3,5 zregenerowanych pędów w ciągu 6-tygodni kultury. Z fragmentów pędów użytych przez Momčilović i wsp. (40) powstawało średnio 1,3; 3,2; 4,1; 6,5 pędów kolejno w kulturach następujących gatunków goryczek: *G. acaulis* L., *G. cruciata* L., *G. purpurea* L. i *G. lutea* L. Eksplantatami wyjściowymi w wielu przypadkach były merystemy wierzchołkowe, wierzchołki pędów oraz paki kątowe (10,39,41). Opisany przez Yamada i wsp. (10) system regeneracji *G. scabra* pozwala na otrzymywanie z paków wierzchołkowych $4,7 \times 10^8$ roślin w ciągu roku. U *G. lutea* i *G. pneu-*

monanthe L. stosowano eksplantaty pochodzące z siewek, zawierające wykształcone merystemy wierzchołkowe lub kątowe (42).

Często w kulturach *in vitro* wykorzystywano również jako źródła eksplantatów pędy pochodzące ze zregenerowanych roślin. Taki system mikrorozmnażania opracowany dla *G. kurroo* pozwalał na otrzymywanie regenerantów przez kilka lat, bez konieczności sięgania do wyjściowego materiału roślinnego (39). Podobną metodę opracowano dla *G. scabra* (10). Z eksplantatów pierwotnych otrzymywano średnio 18 pędów, a z wtórnych eksplantatów pędowych przeszło 70 w obecności 2,5 razy wyższych stężeń hormonów.

3.1.2. Stosowane pożywki

Stosowane w kulturach pożywki różnią się zawartością makro- i mikroelementów oraz witamin. W badaniach zmierzających do ustalenia odpowiedniego składu podłoża dla goryczek Wesołowska i wsp. (43) poddali analizie 37 wariantów pożywki Nitsch i Nitsch (NN) oraz Murashige i Skoog (MS). Skrzypczak i wsp. (9) testowali zmodyfikowane pożywki MS, NN i Gamborga (B5). Hosokawa i wsp. (38) badali MS i B5, a Momčilović i wsp. (40) obok MS testowali również pożywkę dla roślin drzewiastych. W przedstawionych pracach najlepszą reakcję eksplantatów oraz największą liczbę regenerantów zapewniał podstawowy zestaw substancji mineralnych i organicznych pożywki MS i B5, o zmodyfikowanym odpowiednio składzie regulatorów wzrostu.

Najczęściej do mikrorozmnażania goryczek stosowano pożywki zestalone agarem. Kultury płynne stosowano głównie w celu pobudzenia do intensywnego wzrostu tkanki kalusowej, a następnie wykorzystania jej jako źródła metabolitów wtórnych, tj. gencjopikrozydu (11,12). Jedynie w przypadku mieszańca WSP3 (*G. triflora* x *G. scabra*) podjęto się jego rozmnażania bezpośrednio w środowisku pożywki płynnej, w warunkach fermentora. Zastosowana metoda pozwoliła na masowe otrzymywanie pędów przy jednoczesnym skróceniu czasu trwania kultury oraz zmniejszeniu nakładów pracy (2).

3.1.3. Stosowane regulatory wzrostu

Regulatory wzrostu stosowane w pożywkach indukcyjnych stymulują podziały komórkowe w eksplantatach, prowadzące w konsekwencji do ich proliferacji i powstawania stref merystematycznych, a następnie różnicowania się z nich zawiązków pędów lub korzeni. Odpowiednio dobrany stosunek auksyn do cytokinin decyduje o kierunku rozwoju eksplantatów (44). W zależności od wzajemnych proporcji hormonów można stymulować tworzenie pędów lub korzeni, bądź indukować proces somatycznej embriogenezy. Rodzaj i stężenie użytych regulatorów wzrostu zależą od badanego gatunku i powinny być dobrane indywidualnie. W badaniach nad rozmnażaniem goryczek drogą organogenezy, testowano wpływ różnych cytokinin: zeatyny, kinetyny, BAP, tidiazuronu (TDZ), 4PU-30 oraz auksyn: naturalnej (IAA) i syntetycznych NAA, IBA, 2,4-D, dicamby i picloramu (tab. 1).

