

2397

PL ISSN 0303 4135

A k a d e m i a M e d y c z n a w G d a ń s k u

ANNALES

ACADEMIAE MEDICAE

GEDANENSIS

**BADANIA NAD AKUMULACJĄ AKTYWNYCH
LECZNICZO IZOFLAWONÓW W KULTURACH
IN VITRO WYBRANYCH GATUNKÓW
Z RODZAJU GENISTA**

MARIA ŁUCZKIEWICZ

ROZPRAWA HABILITACYJNA

TOM XXXVI

2 0 0 6

SUPPLEMENT 8



**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVI
2006
SUPPLEMENT 8**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Maria Łuczkiewicz

**BADANIA NAD AKUMULACJĄ AKTYWNYCH
LECZNICZO IZOFLAWONÓW W KULTURACH
IN VITRO WYBRANYCH GATUNKÓW
Z RODZAJU GENISTA**

***RESEARCH INTO THE ACCUMULATION OF MEDICALLY
ACTIVE ISOFLAVONES IN IN VITRO CULTURES OF
SELECTED GENISTA PLANTS***

Rozprawa habilitacyjna

Akademia Medyczna w Gdańsku
Katedra i Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych
Kierownik: prof. dr hab. Wojciech Cisowski

Gdańsk 2006

REDAKTOR NACZELNY
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji - dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Akademia Medyczna w Gdańsku
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
*Articles published in Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)*

PL ISSN 0303-4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

Rozprawę habilitacyjną wykonano częściowo w ramach
rocznego stypendium firmy L'Oréal Polska dla Kobiet i Nauki,
przy wsparciu Polskiego Komitetu do spraw UNESCO (2005 rok)

**Omnes trāhimur et dūcimur ad cognitionis et scientia
ecupiditatem, in qua excēllere pulchrum putamus, labi aurem**

/Cicero, De officiis I, 1,8/

*Kochanym Rodzicom
i pamięci najdroższej Cioci Krysi poświęcam*

Praca obejmuje wyniki dotychczas nie publikowane oraz zawarte w następujących publikacjach:

Oryginalne publikacje eksperymentalne:

- [1] M. Łuczkiwicz, D. Głód, Callus cultures of *Genista* plants – *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity, *Plant Sci.* 165 (2003) 1101-1108.
- [2] M. Łuczkiwicz, P. Migas, A. Kokotkiewicz, M. Walijewska, W. Cisowski, Two-dimensional TLC with adsorbent gradient for separation of quinolizidine alkaloids in the herb and *in vitro* cultures of several *Genista* species, *J. Planar Chrom.* 17 (2004) 89-94.
- [3] M. Łuczkiwicz, D. Głód, T. Bączek, A. Buciński, LC-DAD UV and LC-MS for the analysis of isoflavones and flavones from *in vitro* and *in vivo* biomass of *Genista tinctoria* L., *Chromatographia* 60 (2004) 179-185.
- [4] M. Łuczkiwicz, D. Głód, Morphogenesis-dependent accumulation of phytoestrogens in *Genista tinctoria in vitro* cultures, *Plant Sci.* 168 (2005) 967-979.
- [5] M. Łuczkiwicz, A. Piotrowski, Two-stage system for micropropagation of several *Genista* plants producing large amounts of phytoestrogens, *Z. Naturforsch.* 60c (2005) 557-566.
- [6] M. Łuczkiwicz, A. Kokotkiewicz, *Genista tinctoria* hairy root cultures for selective production of isoliquiritigenin, *Z. Naturforsch.* 60c (2005) 867-875.
- [7] M. Łuczkiwicz, A. Kokotkiewicz, Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens, *Plant Sci.* 169 (2005) 862-871.

Rozdział w książce:

- [1] M. Łuczkiwicz, W. Cisowski, G. Gryniewicz, T. Bączek, R. Kaliszan, Isoflavonoids of estrogenic activity in tissue cultures of *Glycine soja* and *Genista tinctoria*, w: *Bioactive compounds in plant foods: health effects and perspectives for the food industry*, Ed. by R. Amado i in., Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002, str. 177-178.

Komunikaty zjazdowe:

- [1] M. Łuczkiwicz, W. Cisowski, G. Gryniewicz, T. Bączek, R. Kaliszan, Isoflavonoids of estrogenic activity in tissue cultures of *Glycine soja* and *Genista tinctoria*, European Conference „Bioactive Compounds in Plant Foods, Health Effects and Perspectives for the Food Industry.” Final Cost 916 Conference, 6. IV – 28. IV 2001, Tenerife, Canary Islands, Hiszpania.
- [2] M. Łuczkiwicz, D. Głód, Isoflavonoids of estrogenic activity in shoot and suspension cultures of *Genista tinctoria*, 3rd International Symposium on Chromatography of Natural Products: “The application of chromatographic methods in phytochemical & biomedical analysis.” 12. VI – 15. VI 2002, Lublin-Kazimierz Dolny.
- [3] M. Łuczkiwicz, D. Głód, T. Bączek, R. Kaliszan, A. Buciński, Analysis of *in vitro* and *in vivo* cultures of several *Genista* species for isoflavone content by HPLC with ultraviolet diode array and mass detection, 3rd International Symposium on Chromatography of Natural Products: “The application of chromatographic methods in phytochemical & biomedical analysis.” 12.VI – 15.VI 2002, Lublin-Kazimierz Dolny.
- [4] M. Łuczkiwicz, Callus cultures of *Genista* plants – *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity.” Scan Balt Forum – Borderless-Biotech. “Biologically active compounds from plants.” 08.V – 10.V 2003, Gdańsk.

- [5] M. Łuczkiwicz, P. Migas, A. Kokotkiewicz, M. Walijewska, W. Cisowski, Two-dimensional TLC with sorbent gradient for the analysis of quinolizidine alkaloids in the herb and *in vitro* cultures of several *Genista* species, International Symposium on Planar Separation, Planar Chromatography, 21.VI – 23.VI 2003, Budapest, Węgry.
- [6] M. Łuczkiwicz, P. Migas, A. Kokotkiewicz, M. Walijewska, W. Cisowski, Dwukierunkowa chromatografia cienkowarstwowa z gradientem fazy stacjonarnej w analizie alkaloidów chinolizydynowych ziela i kultur tkankowych wybranych gatunków z rodzaju *Genista*, XXII Sesja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku, 16. XII 2003, Gdańsk.
- [7] M. Łuczkiwicz, D. Głód, T. Bączek, A. Buciński, W. Cisowski, HPLC-DAD-MS method for the Analysis of Isoflavones and Flavones for *In Vitro* and *In Vivo* Biomass of *Genista tinctoria* L., 4th International Symposium on Chromatography of Natural Products: “ The Application of Chromatographic Methods in Phytochemical & Biomedical Analysis.” 14. VI – 17. VI 2004, Lublin-Kazimierz Dolny.
- [8] M. Łuczkiwicz, A Kokotkiewicz, Kokultury *Genista tinctoria* jako system *in vitro* do biosyntezy i biotransformacji znacznych ilości fitoestrogenów, XI Ogólnopolska Konferencja Kultur *In Vitro* i Biotechnologii Roślin: „Kultury *In Vitro* Podstawą Biotechnologii Roślin.” 6.IX – 9. IX 2006, Międzyzdroje.

SPIS TREŚCI

WSTĘP I ZAŁOŻENIA PRACY	11
1. STANOWISKO W SYSTEMIE ORAZ CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA BADANYCH GATUNKÓW Z RODZAJU <i>GENISTA</i>	17
2. ZWIĄZKI FLAWONOIDOWE ORAZ ALKALOIDY CHINOLIZYDYNOWE ZIDENTYFIKOWANE DOTYCHCZAS W BADANYCH GATUNKACH	26
3. BIOSYNTeza ZWIĄZKÓW IZOFLAWONOIDOWYCH.....	31
4. BADANIA NAD IZOFLAWONOIDAMI W KULTURACH <i>IN VITRO</i>	46
5. AKTYWNOŚĆ FARMAKOLOGICZNA IZOFLAWONOIDÓW.....	77
6. KULTURY KALUSOWE WYBRANYCH GATUNKÓW Z RODZAJU <i>GENISTA</i> JAKO WYBIÓRCZE ŹRÓDŁO IZOFLAWONÓW	91
7. DWUFazowy SYSTEM HODOWLANy W MIKROROZMNAŻANIU WYBRANYCH GATUNKÓW Z RODZAJU <i>GENISTA</i> , PRODUKUJĄCYCH ZNACZNE ILOŚCI FITOESTROGENÓW	109
8. WPŁYW REGULATORÓW WZROSTU NA AKUMULACJĘ IZOFLAWONÓW W KULTURACH KALUSOWYCH <i>GENISTA TINCTORIA</i>	124
9. WPŁYW MORFOGENEZY NA AKUMULACJĘ FITOESTROGENÓW W KULTURACH <i>IN VITRO GENISTA TINCTORIA</i>	158
10. WPŁYW ELICYTACJI ORAZ PERMEABILIZACJI NA AKUMULACJĘ I PROFIL MAGAZYNOWANIA IZOFLAWONÓW W KULTURACH ZAWIESINOWYCH <i>GENISTA TINCTORIA</i>	181
11. KORZENIE WŁOŚNIKOWATE <i>GENISTA TINCTORIA</i> JAKO SYSTEM <i>IN VITRO</i> DO SELEKTYWNEJ PRODUKCJI WYSOKICH STĘŻEŃ IZOLIKWIRYTYGENINY	213
12. KOKULTURY KORZENI WŁOŚNIKOWATYCH I PĘDÓW <i>GENISTA</i> <i>TINCTORIA</i> JAKO SYSTEM HODOWLANy Z PRZEZNACZENIEM DO AKUMULACJI ORAZ BIOKONWERSJI ZNACZNYCH ILOŚCI FITOESTROGENÓW	237
13. LC-DAD UV I LC-MS W ANALIZIE IZOFLAWONÓW ORAZ FLAWONÓW W RÓŻNYCH CZĘŚCIACH MORFOLOGICZNYCH <i>GENISTA TINCTORIA</i> Z UPRAW GRUNTOWYCH.....	261
14. ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA -TLC ALKALOIDÓW CHINOLIZYDYNOWYCH W CZĘŚCIACH NADZIEMNYCH ORAZ KULTURACH <i>IN VITRO</i> WYBRANYCH GATUNKÓW Z RODZAJU <i>GENISTA</i>	285
15. STRESZCZENIE	306
16. SUMMARY.....	320
17. WYNIKI I WNIO SKI.....	333

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

ABA	kwasy abscyzynowy (<i>abscisic acid</i>)
BAP	6-benzylaminopuryna (<i>6-benzylaminopurine</i>)
β-NOA	kwasy β-naftoksyoctowy (<i>β-naphthoxyacetic acid</i>)
4-CPA	kwasy p-chlorofenoksyoctowy (<i>p-chlorophenoxyacetic acid</i>)
4-CPPU	N-(2-chloro-4-pirydylo)-N'-fenylo-mocznik (<i>N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea</i>)
2,4-D	kwasy 2,4-dichlorofenoksyoctowy (<i>2,4-dichlorophenoxyacetic acid</i>)
1,3-DFM	1,3-difluoromocznik (<i>1,3-difluorurea</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek (<i>dimethylsulfoxide</i>)
DW	sucha masa tkankowa (<i>dry weight</i>)
FW	świeża masa tkankowa (<i>fresh weight</i>)
GA₃	kwasy giberelinowy (<i>gibberelic acid</i>)
GLC	chromatografia gazowo-cieczowa (<i>gas liquid chromatography</i>)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IAA	kwasy indolilo-3-octowy (<i>indole-3-acetic acid</i>)
IBA	kwasy indolilo-3-masłowy (<i>indole-3-butyric acid</i>)
IPA	kwasy indolilo-3-propionowy (<i>indole-3-propionic acid</i>)
2iP	6-{γ-γ-dimetyloallilo}-aminopuryna (<i>6-{γ-γ-dimethylallylamino}-purine</i>)
KIN	kinetyna (<i>kinetin</i>)
NAA	kwasy naftylo-1-octowy (<i>1-naphthaleneacetic acid</i>)
PICL	pikloram (<i>picloram</i>)
±S. D.	odchylenie standardowe (<i>standard deviation</i>)
SH	pożywka Schenk–Hildebrandt'a (<i>Schenk–Hildebrandt medium</i>)
SH₀	pożywka Schenk–Hildebrandt'a bez regulatorów wzrostu (<i>Schenk–Hildebrandt medium without growth regulators</i>)
SH_Z	zoptymalizowana żywka Schenk–Hildebrandt'a do hodowli zawiesiny <i>G. tinctoria</i> (<i>optimised Schenk–Hildebrandt medium for G. tinctoria suspension culture</i>)
SPE	ekstrakcja do fazy stałej (<i>solid phase extraction</i>)
2,4,5-T	kwasy 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (<i>2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid</i>)
TDZ	1-fenilo-3-(1,2,3-tidiazolo-5-yl)mocznik / tidiazuron / <i>1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea / thidiazuron</i>
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (<i>thin-layer chromatography</i>)
TIBA	kwasy 2,3,5-trijodobenzoesowy (<i>2,3,5-triiodobenzoic acid</i>)
W_P	współczynnik przyrostu (<i>growth factor</i>)
ZEA	zeatyna (<i>zeatin</i>)

WSTĘP I ZAŁOŻENIA PRACY

Związki izoflawonoidowe od szeregu lat budzą zainteresowanie zarówno botaników jak i również farmakologów i klinicystów [24]. Z jednej strony omawiane połączenia zostały zaliczone do grupy fitoaleksyn oraz fitoantycypin i jako takie analizowane są w badaniach nad mechanizmami obronnymi roślin [11,23]. Wyniki powyższych doświadczeń dostarczają niezwykle cennych danych odnośnie szlaków metabolicznych wiodących do powstania izoflawonów [11,12,23,38]. Z drugiej strony, izoflawonoidy występujące powszechnie w rodzinie *Fabaceae* charakteryzują się wielokierunkową aktywnością biologiczną będącą, między innymi, wynikiem położenia pierścienia fenyłowego przy trzecim węglu benzo- γ -pironu, a nie przy węglu drugim, jak to ma miejsce u większości flawonoidów [7,15,17,25,27]. W efekcie związki te, poza aktywnością przeciwzapalną i przeciwdrobnoustrojową [15,27], uzyskują cechy połączeń blokujących receptory estrogenowe ER β [17,25,27]. Szczegółowe badania farmakologiczne genisteiny, daidzeiny, glicyteiny, formononetyny i ich pochodnych dowiodły, że izoflawony mogą hamować powstawanie oraz rozwój nowotworów sutka i jajników bezpośrednio zależnych od zaburzeń równowagi estrogenowej w organizmie [17,19,25,27,36]. Takie działanie „hormonalne” omawianych związków jest zrozumiałe w świetle podobieństw strukturalnych izoflawonów do pochodnych dihydrostilbenu [17,25,27]. Jednocześnie stosunkowo prosta budowa powoduje, że izoflawony są praktycznie nietoksyczne [19,36].

W dobie ciągle rosnącej liczby zachorowań na nowotwory sutka oraz kobiecych dróg rodnych poszukuje się ciągle nie tylko skutecznych związków kancerostatycznych, ale również leków łączących w sobie cechy aktywnych chemioterapeutyków oraz związków bezpiecznych, nie powodujących wyniszczenia organizmu. Wstępnie uważa się, że izoflawony spełniają obydwa wyżej wymienione warunki, a przede wszystkim mogą być stosowane w prewencji chorób nowotworowych oraz w terapii postmenopauzalnej [17,19,25,27,36]. Fitoestrogeny zaliczane do klasy izoflawonów stanowią dobrą alternatywę dla hormonalnej terapii zastępczej, skutkującej niekiedy nowotworami sutka, trzonu macicy, a także przerostem endometrium [17,25,27,36].

Jako naturalne źródło fitoestrogenów wykorzystuje się obecnie produkty sojowe oraz preparaty przygotowane na bazie wyciągów z soi, zawierających wieloskładnikowe frakcje izoflawonoidowe [17,19,25,27,36]. Te ostatnie, rejestrowane są w przeważającej mierze jako dietetyczne środki spożywcze oraz suplementy diety, a producenci podają na opakowaniach jedynie ogólną zawartość izoflawonów w preparatach. Z przeprowadzonych badań farmakologicznych wynika, że poszczególne izoflawony różnią się, między innymi, stopniem aktywności fitoestrogennej [7,17,25,27]. Z tego względu jedynie preparat o ściśle określonej zawartości wydzielonego izoflawonu stanowiłby lek spełniający wymogi nowoczesnego leczenia allopatycznego. By taki lek otrzymać niezbędne jest posiadanie bogatego źródła fitoestrogenów.

Na drodze syntezy chemicznej udało się dotychczas otrzymać jedynie nieliczne, proste połączenia izoflawonoidowe [2,10,31,33]. W tym miejscu należy zaznaczyć, że w omawianym przypadku istnieją obawy zaistnienia, istotnej dla działania biologicznego, zmiany w strukturze stereochemicznej syntetyzowanych fitoestrogenów w stosunku do połączeń uzyskanych na drodze biosyntezy [10]. Z uwagi na powyższe, szanse na otrzymanie złożonych struktur izoflawonoidowych stwarzają kultury *in vitro* roślin motylkowych, zawierających bogate frakcje izoflawonoidowe. Nieliczne prace eksperymentalne nad hodowlami tkankowymi wybranych gatunków z rodziny *Fabaceae* nie doprowadziły do opracowania w warunkach

in vitro roślinnego systemu hodowlanego, będącego opłacalnym źródłem fitoestrogenów [1,4,5,13,14]. Cytowane badania wykazały jednak, że wprowadzone do kultur *in vitro* rośliny motylkowe zachowały, właściwą dla gatunków macierzystych, zdolność do biosyntezy izoflawonów [1,4,13,14].

