

Metabolity wtórne kultur tkankowych gatunków roślin z rodziny *Lamiaceae*

Ewa Skrzypczak-Pietraszek

Jan Grzybek

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej

Collegium Medicum

Uniwersytet Jagielloński

Kraków

1. Wstęp

Od wielu lat w światowych i krajowych laboratoriach prowadzone są badania nad możliwością wykorzystania kultur roślin naczyniowych jako alternatywnego źródła substancji leczniczych, niezależniającego przemysł farmaceutyczny od surowców pozyskiwanych z uprawy lub stanu naturalnego. Celem tej pracy było zebranie dotychczasowych wyników badań nad wtórnymi metabolitami o właściwościach leczniczych, biosyntezyowanych w kulturach tkankowych gatunków roślin z rodziny *Lamiaceae*.

Ponadto, omówiono występowanie metabolitów wtórnych w gatunkach roślin gruntowych należących do wymienionej rodziny.

2. Metabolity wtórne roślin gruntowych

Rodzina *Lamiaceae* (*Labiatae*) jest bardzo liczna. We florze światowej reprezentowana jest przez 200-220 rodzajów i 3200-4000 gatunków (1).

Rośliny gruntowe omawianej rodziny posiadają zróżnicowany skład metabolitów wtórnych (2). Obszerny przegląd prac eksperymentalnych opublikowanych do 1987 r. oraz ich omówienie można znaleźć u Hegnauera (3). Najbardziej charakterystyczne dla gatunków rodziny *Lamiaceae* są olejki eteryczne wydzielane i gromadzone we włoskach gruczołowych tzw. różyczkowatych typu *Lamiaceae* (*Labiatae*), znajdujących się przeważnie na liściach oraz działkach kielicha.

Biorąc pod uwagę występowanie olejków eterycznych, gatunki rodziny *Lamiaceae*, można podzielić na bogatoolejkowe, np. *Mentha piperita* L., *Salvia*

officinalis L., *Thymus vulgaris* L., *Lavandula angustifolia* Mill. oraz skapoolejkowe, np. *Marrubium vulgare* L., *Ballota nigra* L., i *Prunella vulgaris* L.

W skład olejków eterycznych w rodzinie *Lamiaceae* wchodzi zasadniczo glikozydy monoterpene i fenylopropanowe.

Do metabolitów wtórnych występujących w gatunkach roślin gruntowych omawianej rodziny należą również:

— diterpeny typu labdanu, klerodanu (kauranu), pimaranu i abietanu, np. sklareol, marrubina, pikrosalwina, ferruginol. Omawiane związki w swej strukturze posiadają często pierścień furanowy, dihydrofuranowy, laktonowy lub epoksydowy. Są też diterpeny z grupami metylowymi,

— triterpeny i saponiny triterpenowe. Najczęstszymi z tej grupy są pentacykliczne kwasy triterpenowe, np. ursolowy, oleanolowy i betulinowy oraz ich hydroksypochodne. Do częstych należą również alkohole triterpenowe: lupeol, germanikol, uwaol, ortosifonol. Występują także α - i β -amyryna. Rzadziej spotykane są tetracykliczne triterpeny oraz saponiny;

— ekdysteroidy, z których najczęstszymi są cyjasteron i ekdysteron,

— irydoidy w postaci wolnej (nepetalakton i dihydronepetalakton) oraz glikozydowej (kwas epideoksyloganinowy, nepetariazyd, lamiol). Nie stwierdzono w rodzinie *Lamiaceae* obecności sekoirydoidów oraz alkaloidów irydoidowych,

— polifenole, do których należą pochodne estrowe kwasu kawowego tzw. garbniki *Lamiaceae*, kwasy chlorogenowe, kwas rozmarynowy i litospermowy oraz flawonoidy. Spośród wolnych połączeń flawonoidowych najczęściej występują: luteolina, apigenina, diosmetyna, skutelareina, a z glikozydowych – diosmina. Rzadziej spotyka się wolne flawonole i flawanony, oraz ich glikozydy. Występują także C-glikozydy flawonowe;

— związki fenolowe, np. hydrochinon i arbutyna;

— chromony;

— kumaryny, np. herniaryna, kumaryna i umbeliferon;

— lignany, np. deoksypodofilotoksyna, β -peltatyna, pochodne α -pironu;

— alkaloidopodobne połączenia, np. alkaloid seskwiterpenowy — paczulipirydyna oraz stachydryna, trygonelina, turycyna, cholina;

— glikozydy cyjanogenne, np. prunazylna oraz jej glikozyd;

— fitosterole: α -, β - i γ -sitosterol;

— antocyjany: pelargonidyna, cyjanidyna, delfinidyna;

— glikozydy bufadienolidowe.

Metabolity wtórne powstają nie tylko w roślinach gruntowych, lecz również w ich kulturach tkankowych, w warunkach *in vitro*.

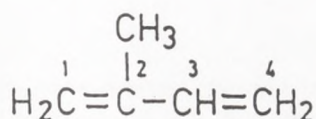
Niektóre związki chemiczne biosyntezywane *in vitro* są analogiczne do tych, które tworzą się w roślinach gruntowych. Kultury tkankowe mogą również wytwarzać metabolity wtórne, które nie występują w roślinach macierzystych.

Roślinne kultury tkankowe hodowane *in vitro*, są wykorzystywane również do biotransformacji substratów dodawanych do pożywki. Biotransformacja ma szczególne znaczenie w przemyśle farmaceutycznym i umożliwia przekształcenie związków biologicznie obojętnych lub toksycznych w substancje o właściwościach leczniczych.

3. Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach tkankowych

3.1. Monoterpeny

Są to lotne związki terpenoidowe, których podstawową jednostką strukturalną jest izopren (rys. 1). Występują przeważnie w olejkach eterycznych. Mają zasadniczy wzór sumaryczny $C_{10}H_{16}$. Mogą mieć charakter węglowodorów, ale też są znane liczne pochodne tlenowe jak: alkohole, aldehydy, ketony, tlenki terpenowe (2). Stanowią główny składnik olejków lotnych. Są poszukiwane i stosowane w przemyśle perfumeryjnym oraz farmaceutycznym.



Rys. 1. Izopren.

Dotychczasowe próby uzyskania monoterpenów z kultur kalusowych, jako ich alternatywnego źródła kończyły się najczęściej niepowodzeniem. Zwykle kultury kalusowe nie biosyntezywały omawianych związków w ogóle (4) lub tylko w ilościach śladowych (5). Badania na ten temat dotyczyły m. in. gatunków: *Lavandula* sp. (4,6); *Melissa officinalis* L. (5,7,8); *Mentha* sp. (9); *Ocimum basilicum* L. (4); *Rosmarinus officinalis* L. (4). W piśmiennictwie znaleziono jedynie dwie prace informujące o pozytywnym rezultacie badań w tym zakresie (10,11). Dotyczyły one kultur kalusowych i zawiesinowych *Ocimum basilicum* L. (10) oraz kultur zawiesinowych *Mentha piperita* L. (11). Kultury mięty pieprzowej prowadzone na pożywce Lina-Staby biosyntezywały 390 mg olejku lotnego/litr pożywki, w tym 19,6% mentolu. Obniżając temperaturę z 27 do 10°C i utrzymując kulturę w tej temperaturze przez 6 godzin w całkowitej ciemności, uzyskano zwiększenie produkcji olejku eterycznego do 528 mg/l pożywki przy zawartości 21% mentolu. Brown i wsp. (12) oraz Charlwood i wsp. (13) utrzymują, że w roślinach monoterpeny wytwarzane są przez wyspecjalizowane komórki. Brak odpowiednich struktur tkanki wydzielniczej w postaci komórek lub zbiorników olejkowych może być przyczyną nieobecności olejków w niezróżnicowanej tkance kalusowej. Innym wytłumaczeniem omawianego zjawiska może być szybkie metabolizowanie monoterpenów w kulturach *in vitro* przez enzymy, które w normalnych warunkach w tkankach roślin gruntowych nie mają kontaktu z olejkiem. Mimo braku obecności tych związków w tkance, czy w pożywce, w komórkach kultur kalusowych stwierdzono występowanie enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę monoterpenów (4,13,14). Dzięki temu kultury *in vitro* wykorzystano do biotransformowania odpowiednich substratów dodawanych do pożywki.