TABELA 1
REGENERACJA *Gentiana* spp. W KULTURZE *in vitro*

Eksplantat	Użyte regulatory wzrostu	Droga różnicowania/wynik kultury	Sekoiirydoidy stwierdzono w:	Literatura
1	2	3	4	5
<i>G. acaulis</i> L.				
fragmenty pędów	IAA, NAA, BA, GA ₃	organogeneza, rośliny	nie badano	40
<i>G. cerina</i>				
pędy boczne	BAP, GA ₃	organogeneza	nie badano	67
<i>G. corymbifera</i>				
pędy boczne	BAP, GA ₃	organogeneza	nie badano	67
<i>G. cruciata</i> L.				
zawiesina komórkowa	2,4-D, BAP	zawiesina komórkowa	PEM	11
liścienie, hipokotyle, korzenie	2,4-D, NAA, KIN, SA, GA ₃	somatyczna embriogeneza (SE), rośliny	nie badano	3, 4, 50
zawiesina komórkowa	Dic, NAA, BA, KIN, SA, GA ₃	somatyczna embriogeneza, rośliny	nie badano	5, 50, 52
fragmenty pędów	IAA, NAA, BA, GA ₃	organogeneza, rośliny	nie badano	40
zarodki zygocyczne, siewki, fragmenty liści	IAA, NAA, IBA, 2,4-D, KIN, BAP, SA	kalus, organogeneza, rośliny	kalus, rośliny	43
<i>G. kurroo</i> Royle				
wierzchołki i fragmenty pędów	IAA, NAA, IBA, KIN, BA	organogeneza, rośliny	nie badano	39
<i>G. lutea</i> L.				
wierzchołki pędów, liścienie i epikotyle	NAA, IBA, KIN, BA, 2iP	organogeneza, rośliny	nie badano	42
fragmenty pędów	IAA, NAA, BA, GA ₃	organogeneza, rośliny	nie badano	40
liścienie, hipokotyle, korzenie	IAA, 2,4-D, BAP, KIN, GA ₃	organogeneza, rośliny	pędy	9
merystemy wierzchołkowe, pąki	IAA, NAA, BA, PBA, Zeat	organogeneza, rośliny	nie badano	41
<i>G. pannonica</i> Scop.				
liścienie, hipokotyle, korzenie	NAA, 2,4-D, KIN, GA ₃	somatyczna embriogeneza, rośliny	nie badano	3
<i>G. pneumonanthe</i> L.				
wierzchołki pędów, liścienie i epikotyle	NAA, IBA, KIN, BA, 2iP	organogeneza, rośliny	nie badano	42
liście, merystemy wierzchołkowe	2,4-D, Picloram, BA	somatyczna embriogeneza, rośliny	nie badano	49

1	2	3	4	5
G. punctata L.				
liścienie, hipokotyle, korzenie	IAA, 2,4-D, BAP, KIN, GA ₃	organogeneza, rośliny	pędy	9
epikotyle siewek	IAA, BA	organogeneza, rośliny	nie badano	46
G. purpurea L.				
zarodki zygotyczne	IAA, NAA, IBA, 2,4-D, KIN, BAP, S.A.	organogeneza, rośliny	nie badano	43
fragmenty pędów	IAA, NAA, BA, GA ₃	organogeneza, rośliny	nie badano	40
G. scabra Bunge var. buergeri Maxim.				
pąki kątowe	IAA, NAA, IBA, BAP, GA ₃	organogeneza, rośliny	korzenie roślin	10
G. scabra TO				
wierzchołki pąków, liście	2,4-D, BA, TDZ	kalus, organogeneza, rośliny	nie badano	45
G. tibetica King				
zawiesina komórkowa	2,4-D, BAP	zawiesina komórkowa	PEM	11
liścienie, hipokotyle, korzenie	NAA, 2,4-D, KIN, GA ₃	somatyczna embriogeneza, rośliny	nie badano	3, 4
zawiesina komórkowa	Dic, NAA, BA, KIN, S.A, GA ₃			5, 52
fragmenty pędów	IAA, NAA, BA, GA ₃	organogeneza, rośliny	nie badano	40
liścienie, hipokotyle, korzenie, pędy	IAA, NAA, IBA, 2,4-D, KIN, BAP, Zeat, GA ₃	organogeneza, rośliny	kalus, rośliny	61
G. triflora Pall. var. japonica Hara cv (F1 hybryd, G. triflora x G. scabra) H-3, Polarno White i WSP-3				
liście, pędy, korzenie	IAA, NAA, 2,4-D, TDZ, 4PU-30, BA, Zeat	organogeneza, rośliny	nie badano	38
pąki kątowe	NAA, TDZ, 4PU-30, BA	organogeneza, rośliny	nie badano	2

Stosowane skróty: **2,4-D** — kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy; **2iP** — 2-izopentinyloadeni-na; **4PU-30** — N-(2-chloro-4-pirydylo)-N'-fenylo-mocznik; **BAP (BA)** — 6-benzylaminopuryna (benzyladenina); **Dic** — kwas 3,6-dwuchloro-2-metoksybenzoesowy (dicamba); **GA₃** — kwas gibberelinowy; **IAA** — kwas β-indoliloctowy; **IBA** — kwas β-indolilomasłowy; **Kin** — 6-furfurylaminopuryna (kinetyna); **NAA** — kwas α-naftalenoctowy; **PEM** — masa proembriogenna; **Picloram** — kwas 4-amino-3,5,6-trójchloropikolinowy; **SA** — siarczan adeniny; **TDZ** — N-fenyl-N'1,2,3-thiadiazol-5-yl-N'-mocznik (tidiazuron); **Zeat** — (6-[4-hydrokso-3-metylobut-2-enylamino] puryna (zeatyna).