W oparciu o powyższe, sformułowano nadrzędny cel projektu habilitacyjnego, którym było opracowanie, w warunkach *in vitro*, roślinnego systemu hodowlanego, produkującego wybiórczo znaczne ilości fitoestrogenów pochodzenia izoflawonoidowego. Wstępne badania fitochemiczne wybranych gatunków z rodzaju *Genista* wraz z danymi literaturowymi dowiodły, że powyższe rośliny, pod względem zawartości izoflawonów, wielokrotnie przewyższają *Glycine max* L. stanowiącą powszechnie uznane źródło fitoestrogenów [9,20,32]. Praktyczne zastosowanie w lecznictwie janowców ogranicza fakt, że jako krzewy charakteryzują się one powolnym wzrostem i otrzymanie masy biologicznej w warunkach upraw gruntowych jest stosunkowo drogie [8]. Ponadto rośliny z rodzaju *Genista* zawierają toksyczny zespół alkaloidów chinolizydynowych o szeroko udokumentowanej aktywności teratogennej i hepatotoksycznej [9,18,32,34]. Z powyższych względów wydawało się celowym otrzymanie biomas roślinnych, syntetyzujących wybiórczo izoflawony, w warunkach *in vitro* właśnie w oparciu o rośliny z rodzaju *Genista*. Hodowle tkankowe janowców umożliwiłyby produkcję biomas niezależnie od pór roku i warunków klimatycznych, dostarczając, w sposób ciągły cennego surowca izoflawonoidowego. Opisany sposób hodowli stwarza ponadto możliwość wyбору kultur charakteryzujących się niską zawartością toksycznych alkaloidów chinolizydynowych oraz sterowania produkcją izoflawonów w namnażanych tkankach, tak by uzyskać optymalną zawartość fitoestrogenów [16].

Wstępne badania biotechnologiczne, stanowiące część projektu habilitacyjnego, postanowiono przeprowadzić w oparciu o sześć wybranych gatunków z rodzaju *Genista* (*G. tinctoria* L., *G. radiata* L., *G. sagittalis* L., *G. germanica* L., *G. aethnensis* D.C. oraz *G. monosperulana* L.) zawierających, w warunkach upraw gruntowych, bogaty zespół izoflawonów [9,18,32,34]. Zamierzano sprawdzić potencjał powyższych roślin w zakresie produkcji fitoestrogenów w warunkach kultur tkankowych (hodowle kalusowe), a następnie wybrać gatunek charakteryzujący się najwyższą zawartością badanych związków, który mógłby stanowić podstawę systemu hodowlanego ukierunkowanego na wybiórczą produkcję izoflawonów. Wstępne doświadczenia obejmowały również opracowanie metody mikrorozmnazania badanych gatunków, z uwagi na endemiczny charakter niektórych janowców [8,9,18,32] oraz próby ustalenia wpływu morfogenezy na akumulację poszczególnych izoflawonów w biomasach roślinnych. W oparciu o obecny stan wiedzy należy zaznaczyć, że kultury tkankowe w postaci zawiesiny rozproszonych komórek nie zawsze zachowują zdolność do biosyntezy wtórnych metabolitów obecnych w roślinach macierzystych [6,16,26,28]. Łączy się to z brakiem właściwych warunków histologicznych niezbędnych do realizacji programu biosyntezy i magazynowania określonych połączeń [6,16,26,28]. W związku z tym, w prezentowanych badaniach postanowiono położyć specjalny nacisk na prowadzenie kultur różniących się stopniem morfogenezy (kultury pędowe, korzeniowe, zawiesiny rozproszonych komórek parenchymatycznych oraz embrionów) w wersji stacjonarnej oraz wytrząsanej.

Istotny element projektu habilitacyjnego miały również stanowić kultury korzeni transformowanych janowca, produkującego w warunkach *in vitro* najbogatszy zespół izoflawonów. Celem powyższego eksperymentu było stwierdzenie wpływu transformacji genetycznej na proces akumulacji izoflawonów w otrzymanych biomasach tkankowych [37].

W ramach części doświadczalnej prezentowanych badań, związanych z kulturami organowymi, postanowiono opracować system hodowlany o charakterze kokultur, złożony z korzeni

transformowanych oraz biomas pędowych bądź zawiesin janowca, w systemie wewnątrzgatunkowym. Anergizacja korzeni włóśnikowatych w stosunku do regulatorów wzrostu stwarza możliwość prowadzenia tego typu doświadczenia w jednym zbiorniku hodowlanym z zastosowaniem pożywki warunkującej optymalny wzrost monokultury nietransformowanej [29,30,37]. Bezpośrednim celem opisywanego doświadczenia było opracowanie systemu hodowlanego, z możliwością przeprowadzenia translokacji i biokonwersji metabolitów syntetyzowanych w poszczególnych monokulturach. W efekcie zamierzano uzyskać biomasy o zmiennym profilu metabolicznym, ukierunkowanym na akumulację znacznych stężeń izoflawonów. Opracowany system hodowlany postanowiono przetestować w skali półtechnicznej, prowadząc doświadczenia w bioreaktorze skonstruowanym specjalnie, w ramach projektu, do prowadzenia kokultur roślinnych.

W biomasie janowca, produkującej znaczne ilości fitoestrogenów, zawartość izoflawonów planowano podnieść nie tylko poprzez opisaną powyżej zmianę typu kultury, ale również na drodze optymalizacji warunków hodowli *in vitro*. W tym celu, w trakcie doświadczeń, postanowiono modyfikować skład podstawowych podłoży hodowlanych w zakresie regulatorów wzrostu (auksyny oraz cytokininy). Szczególny nacisk zamierzano położyć również na elicytację namnażanych biomas. Z racji przynależności izoflawonów do klasy fitoaleksyn, po zastosowaniu elicytorów, można było się spodziewać określonej odpowiedzi tkankowej, w postaci zmiany akumulacji i magazynowania badanych wtórnych metabolitów [3,21,22].

W wyniku wszystkich zastosowanych procedur zamierzano uzyskać biomasy *in vitro* stanowiące bogate i wybiórcze źródło izoflawonów, z przeznaczeniem do izolacji określonych połączeń i prowadzenia badań podstawowych, dotyczących biosyntezy i aktywności fitoestrogenów.

Równolegle do doświadczeń z zakresu roślinnych hodowli *in vitro*, w ramach opisywanego projektu, zamierzano prowadzić badania fitochemiczne nad składem jakościowym i ilościowym frakcji flawonoidowych zawartych w namnażanych biomasach oraz janowcach pochodzących z upraw gruntowych. Postanowiono opracować metodę ekstrakcji i oczyszczania zespołu bioflawonoidów występujących w badanych matrycach roślinnych. Analizę jakościową i ilościową frakcji flawonoidowych z kultur *in vitro* i z upraw gruntowych badanych janowców zamierzano przeprowadzić przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), w oparciu o zoptymalizowane do tego celu warunki rozdzielania. Zastosowanie dwóch typów detekcji (matryca diodowa oraz detektor masowy) miało umożliwić identyfikację poszczególnych składników frakcji flawonoidowych janowców w systemie *on line* [35]. Opracowana metoda chromatograficznego rozdziału flawonów i izoflawonów występujących w rodzaju *Genista* miała następnie służyć do badań skryningowych biomas uzyskanych na wszystkich etapach hodowli *in vitro*, w zakresie połączeń flawonoidowych. W ramach prac fitochemicznych zamierzano również ocenić namnażane biomasy pod kątem zawartości toksycznych alkaloidów chinolizydynowych, w oparciu o chromatografię cienkowarstwową (TLC) wyciągów alkaloidowych, w warunkach zoptymalizowanych w toku eksperymentu.

Skorelowanie doświadczeń fitochemicznych z eksperymentami biotechnologicznymi miało pozwolić na ostateczne zrealizowanie celu pracy, którym było otrzymanie wysokowydajnego roślinnego systemu hodowlanego, z przeznaczeniem do produkcji znacznych ilości fitoestrogenów.

Piśmiennictwo

1. Ames T.T., Worden R.M., Continuous Production of Daidzein and Genistein from Soybean in a Magnetofluidized Bed Bioreactor, *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 336-339.
2. Balasubramanian S., Nair M.G., An efficient "one pot" synthesis of isoflavones, *Synthetic Communications* 30 (2000) 469-484.
3. Barz W., Mackenbrock U., Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpanes in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 199-211.
4. Berlin J., Fecker L., Rügenhagen C., Sator C., Strack D., Witte L., Wray V., Isoflavone Glycoside Formation in Transformed and Non-Transformed Suspension and Hairy Root Cultures of *Lupinus polyphyllus* and *Lupinus hartwegii*, *Z. Naturforsch.* 46 c (1991) 725-734.
5. Bourgaud E., Bouque V., Guckert A., Production of flavonoids by *Psolarea* hairy root cultures, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56 (1999) 97-104.
6. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant. Sci.* 161 (2001) 839-851.
7. Brandi M.L., Natural and synthetic isoflavones in the prevention of treatment of chronic diseases, *Calcif. Tissue Int.* 61 (1997) 55-58.
8. Cronquist A., An Integrated System of Classification of Flowering Plants, Columbia Univ. Press, New York 1981.
9. De Castro O., Cozzolino S., Jury S.L., Caputo P., Molecular relationships in *Genista* L. Sect. *Spartocarpus* Spach (Fabaceae), *Plant. Syst. Evol.* 231 (2002) 91-108.
10. Dixon R.A., Ferreira D., Molecules of Interest, Genistein, *Phytochemistry* 60 (2002) 205-211.
11. Dixon R.A., Steele C.L., Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering, *Trends in Plant Sci.* 4 (10) (1999) 340-400.
12. Dixon R.A., Harrison M.J., Paiva N.L., The isoflavonoid phytoalexin pathway: From enzymes to genes to transcription factors, *Physiol. Plant.* 93 (1995) 385-392.
13. Federici E., Touché A., Choquart S., Avanti O., Fay L., Offord E., Courtois D., High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures, *Phytochemistry* 64 (2003) 717-724.
14. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Glebko L.I., Kulesh N.I., Muzarok T.I., Seletskaya L.D., Bulgakov V.P., Zhuravlev Yu.N., Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*, *Fitoterapia* 71 (2000) 365-372.
15. Fritsche S., Steinhart H., Occurrence of hormonally active compounds in food: a review, *Eur. Food Res. Technol.* 209 (1999) 153-179.
16. Grajek W., Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*, w: S. Malepszy (Ed.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 306-341.
17. Gryniewicz G., Gadzikowska M., Fitoestrogeny jako selektywne modulatory aktywności receptorów estrogenowych, *Postępy Fitoterapii* 10 (1) (2003) 28-35.
18. Kinghorn A.D., Balandrin M.F., Quinolizidine alkaloids of the *Leguminosae*: structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities, *Alkaloids*, 2 (1984) 105-148.

19. Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B., Gustafsson J.A., Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinol* 139 (1998) 4252-4263.
20. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Gryniewicz G., Bączek T., Kaliszan R., Isoflavones of estrogenic activity in tissue cultures of *Glycine soja* and *Genista tinctoria*, w: R. Amado i in. (Ed.), *Bioactive compounds in plant foods: health effects and perspectives for the food industry*, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002, str. 147-148.
21. Paiva N.L., Oommen A., Harrison M.J., Dixon R.A., Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 213-220.
22. Park H.H., Hakamatsuka T., Sankawa U., Ebizuka Y., Rapid metabolism of isoflavonoids in elicitor-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*, *Phytochemistry* 38 (2) (1995) 373-380.
23. Phillips D.A., Kapulnik Y., Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts, *Trends Microbiol.* 3 (2) (1995) 58-64.
24. Qiang Ren M.M., Kuhn G., Wegner J., Chen J., Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties, *Eur. J. Nutr.* 40 (2001) 135-146.
25. Radzikowski Cz., Wietrzyk J., Gryniewicz G., Opolski A., Genisteina – izoflawonoid soi o zróżnicowanym mechanizmie działania – implikacje kliniczne w leczeniu i prewencji chorób nowotworowych, *Postępy Hig. Med. Dośw.* 58 (2004) 128-139.
26. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 101-153.
27. Ren M.Q., Kuhn G., Wegner J., Chen J., Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties, *Eur. J. Nutr.* 40 (2001) 135-146.
28. Roberts S.C., Shuler M.L., Large-scale plant cell culture, *Curr. Op. Biotechnol.* 8 (1997) 154-159.
29. Sidwa-Gorycka M., Królicka A., Kozyra M., Głowniak K., Bourgaud F., Łojkowska E., Establishment of a co-culture of *Ammi majus* L. and *Ruta graveolens* L. for synthesis of furanocoumarins, *Plant Sci.* 165 (2003) 1315-1319.
30. Subroto M.A., Kwok K.H., Hamill J.D., Doran P.M., Co-culture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996) 481-494.
31. van Aardt T.G., van Rensburg H., Ferreira D., Synthesis of isoflavonoids. Enantiopure *cis*- and *trans*-6a-hydroxypterocarpan and a racemic *trans*-pterocarpan, *Tetrahedron* 56 (2001) 455-460.
32. van Rensen I., Veit M., van Rensen U.R., Cantó P., Vogt H., Greinwald R., Czygan F.Ch., Line-scatter plots in chemotaxonomy of *Genista* L. Section *Spartenoides* SPACH in Western Europe, *Biochem. System. Ecol.* 27 (1999) 687-708.
33. Waldemar A., Rao P.B., Degen H.G., Levai A., Patonay T., Saha-Moeller C.R., Asymmetric Weitz-Scheffer epoxidation of isoflavones with hydroperoxides mediated by optically active phase-transfer catalysts, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 259-264.
34. Wink M., Quinolizidine alkaloids, *Methods Plant Biochem.* 8 (1993) 197-239.
35. Wolfender J.L., Ndjoko K., Hostettmann K., Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 437-455.
36. Wuttke W., Jarry H., Becker T., Schultens A., Christoffel V., Gorkow Ch., Seidlová-Wuttke D., Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 44 (supl. 1) (2003) 9-20.

37. Wysokińska H., Chmiel A., Transformed root cultures for biotechnology, *Acta Biotechnol.* 17 (1997) 131-159.
38. Yu O., McGonigle B., Metabolic Engineering of Isoflavone Biosynthesis, *Adv. Agron.* 86 (2005) 147-190.

1. STANOWISKO W SYSTEMIE ORAZ CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA BADANYCH GATUNKÓW Z RODZAJU *GENISTA*

Stanowisko systematyczne rodzaju *Genista* przedstawiono poniżej

Królestwo	<i>Planta</i>	
Typ	<i>Cormophyta</i>	
Podtyp	<i>Anthophyta</i>	
Gromada	<i>Magnoliophyta</i>	Cronquist, Takthajan, Zimmermann [1]
Podgromada	<i>Angiospermae</i>	Cronquist [1]
Klasa	<i>Magnoliopsida</i>	Cronquist, Takthajan, Zimmermann [1]
Podklasa	<i>Rosidae</i>	Takthajan [1]
Rząd	<i>Fabales</i>	Bromhead [1]
Rodzina	<i>Fabaceae</i>	Lindley [1]
Podrodzina	<i>Caesalpinioideae</i>	
Rodzaj	<i>Genista</i> L.	

Rodzaj *Genista* obejmuje według Indeksu Kewńskiego 241, a według Englera 90 gatunków. Janowce są kolczastymi bądź pozbawionymi cierni krzewami, występującymi powszechnie na terenie całej Europy (przede wszystkim w rejonie śródziemnomorskim), Północnej Afryki i Zachodniej Azji. Są spotykane w widnych lasach, zaroślach i na nasłonecznionych wzniesieniach [2-4,17-19].

Liście roślin z rodzaju *Genista* są pojedyncze lub 3-listkowe, lancetowate, rzadziej jajowate, o ułożeniu skrętoległym, z drobnymi przylistkami lub bez. Kwiaty, najczęściej zebrane w grona, wyrastają z kątów liści. Kielich ma budowę dwuwargową, przy czym dolna warga jest trójząbkowa, a górna głęboko dwuwcięta. Korona o budowie charakterystycznej dla rodziny *Fabaceae*, jest najczęściej barwy żółtej. Pręciki występują w ilości 10, z czego najczęściej jeden jest wolny, a pozostałe 9 zrosnięte. Kwitnienie przypada na miesiące letnie. Owocem jest nagi lub owłosiony, pękający bądź nie pękający strąk, kształtu jajowatego do podłużnego, zawierający od 2 do 11 nasion [2-4,17-19].

Jedynie kilka gatunków janowców jest spotykanych w Polsce w stanie naturalnym. Znacznie więcej gatunków uprawia się, przede wszystkim dla celów ozdobnych [4].

Charakterystyki botaniczne poszczególnych gatunków przedstawiono w kolejności alfabetycznej nazw łacińskich.

Charakterystyka botaniczna *Genista aethnensis*:

Genista aethnensis (Biv.) DC. – janowiec etneński [20]

Syn: *Cytisanthus aethnensis* (Biv.) Cristof & Feoli Chiapella [20]

Spartium aethnensis Biv. [20]

Janowiec etneński (*Genista aethnensis*) jest gatunkiem pochodzącym z Włoch, występującym endemicznie na zboczach wulkanu Etna i na terenie wschodniej Sardynii, na wysokości od 500 do 800 m. n.p.m. (ryc. 1). Bywa również uprawiany jako roślina ozdobna [2,6-8,17,19,20].