Kultury pędowe gatunków *Lavandula angustifolia* Mill. (6), *Mentha canadensis* L. (15), *Mentha spicata* L. (9), *Rosmarinus officinalis* L. (16) biosyn-

tezowały monotereny w ilościach niższych (6), podobnych (16), a czasem wyższych (9) niż roślina macierzysta.

Graef i wsp. (15) stwierdzili, że dodanie do pożywki adsorbentów takich jak cyklodekstryny czy triglicerydu Moglyol^(R), zwiększa produkcję omawianych metabolitów wtórnych.

Transgeniczne kultury pędowe *Mentha piperita* L. var. *citrata* (Ehrh.) Briq. i *Mentha piperita* L. var. *vulgaris* (17), uzyskane dzięki transformacji za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*, biosyntezywały związki monoterenowe, których skład jakościowy był zbliżony do składu rośliny macierzystej.

Kultury te prowadzono ponad dwa lata i produkcja metabolitów wtórnych była na stałym poziomie.

3.2. Pochodne fenylopropanu

Są to lotne związki nieterenowe, często występujące w olejkach eterycznych (2). Nie stanowią jednak ich głównych składników i zwykle nie mają decydującego wpływu na działanie farmakologiczne. Są biosyntezywane w kulturach *in vitro* (7,8,10,16,18). Przykładami takich związków występujących w omawianej rodzinie są estragol (= metylochawikol) i eugenol.

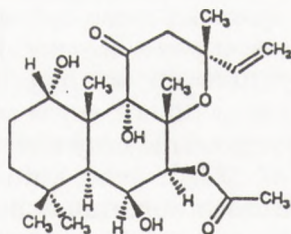
3.3. Diterpeny

Są połączeniami o wzorze sumarycznym $C_{20}H_{32}$, złożonymi z czterech reszt izoprenowych. Do diterpenów należą m.in. niektóre alkaloidy, gibereliny, witaminy. Mają budowę linearną lub cykliczną. Przykładem związków diterpenowych stosowanych w lecznictwie są witamina A, delfinina, akonityna, fitol i forskolina.

3.3.1. Forskolina

Forskolina (rys. 2) jest diterpenem, pochodną labdanu. Występuje w kzeniach gatunku *Coleus forskohlii* Briq. Jest związkiem o działaniu nasercowym, inotropowo dodatnim, rozszerzającym naczynia, hipotensyjnym (2). Przeciwdziała agregacji trombocytów, obniża ciśnienie śródgałkowe (19).

Badania nad biosyntezą forskolininy w kulturach *in vitro* prowadzili na większą skalę Meringer i wsp. (19), Krombholz i wsp. (20), Sen i wsp. (21-23)



Rys. 2. Forskolina.

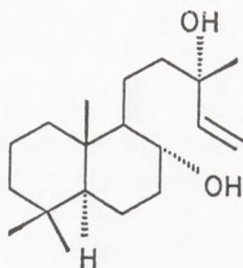
oraz Gan i wsp. (24). Kultury kalusowe *Coleus forskohlii* Briq. wyprowadzili z roślin gruntowych o wysokiej zawartości forskoliny. Prowadzono je początkowo na pożywce B₅ z dodatkiem 2,4-D i kinetyny. Uzyskane kultury zawieszinowe zawierające w pożywce 2,4-D, nie syntezowały forskoliny. Zamiana auktyny 2,4-D na IBA spowodowała tworzenie się omawianego związku w kulturach *in vitro*. Zauważono również niewielkie zróżnicowanie komórek w zawieszynie. Po dwóch pasażach zawartość forskoliny wzrosła od 0,2 do 1 g/kg suchej masy. Oprócz forskoliny występowała również 1,9-dideoksyforskolina. Zawartość tych związków w kulturach *in vitro* i w korzeniach roślin gruntowych jest podobna. Przeprowadzono również doświadczenia nad biosyntezą forskoliny na skalę półprzemysłową w 20-litrowym (A) oraz 200-litrowym (B) bioreaktorze. Uzyskano odpowiednio maksymalne zawartości forskoliny: dla A — 730 mg/kg suchej masy, po 19 dniach; dla B — 298 mg/kg suchej masy, po 26 dniach. W 200-litrowym bioreaktorze, kultury zawieszinowe nie wytwarzały oczekiwanych ilości metabolitów. Badania Krombholza i wsp. (20) miały na celu uzyskanie kultur korzeni nie zmienionych genetycznie i kultur korzeni transformowanych za pomocą *Agrobacterium rhizogenes*. Korzenie transformowane i nie-transformowane biosyntezywały podobne ilości forskoliny w przeliczeniu na suchą masę tkanki, ale korzenie włóśnikowate wykazywały większą wydajność — około 0,3 mg związku/l/dobę, w porównaniu z korzeniami nietransformowanymi — ok. 0,15 mg/l/dobę. Kultury wykazywały dużą tolerancję na uszkodzenia mechaniczne. Pocięcie tkanki na kawałki nie hamowało jej wzrostu ani biosyntezy forskoliny. Przeniesienie kultur korzeni z litrowych kolbek do 20 l bioreaktora, przyniosło pozytywne efekty. Po 21 dniach hodowli biomasa zwiększyła się 4-6-krotnie, a zawartość forskoliny wyniosła 14 mg/l pożywki.

Sen i wsp. (21) badali zawartość forskoliny w roślinach uzyskanych w wyniku mikrorozmnażania. Badano również zawartość omawianego metabolitu w kulturach korzeni, w kalsie z różnicującymi się korzeniami, w niezorganizowanej tkance z różnicującymi się pędami (22). Stwierdzono obecność forskoliny we wszystkich kulturach, oprócz kalusa z tendencją do ryzogenezy. W kulturach korzeni oznaczono jedynie śladowe ilości tego związku. Prowadzono także badania nad kulturami nietransformowanych korzeni (23). Zastosowano modyfikacje pożywek podstawowych MS oraz White'a, uzupełnionych regulatorami wzrostu: IBA, IAA, 4-Cl-IAA lub 5,6-Cl₂-IAA. Stwierdzono, że dla zwiększenia biosyntezy forskoliny korzystne jest dodanie do pożywki obu pochodnych IAA. Prowadzono również badania nad biosyntezą forskoliny w kulturach transformowanych za pomocą *Agrobacterium rhizogenes* i *Agrobacterium tumefaciens*.