Analizując wpływ czterech cytokinin na zdolności regeneracyjne mieszańca WSP-3 *G. triflora* x *G. scabra*, Hosokawa i wsp. (38) stwierdzili większą skuteczność TDZ w porównaniu z 4PU-30, BA i zeatyną. Lepszy efekt pedogenezy przy użyciu TDZ w stosunku do BA potwierdzili również Jomori i wsp. (45). Odpowiednie stężenia tej fenylomocznikowej cytokiny do stymulacji bezpośredniej pedogenezy określono na poziomie 5,0 i 10,0 mg/l. Podniesienie poziomu do 20,0 mg/l przyczyniało się do zwiększenia liczby regenerowanych pędów, jednak wówczas reagowało tylko 60% eksplantatów (38). Niższe stężenia (0,5-1,0 mg/l) TDZ stosowano do regeneracji pędów z tkanki kalusowej (45). Sharma i wsp. (39) wykazali, że u *G. kurroo* użycie BA w stosunku do kinetyny pozwalało na otrzymywanie dwukrotnie większej liczby pędów z jednego eksplantatu, przy jednocześnie dwukrotnie większym procencie reagujących eksplantatów. Podobne rezultaty w badaniach nad czterema gatunkami goryczek otrzymali Momčilović i wsp. (40). Zazwyczaj zastosowanie wyższego stężenia cytokiny (od 2,0-4,0 mg/l do 10,0 mg/l w przypadku TDZ) i relatywnie niskiego poziomu auksyny (0,1-0,2 mg/l) stymulowało eksplantaty do tworzenia pędów (38-40). Natomiast użycie wyższego stężenia auksyny powyżej 0,25 mg/l, np. 2,4-D, w obecności 1,0-2,0 mg/l cytokiny (BA lub kinetyny) prowadziło do powstawania tkanki kalusowej i regeneracji pędów drogą pośredniej organogenezy (45,9). W swoich badaniach nad *G. punctata* autorzy wykazali, że wraz ze wzrostem stężenia BA (od 0,0 do 2,0 mg/l) zwiększała się liczba powstających pędów, jednak wyższe koncentracje cytokiny powodowały silne ich skrócenie i tworzenie się rozet. Zastosowanie dodatkowo 0,1 mg/l IAA stymulowało powstawanie pędów. Stwierdzono również, że zastąpienie IAA przez NAA w koncentracjach wyższych niż 0,1 mg/l wywoływało kalusowanie i powodowało wystąpienie objawów hiperhydratacji (46).

Gibereliny są bardzo rzadko używane w pożywkach indukcyjnych, jakkolwiek znajdują zastosowanie w czasie dojrzewania zarodków czy stymulacji tworzenia systemu korzeniowego oraz w późniejszym wzroście roślin (47). Najczęściej stosowaną w kulturach *in vitro* i jednocześnie uchodzącą za bardzo silny stymulator wzrostu jest GA₃ (48). W pracach dotyczących kultur goryczek, giberelinę stosowano częściej w pożywkach stymulujących prawidłowy rozwój wcześniej otrzymanych pędów, rzadziej natomiast hormon ten był stosowany w pożywkach inicjalnych. Opisano trzy przypadki zastosowania gibereliny, zawsze w zestawieniu z cytokiną, w których pobudzała ona formowanie i namnażanie pędów. Na pożywkę zawierającą GA₃ i BAP (po 1,0 mg/l) otrzymywano przeszło 18 pędów *G. scabra*. W pożywkach, w których zamiast gibereliny zastosowano auksynę (IAA lub NAA) w zestawieniu z BAP, regenerowano znacznie mniej pędów (10). Dodanie GA₃ do pożywki do namnażania pędów *G. punctata* w stężeniu 0,1-1,0 mg/l stymulowało ich elongację (46). U dwóch gatunków: *G. cerina* i *G. corymbifera* stwierdzono korzystny wpływ GA₃ zarówno w pożywkę inicjalnej, jak i ukorzeniającej pędy. Giberelina w kombinacji z BAP zwiększała proliferację pędów oraz stymulowała ich elongację, natomiast w pożywkę do ukorzenia z IBA, znacząco podnosiła liczbę powstających korzeni. Wyniki tych badań wskazują

na celowość uwzględniania GA₃ w kombinacjach hormonów pożywek kultur inicjalnych oraz w pożywkach do ukorzenia goryczek.

Podczas ukorzenia zregenerowanych pędów stwierdzono odmienne wymagania poszczególnych gatunków co do obecności i stężeń stosowanych hormonów. Pędy niektórych badanych gatunków tworzyły korzenie na pożywkach bez regulatorów wzrostu np. *G. cruciata* (40) i *G. scabra* (10). Często stosowanymi stymulatorami ukorzenia części nadziemnych goryczek były IBA lub IAA (43,39,9,46) oraz NAA (40,39,10,41). Do ukorzenia pędów *G. pneumonanthe* konieczne było wzbogacenie pożywki obok auksyny (5,0 mg/l IBA) jeszcze w cytokininę (0,1 mg/l BA) (42). Vinterhalter i Vinterhalter (46) obserwowali lepsze ukorzenie pędów *G. punctata* (88,2%) po 8-dniowym ich traktowaniu pożywką zawierającą 2,0 mg/l IBA, a następnie zmianie pożywki na wolną od regulatorów wzrostu. Stwierdzono, że NAA zastosowane zamiast IBA w pożywce do ukorzenia pędów, stymulowało powstawanie tkanki kalusowej u ich podstawy, a otrzymane korzenie były w znacznym stopniu zniekształcone. Elongację korzeni *G. punctata* istotnie podniesiono stosując 7-dniowe traktowanie pędów pożywką płynną z 2,0 mg/l IBA (46).