Ryc. 1. *Genista aethnensis* D. C. [22]

Genista aethnensis jest krzewem dorastającym najczęściej do 5 cm wysokości, osiągającym niekiedy nawet 5 m. Starsze pędy są zdrewniałe, pokryte brunatnopomarańczową korą, młode wierzchołki natomiast są zielone. Pojedyncze, podługne liście, długości 5-9 mm i szerokości 1-2 mm, są biało owłosione. W trakcie kwitnienia janowiec etneński traci liście. Kwiaty są zebrane w wydłużone, groniaste kwiatostany. Dwuwargowy kielich ma długość około 1,5 mm. Górna warga jest tępa, rozmiarów mniej więcej 1/3 rurki kielicha, dolna warga drobna. Korona barwy żółtej ma budowę charakterystyczną dla rodziny *Fabaceae*. Żagielek, długości 8-9 mm i szerokości ok. 7 mm, jest większy od łódeczki. Roślina kwitnie w okresie od czerwca do sierpnia. Owoc stanowi gładki, półkolisty wygięty strąk barwy brunatnej, zawierający od 2 do 4 brązowych, soczewkowatych nasion. Owocowanie przypada na przełom września i października [2,6-8,17,19,20].

Charakterystyka botaniczna *Genista germanica*:

Genista germanica L. – janowiec ciernisty [20]

Syn: *Cytisus germanica* (L.) Vis. [20]

Genista heterocantha Schloss. & Vuk. [20]

Genista spinosa Gilib. [20]

Scorpius spinosa (Gilib.) Moench [20]

Voglera germanica (L.) Fourr. [20]

Voglera spinosa (Gilib.) Gaertn. [20]

Janowiec ciernisty jest wyprostowanym, wzniesionym krzewem, z umiejscowionymi w pachwinach pędów kolcami, rzadziej pozbawionym cierni. Roślina posiada liście długości 8-20 mm, szerokości 4-5 mm, pojedyncze, eliptyczne lub lancetowate, których dolna blaszka jest długo owłosiona. Kwiaty zgrupowane są w luźne grona. Przylistki długości około 1 mm. Jedwabście owłosiony kielich ma długość 5 mm. Korona o budowie charakterystycznej dla rodziny *Fabaceae* ma barwę żółtą. Żągielek długości około 8 mm jest owalny z ostro zakończonym wierzchołkiem o rozmiarach mniej więcej 1/3 długości łódeczki (ryc. 2). Janowiec ciernisty kwitnie latem w okresie od czerwca do września. Owocem jest równowąski, nagi, brunatny strąk, zawierający od 6 do 10 brunatnych nasion. *Genista germanica* występuje na terenach od południowo-zachodniej Francji do centralnej Rosji i od południowej Szwecji do centralnych Włoch i Bułgarii [2,3,9,10,17,19,20].



Ryc. 2. *Genista germanica* L. [22]

Charakterystyka botaniczna *Genista monospessulana*:

Genista monospessulana (L.) L.A.S. Johnson – janowiec francuski [20]

Syn: *Cytisus candicans* (L.) Lam. [20]

Cytisus kunzeanus Willk. [20]

Cytisus monspessulanus L. [20]

Genista candicans L. [20]

Teline monospessulana (L.) Koch [20]

Teline monspessulana (L.) Koch [20]

Rośliny z gatunku *Genista monospessulana* są krzewami do 3 m wysokości, o srebrzysto-jedwabście owłosionych pędach. Przylistki długości mniejszej niż 2 mm są nietrwałe i szybko opadają. Długość ogonka liściowego wynosi ok. 5 mm, a listki (10-15 mm) obło-lance-towate do obło-owalnych są dwa razy dłuższe niż szersze. Górna blaszka liścia jest intensywnie błyszcząca, natomiast dolna pokryta jest przylegającymi bądź wzniesionymi włoskami. Żółte kwiaty zebrane są w gęste grona umiejscowione na krótkopędach, długości 15-60 mm i zawierają od 4 do 10 kwiatów. Szypułka kwiatostanowa długości 1-3 mm. Kielich (5-7 mm) jest dwuwargowy, gęsto jedwabście owłosiony. Błyszczący żagielek o rozmiarach od 10-15 mm ma kształt owalny. Owoc janowca francuskiego stanowi strąk o długości do 25 mm, gęsto jedwabście owłosiony (ryc. 3).

Janowiec francuski występuje w Europie południowo-zachodniej: Francji, Portugalii, Hiszpanii, poza tym w Albanii, Grecji, Włoszech, zachodniej Azji (Liban, Turcja), Gruzji i północnej Afryce [2,3,10-12,17,19,20].



Ryc. 3. *Genista monospessulana* L. [25]

Charakterystyka botaniczna *Genista radiata*:

Genista radiata (L.) Scop. – janowiec promienisty [20]

Syn: *Cytisanthus radiatus* (L.) O. Lang [20]

Cytisus radiatus Koch [20]

Janowiec promienisty jest wzniesionym krzewem z gałęziami umieszczonymi naprzeciwległe. Roślina posiada liście 3-listkowe, naprzeciwległe, o długości od 5-20 mm i szerokości 2-4 mm. Błyszcząca blaszka liściowa obło-lancetowata, pod spodem jedwabście owłosiona, od strony górnej jest lekko błyszcząca. Kwiaty ułożone prawie naprzeciwległe, niemal siedzące, zebrane są po 4-12 w wierzchołkowych gronach. Najniższe kwiaty charakteryzują się prostymi, przeważnie krótkotrójząbkowymi, pergaminowatymi podsadkami, znacznie krótszymi od kwiatów górnych. Kielich długości 4-6 mm posiada wargi mniej więcej długości rurki. Korona ma barwę żółtą a żagielek długości od 8-14 mm, szerokoowalny, rozmiarów łódeczki, bądź nieco od niej krótszy, charakteryzuje się występowaniem jedwabistych włosków (ryc. 4).

Obszar występowania janowca promienistego obejmuje południową część Alp po wschodnią Szwajcarię, centralne Włochy i zachodnią Jugosławię. Poza tym omawiane rośliny spotyka się sporadycznie w południowo-zachodniej Rumunii i centralnej Grecji [10,17,20].



Ryc. 4. *Genista radiata* L. [23]

Charakterystyka botaniczna *Genista sagittalis*:

Genista sagittalis L. – janowiec strzałkowaty, janowczyk strzałkowaty [20]

Syn: *Chamaespartium sagittale* (L.) P.E. Gibbs [20]

Cytisus sagittalis (L.) Koch [20]

Genista delphinensis Verl. [20]

Genista herbacea Lam. [17]

Genistella racemosa Moench. [17]

- Genistella sagittalis* (L.) Gams [20]
Genistella sagittalis (L.) Gams subsp. *delphinensis* (Verl.) P. Fourn. [20]
Genistella sagittalis (L.) Gams subsp. *sagittalis* (L.) Gams [20]
Pterospartum sagittale (L.) Willk. [20]
Spartium sagittale Roth [17]
Syspone sagittalis Griseb. [17]
Salzwedelia sagittalis [17]

Przedstawiciele gatunku *Genista sagittalis* są zazwyczaj pozbawionymi cierni półkrzewami wysokości od 10 do 50 cm (ryc. 5).



Ryc. 5. *Genista sagittalis* L. [13]

Rozesłane łodygi wyrastają z krótkiego, zdrewniałego pieńka. Wzniesione, wyprostowane, charakterystycznie oskrzydłone pędy są pojedyncze lub tylko słabo rozgałęzione. Skrzydełka mają barwę zieloną, są nagie, błyszczące, o ciągłym, pozbawionym ząbków brzegu, zwężają się w węzłach. Siedzące, pozbawione przylistków pojedyncze liście mają szerokość zbliżoną do łodygi lub nieznacznie większą. Długość liści wynosi najczęściej 5-20 mm, przy szerokości 4-7 mm. Kształt blaszki liściowej jest eliptyczny, wierzchołek tępy lub zaokrąglony. Starsze liście są prawie lub całkowicie nagie, młode charakteryzują się natomiast gęstym, miękkim, krótkim owłosieniem. Kwiatostany janowca strzałkowatego tworzą się na szczytach pędów i mają postać zwartych gron zawierających od 3 do 16 krótkoszypułkowych, jasnożółtych kwiatów długości 10-12 mm. Rurkowaty, miętko owłosiony kielich długości 5-8 mm ma

budowę dwuwargową. Górna warga jest głęboko dwudzielna dolna zaś 3-ząbkowa. Korona żółtej barwy składa się z pięciu, mniej więcej równej długości, płatków z niekiedy orzęsionym żagielkiem. Roślina kwitnie od maja do lipca, czasami również jesienią. Brązowy strąk kształtu równowąskiego ma długość 14-20 mm, szerokość 4-5 mm i jest omszony. Owoc pęka dwoma kłapami, uwalniając od 2 do 6 lśniących, brązowozielonych nasion [5,10,14,17,20].

Janowiec strzałkowaty preferuje suche, ubogie gleby, rośnie również na ubogowapiennych terenach stepowych, łąkach, w widnych lasach dębowych i sosnowych, często lokalizuje się na południowych stokach wzniesień. Roślina jest rozpowszechniona w Europie południowej, od Hiszpanii po Półwysep Bałkański i na wybrzeżu Adriatyku. W Europie środkowej występowanie *Genista sagittalis* ma charakter lokalny, obejmując obszary od Francji do południowej Belgii, na wschodzie zaś od środkowej Rumunii po Węgry. Do Polski gatunek został zawleczony i występuje jedynie sporadycznie na nielicznych stanowiskach [10,14,16,17,20].

Charakterystyka botaniczna *Genista tinctoria*:

Genista tinctoria L. – janowiec barwierski [20]

Syn: *Cytisus tinctoria* (L.) Vis. [20]

Genista alpestris Bertol. [20]

Genista anxantica Ten. [20]

Genista borysthenica Kotov [20]

Genista campestris Janka [20]

Genista donetzica Kotov [20]

Genista elata (Moench) Wender [20]

Genista elatior Koch [20]

Genista humilis Ten. [20]

Genista hungarica A. Kern. [20]

Genista lasiocarpa Spach [20]

Genista mantica Pollini [20]

Genista marginata Besser [20]

Genista mayeri Janka [20]

Genista oligosperma (Andrae) Simonk. [20]

Genista ovata Waldst. & Kit. [20]

Genista patula M. Bieb. [20]

Genista perreymondii Loisel. [20]

Genista ptilophylla Spach [20]

Genista pubescens O. Lang [20]

Genista rupestris Schur [20]

Genista sibirica L. [20]

Genista tanaitica P.A. Smirn. [20]

Genista tenuifolia Loisel. [8]

Genista tinctoria var. *campestris* (Janka) Morariu [20]

Genista tinctoria var. *oligosperma* Andrae [20]

Genista tinctoria subsp. *Oligosperma* [20]

Genista virgata Willd. [20]

Genistoides elata Moench [20]

Genistoides tinctoria (L.) Moench [20]

Janowiec barwierski należy do gatunków charakteryzujących się dużą zmiennością pod względem morfologii. Jest to krzew, rzadziej półkrzew, pozbawiony kolców bądź ciernisty.

Dorasta do 30-60, a nawet 110 cm wysokości. Wzniesione pędy wyrastają z krótkiego pieńka. Gałązki są rozestlane, różgowate i miotlasto rozgałęzione, pokryte jedwabistymi włoskami bądź nagie. Liście są pojedyncze, lancetowate lub eliptyczne, u nasady klinowato zwężone, na szczycie zastrzone, krótkoogonkowe. Powierzchnia górna blaszki liściowej jest ciemnozielona i naga, pod spodem zaś jaśniejsza i pokryta włoskami. Przylistki są drobne, sztydłaste. Kwiatostany mają postać gron umiejscowionych na szczytach pędów, złożonych z żółtych kwiatów długości ok. 12-18 mm. Kielich płatkodwuwargowy, nagi lub owłosiony na brzegu, posiada górną wargę dwu-, a dolną 3-ząbkową. Zawsze naga łódeczka ma długość żagielka. Owoc stanowi równowąski, nagi i czarny strąk, zawierający od 6 do 10 brunatnych nasion (ryc. 6) [9,10,14-17,20].

Stanowiskami janowca barwierskiego są widne, suche lasy liściaste i iglaste, zarośla i słoneczne wzgórza, rzadziej łąki. Rozpowszechniony w Europie środkowej i wschodniej, a także w Azji, od Turcji i Iranu po Syberię. W Polsce występuje na większej części niżu oraz w południowej części kraju. Gatunek rzadki w Polsce północno-zachodniej [9,10,16,17,20].



Ryc. 6. *Genista tinctoria* L. [24]

Piśmiennictwo

1. Cronquist A., An Integrated System of Classification of Flowering Plants, Columbia Univ. Press, New York 1981.
2. De Castro O., Cozzolino S., Jury S.L., Caputo P., Molecular relationships in *Genista* L. Sect. *Spartocarpus* Spach (Fabaceae), Plant. Syst. Evol. 231 (2002) 91-108.
3. Harborne J.B., Chemosystematics of the *Leguminosae*. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe *Genisteeae*, Phytochemistry 8 (1969) 1449-1456.
4. Hegi G., Illustrierte Flora von Mittel-Europa, Univ. Press, München, 1931.
5. http://erick.dronnet.free.fr/belles_fleurs_de_france, 22.05.2006
6. <http://nature.jardin.free.fr>, 22.05.2006
7. <http://web.tiscali.it/florasicula>, 22.05.2006
8. <http://www.plantpress.com/plant-encyclopedia>, 22.05.2006
9. <http://www.pfaf.org/database>, 22.05.2006
10. <http://www.ars-grin.gov>, 22.05.2006
11. <http://www.calflora.net/bloomingplants>, 22.05.2006
12. <http://www.dpi.vic.gov.au/dpi/nreninf.nsf>, 22.05.2006
13. http://www.jeantosti.com/fleurs2/Genista_sagittalis1, 22.05.2006
14. <http://www.atlas-roslin.pl>, 22.05.2006
15. <http://www.iop.krakow.pl/ias>, 22.05.2006
16. <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/b/brodye72.html>, 22.05.2006
17. Szafer W., Pawłowski B., Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych, PWN, Warszawa, 1959.
18. Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., Flora Europaea, Univ. Press, Cambridge, 1964.
19. van Rensen I., Veit M., van Rensen U.R., Cantó P., Vogt H., Greinwald R., Czygan F.Ch., Line-scatter plots in chemotaxonomy of *Genista* L. Section *Spartenoides* SPACH in Western Europe, Biochem. System. Ecol. 27 (1999) 687-708.
20. www.ildis.org/LegumeWeb, 22.05.2006
21. www.rz.uni-karlsruhe.de/~db50/FOTO - Archiv/Genista%2520aethnensis, 22.05.2006
22. www.rz.uni-karlsruhe.de/~db50/FOTO - Archiv/Genista%2520germanica, 22.05.2006
23. www.rosebay.org/chapterweb/images/idm-genista, 22.05.2006
24. www.kulak.ac.be/facult/wet/biologie, 22.05.2006
25. www.weedmapper.org/weed%2520photos/staff/broom/french, 22.05.2006

2. ZWIĄZKI FLAWONOIDOWE ORAZ ALKALOIDY CHINOLIZYDYNOWE ZIDENTYFIKOWANE DOTYCHCZAS W BADANYCH GATUNKACH

Badania naukowe nad rodzajem *Genista* można sklasyfikować pod kątem prac, w których analizowane gatunki traktowane są jako obiekty modelowe do prowadzenia doświadczeń o charakterze „ogólnobiologicznym” [5,30,31,33,34] oraz eksperymenty czysto fitochemiczne zmierzające do ustalenia składu wybranych roślin, w zakresie wtórnych metabolitów [1-4,6-33].

W pierwszej grupie badań, gatunki z rodzaju *Genista*, ze względu na swoiste relacje z mikroorganizmami symbiotycznymi, stosuje się w eksperymentach mających na celu wyjaśnienie wzajemnych powiązań między organizmami roślinnymi a środowiskiem [5,18,30,31,33]. Ponadto na podstawie doświadczeń z udziałem janowców ustalono wpływ gatunków ruderalnych na lokalne ekosystemy [5,31].

W wyniku badań fitochemicznych, w prawie wszystkich gatunkach z rodzaju *Genista* stwierdzono bardzo bogatą frakcję flawonoidową (w tym izoflawony) [2,5,6,9,12,14-18,20,21,23,24,27,29-33], alkaloidy chinolizydynowe [2,3,6,9,12-18,20,21,23-25,27-29,32] kumaryny, fenylopropanoidy, antrachinony, fenolokwasy, terpenoidy [5,18,30,31,33] oraz lektyny [1]. Ustalono, że zasadnicza aktywność biologiczna janowców warunkowana jest przede wszystkim obecnością określonych alkaloidów chinolizydynowych (m.in. zwolnienie akcji serca, obniżenie ciśnienia krwi, silna aktywność hepatotoksyczna) oraz izoflawonów (aktywność fitoestrogena) [5,18,30,31,33]. Ze względu na powyższe oraz zasadniczy cel projektu habilitacyjnego, w niniejszym rozdziale postanowiono ograniczyć się do omówienia aktualnego stanu wiedzy w zakresie składu chemicznego badanych gatunków, uwzględniając jedynie połączenia o charakterze bioflawonoidów oraz alkaloidów chinolizydynowych.

Alkaloidy chinolizydynowe

Pierwsze analizy fitochemiczne roślin z rodzaju *Genista* wiązały się z obecnością w janowcach bogatego zespołu alkaloidów chinolizydynowych. Począwszy od lat trzydziestych ubiegłego stulecia z poszczególnych gatunków izolowano i identyfikowano kolejne alkaloidy, stosując dostępne techniki chromatograficzne oraz spektroskopowe [3,4,7,8,10,11,13,18,19,21,22,24-26,28]. Dotychczasowe wyniki badań nad alkaloidami chinolizydynowymi, w objętych projektem habilitacyjnym janowcach, przedstawiono w tabeli 1.