Gan i wsp. (24) uzyskali kultury kalusowe *Coleus forskohlii* Briq. na pożywce uzupełnionej dodatkiem IBA.

Zamiana IBA na 2,4-D, NAA lub IAA była niekorzystna dla wzrostu kultur. W kulturze kalusowej stwierdzono obecność acetyloforskoliny, koleonolu B i triacetylocoleonolu B.

Petersen (25) opublikowała pracę przeglądową dotyczącą kultur *in vitro* i metabolitów wtórnych biosyntezyowanych przez rodzaj *Coleus*, m.in. forskoliny tworzącej się w kulturach komórkowych *Coleus forskohlii* Briq.



Rys. 3. Sklareol.

3.3.2. Sklareol

Sklareol (rys. 3) jest dicyklicznym alkoholem diterpenowym typu labdanu. Występuje m. in. w *Salvia sclarea* L. Jest stosowany w przemyśle perfumeryjnym. Stwierdzono też jego działanie przeciwgrzybicze (27).

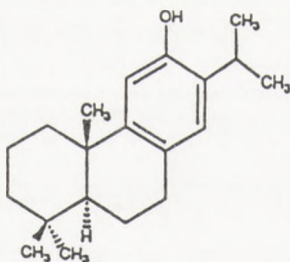
Kultury kalusowe i zawiesinowe *Salvia sclarea* L. zawierające niezróżnicowane komórki, biosyntezują sklaerol (26). Najbardziej intensywna jego biosynteza przypada na początek wykładniczej fazy wzrostu tkanki kalusowej. Nie jest to typowe zjawisko. W przypadku biosyntezy innych metabolitów wtórnych w kulturach kalusowych *in vitro*, u wielu gatunków roślin maksimum ich produkcji najczęściej występuje w fazie stacjonarnej. Stwierdzono, że dodatek kwasu 2,4-D do pożywki sprzyja biosyntezie sklareolu (26).

3.3.3. Tanszinony i ferruginol

Korzenie *Salvia miltiorrhiza* Bunge stosowano w chińskiej medycynie w leczeniu schorzeń hematologicznych i naczyń wieńcowych. Uważa się, że za omawiane działanie odpowiedzialne są tanszinony, pomarańczowo-czerwone pigmenty diterpenowe. W surowcu występuje również inny diterpen, bezbarwny ferruginol, któremu przypisuje się działanie przeciwbakteryjne (27).

W kulturach zawiesinowych *Salvia miltiorrhiza* Bunge (28) biosyntezowany jest ferruginol (rys. 4) i kryptotanszinon (rys. 5d).

Stwierdzono, że dwustopniowa metoda hodowli zawiesinowej na standardowej pożywce MS, a następnie pożywce bez Fe-EDTA, sprzyja znacznie



Rys. 4. Ferruginol.

zwiększeniu wytwarzania diterpenów (tab. 1). Omawiane związki znajdowały się zarówno w komórkach, jak i pożywce. Taką samą dwustopniową metodę zastosowano przy otrzymywaniu kultury komórek immobilizowanych (29). Większość biosyntezy kryptotansziny była uwalniana do pożywki, podczas gdy większość ferruginolu pozostawała w komórkach. Produkcja kryptotansziny i ferruginolu przez immobilizowane komórki była odpowiednio o 61 i 39% niższa niż w kulturze zawieszinowej.

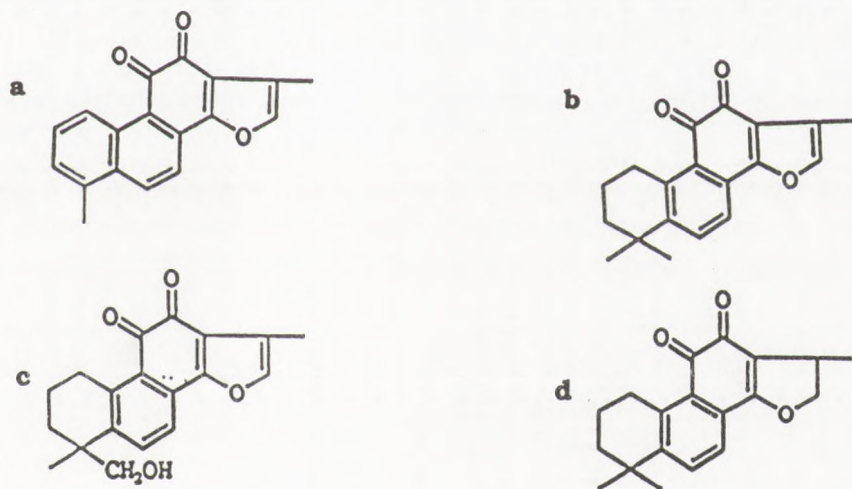
TABELA 1

ZAWARTOŚĆ PROCENTOWA DITERPENÓW W KULTURZE ZAWIESINOWEJ I W KORZENIACH *Salvia miltiorrhiza* BUNGE, W PRZELICZENIU NA SUCHĄ MASĘ (WG 28)

Surowce	Zawartość (%)	
	ferruginol	kryptotanszynon
kultury zawieszinowe 2-stopniowe	13,7	3,6
korzenie rośliny gruntowej	1,1	0,7

Hu i wsp. (30) wykazali, że w celu otrzymania diterpenów z kultur *in vitro*, gatunku *Salvia miltiorrhiza* Bunge można też zastosować kultury korzeni włośnikowatych. Kultury transformowanych korzeni uzyskano w wyniku zakażenia sterylnych fragmentów roślin określonymi szczepami *Agrobacterium rhizogenes*. W kulturach tych stwierdzono obecność i oznaczono zawartość siedmiu związków: tansziny I, II_A, II_B, V, VI, dihydrotansziny I i kryptotansziny (rys. 5a-d).

Wykryto także obecność ferruginolu. Ponadto metodą chromatografii cienkowsarstwowej stwierdzono obecność opin: agropiny i mannopiny. Diterpeny



Rys. 5. Tansziny: I (a), II_A (b), II_B (c), kryptotanszynon (d).

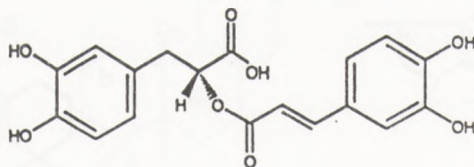
znajdowały się zarówno w transformowanych korzeniach, jak i w płynnej pożywce. Badano wpływ źródła azotu i źródła węgla w pożywce na wzrost kultur korzeni włośnikowatych i biosyntezę diterpenów. Stosowano pożywkę MS z azotanem amonowym i bez azotanu. Stwierdzono większy przyrost masy i wyższą zawartość diterpenów w kulturach nie zawierających tego związku. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że sacharoza zawarta w pożywce jest zużywana przez kultury w ciągu szesnastu dni. Zwiększenie w pożywce jej stężenia do 3%, w dwunastym dniu hodowli, korzystnie wpływa na przyrost biomasy i biosyntezę diterpenów.

3.4. Depsydy

Są połączeniami estrowymi dwóch lub więcej fenolokwasów. Są rozpowszechnione w świecie roślin, zwłaszcza kwiatowych. Występują także często w plechach porostów.