3.2. Proces somatycznej embriogenezy w kulturach goryczek

Somatyczna embriogeneza jest zjawiskiem szczególnie interesującym ze względu na to, że pozwala na zintensyfikowanie procesu regeneracji, dostarcza również materiału do badań podstawowych. U roślin z rodzaju *Gentiana* ta droga nie była jeszcze dostatecznie opisana. Spośród kilku prac, które ukazały się dotychczas większość stanowią doniesienia pokonferencyjne. Embriogenną tkankę kalusową i regeneranty otrzymano u *G. pneumonanthe* (49). Somatyczną embriogenezę indukowano na blaszkach liściowych i merystemach wierzchołkowych regenerantów pod wpływem 2,4-D i picloramu. Dojrzewanie zarodków somatycznych zachodziło na pożywce wzbogaconej BA. Wesołowska i wsp. (50) zaindukowali somatyczną embriogenezę na eksplantatach siewek *G. cruciata* w obecności 2,4-D i kinetyny. Zarodki somatyczne przenoszono na pożywki MS uzupełnione NAA i siarczanem adeniny (SA) lub GA₃ i SA. W przypadku *G. crassicaulis* Duthie embriogenną tkankę kalusową wyprowadzono z protoplastów na pożywce MS zawierającej 3,0 mg/l zeatyny, 2,0 mg/l 6BA, 1,0 mg/l GA₃, 1,0 mg/l NAA i 6% sacharozę. Kalus utrzymywał swoje embriogenne właściwości przez okres około jednego roku na pożywce wolnej od hormonów. Rośliny regenerowano na pożywkach pozbawionych regulatorów wzrostu. Średnio 30% regenerantów przeżywało i wykazywało prawidłowy rozwój po przeniesieniu do szklarni (51).

Pierwsza obszerna praca dotycząca regeneracji goryczek drogą somatycznej embriogenezy ukazała się w 1994 r. (3). Autorzy używając 0,5 mg/l 2,4-D i 1,0 mg/l kinetyny, zaindukowali embriogenną tkankę kalusową trzech gatunków goryczek: *G. cruciata* L., *G. pannonica* Scop. i *G. tibetica* King. Eksplantatami wyjściowymi były fragmenty 25-dniowych siewek: liścienie, hipokotyle i korzenie. W pracy opisano czynniki wpływające na wydajność tworzenia kalusa przez poszczególne eksplantaty w różnych warunkach kultury.

Z embriogenicnej tkanki kalusowej otrzymano zarodki somatyczne, a następnie rośliny (3). Różnicowanie się i kolejne stadia rozwojowe zarodków somatycznych: od prazarodka, zarodka globularnego po stadium liścieniowe i jego konwersję w roślinę przedstawiono na bazie preparatów parafinowych barwionych różnymi metodami: reakcją PAS i leukofuksyną, safraniną i zielenią trwałą, hematoksyliną Erlicha (5). W badaniach nad przebiegiem somatycznej embriogenezy u goryczek skupiono się nie tylko nad opracowaniem optymalnych warunków dla wzrostu i rozwoju zarodków somatycznych (52), ale przede wszystkim dokonano wnikliwej analizy tego procesu. Dzięki zmodyfikowaniu pożywki płynnej rozwinięto system wieloletnich kultur zawieszinowych. Zastosowanie regulatorów wzrostu w postaci: 1,0 mg/l dicamby, 0,1 mg/l NAA, 2,0 mg/l BAP i 80,0 mg/l siarczanu adeniny, pozwoliło na utrzymanie intensywnie rosnącej masy proembriogenicnej (PEM) i zachowanie jej zdolności do regeneracji przez około cztery lata dla badanych trzech gatunków. W kulturach zawieszinowych prześledzono pochodzenie zarodków somatycznych. Wykazano, że powstają one w wyniku podziałów pojedynczej, totipotentnej, wolno pływającej w pożywce komórki lub pojedynczych komórek różnicujących się w PEM-ie (4). Dokonano porównania zdolności morfogenetycznych trzech analizowanych gatunków, regenerowanych drogą somatycznej embriogenezy na pożywce agarowej oraz w kulturze zawieszinowej. Zwrócono uwagę na wysoką wydajność tego procesu, a także na stosunkowo duże możliwości manipulowania badanym materiałem w opracowanych warunkach kultur zawieszinowych (53).

3.3. Manipulacje genetyczne

3.3.1. Kultura protoplastów *Gentiana* spp. i somatyczna hybrydyzacja

Regeneracji roślin goryczek można dokonać z pojedynczych, pozbawionych ścian komórkowych protoplastów. Dotychczas tą drogą otrzymano rośliny *G. crassicaulis* Duthie, *G. scabra* Bunge i czterech odmian mieszańca *G. triflora* x *G. scabra* (tab. 2). Pierwsze próby otrzymania protoplastów *G. scabra* podjęte przez Zhou i wsp. w 1985 (54) doprowadziły tylko do powstania tkanki kalusowej. W kolejnych badaniach doprowadzono do różnicowania się korzeni (55). Pierwsze rośliny w kulturze protoplastów goryczek otrzymano w 1989 r. (56).