W toku prowadzonych analiz ustalono skład jakościowy oraz ilościowy roślin z rodzaju *Genista* w obrębie frakcji alkaloidowych. Ponadto stwierdzono, że omawiane związki są odpowiedzialne nie tylko za aktywność farmakologiczną i działanie toksyczne janowców, ale mogą być również traktowane jako markery chemotaksonomiczne rodzaju *Genista*. Fakt ten dotyczy w szczególności pochodnych estrowych retaminy, cytyzyny oraz anagiry, spotykanych jedynie sporadycznie w niewielu gatunkach janowców [5,30,31,33,34].

Bioflawonoidy

Za fitoestrogenne działanie wyciągów sporządzonych z janowców odpowiedzialna jest bardzo bogata frakcja bioflawonoidowa [18]. Należą do niej związki z grupy prostych izoflawonów (pochodne genisteiny, daidzeiny oraz formononetyny), flawonów (pochodne luteoliny i apigeniny) oraz sporadycznie flawonoli (pochodne kwercetyny i kemferolu). Omawiane

połączenia występują w janowcach w postaci aglikonów, O- i C-glikozydów (mono- i wielocukry) oraz estrów [2,5,6,9,12,15-18,20,21,23,24,27,29-33].

Podobnie jak w przypadku frakcji alkaloidowych, pewne bioflawonoidy mogą być traktowane jako markery chemotaksonomiczne rodzaju *Genista* [5,30,31,33].

Najszerzej zakrojone doświadczenia fitochemiczne dotyczące zespołu flawonoidów w janowcach prowadzili Harborne i wsp. [14] oraz van Rensen i wsp. [30,31,33]. W wyniku przeprowadzonych badań ustalili, że w przeciwieństwie do alkaloidów, zmienność w obrębie składu frakcji bioflawonoidowych, w rodzaju *Genista*, ma charakter zarówno międzygatunkowy jak wewnątrzgatunkowy i zależy bezpośrednio od warunków klimatycznych oraz lokalnego ekosystemu, w którym występują rośliny [30,31,33]. Stwierdzenie to dotyczy zarówno składu jakościowego jak i ilościowego zespołu bioflawonoidów obecnych w rodzaju *Genista*. Wykazano również specyfikę występowania poszczególnych izoflawonów oraz flawonów w różnych częściach morfologicznych badanych roślin. W tym wypadku gatunkami przebadanymi wyjątkowo wnikliwie były: janowiec barwierski (*G. tinctoria*) i janowiec etneński (*G. aethnensis*) [5,14,30,31,33,34].

Szczegółowe badania odnośnie frakcji flawonoidowych występujących w janowcach objętych projektem habilitacyjnym przedstawiono w tabeli 2, uwzględniając dane źródłowe dotyczące analiz poszczególnych surowców.

Tab. 1. Dotychczasowe wyniki badań nad alkaloidami chinolizydynowymi w wybranych gatunkach rodzaju *Genista*.

Tab. 1. *Quinolizidine alkaloid fractions in the selected Genista plants.*

Gatunek	Alkaloidy	Surowiec	Piśmiennictwo
<i>Genista tinctoria</i>	cytyzyna, metylocytyzyna, retamina, sparteina, izosparteina, lupanina, anagiryne, tinktoryna, rombifolina, tetrahydro-rombifolina, baptifolina	nasiona, części nadziemne, liście	[4,8,10-12,15,18, 19,22,24,27,28]
<i>Genista sagittalis</i>	cytyzyna, retamina, sparteina, lupanina, lusitanina	części nadziemne	[4,8,10,11,19,24, 26]
<i>Genista germanica</i>	cytyzyna, lupanina, sparteina, izosparteina, anagiryne, sofokarpina	części nadziemne	[4,8,10,13,21,24]
<i>Genista radiata</i>	retamnina, sparteina, anagiryne	części nadziemne, korzenie	[4,7,8,11,18,24]
<i>Genista aethnensis</i>	cytyzyna, metylocytyzyna, retamina, sparteina, izosparteina, anagiryne	części nadziemne, liście, kwiaty	[3,8,10,18,24,25]
<i>Genista monospeulana</i>	cytyzyna, metylocytyzyna, retamina, sparteina, izosparteina, anagiryne	nasiona, liście, części nadziemne	[4,8,18,19,24]

Tab. 2. Dotychczasowe wyniki badań frakcji flawonoidowych w wybranych gatunkach rodzaju *Genista*.
 Tab. 2. *Flavonoid fractions in the selected Genista plants.*

Gatunek	Flawonoidy	Surowiec	Piśmiennictwo
<i>Genista tinctoria</i>	genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny, 7-O-diglukozyd genisteiny, 5-metoksy-genisteina, daidzeina, daidzina, pueraryna, luteolina, 7-O-glukozyd luteoliny, 5,7-O-diglukozyd luteoliny, 7-O-glukozyd apigeniny	części nadziemne, liście, nasiona	[14,16,20,23,24, 29-32]
<i>Genista sagittalis</i>	genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny, 7-O-diglukozyd genisteiny, daidzeina, daidzina, luteolina, 7-O-glukozyd luteoliny, 7-O-glukozyd apigeniny, apigenina	części nadziemne, liście	[5,14,16,17, 30-33]
<i>Genista germanica</i>	genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny, 7-O-diglukozyd genisteiny, daidzeina, daidzina, pueraryna, luteolina, 7-O-glukozyd luteoliny, 7-O-glukozyd apigeniny	części nadziemne, liście	[5,14,21,30-33]
<i>Genista radiata</i>	genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny, 7-O-diglukozyd genisteiny, daidzeina, daidzina, pueraryna, 7-O-glukozyd luteoliny, kemferol	części nadziemne, liście	[5,14,16,23,30, 31,33]
<i>Genista aethnensis</i>	genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny, 7-O-diglukozyd genisteiny, 5-metoksy-genisteina, daidzeina, daidzina, pueraryna, formononetyna, 7-O-glukozyd luteoliny, tamaryksatyna, kemferol	części nadziemne, liście, nasiona	[2,5,6,9,12, 14-16,18,20,23, 24,29-33]
<i>Genista monosperulana</i>	genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny, 7-O-diglukozyd genisteiny, daidzeina, daidzina, luteolina, 7-O-glukozyd apigeniny, apigenina	części nadziemne, liście	[5,14,16,18, 30-33]

Piśmiennictwo

1. Antonyuk V.A., Lutsik M.D., The annual cycle of lectin activity specific to carbohydrates of the D-galactose group in perennials, Ukr. Bot. Zh. 43 (4) (1986) 21-25.
2. Arstamonova N.A., Nikonov G.K., Nusipbekova K., Nosulchak V.A., Flavonoids from *Genista aethnensis*, Khim. Prir. Soedin. 5 (1987) 756-757.
3. Bankovskij A.I., Frolova V.I., Zheleznova E.S., Chemical study of the alkaloids of *Genista aethnensis*, Med. Prom. S.S.S.R. 11 (12) (1957) 23-27.
4. Bernasconi R., Gill St., Steinegger E., Chemotaxonomic-phylogenetic classification of the genus *Genista* based on the determination of alkaloids. I. Quantitative distribution of alkaloids in 26 species and varieties of *Genista*. 8. Alkaloids of the *Leguminosae*, Pharm. Acta Helv. 40 (4) (1965) 246-256.
5. De Castro O., Cozzolino S., Jury S.L., Caputo P., Molecular relationships in *Genista* L. Sect. *Spartocarpus* Spach (Fabaceae), Plant. Syst. Evol. 231 (2002) 91-108.
6. Faugeras G., Paris R.R., Alkaloids and polyphenols from legumes. XVI. *Genista aethnensis* flavonoids. Isolation of genistoxide, Plant. Med. Phytother. 3 (1) (1969) 20-27.
7. Faugeras G., Paris R.R., Alkaloids of *Genista radiata* – separation of retamine and *d*-sparteine, Compt. Rend. 259 (25) (1964) 4864-4864.
8. Faugeras G., Paris R., Chemotaxonomy of *Leguminosae*, *Genista*, Mem. Soc. Bot. Fr. 2 (1966) 75-101.
9. Faugeras G., Paris R., Rene R., Alkaloids and polyphenols from legumes. XVI. *Genista aethnensis* flavonoids. Isolation of genistoxide, Plant. Med. Phytother. 3 (1) (1969) 20-27.
10. Faugeras G., Paris R., The alkaloid content of some *Genista* species and other legumes, Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem., Geol. Biol. 3 (1966) 235-236.
11. Gill St., Steinegger E., Occurrence of alkaloids in *Genista* species, Pharm. Acta Helv. 39 (9) (1964) 565-574.
12. Gulubov A., Venkov A., Alkaloid composition of *Genista tinctoria*, Nauch. Tr., Plovdivski Univ., Mat., Fiz., Khim., Biol. 11(1) (1973) 87-89.
13. Hajkova T., Homola V., Alkaloids of *Genista germanica*, Cesk. Farm. 13 (4) (1964) 181-183.
14. Harborne J.B., Chemosystematics of the *Leguminosae*. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe *Genisteae*, Phytochemistry 8 (1969) 1449-1456.
15. Knoefel D., Schuette H.R., Horst R., Quinolizidine alkaloids. Constitution and configuration of tinctorine from *Genista tinctoria*, J. Prakt. Chem. 312 (5) (1971) 887-895.
16. Nakov N., Akhtardzhiev Kh., Flavonoid content of some representatives of the genus *Genista* in Bulgaria, Probl. Farm. 10 (1982) 46-52.
17. Nakov N., Akhtardzhiev Kh., Flavonoids in *Genista sagittalis*, Pharmazie 38 (3) (1995) 202.
18. Nakov N., Biologically active substances in some representatives of the genus *Genista* L., Farmatsiya 35 (1) (1985) 19-22.
19. Nakov N., Boichinov As., The alkaloid content of *Genista* species in Bulgaria, Farmatsiya, 17 (3) (1967) 34-37.
20. Palamarchuk A.S., Bondarenko V.E., Antimicrobial activity and chemical composition of *Genista tinctoria*, Rastit. Resur. 12 (2) (1976) 229-232.

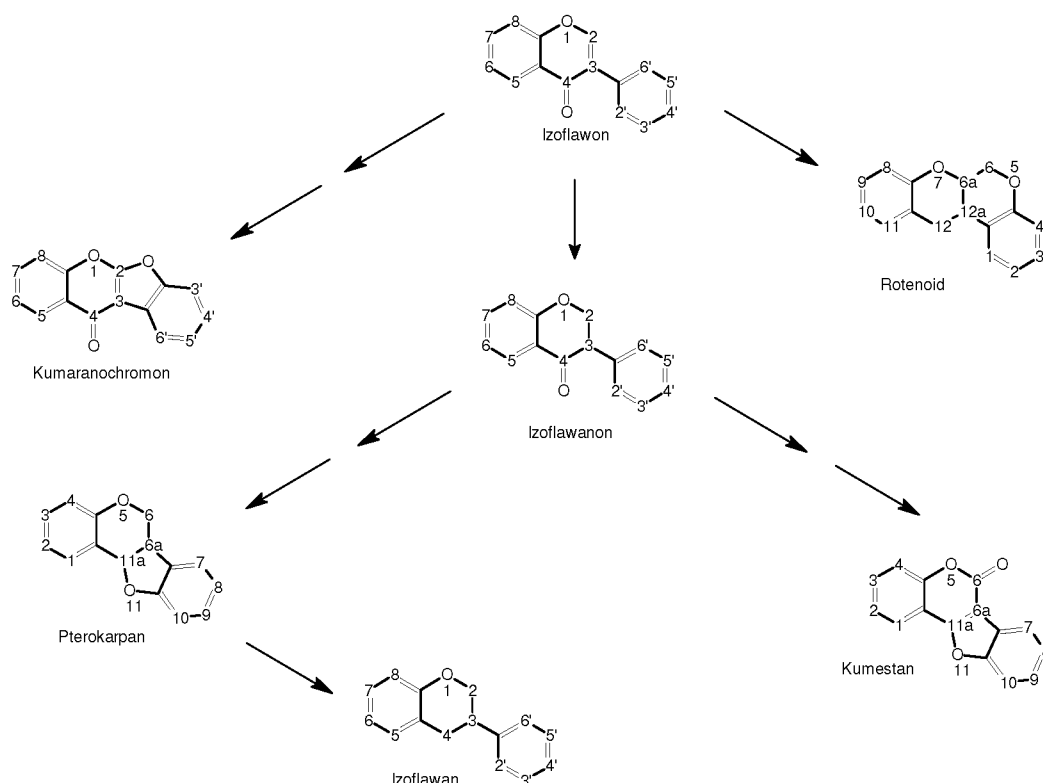
21. Paris R.R., Faugeras G., Flavonoids and alkaloids of *Genista anglica* and *Genista germanica*, Compt. Rend. 260 (14) (1965) 4105-4108.
22. Przyborowska M., Soczewiński E., Waksmundzki A., Gólkiewicz W., Investigations on the alkaloids from *Genista tinctoria*, Diss. Pharm. Pharmacol. 19 (3) (1967) 289-295.
23. Rainova L., Gakhniyan R., Changes of the resistance of the capillary walls in rats under the effect of flavonoids, isolated from *Genista* L (*Leguminosae*), Farmatsiya 28 (4) (1978) 27-28.
24. Salatino A., Gottlieb O.R., Chemosystematics and phylogeny. Part XIX. Quinolizidine alkaloids as systematic markers of the *Genisteae*, Biochem. Syst. Ecol. 9 (4) (1981) 267-273.
25. Steinegger E., Bernasconi R., The biogenesis of alkaloids in *Genista aemensis*, Pharm. Acta Helv. 39 (8) (1964) 480-493.
26. Steinegger E., Wicky K., Leguminosae alkaloids. X. Lusitanine, a new legume alkaloid, Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem., Geol. Biol. 3 (1966) 255-257.
27. Tosun F., Tanker M., Tosun A., Ozden T., Alkaloids of *Genista tinctoria* L. growing in Turkey, Pharmacia 31 (1) (1991) 5-8.
28. Tsarev M.V., Investigation of the cytosine content in the dyer's broom (*Genista tinctoria*), Farmatsiya 6 (1944) 21-22.
29. Ulubelen A., Cetin E.T., Guran A., Iyengar M.A., Flavonoid compounds of *Genista tinctoria*, 34 (2) (1971) 258-259.
30. van Rensen I., Veit M., van Rensen U.R., Cantó P., Vogt H., Greinwald R., Czygan F.Ch., Line-scatter plots in chemotaxonomy of *Genista* L. Section *Spartenoides* SPACH in Western Europe, Biochem. System. Ecol. 27 (1999) 687-708.
31. van Rensen I., Veit M., Simultaneous determination of phenolics and alkaloids using ion exchange chromatography for sample preparation, Phytochem. Anal. 6 (1995) 121-124.
32. van Rensen I., Veit M., Canto P., Greinwald R., Roehner U., Czygan F.C., Isoflavonoids as chemotaxonomic markers in the genus *Genista*, Colloq. – Inst. Natl. Rech. Agron. 69 (1995) 313-314.
33. van Rensen I., Veit M., Czygan F.C., Environmental and artificial influences on the accumulation of phenolics in *Genista* species of the section *Spartioides*, Polyphenol Commun. 96 (1996) 399-400.
34. Wink M., Mohamed G.I.A., Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene, Biochem. System. Ecol. 31 (2003) 897-917.

3. BIOSYNTETA ZWIĄZKÓW ISOFLAWONOIDOWYCH

Izoflawonoidy są grupą wtórnych metabolitów roślinnych związanych biogenetycznie ze szlakiem fenylopropanoidowym. Podstawowy szkielet izoflawonoidów tworzy 15-węglowy układ C₆-C₃-C₆ 1,2-difenylopropanu, w odróżnieniu od flawonoidów, w przypadku których rdzeń cząsteczki stanowi 1,3-difenylopropan [4,12-14,28,45,53].

W porównaniu do flawonoidów, izoflawonoidy należą do związków mniej rozpowszechnionych w świecie roślinnym. Ich występowanie ogranicza się prawie wyłącznie do roślin dwuliściennych, przede wszystkim zaś do rodziny *Fabaceae*, w obrębie której stwierdzono obecność 95% związków tej klasy [4,12-14,28,45,53]. Izoflawonoidy są spotykane rzadziej w takich rodzinach jak: *Apocynaceae*, *Compositae*, *Meliaceae*, *Myristicaceae*, *Pinaceae*, *Polygalaceae* i *Rosaceae* [12]. Jak dotąd sklasyfikowano około 870 połączeń izoflawonoidowych, czyli ponad czterokrotnie mniej niż flawonoidów (ponad 4000 związków) [4,12,28].

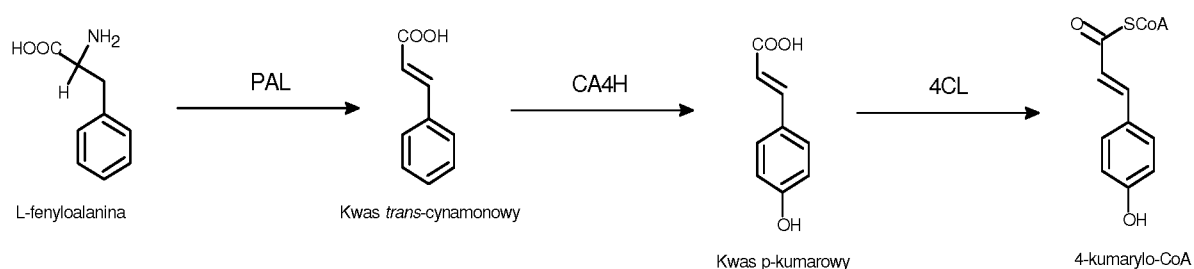
Podstawowy szkielet izoflawonu może ulegać, na drodze biochemicznej, licznym modyfikacjom, prowadzącym do powstania pterokarpanów, izoflawanów, kumaranochromonów, rotenoidów i kumestanów, stanowiących, obok izoflawonów, podstawowe klasy połączeń izoflawonoidowych [4,12-14,28,45,53].