3.4.1. Kwas rozmarynowy

Do omawianej grupy związków należy kwas rozmarynowy (rys. 6) czyli depsydy kwasu kawowego i kwasu α -hydroksydihydrokawowego. Jest naturalnym przeciwutleniaczem. Wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i z tego względu jest cennym związkiem z punktu widzenia leczniczego. Występuje w wielu gatunkach roślin z rodziny *Lamiaceae*. Stwierdzono jego obecność w kulturach tkankowych *Coleus blumei* Benth. (31), *Perilla frutescens* L. (32), *Orthosiphon aristatus* (Bl.) Miq. (33,34), *Salvia officinalis* L. (35–37), *Salvia triloba* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L. (31). Badania nad biosyntezą kwasu rozmarynowego w kulturach *in vitro* *Coleus blumei* Benth. prowadzone były na większą skalę przez Häuslera i wsp. (38), Gertlowskiego i wsp. (39), Zenka i wsp. (40), Ulbricha i wsp. (41), Parka i wsp. (42) oraz Martineza i wsp. (43). Stwierdzono, że na wydajność tworzenia się kwasu rozmarynowego w kulturach zawiesinowych gatunku *Coleus blumei* Benth. może wpływać wiele czynników (40). Najwięcej omawianego związku powstaje w kulturach z pożywką B₅, po dodaniu kwasu 2,4-dimetylofenoksyoctowego, jako prekursora. Obserwuje się wtedy 40% wzrost biosyntezy w porównaniu z kontrolną kulturą, nie zawierającą regulatorów wzrostu. Stężenie sacharozy ma również duży wpływ



Rys. 6. Kwas rozmarynowy.

na tworzenie się kwasu rozmarynowego. Stwierdzono, że jej 7% zawartość w pożywce jest optymalna. Przy 2% zawartości sacharozy (to stężenie występuje w większości rutynowo stosowanych pożywek), powstaje zaledwie ok. 13% kwasu rozmarynowego, w porównaniu z maksymalną wydajnością. W optymalnych warunkach, kultury zawiesinowe mogą biosyntezować 5 razy więcej omawianego metabolitu niż rośliny macierzyste (tab. 2). Warto również zaznaczyć, że maksymalna ilość tego związku tworzy się w ciągu stosunkowo krótkiego czasu, mianowicie trzynastu dni. Stwierdzono, że dodatek DMSO do pożywki może zwiększyć uwalnianie omawianego metabolitu z komórek (42). W przypadku kultur zawiesinowych *Salvia officinalis* L. stwierdzono, podobnie jak w doświadczeniach z *Coleus blumei* Benth. (35), dodatni wpływ zwiększenia stężenia sacharozy w pożywce, na biosyntezę kwasu rozmarynowego. Zaobserwowano, że optymalny skład pożywki dla zwiększenia masy komórek nie jest jednocześnie najlepszy dla biosyntezy omawianego metabolitu wtórnego.

TABELA 2

ZAWARTOŚĆ KWASU ROZMARYNOWEGO W KULTURACH *IN VITRO* I ROŚLINACH GRUNTOWYCH *Coleus blumei* BENTH. W PRZELICZENIU NA SUCHĄ MASĘ (WG 40)

Surowce	Zawartość (%)
kultury zawiesinowe	13 - 15
rośliny gruntowe:	
pędy	2,8
liście	2,5
korzenie	2,1

Kultury zawiesinowe *Orthosiphon aristatus* (Bl.) Miq. gromadzą kwas rozmarynowy w ilości 1,0 - 2,0 $\mu\text{mol/g}$ świeżej masy (33). Dodatek ekstraktu drożdżowego w ilości 4-6 g/l pożywki powoduje wyraźne zwiększenie jego biosyntezy. Po 72-98 godz. uzyskuje się do 10 μmoli związku/g świeżej masy. Z ekstraktu drożdżowego wydzielono 2 aktywne frakcje, które mają właściwości elicytujące w odniesieniu do omawianego kwasu.

Otrzymywanie kwasu rozmarynowego z kultur zawiesinowych *Coleus blumei* Benth. prowadzone jest obecnie na skalę przemysłową (41). Dotychczasowe wyniki badań nad biologiczną aktywnością kwasu rozmarynowego wykazały jego właściwości przeciwwirusowe, przeciwzapalne i hamujące uwalnianie gonadotropiny oraz cyklazy adenylowej u szczurów (44).

De-Eknamkul i wsp. (31) opublikowali pracę przeglądową dotyczącą wytwarzania kwasu rozmarynowego przez kultury tkankowe roślin należących nie tylko do rodziny *Lamiaceae*, a Petersen (25) omówiła biosyntezę tego związku przez kultury *Coleus* sp.

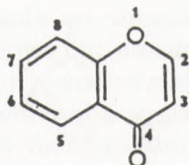
3.5. Estrы enolowe kwasu kawowego

Banthorpe i wsp. (45) zaobserwowali, że kultury kalusowe *Lavandula angustifolia* Mill. (= *L. officinalis* Chaix = *L. vera* DC.) wydzielają do pożywki intensywnie niebieski barwnik. Tkanki były wielokrotnie pasażowane (120 razy w ciągu pięciu lat) i synteza barwnika utrzymywała się. Oznaczono jego ilość kolorymetrycznie. Stwierdzono, że jego zawartość wzrasta wraz ze zwiększeniem stężenia sacharozy w pożywce, oraz po dodaniu asparaginy. Przypadkowe, bakteryjne lub grzybowe zakażenie kultury powodowało również nasilenie zabarwienia. Dodatek mleczka kokosowego, czy zwiększenie stężenia chlorowodoru pirydoksyny (wit. B₆) wyraźnie hamowało syntezę barwnika. Po usunięciu jonów Fe²⁺ z pożywki lub po dodaniu hydrolizatu kazeiny, zabarwienie nie pojawiło się. Stwierdzono, że kultury kalusowe wytwarzają pierwotnie żółte barwniki, które dopiero w reakcji kompleksowania z jonami Fe²⁺ w pożywce, zmieniają swój kolor na niebieski. Związki te wyizolowano i oznaczono ich struktury za pomocą ¹H NMR i MS. Są to: ester (Z,E)-2-(3,4)-dihydroksyfenyloetylenowy kwasu kawowego i jego (E,E) izomer. Omawiane substancje nie występują w roślinie macierzystej. Obecność żółtych barwników stwierdzono jeszcze w tkankach kalusowych następujących gatunków: *Plectranthus caninus* Roth., *Mentha spicata* L., *Mentha longifolia* (L.) Huds., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., a także w liściach roślin gruntowych *Plectranthus caninus* Roth., *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha spicata* L., *Salvia officinalis* L., *Mentha longifolia* (L.) Huds., *Hyssopus officinalis* L. (46). Stwierdzono, że omawiane barwniki wykazują działanie fungistatyczne (46). Hamują wzrost grzyba *Cladosporium herbarium*, bardzo rozpowszechnionego pasożyta roślin.

W celu uzyskania omawianych barwników, prowadzono również kultury immobilizowanych komórek gatunku *Lavandula vera* DC (47–49). Stwierdzono, że do ich biosyntezy niezbędne jest też światło (47).

Kultury prowadzone w ciemności gromadziły brązowe barwniki, będące prekursorami niebieskich pigmentów. Zauważono, że korzystne jest prowadzenie hodowli ciągłej w bioreaktorze, z możliwością stałej wymiany pożywki (48). Biosynteza barwnika utrzymywała się na prawie maksymalnym poziomie przez ponad 10 dni.