Jako źródła protoplastów najczęściej używano liści (tab. 2). W przypadku *G. lutea* wykorzystano ustabilizowane zawiesziny komórkowe wyprowadzone z eksplantatów liści (57), natomiast u *G. crassicaulis* tkankę kalusową otrzymaną z hipokotyli siewek (51). Stosowano również liście pobierane z pędów roślin wyprowadzonych w warunkach *in vitro* z wierzchołków pędów na pożywkach bez hormonów wzrostu (45,58).

TABELA 2
REGENERACJA ROŚLIN Z RODZAJU *Gentiana* W KULTURZE PROTOPLASTÓW

Gatunek	Eksplantat	Rezultaty	Literatura
<i>G. crassicaulis</i> Duthie	kalus	kalus, somatyczne zarodki, rośliny	51
<i>G. lutea</i> L.	zawiesina komórkowa	kalus	57
<i>G. scabra</i> Bunge	liście	kalus	54
	liście	kalus, korzenie	55
	liście	kalus, pędy, rośliny	56
<i>G. scabra</i> linia TO	liście	kalus, pędy, rośliny	57
<i>G. triflora</i> Pall. var. <i>japonica</i> Hara linia Yahaba	liście regenerantów	kalus	45
<i>G. triflora</i> x <i>G. scabra</i> cv. Ihatovo, cv. Iwate, cv. Maciry, cv. WSP-3	liście regenerantów	kalus, pędy, rośliny	58

Regeneracja roślin w kulturze protoplastów przebiegała głównie drogą organogenezy (tab. 2). W wyniku wielokrotnych podziałów komórkowych nastąpiło tworzenie wielokomórkowych agregatów (protokalusów), które następnie intensywnie proliferując tworzyły tkankę kalusową. Tkanka kalusowa powstawała zazwyczaj w obecności auksyn i cytokinin. W niektórych kulturach regeneracja pędów zachodziła na pożywkach zawierających wysokie stężenia cytokinin (56,57). Wykorzystywany często w kulturach goryczek tidiazuron w stężeniach od 0,5 mg/l do 10,0 mg/l, stymulował efektywniejsze powstawanie pędów niż stosowane zazwyczaj cytokiny typu puryn takie jak: BA, kinetyna czy zeatyna. Jego zastosowanie przyczyniało się do 10-13-krotnego zwiększenia liczby otrzymanych pędów (45,58). Hormon ten podnosił również współczynnik podziałów komórkowych w kulturach protoplastów (58).

W kulturze protoplastów tkanki kalusowej hipokotyli, drogą somatycznej embriogenezy otrzymano rośliny *G. crassicaulis* (51). Eksplantaty w postaci fragmentów 4-tygodniowych hipokotyli wykładano na pożywkę z 2,0 mg/l 2,4-D i 0,5 mg/l BA. Po 2-tygodniach kultury zainicjowaną tkankę kalusową przenoszono i pasażowano co trzy tygodnie na pożywkę MS zawierającą 1,0 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l BAP, 500 mg/l hydrolizatu laktalbuminy i 4% sachrozę.

Takahata i wsp. (57) podjęli próbę otrzymania mieszańców somatycznych drogą fuzji protoplastów pomiędzy *G. scabra* Bunge i *Eustoma grandiflorum* Shinn. (*Gentianaceae*) oraz *G. lutea* i *E. grandiflorum*. W elektrofuzji uczestniczyło 10-20% protoplastów i otrzymano 2,1-4,1% heterokarionów pomiędzy *G. lutea* i *E. grandiflorum*.

3.3.2. Transformacja za pomocą *Agrobacterium*

Dażenie do zwiększenia przydatności użytkowej roślin oraz poszukiwanie nowych, bardziej wydajnych dróg pozyskiwania metabolitów wtórnych skłoniły badaczy do modyfikowania roślin z rodzaju *Gentiana*. Dokonując transformacji wykorzystano zjawisko naturalnego wprowadzania zmodyfikowanego plazmidu Ri przy użyciu *Agrobacterium rhizogenes* do genomu transformowanej rośliny. Następstwem infekcji komórek roślinnych była zmiana ich metabolizmu i tworzenie dużej masy drobnych korzeni przybyszowych zwanych *hairy roots*. Zwykle w kulturach uzupełnionych substancjami wzrastowymi korzenie zdolne do różnicowania pędów wykazują transgen.

Pierwszej transformacji roślin należących do rodzaju *Gentiana* według danych Mugniera (59) i Tepfera (60) poddano dwa gatunki goryczek: *G. cruciata* i *G. lutea*. W pierwszym przypadku otrzymano tumory w tkance kalusowej, w drugim zaś tylko korzenie włośnikowe (Davioud, nie publikowane). Pierwszej udanej transformacji goryczek dokonano dopiero w 1995 r. W opisywanym doświadczeniu uzyskano najpierw hodowlę korzeni włośnikowych, z których kolejno regenerowano rośliny w kulturze na pożywce 0,5 MS zawierającej BAP i NAA. Podjęte próby transformacji dotyczyły *G. scabra* Bunge var. *buergeri* Maxim. Przy użyciu dzikiego typu *Agrobacterium rhizogenes* (szczep MAFF03-01724) wprowadzono gen *rol*, dzięki czemu otrzymano rośliny o zmienionym fenotypie. Transformanty różniły się wysokością i terminem zakwitania. Obserwowano karłowe osobniki o bardzo skróconych pędach z 30-60 cm aż do 2-5 cm. Przy tej długości pędów obserwowano we wszystkich międzywęzłach zawiązywanie się pąków kwiatowych, czego nie spotyka się u roślin nie transformowanych. Dzięki tej modyfikacji wyprowadzono nowe formy ozdobne gatunku *G. scabra* zakwitające już około pierwszego roku kultury, podczas gdy rośliny ze stanowisk naturalnych kwitną po raz pierwszy zwykle po 3-latach (6).