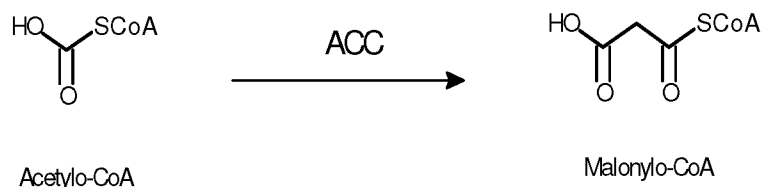
Pierścień A 15-węglowego szkieletu izoflawonoidów powstaje na skutek kondensacji typu głowa-ogon (*head-to-tail condensation*) 3 cząsteczek malonylo-CoA, pierścień B wywodzi się natomiast z fenylopropanowej jednostki 4-kumarylo-CoA [4,5,12-14,28,44,45,53]. W wyniku, katalizowanej enzymatycznie, reakcji kondensacji, w której bierze udział jedna

cząsteczka 4-kumarylo-CoA oraz 3 cząsteczki malonylo-CoA, powstaje chalcon – pierwszy 15-węglowy prekursor związków izoflawonoidowych [4,5,12-14,28,44, 45,51,53].

Jednostka 4-kumarylo-CoA wywodzi się z aminokwasu fenyloalaniny. Na drodze deaminacji, katalizowanej przez amoniolazę L-fenyloalaniny (PAL), powstaje kwas *trans*-cynamonowy. Związek ten ulega następnie hydroksylacji w pozycji 4, której produktem jest kwas p-kumarowy. Drugą z wymienionych reakcji katalizuje 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego (CA4H), enzym należący do klasy hydroksylaz aromatycznych, związanych z cytochromem P450. „Aktywny kumaran”, czyli 4-kumarylo-CoA, powstaje w wyniku ATP-zależnej reakcji katalizowanej przez ligazę 4-kumarylo-CoA (4CL) [4,5,12-14,17,28,33,35, 44,45,51,53].

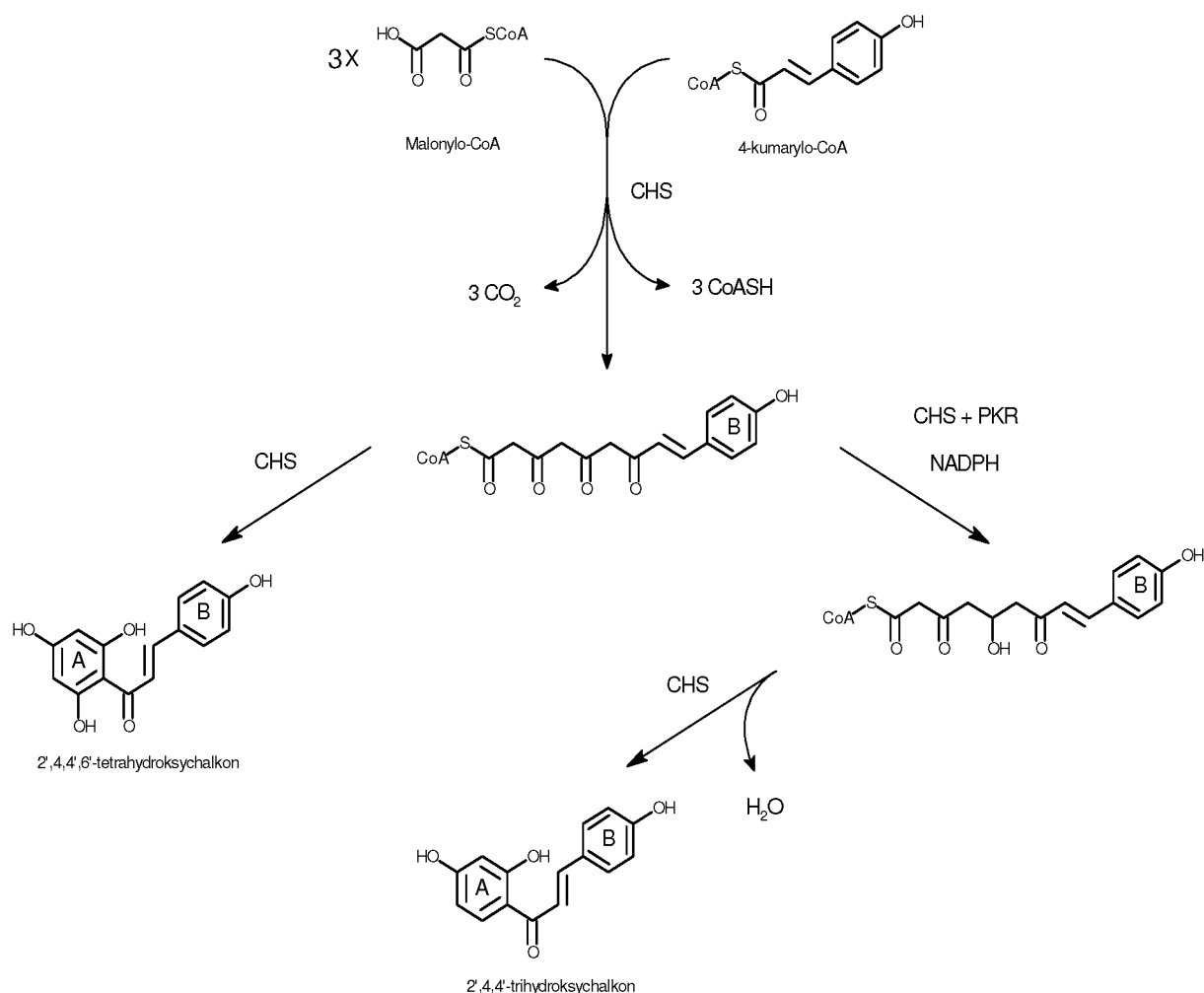


Cząsteczki malonylo-CoA, biorące udział w tworzeniu pierścienia A izoflawonoidów, są produktem ATP-zależnej reakcji przyłączenia dwutlenku węgla do „aktywnego octanu”, zachodzącej w obecności karboksylazy acetylo-CoA (ACC) [12,13,53].

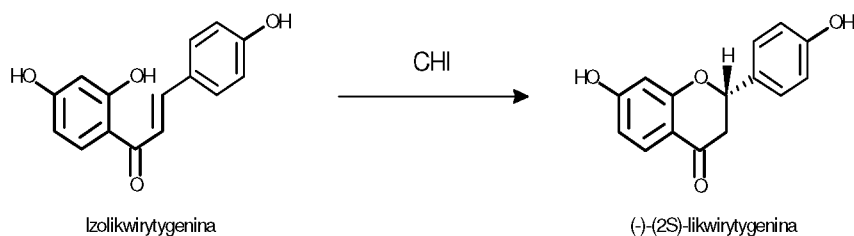


Powstałe cząsteczki 4-kumarylo-CoA oraz malonylo-CoA stanowią substrat dla syntazy chalconowej (CHS), homodimerycznej syntazy poliketydowej, katalizującej reakcje addycji, kondensacji i cyklizacji prowadzące do powstania 2,4,4',6'-tetrahydroksychalkonu, będącego prekursorem zarówno 5-hydroksyflawonoidów, jak i 5-hydroksyzioflawonoidów [4,5,12-14, 28,44,45,51,53].

Szereg związków o budowie izoflawonoidowej nie posiada grupy hydroksylowej w pozycji 5, odpowiadającej atomowi węgla 6' chalkonu. Biosynteza 6'-deoksychalkonów jest związana z obecnością enzymu - reduktazy chalconowej (CHR), określanej również mianem reduktazy poliketydowej (PKR). CHR katalizuje NADPH-zależną reakcję redukcji, prowadzącą do utraty grupy hydroksylowej w postaci cząsteczki wody na etapie poliketydu, przed utworzeniem pierścienia A chalkonu [4,5,12-14,28,44-46,51,53].



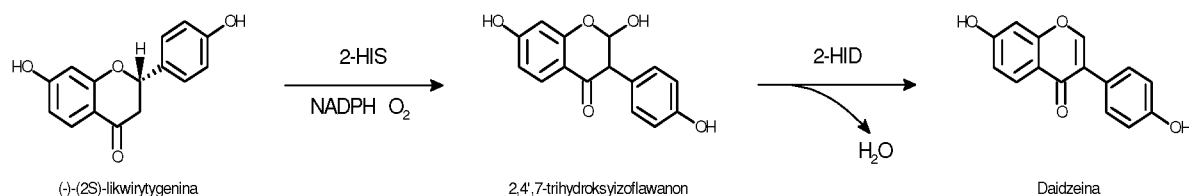
Powstające w tkankach roślinnych chalkony ulegają często przekształceniu w swoją izomeryczną, bardziej stabilną formę – flawanony. Proces izomeryzacji chalkonu jest stereospecyficzny i prowadzi do powstania (-)-(2S)-flawanonu na drodze wewnątrzcząsteczkowej *cis*-addycji grupy hydroksylowej w pozycji 2' do podwójnego wiązania w mostku triwęglowym łączącym pierścienie fenyłowe. Katalizatorem opisywanej reakcji jest izomeraza chalkonowa (CHI), wykazująca u roślin z rodziny *Fabaceae* powinowactwo zarówno do 6'-deoksy-, jak i 6'-hydroksychalkonów [4,5,12-14,28,44,45,51,53].



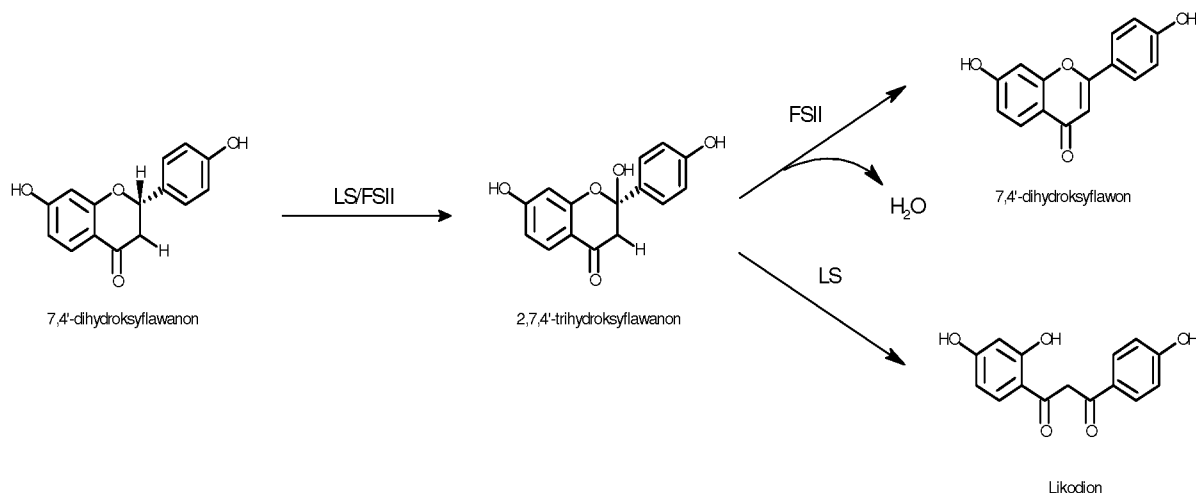
(-)-(2S)-flawanon podlega dalszym przemianom biochemicznym, prowadzącym do powstania izoflawonu. Biosynteza izoflawonu przebiega dwuetapowo i wymaga obecności kompleksu enzymatycznego zwanego syntazą izoflawonową (IFS) [4,5,12-14,25,28,44,45,

51,53]. Pierwszy etap obejmuje hydroksylację (-)-(2S)-flawanonu w pozycji C-2, sprzężoną z migracją arylu, drugi zaś dehydratację powstałego 2-hydroksyizoflawnonu do izoflawnonu [4,12,14,29,49,53].

Za NADPH- i O₂-zależną reakcję hydroksylacji (-)-(2S)-flawanonu w pozycji 2 odpowiedzialna jest syntaza 2-hydroksyizoflawnonowa (2-HIS), mikrosomalna hydroksylaza związana z rodziną białek cytochromu P450. Katalizatorem reakcji dehydratacji 2-hydroksyizoflawnonu jest natomiast znajdująca się poza frakcją mikrosomalną dehydrataza 2-hydroksyizoflawnonowa (2-HID). Obydwa wymienione enzymy, tzn. 2-HIS oraz 2-HID określane są łącznie mianem syntazy izoflawnonowej (IFS), kluczowego kompleksu enzymatycznego szlaku izoflawnonoidowego [2,4,12,14,27,29,48,49,53].



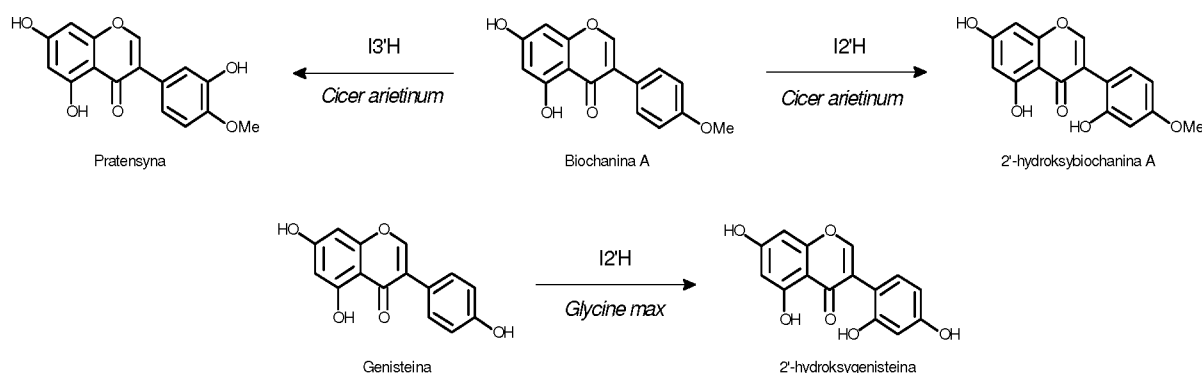
Szlaki biosyntezy flawonoidów i izoflawnonoidów rozdzielają się na etapie (-)-(2S)-flawanonu. Związek ten może ulegać hydroksylacji w pozycji C-2 nie związanej z migracją arylu, katalizowanej przez enzymy określane wspólnie mianem 2-hydroksylazy flawnonowej (F2H) [1,2,4,12,14,43]. Utworzony 2-hydroksyflawnon podlega następnie przemianom, prowadzącym do powstania flawonów (na skutek dehydratacji, w przypadku kiedy reakcja przebiega w obecności syntazy flawonowej II - FSII), lub retrochalkonów (obejmujących otwarcie pierścienia hemiacetalowego z udziałem syntazy likodionu – LS). Zarówno FSII, jak i LS należą do rodziny białek cytochromu P450 [1,2,4,12,14,43].



Podstawowy szkielet izoflawnonu może podlegać dalszym przemianom biochemicznym, prowadzącym do powstania połączeń o bardziej złożonej strukturze.

W wyniku hydroksylacji pierścienia aromatycznego B w pozycji 2' powstają związki stanowiące ogniwo łączące proste izoflawnony z izoflawnonoidami o bardziej złożonej strukturze, jak pterokarpiny i kumestany [4,5,12,13,14,22,28,30,43-45,53]. Reakcję katalizuje 2'-hydro-

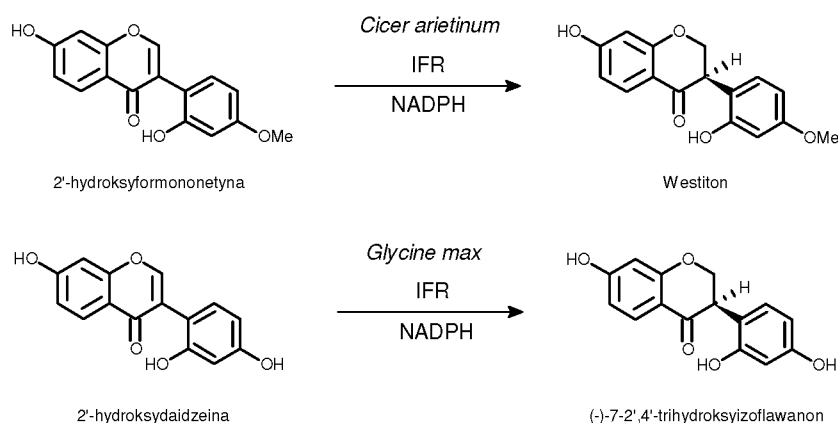
ksylaza izoflawonowa (I2'H), należąca do klasy hydroksylaz aromatycznych związanych z cytochromem P450 [1,2,4,12,22,30,35,43,48]. Niektóre odmiany I2'H mogą charakteryzować się specyficznością wobec substratu, czego przykładem jest enzym wyizolowany z *Cicer arietinum*, przekształcający w 2'-hydroksypochodne jedynie 4'-O-metoksyizoflawony, nie wykazujący natomiast aktywności wobec prostych izoflawonów, takich jak daidzeina i genisteina. 2'-hydroksylaza izoflawonowa otrzymana z soi (*Glycine max*), rośliny nie syntetyzującej 4'-metoksyizoflawonów, nie wymaga obecności w substracie grupy 4'-metoksylowej. Enzymy obecne we frakcji mikrosomalnej *Cicer arietinum* katalizowały hydroksylację 4'-metoksyizoflawonu zarówno w pozycji 2', jak i 3', nie zaobserwowano natomiast powstawania 2',3'-dihydroksy-pochodnych. Nie jest do końca wyjaśnione, czy w reakcje hydroksylacji pierścienia B izoflawonów zaangażowany jest jeden, czy więcej enzymów [12,22,30].