Dodatek glukozy jako źródła węgla zwiększał ilość wytwarzanego pigmentu (49).



Rys. 7. Benzo- γ -piron (chromon).

3.6. Flawonoidy

Są barwnikami roślinnymi, pochodnymi benzo- γ -pironu (chromonu) (rys. 7). Ich podstawowa struktura ma szkielet węglowy $C_6-C_3-C_6$ zbudowany z 2 pierścieni benzenowych połączonych mostkiem propanowym. Występują w formie glikozydowej lub wolnej. Są najbardziej rozpowszechnionymi metabolitami wtórnymi w świecie roślin. Wiele z nich posiada wielorakie właściwości lecznicze, m.in. uszczelniają i wzmacniają ściany naczyń kapilarnych, działają moczopędnie, hipotensyjnie, spazmolitycznie, antyagregacyjnie, ułatwiają przepływ wieńcowy.

Korzenie *Scutellaria baicalensis* Georgi są stosowane w chińskiej medycynie, w postaci surowca leczniczego o nazwie wogon (50). Jest on używany jako składnik leków m.in. o działaniu przeciwbiegunkowym, przeciwzapalnym, przeciwgorączkowym. Uważa się, że jego właściwości lecznicze warunkowane są występowaniem w surowcu licznych flawonoidów (50,51). Kultury zawieszinowe *Scutellaria baicalensis* Georgi również biosyntezują flawonoidy (52). Podobnie jak w korzeniach rośliny macierzystej, głównymi składnikami są: bajkalina i 7-O-glukuronid wogoniny. Stwierdzono doświadczalnie, że najlepszy wzrost kultury zawieszinowej uzyskuje się na pożywce LS zawierającej IAA, podczas gdy najwyższą zawartość flawonoidów warunkuje pożywka White'a z dodatkiem IAA i kinetyny. Dobór cukru, stanowiącego źródło węgla w pożywce, ma również wpływ na kultury zawieszinowe. Uzupełnienie pożywki maltozą (5%) stymuluje wzrost komórek i zwiększa biosyntezę niektórych metabolitów wtórnych. Stwierdzono jednak, że intensywnie rosnące kultury wytwarzają mało flawonoidów. W związku z tym zauważono, że celowe jest stosowanie dwustopniowej kultury, najpierw na pożywce LS, a potem na pożywce White'a (53). Uzyskano następujące ilości metabolitów wtórnych: 1,17 g bajkaliny na litr pożywki; 0,82 g wogoniny na litr pożywki. Dalsza modyfikacja i optymalizacja składu pożywki doprowadziła do zwiększenia biosyntezy flawonoidów (51,54). Stosując zmodyfikowaną pożywkę Schenka i Hildebrandta, zawierającą NAA — 5 mg/l i kinetynę — 0,1 mg/l, uzyskano: bajkaliny 2,9 g/l pożywki i wogoniny 1,07 g/l pożywki (51). Stwierdzono też istotny wpływ temperatury na produkcję metabolitów wtórnych. Najszybszy wzrost kultury zawieszinowej występował w temp. 30°C, podczas gdy synteza flawonoidów była najwyższa w temp. 25°C. Obniżenie temperatury z 30 na 25°C po 72 godz. prowadzenia kultury zawieszinowej spowodowało zwiększenie biosyntezy bajkaliny do 4,2 g/l pożywki (51).

3.7. Antocyjany

Są pigmentami flawonoidowymi występującymi w soku komórkowym licznych gatunków roślin. Ich barwa zmienia się w zależności od pH środowiska, podobnie jak barwa lakmusu. Występują w formie glikozydowej (cyjaniny) lub wolnej (cyjanidyny).

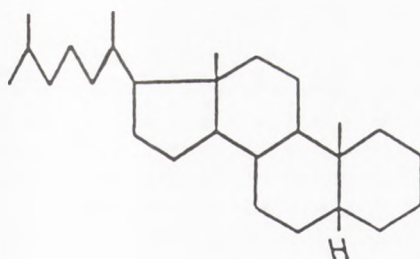
Antocyjany uszczelniają ściany naczyń włosowatych. Mają także właściwości przeciwzapalne, w związku z czym są stosowane w krwawieniach i zaburzeniach mikrokrążenia, szczególnie w oftalmologii.

Występowanie barwników antocyjanowych stwierdzono w kulturach *in vitro* następujących gatunków: *Ajuga reptans* Bugle (55–57), *Perilla frutescens* L. (58–61).

Kultury kalusowe *Ajuga reptans* Bugle (55) wytwarzają antocyjany, pochodne cyjanidyny. Biosynteza zachodzi w ciemności z wydajnością 1% w przeliczeniu na suchą masę tkanki kalusowej, a przy zmiennym oświetleniu wydajność wynosi 2,5%. W przypadku kultur zawieszinowych, biosynteza odbywa się tylko przy stosowaniu zmiennego oświetlenia. Nie była ona stabilna i po 8–12 pasażach wyraźnie malała. W wyniku dalszych doświadczeń (57) uzyskano kulturę zawieszinową, w której biosynteza antocyjanów utrzymywała się na stałym poziomie przez ponad dwa lata. Zawiesina była mieszaniną bezbarwnych i zabarwionych w różnym stopniu komórek. Kultura była prowadzona w kolbkach na wstrząsarce, a także w bioreaktorze o pojemności 2 l. Stwierdzono, że dla zwiększenia biosyntezy omawianych metabolitów wtórnych, celowe jest zastosowanie zmodyfikowanej pożywki B₅ zamiast pożywki MS. Zastąpienie 2,4-D przez NAA lub dodanie GA₃ do pożywki powoduje zmniejszenie wzrostu kultur kalusowych oraz obniżenie biosyntezy antocyjanów. Zauważono, że dodatek NAA do pożywki nie wpływa negatywnie na kultury zawieszinowe prowadzone w bioreaktorze. Przeprowadzono również próby hodowli kultur kalusowych na pożywce zawierającej serwatkę z laktozą jako źródłem węgla (56).

Stwierdzono, że biosynteza antocyjanów jest podobna, jak przy stosowaniu pożywki MS. Jest to przykład użycia tańszej pożywki, umożliwiającej obniżenie kosztów hodowli w kulturach *in vitro*. Stwierdzono również, że dla zwiększenia biosyntezy antocyjanów korzystne jest zastąpienie sacharozy galaktozą, glukozą lub fruktozą, a także dodanie zeatyny i BAP. Alkaliczacja pożywki powoduje zmniejszenie zawartości omawianych metabolitów w tkance kalusowej.