Za pomocą *A. rhizogenes* A4 zawierającego agropinowy plazmid (pRiA4) zaindukowano korzenie włośnikowe na fragmentach pędów pochodzących z kultury aksenicznej odmiany mieszańcowej „*Polarno white*” (*G. triflora* x *G. scabra*). Regeneranty uzyskane z kultury korzeni włośnikowych wykazywały bardzo szerokie spektrum zmienności fenotypowej. Obok skróconych pędów, u niektórych roślin stwierdzono zaburzenia dominacji wierzchołkowej, co wpływało na większe krzewienie się i tworzenie większej liczby kwiatów. Liście eliptycznego kształtu były kolejnym organem wykazującym zmiany w morfologii (7).

Za pomocą dwóch szczepów *A. rhizogenes* podjęto próby transformacji pędów rozmnażanych wegetatywnie czterech gatunków goryczek: *G. lutea* i *G. purpurea* (szczep ATCC 15834) oraz *G. acaulis* i *G. cruciata* (szczep A4M70GUS). Szczep ATCC 15834, był szczepem typu dzikiego, natomiast A4M70GUS był nie rozbrojonym agropinowym typem zawierającym gen glukuronidazy, zintegrowany z regionem TL plazmidu pRiA4. Konstrukcja GUS zawierał *uidA*, sekwencje pod promotorem 70S (podwójny promotor 35SCaMV) z następującą sekwencją poliadenylacji NOS. Efektem transformacji *G. acau-*

lis i *G. lutea* było powstanie korzeni włośnikowych, z których otrzymano jedynie tkankę kalusową. Bezpośrednio z korzeni włośnikowych spontanicznie powstawały pąki *G. cruciata*, a pędy *G. purpurea* otrzymano w wyniku wtórnej organogenezy (poprzez tkankę kalusową). Powstałe regeneranty pochodzenia *hairy roots* były różne fenotypowo. Najczęściej miały skrócone międzywęzła i zwinięte lub pomarszczone liście. W przypadku *G. lutea* morfologiczne różnice regenerantów obserwowano również pomiędzy pięcioma klonami otrzymanymi na drodze niezależnych eksperymentów transformacji. Wstępne analizy ekstraktów z korzeni włośnikowych *G. lutea* wykazały obecność w nich gencjopikrozydu i ksantonu-gentyzyny. Optymalizacja warunków kultury transformowanych korzeni trzech przebadanych klonów *G. lutea* posłużyła do otrzymywania sekoirydoidów (8).

3.4. Kultury *in vitro* jako źródło metabolitów

Kultury tkankowe lub zregenerowane *in vitro* rośliny stanowiąc mogą źródło substancji naturalnych. Wiele gatunków z rodziny *Gentianaceae*, w tym również roślin z rodzaju *Gentiana* wprowadzonych do kultur, poddawanych jest badaniom pod kątem zawartości substancji czynnych (tab. 1). Obecność sekoirydoidów stwierdzono w zregenerowanych pędach lub roślinach (9,10,43,61), a także w tkance kalusowej (10,61). Występowanie gencjopikrozydu obserwowano również w masie proembriogenicznej (PEM-ie) kultur zawieszinowych *G. cruciata* i *G. tibetica* (11,12) oraz wykazano, że związek ten wydalany jest do pożywki płynnej (12). Zwykle zawartość gencjopikrozydu w korzeniach roślin rosnących *in vivo* waha się od 3,5 do 8% suchej masy u *G. pannonica* i *G. punctata*, do 10% s.m. u *G. lutea* (64,65), zaś w liściach do 3% s.m. (65). Dla porównania w pędach pochodzących z kultury *in vitro* zawartość gencjopikrozydu wynosiła 3,7% (9), natomiast w korzeniach regenerantów *G. scabra* około 8% s.m. (10). W wyselekcjonowanych klonach *G. scabra* ilość tego związku wzrastała nawet do około 12% s.m. (10). Obecność niewielkich ilości gencjopikrozydu, bo od około 0,01 do 0,02% s.m. wykazano w tkance rozwijającej się w warunkach kultury zawieszinowej oraz w płynie pohodowlanym, w którym jego zawartość wynosiła 2×10^{-3} % s.m. (12).

Znajomość dróg biosyntezy substancji naturalnych ma swoje implikacje praktyczne. Obok możliwości otrzymywania metabolitów w warunkach kultury, pozwala również na badanie enzymatyki procesów. Umożliwia to odnajdywanie prekursorów związków, które po dodaniu do kultury wzmagają tworzenie metabolitów wtórnych (62). Badania prowadzone na poziomie molekularnym i biochemicznym u goryczek, dążą do opisanie dróg biosyntezy antocyjanów występujących w ich kwiatach (34,63,66). Identyfikacja genów odpowiedzialnych za enzymatyczną kontrolę procesów biosyntezy gencjodelfiny w kwiatach *G. triflora*, umożliwi klonowanie odcinków cDNA, co w tym przypadku może znaleźć wykorzystanie w modyfikowaniu barwy kwiatów (34).