Dalszy etap biosyntezy pterokarpanów obejmuje redukcję powstałych 2'-hydroksypochodnych do izoflavanonów, przy czym wykazano, że obecność grupy hydroksylowej w pozycji 2' jest niezbędna do przebiegu wspomnianej reakcji. Redukcja zachodzi w obecności NADPH i enzymu - reduktazy izoflawonowej (IFR) [4,5,12-14,23,44,45,].

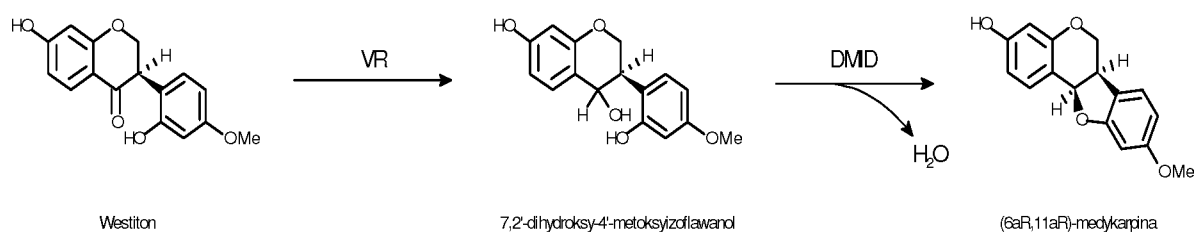
Podobnie jak 2'-hydroksylaza izoflawonowa, również IFR może charakteryzować się pewną specyficznością substratową. Odmiana IFR pochodząca z *Cicer arietinum* wymaga do przebiegu reakcji, oprócz grupy hydroksylowej w pozycji 2', również obecności podstawnika 4'-metoksyloвого lub 4,5-metylenodioksylowego w pierścieniu B. Zawężenie grupy metabolizowanych związków do 4'-metoksy- i 4,5-metylenodioksypochodnych nie dotyczy natomiast reduktazy izoflawonowej wyizolowanej z soi (*Glycine max*), rośliny, która jak już wspomniano, nie produkuje 4'-metoksyizoflawonoidów [12].

Redukcja wiązania podwójnego w heterocyklicznym pierścieniu izoflawonów prowadzi do powstania centrum chiralnego na atomie C 3. Reakcja katalizowana przez roślinne IFR jest stereospecyficzna pod względem produktu, prowadzi ona bowiem zawsze do powstania izoflavanonu o konfiguracji (3R)-(-) [12,47].

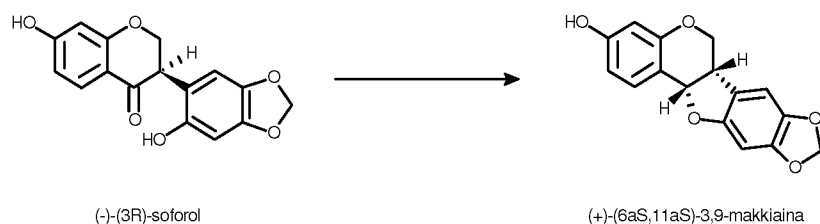


Przekształceniem prowadzącym bezpośrednio do powstania pterokarpanów jest utworzenie mostka tlenowego pomiędzy atomami węgla 4' i 2' izoflwanonu, katalizowane przez kompleks enzymatyczny nazwany syntazą pterokarpanową [4,9,12-14,23,28,45,53]. Również w przypadku tego enzymu zaobserwowano międzygatunkowe różnice dotyczące specyficzności substratowej. Syntaza pterokarpanowa wyizolowana z *Medicago sativa* wymaga bezwzględnie obecności grupy metoksyowej w pozycji 4', w przeciwieństwie do analogicznego enzymu obecnego w soi (*Glycine max*) [12].

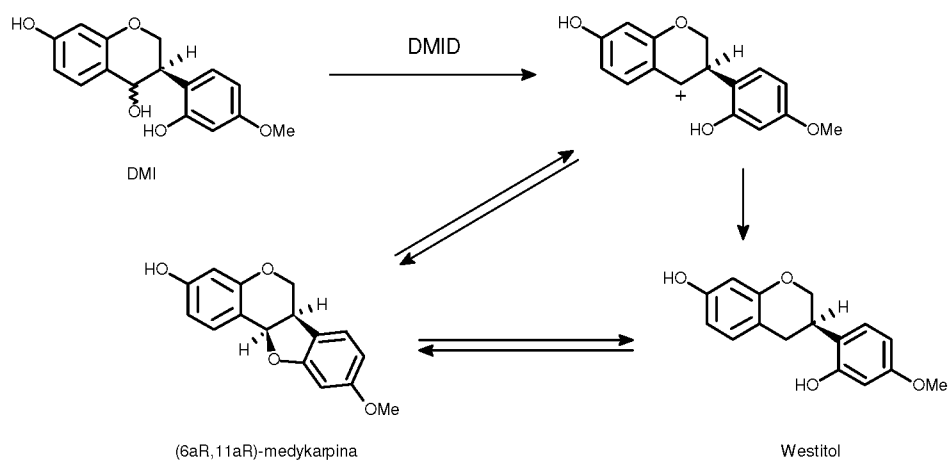
Badania wykazały, że na kompleks syntazy pterokarpanowej *Medicago sativa* składają się dwa enzymy [4,12,14,23]. Pierwszym z nich jest reduktaza izoflwanonowa (nazwana w przypadku *Medicago sativa* reduktazą westitonu – VR), przekształcająca izoflwanon w odpowiadający mu izoflwanol (w *Medicago sativa* jest to redukcja westitonu do 7,2'-dihydroksy-4'-metoksyizoflwanolu – DMI). W kolejnym etapie 7,2'-dihydroksy-4'-metoksyizoflwanol ulega enzymatycznej dehydratacji pod wpływem dehydratazy DMI (DMID), prowadzącej do powstania pterokarpanu – (-)-(6aR,11aR)-medykarpiny [4,12,14,23]. Obydwie wymienione reakcje charakteryzuje stereospecyficzność: reduktaza westitonu wykazuje powinowactwo tylko do izoflwanonu o konfiguracji 3R, dehydrataza DMI natomiast katalizuje powstawanie jedynie izomeru (-)-(6aR,11aR)-medykarpiny [12].



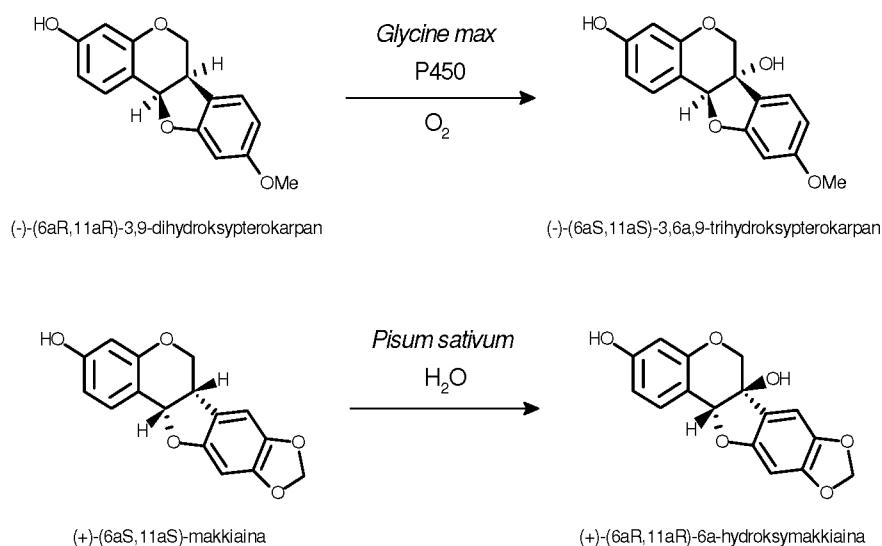
Pterokarpany obecne w grochu (*Pisum sativum*) stanowią wyjątek od opisanych powyżej prawidłowości dotyczących konfiguracji przestrzennej, jako że wykazują one konfigurację (+), podczas gdy substratem wykorzystywanym do ich biosyntezy jest (-)-(3R)-flawanon. Enzymy obecne w grochu katalizują przekształcenie (-)-(3R)-soforolu w (+)-(6aS,11aS)-makkiainę. Do zmiany enancjomerów dochodzi najprawdopodobniej na etapie izoflwanonu. Faktu tego nie potwierdzono jednak badaniami enzymatycznymi [12,13,28].



Związkami spokrewnionymi z pterokarpami pod względem budowy chemicznej są izoflawany. Wykazano, że w *Medicago sativa* medykarpa może ulegać przekształceniu do izoflwanu westitolu i odwrotnie. Zaproponowany dla wyjaśnienia tego zjawiska mechanizm dehydratacji katalizowanej przez DMID obejmuje utworzenie jonu karboniowego jako związku pośredniego w biosyntezie pterokarpów, izoflawanów i kumestanów [4,12,28].



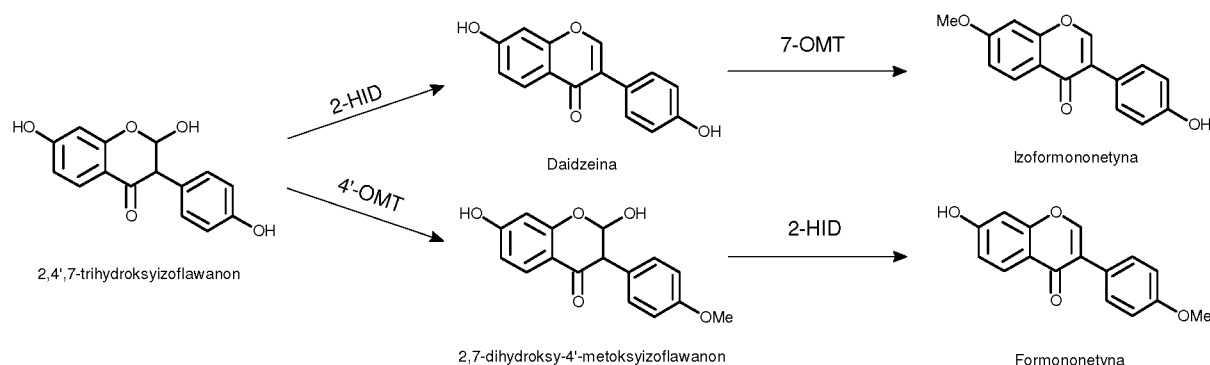
Szereg izoflawonoidów o budowie pterokarpanowej posiada grupę hydroksylową w pozycji 6a. Przykład stanowią gliceoliny syntetyzowane w soi (*Glycine max*), bądź obecna w grochu (*Pisum sativum*) pisatyna. Enzymem katalizującym powstawanie 6a-hydroksypterokarpów jest 6a-hydroksylaza pterokarpanowa (P6aH), należąca do białek cytochromu P450 związanych z frakcją mikrosomalną [4,12,13,28]. W przypadku soi katalizuje ona NADPH- i O₂-zależną reakcję przekształcenia (-)-(6aR,11aR)-3,9-dihydroksypterokarpanu w (-)-(6aS,11aS)-3,6a,9-trihydroksypterokarpan [12]. Badania nad biosyntezą pterokarpów o konfiguracji (+) w grochu (*Pisum sativum*), przeprowadzone z wykorzystaniem radioaktywnego izotopu tlenu ¹⁸O wykazały natomiast, że grupa 6a-hydroksylowa obecna w 6a-hydroksymakkiainie i pisatynie pochodzi raczej z cząsteczki wody, a nie tlenu. Fakt ten wskazuje na odmienne mechanizmy powstawania (+)- i (-)-pterokarpów [12,13].



Jak już wcześniej wspomniano, izoflawonoidy syntetyzowane przez szereg roślin, w tym *Cicer arietinum* i *Medicago sativa*, posiadają grupy metoksyłowe w pozycji 4' [3-5,12-14, 28,44,45]. Enzymem biorącym udział w powstawaniu wspomnianych połączeń jest 4'-O-metylotransferaza izoflawonowa. Substrat do ich biosyntezy stanowi zaś 2,7,4'-trihydroksyizoflawanon, produkt reakcji katalizowanej przez syntazę 2-hydroksyizoflawanonową (2-HIS) [3,4,12].

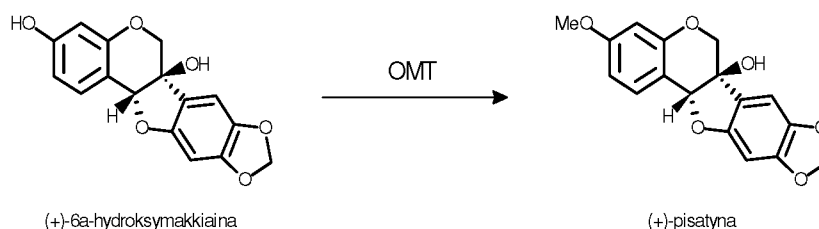
Przeprowadzone z wykorzystaniem elicytowanych kultur zawiesinowych *Medicago sativa* eksperymenty wykazały, że hodowle te cechowała podwyższona aktywność 7-O-metylotransferazy izoflawonowej (7-OMT), enzymu katalizującego przekształcenie daidzeiny w izoformononetynę, nie biorącego natomiast udziału w biosyntezie medykarpiry. Aktywność kluczowej dla powstawania medykarpiry 4'-O-metylotransferazy była jednocześnie bardzo niska [4,12].

Opisane zjawisko może być spowodowane odmienną specyficznością substratową O-metylotransferazy w warunkach *in vitro*, gdzie wykazuje ona cechy 7-OMT wobec egzogennie podanej daidzeiny, oraz *in vivo*, gdzie ten sam enzym funkcjonuje jako 4'-OMT [3,4,12]. Jest prawdopodobne, że dużą rolę odgrywa w tym przypadku zlokalizowanie metylotransferazy w komórce, tworzącej wraz z syntazą izoflawonową oraz 2'-hydroksylazą izoflawonową swoisty „kanał metaboliczny”. 4'-O-metylacji podlega wówczas jedynie substrat produkowany endogennie przez IFS. Dostarczana egzogennie do kultur *in vitro* *Medicago sativa* daidzeina znajduje się poza wspomnianym „kanałem metabolicznym”, powodując przy tym odmienne działanie O-metylotransferazy, katalizującej wówczas reakcję metylacji w pozycji 7 [3,4,12].



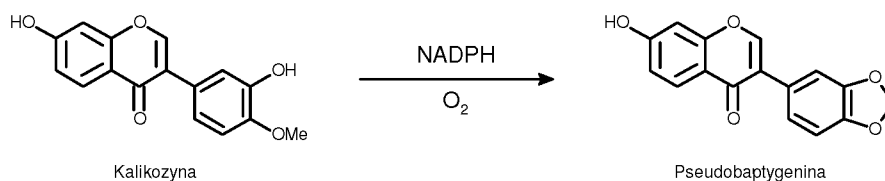
Procesom metylacji podlega również grupa hydroksylowa w pozycji 5, proces ten przebiega jednak trudniej ze względu na tworzenie połączenia chelatowego z karbonyłem w pozycji 4. Obecność 5-O-metylotransferazy izoflawonowej stwierdzono w korzeniach łubinu żółtego (*Lupinus luteus*). Enzym ten wykazuje aktywność wobec genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny, 8-prenylogenieiny oraz 2'-hydroksy-8-prenylogenieiny, co świadczy, że metylacja grupy 5-hydroksylowej w *Lupinus luteus* możliwa jest na różnych etapach biosyntezy [12].

Do związków podlegających reakcjom O-metylacji należą często bardziej złożone połączenia izoflawonoidowe, między innymi pterokarpany. (+)-6a-hydroksymakkiaina obecna w grochu (*Pisum sativum*) ulega metylacji w pozycji 3 (odpowiadającej atomowi węgla 7 izoflawonów). Katalizującą reakcję metylotransferaza charakteryzuje się specyficnością substratową, wykazując najwyższą aktywność wobec (+)-6a-hydroksymakkiainy, znacznie niższą natomiast w stosunku do (-)-6a-hydroksymakkiainy, (+)-makkiainy i (+)-medykarpiny [12].



Niezależnie od położenia grupy metoksyłowej, mechanizm O-metylacji jest w każdym przypadku jednakowy. Reakcja transmetylacji obejmuje przeniesienie aktywnej grupy metylowej z S-adenozylu-L-metioniny (SAM) na atom tlenu grupy hydroksylowej, katalizatorem jest zaś odpowiednia O-metylotransferaza [11,16,39].