Kultury kalusowe *in vitro* *Perilla frutescens* L. prowadzone były w 100 l bioreaktorze, w pożywce LS uzupełnionej NAA i BAP (58). W ciągu 14 dni początkowa zawartość barwników zwiększyła się siedmiokrotnie. Inni autorzy (59,60) badali wpływ, wewnętrznego oświetlenia oraz napowietrzania i dostarczania tlenu do hodowli *P. frutescens* L., prowadzonej w 2,6 l bioreaktorze, na biosyntezę antocyjanów. Początkowa produkcja barwnika wynosiła nie więcej niż 0,6 g/l pożywki. Modyfikując napowietrzanie bioreaktora i zwiększając dostarczanie tlenu do pożywki, uzyskano 1,65 g antocyjanów z 1 l pożywki. Stosując wewnętrzne oświetlenie hodowli, przy pozostawieniu bez zmian pierwotnych warunków kultury, uzyskano również znaczące zwiększenie akumulacji antocyjanów. Połączenie obu czynników: wewnętrznego oświetlenia i zwiększonego dostarczania tlenu do kultury, spowodowało jednak spadek produkcji barwników. Kontynuowano te badania prowadząc kultury w kolbkach i różnego typu bioreaktorach. Dzięki optymalizacji warunków hodowli, uzyskano ok. 3 g antocyjanów/l pożywki. Badano również wpływ temperatury na biosyntezę omawianych metabolitów wtórnych (61). Temperatura w zakresie 22 – 28°C warunkowała intensywny wzrost kultury zawieszinowej. W temperaturze 28°C następowało jednak obniżenie biosyntezy antocyjanów. Największe wytwarzanie omawianych metabolitów wtórnych zachodziło w tem-



Rys. 8. Koprostan.

peraturze 25°C. W innej pracy (65) stwierdzono, że podwyższenie zawartości sacharozy w pożywce z 30 g do 40–50 g/l powoduje zwiększone uwalnianie antocyjanów z komórek. Sugeruje się, że obserwowane zjawisko może być związane z większym ciśnieniem osmotycznym roztworu pozakomórkowego.

Zhong i wsp. prowadzili badania nad kulturami zawiesinowymi hodowanymi w biofermentorach (62–64). Stwierdzili, że komputerowe monitorowanie niektórych parametrów prowadzenia tych kultur może być użyteczne przy określaniu optymalnych warunków dla biosyntezy antocyjanów (62). Lepkość kultur zawiesinowych znacząco wzrasta, gdy zawartość komórek wynosi ponad 12,8 g suchej masy na 1 litr pożywki. Prowadząc kultury w biofermentorach trzeba brać pod uwagę właściwości reologiczne zawiesiny (63,64).

3.8. Fitoekdysteroidy

Jest to grupa steroidowych substancji naturalnych, pochodnych koprostanu (rys. 8). Ekdysteroidy zostały wyizolowane po raz pierwszy z kokonów jedwabnika jako juwenilne hormony owadów, a następnie znaleziono je w świecie roślinnym. W związku z tym, wyróżniane są zoekdysteroidy i fitoekdysteroidy (66). Substancje te mają właściwość indukowania przepoczwarczenia się owadów. Wykazują również wpływ na organizm ludzki, m.in. zmniejszając stężenie cholesterolu i lipidów w surowicy krwi. Właściwość taką wykazuje np. β -ekdyson, czyli 20-hydroksyekdyson (66,67). Grzybek (67) stwierdził stymulujący wpływ fitoekdysteroidów na mitozę w merystematycznych komórkach roślinnych. Fitoekdysteroidy są wytwarzane m.in. przez korzenie roślin rodzaju *Ajuga* sp. Badania nad biosyntezą omawianych metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* gatunku *Ajuga reptans* Bugle prowadzili Matsumoto i wsp. (68), Tanaka i wsp. (69), Nagakari i wsp. (70,71), Tomás i wsp. (72,73). Stwierdzono, że kultury kalusowe i kultury korzeni włósnikowatych *Ajuga reptans* L. var. *atropurpurea* mają zdolność do wytwarzania fitoekdysteroidów. W kulturach stwierdzono obecność 4 związków: 20-hydroksyekdysonu, norcyjasteronu B, cyjasteronu i izocyjasteronu (68). Jedną z szybko rosnących linii przeniesiono do napowietrzanego fermentora. Po 45 dniach masa kultury korzeniowej zwiększyła się 230 razy, a zawartość

20-hydroksyekdysonu wzrosła do 0,12% suchej masy i 4-krotnie przewyższyła zawartość w korzeniach rośliny gruntowej. W wyniku dalszych badań, z kultur korzeni włośnikowatych uzyskano zregenerowane, transformowane rośliny (69). Charakteryzowały się one zmniejszeniem rozmiarów liści, zwiększeniem ich ilości i masy korzeni. Transformowane rośliny cechowała też wysoka zawartość 20-hydroksyekdysonu (do 0,1% suchej masy), podobna do odpowiadającej im macierzystej linii korzeni włośnikowatych. Właściwość ta utrzymywała się we wszystkich zregenerowanych, transformowanych roślinach. Prowadzono również badania z zastosowaniem związków chemicznych znakowanych ^2H i ^{13}C , mające na celu ustalenie szlaku metabolicznego prowadzącego do biosyntezy ekdysteroidów (70,71).

Tomásowi i wsp. (72) nie udało się wyprowadzić kultury kalusowej biosyntezującej fitoekdysteroidy. Autorzy ci badali również zawartość omawianych metabolitów wtórnych w roślinach uzyskanych w wyniku mikrorozmnażania. Stwierdzono, że rośliny z kultur *in vitro* mają małą zawartość fitoekdysteroidów w liściach, podczas gdy w korzeniach zawartość tych związków była najwyższa w porównaniu z roślinami gruntowymi, pochodzącymi ze stanu naturalnego i ze szklarni. Stwierdzono, że głównymi składnikami były: 29-norsengosteron, 29-norcysteron, cyjasteron i ajugalakton. Prowadzono również kultury korzeni i pędów. W pędach nie pojawiały się fitoekdysteroidy, jeżeli rośliny nie były ukorzenione. Dowodzi to, że głównym miejscem biosyntezy tych związków są korzenie (73).

Fitoekdysteroidy kumulują się również w kulturach kalusowych i zawieszinowych gatunku *Ajuga turkestanica* L. (74). Ich zawartość wynosiła 0,1–0,12% suchej masy, w tym turkesteronu 0,032–0,036%, tj. więcej niż w roślinie gruntowej.

3.9. Polisacharydy

Występowanie polisacharydów w kulturach kalusowych przedstawicieli rodziny *Lamiaceae* było analizowane jedynie przez Uchiyamę i wsp. (75). Autorzy stwierdzili uwalnianie znacznych ilości pozakomórkowych polisacharydów (ECP) w kulturach zawieszinowych uzyskanych z mieszańca mięty (*Mentha arvensis* L. x *Mentha spicata* L.). Omawiane zjawisko zachodziło w logarytmicznej fazie wzrostu kultur. Na podstawie analizy składu chemicznego ECP wykazano, że ich głównym składnikiem jest kwas galakturonowy. W mniejszych ilościach występowały: arabinoza, galaktoza, glukoza, ksyloza, ramnoza i mannoza. Względna zawartość ksylozy i glukozy w ECP malała w miarę starzenia się kultury, natomiast zawartość arabinozy rosła, a ramnozy, mannozy i galaktozy utrzymywała się na stałym poziomie.

4. Wnioski

Z dokonanego przeglądu danych literaturowych wynika, że kultury tkankowe gatunków roślin z rodziny *Lamiaceae* biosyntezują wtórne metabolity

charakterystyczne dla gruntowych przedstawicieli tej rodziny, m.in. monoterpeny, pochodne fenylopropanu, diterpeny, depsydy, estry enolowe kwasu kawowego, flawonoidy, wśród nich antocyjany, fitoekdysteroidy i polisacharydy.