4. Podsumowanie

Kultury *in vitro* umożliwiają wydajne rozmnażanie goryczek zarówno drogą organogenezy jak i somatycznej embriogenezy, a tkanka kalusowa i regeneranty stanowiąc mogą źródło metabolitów wtórnych. Manipulowanie roślinnym genomem goryczek otwiera nowe perspektywy w genetyce i hodowli tych roślin. Z danych literaturowych wynika, że zmodyfikowane metodą transformacji za pomocą *A. rhizogenes* goryczki posiadają cechy podnoszące ich walory ozdobne. W przypadku roślin należących do rodzaju *Gentiana* z wielu względów, na które zwrócono uwagę w tym artykule, istnieje, jak się wydaje, potrzeba szerszego wykorzystywania nowoczesnych metod biotechnologicznych dla większej grupy goryczek. Dotychczas w kulturach *in vitro* opracowano metody rozmnażania dwunastu gatunków goryczek, a transformacji zakończonej otrzymaniem stransformowanych roślin dokonano zaledwie w przypadku czterech gatunków.

Literatura

1. Rote Liste, (1986), *Verzeichnis von Fertigarzne-imitteln der Mitglieder des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie*, Cantor, Aulendorf Württ.
2. Hosokawa K., Oikawa Y., Yamamura S., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 747-751.
3. Mięka A., Rybczyński J. J., (1994), *Prace Ogródu Botanicznego PAN*, 5/6, 425-432.
4. Mięka A., Tykarska T., Kuraś M., Iwanowska A., Rybczyński J. J., (1996a), *Proceedings International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants*, Quedlinburg, Germany, 290-295.
5. Mięka A., Wesołowska M., Kapusta J., Skrzypczak L., Rybczyński J. J., (1996 b), *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 65, 47-51.
6. Suginuma C., Akihama T., (1995), *Acta Horticulturae*, 392, 153-160.
7. Hosokawa K., Matsuki R., Oikawa Y., Yamamura S., (1997), *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.*, 51, 137-140.
8. Momčilović I., Grubišić D., Kojić M., Nešković M., (1997a), *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.*, 50, 1-6.
9. Skrzypczak L., Wesołowska M., Skrzypczak E., (1993), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 21, *Medicinal and Aromatic Plants IV*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 172-186.
10. Yamada Y., Shoyama Y., Nishioka I., Kohda H., Namera A., Okamoto T., (1991), *Chem. Pharm. Bull.*, 39(1), 204-206.
11. Kamińska D., Wesołowska M., Króliczak P., Mięka A., (1996), *44th Annual Congress on Medicinal Plant Research*, Book of Abstracts, Prague, 93-94.
12. Kamińska D., Wesołowska M., Króliczak P., Skrzypczak L., Grajek W., (1998), *Biotechnologia*, 3(42), 106-113.
13. Pawłowski B., Jasiewicz A., (1971), „*Flora polska*”. *Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych*, t. XII, PWN, Warszawa-Kraków.
14. Yuan Y.-M., Küpfer P., Doyle J., (1996), *Am. J. of Botany*, 83(5), 641-652.
15. Ho T. N., Liu S. W., (1990), *Bulletin of the British Museum (natural History)*, Botany Series, 20, 169-192.
16. Świejkowski L., (1956), *Ochrona roślin w Polsce*, Spół. Wyd. Artystycznych i Użytkowych „Poziom” Łódź, 231-256.
17. Radwańska-Paryska Z., (1953), *Zielony świat Tatr*, Nasza Księgarnia, Warszawa.
18. Hereźniak J., (1984), *Rośliny chronione w Polsce. Goryczkowate*, Liga Ochrony Przyrody, Warszawa.