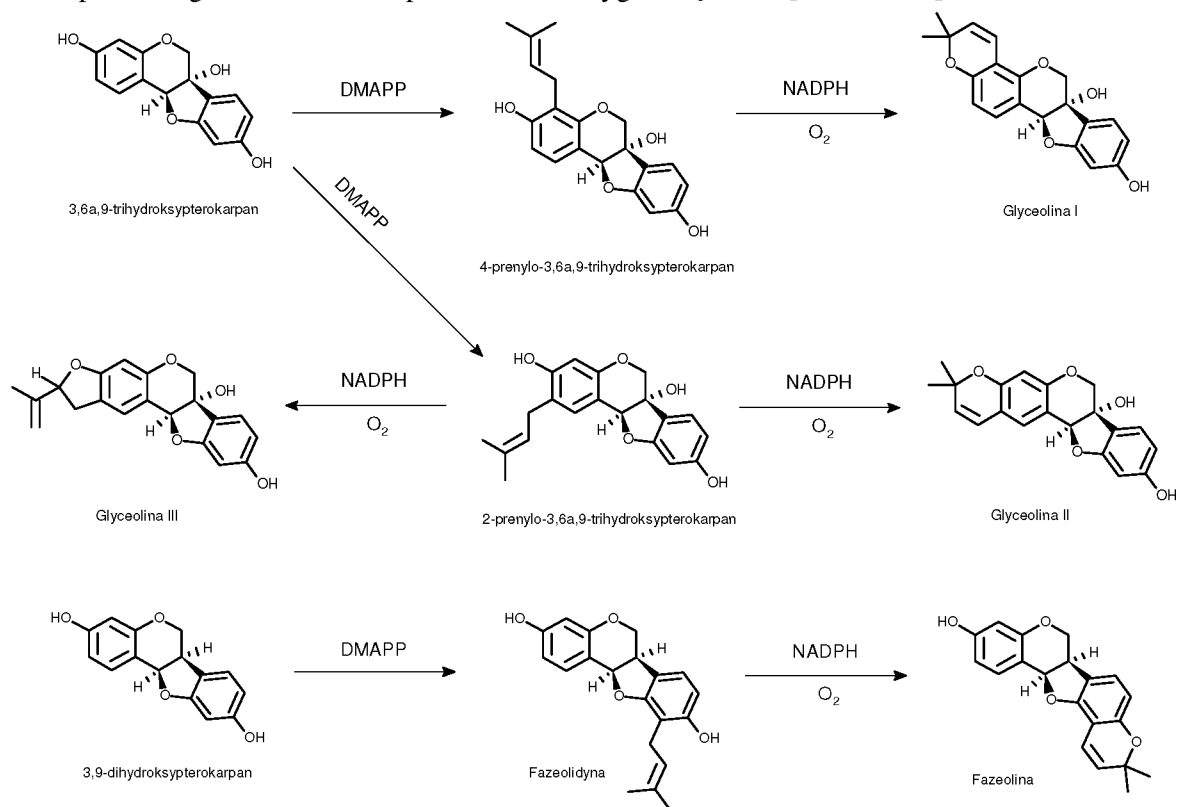
Grupa metoksyłowa może być przekształcona na drodze reakcji biochemicznych w mostek metylenodioksyłowy [10,12,13,28]. Przykładami związków posiadających tego rodzaju układ chemiczny są pterokarpany makkiaina i pisatyna. Badania wykazały, że biosynteza makkiainy w *Cicer arietinum* obejmuje hydroksylację formononetyny w pozycji 3', a powstała kalikozyna ulega następnie przekształceniu w pseudobaptygeninę poprzez utworzenie mostka metylenodioksyłowego. Opisana reakcja wymaga obecności tlenu i NADPH, co wskazuje na udział białek cytochromu P450 w jej przebiegu [10,12].



Szacuje się, że co najmniej połowa wszystkich połączeń izoflawonoidowych spotykanych w rodzinie *Fabaceae* posiada podstawniki prenylowe [12]. Większość badań dotyczących prenylowanych izoflawonoidów przeprowadzono z wykorzystaniem soi (*Glycine max*) i fasoli (*Phaseolus vulgaris*), w których procesy powstawania prenylowanych izoflawonoidów są inicjowane elicytacją, jak również łubinu białego (*Lupinus luteus*), produkującego pochodne prenylowe konstytucyjnie [6,12,15,19-21,24,37,38,41,50,52].

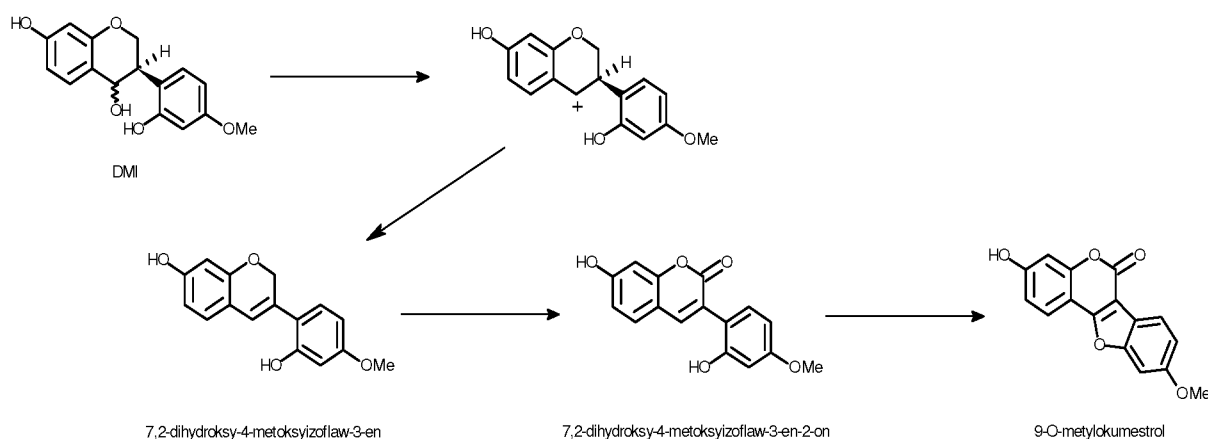
Badania enzymatyczne dotyczące procesów biosyntezy izoflawonoidów w soi wykazały, że podstawienie atomów węgla 2 i 4 3,6a,9-trihydroksypterokarpanu grupami prenyłowymi zachodzi z udziałem dimetyloallilopirofosforanu (DMAPP), przy czym dominująca jest reakcja ukierunkowana na powstawanie pochodnej prenylowanej w pozycji C-2 [12,37,39]. Analogiczne procesy biochemiczne zaobserwowano w kulturach zawiesinowych *Phaseolus vulgaris*, gdzie produktem prenylacji 3,9-dihydroksypterokarpanu jest fazeolidyna [12]. Procesy powstawania prenylowanych izoflawonoidów w obydwu wymienionych roślinach są katalizowane przez prenylotransferazy zlokalizowane w wewnętrznej błonie chloroplastów [8,12]. Reakcje prenylacji są stereospecyficzne, substrat dla prenylotransferaz stanowią bowiem tylko pterokarpany o konfiguracji 6aR,11aR [12].

Ostatnim etapem biosyntezy gliceolin w soi oraz fazeoliny w fasoli jest cyklizacja łańcucha izoprenowego katalizowana przez monooksygenazę P450 [4,12,13,45].



Prenylowe pochodne genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny są produkowane konstytucyjnie przez tkanki łubinu białego (*Lupinus albus*) [6,12,19,21,37,52]. Związki te wykryto w liściach, korzeniach, jak również kulturach zawieszinowych tej rośliny. Prenylacja izoflawonów w łubinie białym zachodzi w pozycjach 6, 8 i 3', możliwe jest również tworzenie 6,3'-diprenylowych pochodnych [6,12,19,21,37,52].

Zagadnienia biosyntezy kumestanów, stanowiących jedną z głównych grup połączeń izoflawonoidowych, są w przeciwieństwie do procesów powstawania pterokarpanów stosunkowo słabo poznane [12]. W czasie badań nad *Medicago sativa* stwierdzono, że prekursorami 9-O-metylokumestrolu są zarówno 7,2'-dihydroksy-4'-metoksyizoflaw-3-en, jak i 7,2'-dihydroksy-4'-metoksyizoflaw-3-en-2-on, należące odpowiednio do izoflaw-3-enów i 3-arylokumaryn. Przedstawiony schemat biosyntezy kumestanów obejmuje etap jonu karboniowego, nietrwałego związku pośredniego, stanowiącego wspólne ogniwo szlaków biosyntezy pterokarpanów, izoflawanów i kumestanów [4,12,13,28].



Izoflawonoidy występują często w świecie roślinnym w postaci połączeń glikozydowych, oraz pochodnych estrowych glikozydów [5,6,7,8,12,18,28,31,33,36,42,44,45,52]. Większość badań dotyczących powstawania i metabolizmu glikozydów izoflawonoidowych przeprowadzono z wykorzystaniem takich roślin jak *Lupinus albus*, *Glycine max*, *Medicago sativa* i *Cicer arietinum* [5,6,12,18,33,36,44,52]. Przyłączenie cząsteczki glukozy do rdzenia izoflawonoidowego jest katalizowane przez cytoplazmatyczną glukozylotransferazę izoflawonową (IGT), wykorzystującą urydyldifosfoglukozę jako donor reszty cukrowej [5,12,28,34,39,40,44]. Glukozylotransferaza izoflawonowa pochodząca z *Cicer arietinum* charakteryzuje się specyficznością wobec substratu, jej powinowactwo do izoflawonów posiadających grupę metoksyłową w pozycji 4' (formononetyna i biochanina A) jest bowiem wyraźnie mniejsze niż do izoflawonów nie posiadających tej grupy, takich jak daidzeina i genisteina [12].

Glukozydacji mogą podlegać nie tylko proste izoflawony, ale również bardziej złożone połączenia izoflawonoidowe. Glukozylotransferaza wyizolowana z kultur zawieszinowych *Medicago sativa* katalizuje przyłączenie glukozy w pozycji 3 pterokarpanu medykarpany oraz kumestanu kumestrolu [12].

Dalsze modyfikacje pochodnych glikozydowych izoflawonoidów obejmują między innymi acylację w obrębie reszty cukrowej. Enzymem katalizującym reakcję przyłączenia reszty malonowej w pozycji 6'' reszty cukrowej 7-O-β-glukozydów izoflawonoidowych jest zlokalizowana w soku komórkowym malonylotransferaza glikozydów izoflawonowych (IMT).

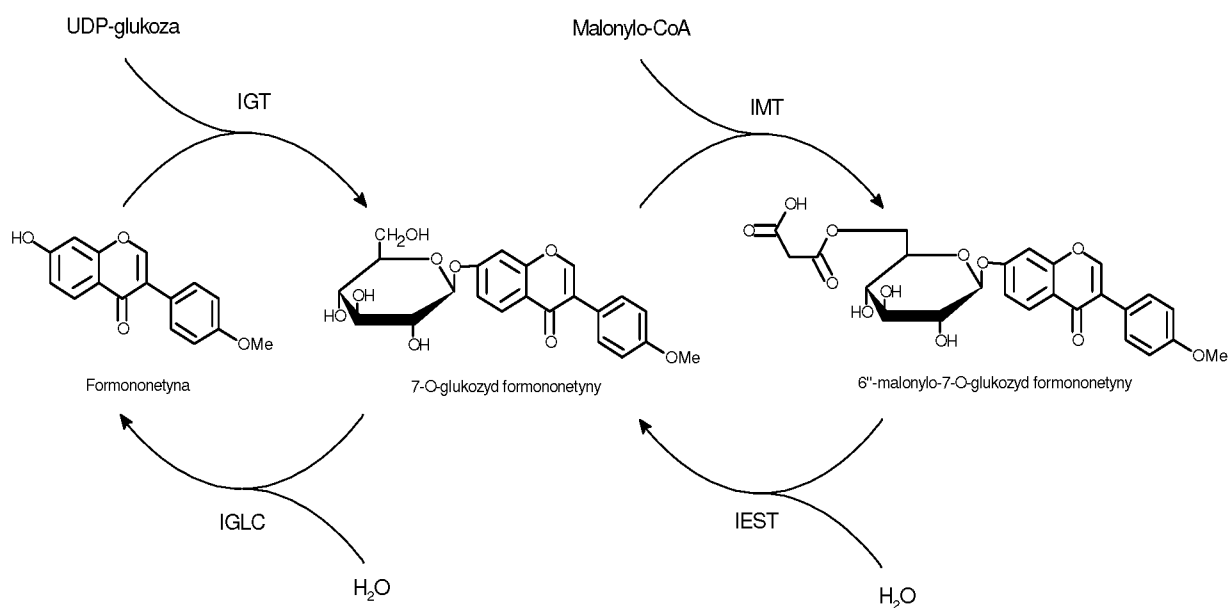
Donorem grupy acylowej jest malonylo-CoA, produkt reakcji stanowi zaś odpowiedni 6''-O-malonylo-7-O- β -glukozyd [5,12,26,28,31,10,44,45].

Substratami IMT są, zgodnie z malejącym powinowactwem, glukozydy: biochaniny A, formononetyny, genisteiny, pratensyny, daidzeiny i makkiainy [12].

Glikozydy izoflawonoidowe oraz ich pochodne estrowe rozpuszczone w soku komórkowym określone są mianem form magazynowych izoflawonoidów [5,12,31,32,45]. Pierwszym etapem rozpadu malonyloglukozydów w *Cicer arietinum* jest hydroliza wiązania estrowego, katalizowana przez malonyloesterazę malonyloglukozydów izoflawonowych (IEST), związaną z błoną tonoplastu [5,12,45]. IEST pochodząca z *Cicer arietinum* charakteryzuje się wysoką specyficznością substratową i wykazuje dużą aktywność wobec 6''-O-malonylo-7-O- β -glukozydu biochaniny A [12].

Mobilizacja wolnych aglikonów izoflawonoidowych następuje na drodze hydrolizy wiązania β -glikozydowego, katalizowanej przez glukozydazę glukozydów izoflawonowych (IGLC) [5,12,32,44,45]. Wspomniana β -glukozydaza jest związana z frakcją cytoplazmatyczną i charakteryzuje się, w przypadku enzymu wyizolowanego z korzeni *Cicer arietinum*, wysokim powinowactwem wobec 7-O- β -glukozydów formononetyny i biochaniny A [12]. Glukozydazę o dużej specyficzności w stosunku do połączeń izoflawonowych wyizolowano również z korzeni *Glycine max*, w których enzym ten katalizuje reakcje hydrolizy zarówno glukozydów genisteiny i daidzeiny, jak również ich malonowych pochodnych [32]. Nie stwierdzono jednocześnie obecności odpowiedniej malonyloesterazy katalizującej reakcje rozpadu malonyloglukozydów wspomnianych izoflawonów. Fakt ten może świadczyć, że reakcje rozpadu malonyloglukozydów w *Glycine max* przebiegają odmiennie niż to ma miejsce w *Cicer arietinum*, gdzie do uwolnienia aglikonu konieczna jest najpierw hydroliza wiązania estrowego, po czym powstały glukozyd poddawany jest działaniu odpowiedniej glukozydazy. Wyniki badań wskazują na możliwość uwalniania wolnych aglikonów w *Glycine max* zarówno na drodze hydrolizy wiązania β -glukozydowego glukozydu, jak również bezpośredniego działania odpowiedniej glukozydazy na ich pochodne malonylowe [32].

Procesy powstawania i hydrolizy pochodnych glikozydowych izoflawonów obrazuje poniższy schemat:



Piśmiennictwo

1. Akashi T., Aoki T., Ayabe S., Identification of a cytochrome P450 cDNA encoding (2S)-flavanone 2-hydroxylase of licorice (*Glycyrrhiza echinata* L.; *Fabaceae*) which represents licodione synthase and flavone synthase II, *FEBS Lett.* 431 (1998) 287-290.
2. Akashi T., Aoki T., Takahashi T., Kameya N., Nakamura I., Ayabe S., Cloning of cytochrome P450 cDNAs from cultured *Glycyrrhiza echinata* L. cells and their transcriptional activation by elicitor-treatment, *Plant Sci.* 126 (1997) 39-47.
3. Akashi T., Sawada Y., Aoki T., Ayabe S., New Scheme of the Biosynthesis of Formononetin Involving 2,7,4'-Trihydroxyisoflavanone but Not Daidzein as the Methyl Acceptor, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (2000) 2276-2279.
4. Aoki T., Akashi T., Ayabe S., Flavonoids of Leguminous Plants: Structure, Biological Activity, and Biosynthesis, *J. Plant Res.* 113 (2000) 475-488.
5. Barz W., Mackenbrock U., Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpan in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 199-211.
6. Bednarek P., Frański R., Kerhoas L., Einhorn J., Wojtaszek P., Stobiecki M., Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor, *Phytochemistry* 56 (2001) 77-85.
7. Berlin J., Fecker L., Rügenhagen C., Sator C., Strack D., Witte L., Wray V., Isoflavone Glycoside Formation in Transformed and Non-Transformed Suspension and Hairy-Root Cultures of *Lupinus polyphyllus* and *Lupinus hartwegii*, *Z. Naturforsch.* 46 (1991) 725-734.
8. Biggs D.R., Welle R., Grisebach H., Intracellular localization of prenyltransferases of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis in bean and soybean, *Planta* 181 (1990) 244-248.
9. Bleß W., Barz W., Isolation of pterocarpan synthase, the terminal enzyme of pterocarpan phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Cicer arietinum*, *FEBS Lett.* 235 (1988) 47-50.
10. Clemens S., Barz W., Cytochrome P450-dependent methylenedioxy bridge formation in *Cicer arietinum*, *Phytochemistry* 41 (1996) 457-460.
11. Daniell T., O'Hagan D., Edwards R., Alfalfa cell cultures treated with a fungal elicitor accumulate flavone metabolites rather than isoflavones in the presence of the methylation inhibitor tubericidin, *Phytochemistry* 44 (1997) 285-291.
12. Dixon R.A., Isoflavonoids: Biochemistry, Molecular Biology, and Biological Functions, *Comp. Nat. Prod. Chem.* 1 (1999) 773-823.
13. Dixon R.A., Harrison M.J., Paiva N.L., The isoflavonoid phytoalexin pathway: From enzymes to genes to transcription factors, *Physiol. Plant.* 93 (1995) 385-392.
14. Dixon R.A., Steele C.L., Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering, *Trends in Plant Sci.* 4 (10) (1999) 340-400.
15. Edwards R., Blount J.W., Dixon R.A., Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures, *Planta* 184 (1991) 403-409.
16. Edwards R., Daniell T.J., Gregory A.C.E., Methylation reactions and the phytoalexin response in alfalfa suspension cultures, *Planta* 201 (1997) 359-367.
17. Edwards R., Mavandad M., Dixon R.A., Metabolic fate of cinnamic acid in elicitor treated cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*, *Phytochemistry* 29 (1990) 1867-1873.