Zainteresowanie metabolitami wtórnymi wiąże się z ich biologiczną aktywnością. Zwłaszcza uwagę placówek naukowych budzą te substancje, które mogą znaleźć zastosowanie lecznicze. Przykładami takich związków są m.in. forskolina wykazująca działanie hipotensyjne, inotropowo dodatnie, antyagregacyjne; sklareol o działaniu przeciwgrzybiczym, użyteczny też w przemyśle perfumeryjnym; tanszynony mogące znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób naczyń krwionośnych, krwi; ferruginol o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym i przeciwwirusowym; flawonoidy, wśród nich także antocyjany o różnorodnych właściwościach leczniczych m.in. użyteczne w chorobach układu naczyniowego; fitoekdysteroidy obniżające poziom cholesterolu i lipidów we krwi; czy wreszcie polisacharydy o działaniu immunotropowym. Polisacharydy stosunkowo niedawno znalazły zastosowanie w lecznictwie, stąd też literatura na ich temat, zwłaszcza dotycząca tkanek kalusowych jako surowca do ich pozyskiwania, jest stosunkowo uboga.

W przytoczonych w tekście danych wykazujemy, że w warunkach kultur *in vitro* można optymalizować warunki biosyntezy metabolitów przez stosowanie odpowiedniego składu pożywek, uwzględniając m.in. substancje wzrostowe, źródła azotu i węgla, prekursorzy i elicitatory. Przykładem optymalizacji omawianego procesu są kultury kalusowe *Salvia miltiorrhiza* Bunge, które biosyntezują 13-krotnie więcej ferruginolu i 5-krotnie więcej kryptotanszironu niż rośliny gruntowe omawianego gatunku (30), kultury kalusowe *Coleus blumei* Benth. produkujące 6-krotnie więcej kwasu rozmarynowego (44), transformowane korzenie włośnikowe *Ajuga reptans* L. zawierające 4-krotnie więcej 20-hydroksyekdysteronu w porównaniu z jego zawartością w korzeniach roślin gruntowych. Omawiane przykłady dowodzą, że poznano wiele czynników wpływających na zwiększoną wydajność biosyntezy określonych związków chemicznych. Jedną z głównych przeszkód ograniczających wykorzystanie tych wyników w produkcji metabolitów wtórnych na skalę przemysłową w warunkach hodowli *in vitro*, jest problem ekonomiczny. Stosowanie tej metody jest często jeszcze nieopłacalne ze względu na wysokie koszty.

W przeglądzie piśmiennictwa wykazano również, że kultury kalusowe biosyntezują metabolity, które nie występują w roślinie macierzystej, np. wspomniany ester kwasu kawowego i jego izomer występujący jedynie w kulturze kalusowej *Lavandula angustifolia* Mill. (45).

W omówionych przykładach biosyntezy metabolitów wtórnych przebiegającej w warunkach hodowli *in vitro*, w kulturach kalusowych przedstawicieli rodziny *Lamiaceae* wykazano, że dotychczasowe wysiłki z tego zakresu zgromadziły już wiele interesujących wyników o charakterze poznawczym, które w przyszłości mogą być wykorzystane w praktyce m.in. w przemyśle farmaceutycznym.

Objaśnienia stosowanych skrótów:

- B₅ — pożywka podstawowa wg Gamborga
 BAP — 6-benzylaminopuryna
 4-Cl-IAA — kwas 4-chloroindolilo-3-octowy
 5,6-Cl₂-IAA — kwas 5,6-dichloroindolilo-3-octowy
 2,4-D — kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
 DMSO — dimetylosulfotlenek
 Fe-EDTA — żelazian (III) etylenodiaminotetraoctowy
 GA₃ — kwas giberelinowy
 IAA — kwas indolilo-3-octowy
 IBA — kwas indolilo-3-masłowy
 LS — pożywka podstawowa wg Linsmaiera i Skooga
 MS — pożywka podstawowa wg Murashige i Skooga
 NAA — kwas α-naftylooctowy

Praca była finansowana z funduszu grantu KBN nr 6P2060605. Autorzy serdecznie dziękują Władzom KBN za pozwolenie wykorzystania części grantu na niniejszą pracę.

Literatura

- Eds. Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A., (1972), *Flora Europaea*, vol. 3, University Press, Cambridge, 126.
- Kohlmünzer S., (1993), *Farmakognozja*, PZWL, Warszawa.
- Hegnauer R., (1966), *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 4, 289-346; (1989), Bd. 8, 579-631, Birkhäuser Verl., Basel, Stuttgart.
- Banthorpe D. V., Branch S. A., Njar V. C. O., Osborne M. G., Watson D. G., (1986), *Phytochemistry*, 25, 629-636.
- Schultze W., Koch I., Czygan F.C., (1983), *Deutsch. Apoth. Ztg.* 47, 2264-2269.
- Segura J., Calvo M. C., (1991), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 15, *Medicinal and Aromatic Plants III*, Springer-Verl., Berlin-Heidelberg, 283-310.
- Gbolade A. A., Lockwood G. B., (1991), *Fitoterapia*, 62, 237-242.
- Gbolade A. A., Lockwood G. B., (1992), *J. Plant Physiol.*, 140, 28-32.
- Hirata T., Murakami S., Ogihara K., Suga T., (1990), *Phytochemistry*, 29, 493-495.
- Lang E., Hörster H., (1977), *Planta Med.*, 31, 112-118.
- Kim J. H., Lee H. J., (1992), *Han'guk Nonghwa Hakhoechi*, 35, 443-448.
- Brown J. T., Charlwood B. V., (1986), in: Eds. Morris P., Scragg A. H., Stafford A., Fowler M. W., *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*, Cambridge University Press, Cambridge, 69.
- Charlwood B. V., (1993), *Acta Horticult.*, 330, 255-260.
- Park S. H., Chae Y. A., Lee H. J., Kin S. U., (1993), *Han'guk Nonghwa Hakhoechi*, 36, 358-363.
- Graef S., Knorr D., (1993), in: Eds. Schreier P., Winterhalter P., *Progr. Flavour Precursor Stud. Proc. Int. Conf.*, 1992, 471-475.
- Jain M., Banerji R., Nigam S. K., Scheffer J. J. C., Chaturvedi H. C., (1991), *Planta Med.*, 57, 122-124.
- Spencer A., Hamill J. D., Rhodes M. J. C., (1993), *Phytochemistry*, 32, 911-919.
- Menghini A., Capuccella M., Pagiotti R., Poceschi N., Spigarelli M., (1992), *J. Essent. Oil Res.*, 4, 483-486.
- Mersinger R., Dornauer H., Reinhard E., (1988), *Planta Med.*, 54, 200-204.
- Krombholz R., Mersinger R., Kreis W., Reinhard E., (1992), *Planta Med.*, 58, 328-333.
- Sen J., Sharma A. K., (1991), *Planta Cell Rep.*, 9, 698.
- Sen J., Sharma A. K., Sahu N. P., Mahato S. B., (1992), *Planta Med.*, 58, 324-327.
- Sen J., Sharma A. K., Sahu N. P., Mahato S. B., (1993), *Phytochemistry*, 34, 1309-1312.