19. Ożarowski A., Jaroniewski W., (1987), *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*, IWZZ, Warszawa, 167-170.
20. Rumińska A., Ożarowski A., (1990), *Leksykon roślin leczniczych*, PWNiL, Warszawa, 160-161.
21. Skrzypczak L., (1992), *Biotechnologia*, 4(19), 50-55.
22. Czikow J., Łapitiew J., (1987), *Rośliny lecznicze i bogate w witaminy*, (wyd. 3), PWRiL, Warszawa, 124-126.
23. Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Malinowski J., Walewska E., (1987), *Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych*, PZWL, Warszawa, 287-296.
24. Kohlmünzer S., (1993), *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji*, (wyd. 4), Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 30-40, 265-274, 446-447.
25. Świątek L., Dombrowicz E., Zadernowski R., (1988), *Herba Polonica*, t. XXXIV (1-2), 15-20.
26. Tankhaeva L. M., Aseeva T. A., Nikolaeva G. G., Nikolaev S. M., Rastnikowa G. V., (1989), *Rastitei'nye Resursy*, 25 (3), 321-330.
27. Hayashi T., Yamagishi T., (1988), *Phytochemistry*, 27, 3696-3699.
28. Mpondo E. M., Garcia J., Cartier G., Pellet G., (1990 c), *Planta Medica*, 56, 334.
29. Mpondo E. M., Garcia J., Chulia A. J., (1990 b), *Phytochemistry*, 29, 1687-1688.
30. Chulia A. J., Kaouadji M., (1985), *J. Nat. Prod.*, 48(1), 54-58.
31. Garcia J., Chulia A. J., (1986), *Planta Medica*, 4, 327-329.
32. Ikeshiro Y., Tomita Y., (1983), *Planta Med.*, 48(3), 169-173.
33. Mpondo E. M., Garcia J., (1990a), *Phytochemistry*, 29, 643-644.
34. Tanaka Y., Yonekura K., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Fujiwara H., Ashikari T., Kusumi T. (1996), *Plant Cell Physiol.*, 37(5), 711-716.
35. Procyk A., (1982), *Wiadomości Zielarskie*, 1-2, 7-8.
36. Kozłowski J., (1983), *Wiadomości Zielarskie*, 10-11, 16-17.
37. Kusińska M., (1985), *Wiadomości Zielarskie*, 2, 11-12.
38. Hosokawa K., Nakano M., Oikawa Y., Yamamura S., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 578-581.
39. Sharma N., Chandel K. P. S., Paul A., (1993), *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.*, 34, 307-309.
40. Momčilović I., Grubišić D., Nešković M., (1997b), *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.*, 49, 141-144.
41. Viola U., Franz C., (1989), *Planta Med.*, 55(7), 290.
42. Lamproye A., Crevecoeur M., Kevers C., Gaspar Th., (1987), *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, 52 (3b), 1255-1257.
43. Wesołowska M., Skrzypczak L., Dudzińska R., (1985), *Acta Polon. Pharm.*, XLII, 1, 79-83.
44. Fakhrai H. K., Fakhrai F., (1990), in: Eds. Pollard J. W., Walker J. M., *Plant Cell and Tissue Culture. Methods in Molecular Biology*, 49-56.
45. Jomori H., Takahata Y., Kaizuma N., (1995), *Acta Horticulture*, 392, 81-86.
46. Vinterhalter B., Vinterhalter D., (1998), *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 50(3), 177-182.
47. Ammirato P. V., (1983), in: Eds. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y., *Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding*, Macmillan, Inc. New York, vol 1, 82-123.
48. Michniewicz M., (1985), w: Zurzycki J. (red), *Fizjologia roślin*, PWRiL, Warszawa, (wyd. II), 520-639.
49. Bach A., Pawłowska B., Micor J., (1994), *Prace Ogrodu Botanicznego PAN*, 5/6, 433-437.
50. Wesołowska M., Kapusta J., Skrzypczak L., (1994), *Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Florentia*, 176.
51. Meng Y., Gao Y., Jia J., (1996), *Plant Cell Reports*, 16, 88-91.
52. Mikuła A., Wilbik W., Rybczyński J. J., (1997), w: Dubert F., Skoczowski A. (red.), *Zastosowanie kultur in vitro w fizjologii roślin*, Zakład Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, 141-154.
53. Mikuła A., (1998), *Praca doktorska 1-136*, Biblioteka OB CZRB PAN, Warszawa.
54. Zhou Y., Qian Y., Cai Q., Zhang Z., Yan X., (1985), *Acta Bot. Sin.*, 27, 148-150.

55. Takahata Y., (1987), J. Jpn. Soc. Hortic. Sci., 56 (Suppl. 2), 794.
56. Takahata Y., Jomori H., (1989), Plant Tiss. Cult. Lett., 6, 19-21.
57. Takahata Y., Jomori H., Miyano S., Kunitake H., Mii M., (1995), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 34, *Plant protoplasts and Genetic Engineering VI*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 55-62.
58. Nakano M., Hosokawa K., Oomiya T., Yamamura S., (1995), Plant Cell, Tiss. and Org. Cult., 41, 221-227.
59. Mugnier J., (1988), Plant Cell Reports, 7, 9-12.
60. Tepfer D., (1990), Physiol. Plantarum, 79, 140-146.
61. Skrzypczak-Pietraszek E., Skrzypczak L., Wesolowska M., (1993), Scientia Pharmaceutica, 61, 287-296.
62. Xu J. F., Liu C. B., Han A. M., Feng P. S., Su Z. G., (1998), Plant Cell Rep., 17, 288-293.
63. Yoshida K., Kondo T., Goto T., (1992), Tetrahedron, 48, 4313-4326.
64. Franz Ch., Bezzi A., Belliardo F., (1996), *Atti del Convegno Genziana e specie amaro-aromatiche. Ricerche ed Applicazioni*, University of Camarino Publications, 29-34.
65. Keller F., (1986), J. Plant Physiol., vol.122, 473-476.
66. Hosokawa K., Fukushi E., Kawabata J., Fujii C., Ito T., Yamamura S., (1995), Phytochemistry, 40, 941-944.
67. Morgan E.R., Butler R.M., Bicknell R.A., (1997), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 25, 1-8.

Present status of *Gentiana* taxa biotechnology

Summary

Data on the tissue culture and genetic manipulation of several species of the genus *Gentiana* in support on the review of literature are presented.

Key words:

Gentiana, organogenesis, somatic embriogenesis, genetic transformation, botanical description.

Adres do korespondencji:

Anna Mikuła, Ogród Botaniczny CZRB PAN, ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa, e-mail: obpan@ikp.atm.com.pl