24. Gan F., Zheng G., Shen Y., (1993), *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 5, 50-53.
25. Petersen M., (1994), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 26, *Medicinal and Aromatic Plants VI*, Springer-Verl., Berlin-Heidelberg, 69-92.
26. Banthorpe D. V., Brown J. T., Morris G. S., (1990), *Phytochemistry*, 29, 2145-2148.
27. Miyasaka H., Nasu M., Yoneda K., (1989), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 7, *Medicinal and Aromatic Plants II*, Springer-Verl., Berlin-Heidelberg, 417-430.
28. Miyasaka H., Nasu M., Yamamoto T., Endo Y., Yaneda K., (1986), *Phytochemistry*, 25, 637-640.
29. Miyasaka H., Nasu M., Yamamoto T., Endo Y., Yaneda K., (1986), *Phytochemistry*, 25, 1621-1624.
30. Hu Z. B., Alfermann A. W., (1993), *Phytochemistry*, 32, 699-703.
31. de-Eknamkul W., Ellis B. E., (1988), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 4, *Medicinal and Aromatic Plants I*, Springer-Verl., Berlin-Heidelberg, 310-329.
32. Ishikura N., (1991), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 15, *Medicinal and Aromatic Plants III*, Springer-Verl., Berlin-Heidelberg, 353-361.
33. Sumaryono W., Proksch P., Hartmann T., Nimitz M., Wray V., (1991), *Phytochemistry*, 30, 3267-3271.
34. Sumaryono W., Proksch P., (1993), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 24, *Medicinal and Aromatic Plants V*, Springer-Verl., Berlin-Heidelberg, 287-299.
35. Hippolyte I., Marin B., Baccou J.C., Jonard R., (1991), *C. R. l'Academie Sci. Ser. III*, 313, 365-371.
36. Hippolyte I., Marin B., Baccou J.C., Jonard R., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11(3), 109-112.
37. Guo Y., Li H. J., Cai Y. X., Zhang Y., Peng Z. Y., (1992), *Biochem. Eng. 2001, Proc. Asia-Pac. Biochem. Eng. Conf.*, 242-245.
38. Häusler E., Petersen M., Alfermann A. W., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 510-512.
39. Gertlowski C., Petersen M., (1993), *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 34, 183-190.
40. Zenk M. H., El-Shagi H., Ulbrich B., (1977), *Naturwissenschaften*, 64, 585-586.
41. Ulbrich B., Weisner W., Arens L., (1985), in: Eds. Deus-Neumann B., Barz W., Reinhard E., *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, Springer-Verl., Berlin, 293-303.
42. Park Ch. H., Martinez B. C., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 459-464.
43. Martinez B. C., Park Ch. H., (1993), *Biotechnol. Prog.*, 9, 97-100.
44. Harborne J. B., Baxter H., (1993), *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Tylor & Francis, London, Washington DC.
45. Banthorpe D. V., Bilyard H. J., Watson D. G., (1985), *Phytochemistry*, 24, 2677-2680.
46. Banthorpe D. V., Bilyard H. J., Brown G. D., (1989), *Phytochemistry*, 28, 2109-2113.
47. Sonomoto K., Nakajima H., Sato F., Ichimura K., Yamada Y., Tanaka A., (1990), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 613, 542-546.
48. Nakajima H., Sonomoto K., Sato F., Yamada Y., Tanaka A., (1989), *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3077-3078.
49. Nakajima H., Sonomoto K., Sato F., Ichimura K., Yamada Y., Tanaka, (1989), *J. Ferment. Bioeng.*, 68, 330-333.
50. Yamamoto H., (1991), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 15, *Medicinal and Aromatic Plants III*, Springer-Verl., Berlin-Heidelberg, 398-418.
51. Seo W. T., Park Y. H., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 414-417.
52. Yamamoto H., Sano T., Tomimori T., (1989), *Shoyakugaku Zasshi*, 43, 87-92.
53. Yamamoto H., Sano T., Takeuchi S., Tanaka M., Tomimori T., (1990), *Shoyakugaku Zasshi*, 43, 188-191.
54. Park Y. H., Seo W. T., (1992), *Biochem. Eng. 2001, Proc. Asia Pac. Biochem Eng. Conf.*, 250-253.
55. Callebaut A., Hendrickx G., Voets A. M., Motte J. C., (1990), *Phytochemistry*, 29, 2153-2158.

56. Callebaut A., Voets A. M., Motte J. C., (1990), *Biotechnol. Lett.*, 12, 215-218.
57. Callebaut A., Declaire M., (1993), in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 24, *Medicinal and Aromatic Plants V*, Springer-Verl., Berlin-Heidelberg, 1-22.
58. Koda T., Ichi T., Yoshimitu M., Nihongi Y., Sekiya J., (1992), *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39, 839-844.
59. Zhong J. J., Yoshida M., Fujiyama K., Seki T., Yoshida T., (1993), *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 299-303.
60. Zhong J. J., Seki T., Kinoshita S., Yoshida T., (1992), *Biochem. Eng. 2001, Proc. Asia-Pac. Biochem. Eng. Conf.*, 262-265.
61. Zhong J. J., Yoshida T., (1993), *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 530-531.
62. Zhong J. J., Konstantinov K. B., Yoshida T., (1994), *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 445-447.
63. Zhong J. J., Fujiyama K., Seki T., Yoshida T., (1994), *Bioeng.*, 44, 649-654.
64. Zhong J. J., Yoshida T., (1994), *Stud. Plant. Sci.*, 4, (Advances in Plant Biotechnology), 255-279.
65. Zhong J. J., Xu G. R., Yoshida T., (1994), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 590-592.
66. Grzybek J., (1976), *Farm. Pol.*, 5, 411-415.
67. Grzybek J., (1983), *Acta Pol. Pharm.*, 2, 254-263.
68. Matsumoto T., Tanaka N., (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1019-1025.
69. Tanaka N., Matsumoto T., (1993), *Plant Cell Rep.*, 13, 87-90.
70. Nagakari M., Kushiro T., Yagi T., Tanaka N., Matsumoto T., Kakinuma K., Fujimoto Y., (1994), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 15, 1761-1762.
71. Nakagari M., Kushiro T., Matsumoto T., Tanaka N., Kakinuma K., Fujimoto Y., (1994), *Phytochemistry*, 36, 907-910.
72. Tomás J., Camps F., Claveria E., Coll J., Mel, E., Messeguer J., (1992), *Phytochemistry*, 31, 1585-1591.
73. Tomás J., Camps F., Coll J., Melè, E., Messeguer J., (1993), *Phytochemistry*, 32, 317-324.
74. Lev S. V., Zakirova R. P., Saatov Z., Gorovits M. B., Abubakirov N. K., (1990), *Khim. Prir. Soedin.*, 1, 51-52.
75. Uchiyama T., Numata M., Terada S., Hosino T., (1993), *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 32, 153-159.

Secondary metabolites of tissue cultures of *Lamiaceae* species

Summary

This paper reviews information from the last decade world literature on the occurrence in tissue cultures of some *Lamiaceae* species of secondary metabolites: monoterpenes, diterpenes, phenylpropanoids, depsides, enol esters of caffeic acid, flavonoids, anthocyanins, phytoecdysteroids and polysaccharides.

The introductory part of the paper gives information on the occurrence of the biological active secondary metabolites in the native plant species from *Lamiaceae* family.

Key words:

tissue cultures, *Lamiaceae*, secondary metabolites, monoterpenes, diterpenes, phenylpropanoids, depsides, enol esters of caffeic acid, flavonoids, anthocyanins, phytoecdysteroids, polysaccharides.

Adres do korespondencji:

Ewa Skrzypczak-Pietraszek, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, fax (0-12) 57-02-62.