18. Federici E., Touché A., Choquart S., Avanti O., Fay L., Offord E., Courtois D., High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures, *Phytochemistry* 64 (2003) 717-724.
19. Gagnon H., Ibrahim R.K., Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin, *Phytochemistry* 44 (1997) 1463-1467.
20. Goosens J.F.V. and Vendrig J.C., Effects of abscisic acid, cytokinins, and light on isoflavonoid phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* L., *Planta* 154 (1982) 441-446.
21. Grayer R.J., Kokubun T., Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other anti-fungal compounds from higher plants, *Phytochemistry* 56 (2001) 253-263.
22. Gunia W., Hinderer W., Wittkamp U., Barz W., Elicitor Induction of Cytochrome P-450 Monooxygenases in Cell Suspension Cultures of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Their Involvement in Pterocarpin Phytoalexin Biosynthesis, *Z. Naturforsch.* 43 (1991) 58-66.
23. Guo L., Dixon R.A., Paiva N.L., The 'pterocarpin synthase' of alfalfa: association and co-induction of vestitone reductase and 7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol (DMI) dehydratase, the two final enzymes in medicarpin biosynthesis, *FEBS Lett.* 356 (1994) 221-225.
24. Haberer H., Schröder G., Ebel J., Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (*Glycine max* L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis, *Planta* 177 (1989) 58-65.
25. Hagmann M., Grisebach H., Enzymatic rearrangement of flavanone to isoflavone, *FEBS* 175 (1984) 199-203.
26. Hahlbrock K., Malonyl coenzyme A: flavone glycoside malonyl-transferase from illuminated cell suspension cultures of parsley, *FEBS Lett.* 28 (1972) 65-68.
27. Hakamatsuka T., Mori K., Ishida S., Ebizuka Y., Sankawa U., Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell cultures of *Pueraria lobata*, *Phytochemistry* 49 (1998) 497-505.
28. Harborne J.B., Williams Ch.A., Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* 55 (2000) 481-504.
29. Hashim M.F., Hakamatsuka T., Ebizuka Y., Sankawa U., Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis, *FEBS* 271 (1990) 219-222.
30. Hinderer W., Flentje U., Barz W., Microsomal isoflavone 2'- and 3'-hydroxylases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspensions induced for pterocarpin phytoalexin formation, *FEBS Lett.* 214 (1987) 101-106.
31. Hinderer W., Flavonoids w: F. Constable (Ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Academic Press. Inc., San Diego, 1988, str. 23-48.
32. Hsieh M., Graham T.L., Partial purification of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates, *Phytochemistry* 58 (2001) 995-1005.
33. Janas K.M., Cvikrová M., Pałagiewicz A., Szafrńska K., Posmyk M.M., Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature, *Plant Sci.* 163 (2002) 369-373.
34. Kączkowski J., Pochodne fenylalaniny i tyrozyny w: J. Kączkowski (Ed.), *Biochemia roślin*, PWN, Warszawa, 1985, str. 263-282.
35. Kessmann H., Choudhary A.D., Dixon R.A., Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) III. Induction of medicarpin and cytochrome P450 enzyme activities in elicitor-treated cell suspension cultures and protoplasts, *Plant Cell Rep.* 9 (1990) 38-41.

36. Keßmann K., Barz W., Accumulation of isoflavones and pterocarpin phytoalexins in cell suspension cultures of different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum*), *Plant Cell Rep.* 6 (1987) 55-59.
37. Laflamme P., Khouri H., Gulick P., Ibrahim R., Enzymatic prenylation of isoflavones in white lupin, *Phytochemistry* 34 (1993) 147-151.
38. Landini S., Graham M.Y., Graham T.L., Lactofen induces isoflavone accumulation and gli-ceollin elicitation competency in soybean, *Phytochemistry* 62 (2003) 865-874.
39. Li J., Copeland L., Role of malonate in chickpeas, *Phytochemistry* 54 (2000) 585-589.
40. Li Z., Alfenito M., Rea P.A., Walbot V., Dixon R.A., Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump, *Phytochemistry* 45 (1997) 689-693.
41. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M., Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*, *Plant Physiol. Biochem.* 42 (2004) 671-679.
42. Łuczkiwicz M., Głód D., Callus cultures of *Genista* plants – in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity, *Plant Sci.* 165 (2003) 1101-1108.
43. Nakamura K., Akashi T., Aoki T., Kawaguchi K., Ayabe S., Induction of Isoflavonoid and Retrochalcone Branches of the Flavonoid Pathway in Cultured *Glycyrrhiza echinata* Cells Treated with Yeast Extract, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 1618-1620.
44. Paiva N.L., Oomen A., Harrison M.J., Dixon R.A., Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 213-220.
45. Phillips D.A., Kapulnik Y., Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts, *Trends Microbiol.* 3 (2) (1995) 58-64.
46. Sallaud C., El-Turk J., Breda C., Buffard D., de Kozak I., Esnault R., Kondorosi A., Differential expression of cDNA coding for chalcone reductase, a key enzyme of the 5-deoxyflavonoid pathway, under various stress conditions in *Medicago sativa*, *Plant Sci.* 109 (1995) 179-190.
47. Schlieper D., Tiemann K., Barz W., Stereospecificity of hydrogen transfer by fungal and plant NADPH: isoflavone oxidoreductases, *Phytochemistry* 29 (1990) 1519-1524.
48. Shimada N., Akashi T., Aoki T., Ayabe S., Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis, *Plant Sci.* 160 (2000) 37-47.
49. Steele C.L., Gijzen M., Qutob D., Dixon R.A., Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean, *Arch. Biochem. Biophys.* 367 (1999) 147-150.
50. VanEtten H.D., Smith D.A., Accumulation of antifungal isoflavonoids and 1a-hydroxyphaseollone, a phaseollin metabolite, in bean tissue infected with *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Physiol. Plant Pathol.* 5 (1975) 225-237.
51. Winkel-Shirley B., Biosynthesis of flavonoids and effects of stress, *Cur. Op. Plant Biol.* 5 (2002) 218-223.
52. Wojtaszek P., Stobiecki M., Differential secretion and accumulation of isoflavonoids in *Lupinus albus* in response to fungal elicitor and CuCl₂, *Plant Physiol. Biochem.* 35 (1997) 129-135.
53. Yu O., McGonigle B., Metabolic Engineering of Isoflavone Biosynthesis, *Adv. Agron.* 86 (2005) 147-190.

4. BADANIA NAD IZOFLAWONOIDAMI W KULTURACH *IN VITRO*

Rozpowszechnione od połowy dwudziestego wieku doświadczenia nad hodowlą roślin wyższych w warunkach *in vitro* doprowadziły do otrzymania kultur pojedynczych komórek oraz ich agregatów, protoplastów, tkanek i organów zdolnych do ciągłego wzrostu na sterylnych, odpowiednio dobranych pożywkach wzrostowych [16,19,87]. Ścisłe kontrolowane warunki oraz ciągły dostęp stabilnego materiału biologicznego umożliwił, na większą niż dotychczas skalę, prowadzenie badań podstawowych nad fizjologią roślin oraz wyjaśnienie szeregu procesów biochemicznych składających się na pierwotny i wtórny metabolizm tkankowy [70,87]. Dowiedziono ponadto, że otrzymane w warunkach *in vitro* biomasy roślinne zdolne są do biosyntezy wtórnych metabolitów charakterystycznych dla roślin macierzystych bądź też stanowią źródło całkiem nowych substancji nie określonych w stanie naturalnym [5,56,70,87,98,108,118,136]. W rezultacie została otwarta droga do intensywnych studiów biotechnologicznych nad możliwością wykorzystania roślinnych kultur *in vitro* do produkcji wtórnych metabolitów o wyjątkowo cennych cechach użytkowych, w tym związków mogących znaleźć potencjalne zastosowanie w lecznictwie [68,98,126,127].

Przeprowadzone badania statystyczne dowiodły, że nawet w krajach wysoko rozwiniętych, gdzie podstawą przemysłu farmaceutycznego jest szeroko rozumiana synteza chemiczna, ciągle 25% leków to cenne związki pochodzenia naturalnego. Postępująca degradacja środowiska, powolny wzrost roślin, nierzadko niska zawartość związków aktywnych w uprawianych gatunkach to tylko niektóre czynniki, które ograniczają otrzymywanie substancji biologicznie aktywnych ze stanu naturalnego. Wyżej wymienione trudności wraz z koniecznością hodowli gatunków tropikalnych w określonych warunkach klimatycznych spowodowały, że roślinne kultury *in vitro* zaczęto postrzegać jako alternatywną metodę otrzymywania wtórnych metabolitów o wyjątkowo cennej aktywności terapeutycznej [87,128].

Spośród wielu metabolitów wtórnych związki izoflawonoidowe obok alkaloidów oraz terpenów należą do najczęściej badanych, w warunkach roślinnych hodowli *in vitro*, klas połączeń naturalnych [34,98,108,]. Przyczynę tego faktu możemy upatrywać m. in. w ich wielokierunkowym działaniu biologicznym [50,106]. Jako uznane fitoaleksyny i fitoantycypiny, izoflawony pełnią kluczową rolę w procesach obronnych roślin z rodziny *Fabaceae*. Stąd też biomasy roślinne otrzymywane z gatunków roślin motylkowych stały się układami modelowymi do badań nad odpowiedzią obronną roślin na szeroko rozumiany stres środowiskowy [27,104]. Izoflawony to ponadto wtórne metabolity o szerokiej aktywności prozdrowotnej. Obok aktywności przeciwzapalnej, przeciwgrzybiczej i przeciwwolnorodnikowej, charakterystycznej dla grupy bioflawonoidów, wykazują one cechy połączeń blokujących u ssaków receptory estrogenowe β (ER β) [20,42,50,94,106]. Stąd zaleca się je powszechnie m. in. w leczeniu skutków menopauzy [42,133]. Ponadto rozważa się również możliwość stosowania izoflawonów w prewencji oraz leczeniu nowotworów związanych z zaburzeniami równowagi hormonalnej w organizmie [50,75,94,106,107]. Ograniczone, przede wszystkim do produktów sojowych, naturalne źródła izoflawonów nie pozwalają, nie tylko na masowe otrzymywanie znacznych ilości tych związków, z przeznaczeniem dla przemysłu farmaceutycznego, ale również na kompleksowe badania farmakologiczne i toksykologiczne wyizolowanych substancji [28]. Stąd też w ostatnich latach nieliczne prace biotechnologiczne wskazują na

możliwość wykorzystania kultur *in vitro* określonych gatunków z rodziny *Fabaceae* do przemysłowej produkcji fitoestrogenów [6,39].

Niezależnie od podstawowego celu badań, biosyntezę oraz metabolizm izoflawonoidów w kulturach *in vitro* stymuluje się stosując zarówno standardowe jak i również bardzo nowoczesne strategie biotechnologiczne [28,34]. Można tu wymienić takie procedury jak: modyfikację podstawowego składu podłoża doświadczalnego, ze szczególnym uwzględnieniem równowagi hormonalnej [12,17,29,40,47] oraz regulację warunków prowadzenia hodowli w zakresie oświetlenia i temperatury [47,61,105]. Wykorzystując naturalny aparat enzymatyczny badanej biomasy przeprowadza się również szeroko rozumianą biokonwersję z zastosowaniem bliższych i dalszych prekursorów, w celu uzyskania produktu finalnego [4,9].

W oparciu o fakt przynależności izoflawonów do klasy związków aktywnych w procesach obronnych [27,104], biosyntezę i metabolizm tych związków w roślinnych kulturach *in vitro* reguluje się stosując szeroką gamę elicytorów biotycznych i abiotycznych [10,24,43,99,100].

Przeprowadzone wrywkowe badania dotyczące akumulacji izoflawonów w różnych typach hodowli *in vitro* (kalusy, zawiesina, korzenie oraz pędy) pozwalają wstępnie zorientować się nad możliwością wykorzystania różnego rodzaju kultur do produkcji tych związków [6,12,17,39,40,122].

Metabolizm izoflawonów badano również w oparciu o biomasy transgeniczne (zawiesiny, korzenie włośnikowate, zregenerowane organy) uzyskane na drodze transformacji genetycznej, przy udziale wybranych dzikich lub przekonstruowanych szczepów bakteryjnych [12,18,78,79] oraz mikrowstrzyknięcia informacji genetycznej inkorporowanej na mikrocząsteczkach złota [31,90].

Poniżej, w oparciu o bieżące informacje literaturowe, przedstawiono wpływ określonych strategii hodowlanych na biosyntezę oraz metabolizm izoflawonów w roślinnych kulturach *in vitro*.

Wpływ podstawowego składu podłoża doświadczalnego na biosyntezę izoflawonów w kulturach *in vitro*

Modyfikacje, w zakresie składu podłoża doświadczalnych, należą do podstawowych metod regulacji pierwotnego oraz wtórnego metabolizmu namnażanych, w warunkach *in vitro*, biomas [50]. Powyższe zabiegi dotyczą zarówno zmian jakościowych jak i ilościowych w obrębie makro i mikroelementów, źródeł węgla oraz regulatorów wzrostu odpowiedzialnych za określoną równowagę hormonalną w systemie hodowlanym [19,56,85,108,136].

Większość pożywek stosowanych w hodowlach *in vitro* roślin motylkowych to tzw. bogate podłoża wzrostowe takie jak: Murashige'a i Skooga, Schenk-Hildebrandt'a, Lindsmeyera i Skooga itd. [6,12,17,39,40]. Skład powyższych pożywek, w szczególności w zakresie regulatorów wzrostu, dobierano, przede wszystkim, pod kątem mikrorozmnażania badanych gatunków bądź też uzyskania maksymalnego przyrostu namnażanych biomas [101,115,122,132].

Przykładowo, w kulturach kalusowych i zawiesinowych najczęściej badanych gatunków z rodziny *Fabaceae* takich jak: *Glycine max*, *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Lupinus albus* oraz *Medicago sativa* regulatorami wzrostu z wyboru były przeważnie: kinetyna oraz kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) [6,9,24,38,39,43,99]. W procesie tworzenia pędów u roślin motylkowych przydatne okazały się takie cytokininy jak: benzyloaminopuryna (BAP) i tidiazuron (TDZ) oraz naturalne gibereliny (GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₉ i GA₁₃). W tym miejscu

należy zaznaczyć, że wpływ poszczególnych regulatorów wzrostu na inicjację oraz elongację pędów był zmienny i każdorazowo zależny od badanego gatunku [15,25,45,65,74,88,103,122].

Tylko nieliczne prace nad kulturami *in vitro* roślin z rodziny *Fabaceae* dotyczą bezpośredniego wpływu podstawowego składu podłoża doświadczalnego na zawartość izoflawonów w namnażanych materiałach roślinnych [12,17,40,47,95,105,121]. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że znaczny wzrost stężenia omawianych związków w biomasach można uzyskać m.in. poprzez zubożenie pożywek wzrostowych w obrębie soli mineralnych [14,95,121]. W wyniku redukcji azotanów oraz soli amonowych w podłożu hodowlanym kultury pędowe *Phaseolus vulgaris* syntetyzowały kilkakrotnie więcej faseoliny i kiewetonu niż biomasy kultywowane w warunkach kontrolnych [105]. Procesowi temu towarzyszyło ogólne zwiększenie ekspresji genów związanych ze szlakiem fenylopropanoidowym oraz zahamowanie wzrostu danych kultur. Analogicznie, podwyższenie zawartości azotu w pożywce powodowało nawet 9% obniżenie stężenia fitoaleksyn w pędach fasoli [105]. Zwiększoną zawartość izoflawonów w kulturach *in vitro Phaseolus vulgaris* uzyskano również w przypadku deficytu jonów fosforanowych, boranowych oraz manganowych w systemie hodowlanym [95,121]. Przyczynę powyższego zjawiska upatruje się w tzw. „stresie odżywczym”, którego mechanizm jest stosunkowo słabo poznany. Przypuszcza się, że powoduje on zahamowanie, związanych z wzrostem kultury, podstawowych protein. W efekcie dochodzi do „przełączenia” szlaków biochemicznych w kierunku biosyntezy określonych wtórnych metabolitów [35,89,105,110].

W badaniach dotyczących hodowli *in vitro* roślin motylkowych stwierdzono również wpływ określonych regulatorów wzrostu na biosyntezę izoflawonów w namnażanych biomasach [9,12,17,29,40,47,66,67]. Dowiedziono, że kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) stymulował biosyntezę wolnej oraz zglikozydowanej biochaniny A oraz formononetyny, w zawiesinie *Cicer arietinum* [9,66]. Powyższa auksyna indukowała również produkcję daidzeiny w kalusach pięciu gatunków z rodzaju *Psolarea* [17] oraz makkiainy i medykarpiry w zawiesinie *Medicago sativa* [67]. Korzystną rolę 2,4-D, w procesie biosyntezy izoflawonów, stwierdzono ponadto w liniach kalusowych *Maackia amurensis* [40]. Omawiane kultury, w obecności powyższej auksyny, syntetyzowały nawet 4-krotnie więcej daidzeiny, genisteiny, formononetyny oraz retuzyny niż roślina macierzysta. Natomiast zjawiska tego nie obserwowano, gdy auksyną z wyboru był kwas naftylo-1-octowy (NAA) [40]. Opisywana rola kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego w procesie biosyntezy izoflawonów wydaje się zaskakująca. Powyższy regulator wzrostu cytowany jest bowiem, w licznych doniesieniach literaturowych, jako bloker kluczowego enzymu szlaku fenylopropanoidowego-syntazy chalkonowej (CHS) [32,67].

Doświadczenia nad kulturami *in vitro Phaseolus vulgaris* [26,29,47,123] wykazały, że regulatory wzrostu mogą, w sposób wybiórczy, regulować biosyntezę i metabolizm określonych izoflawonów. Przykładowo, kwas abscyzynowy (ABA) oraz benzyloaminopuryna (BAP) stymulowały biosyntezę faseoliny w kulturach zawiesinowych i liścieniach fasoli. Jednocześnie ABA, w przeciwieństwie do BAP hamował, w tych samych biomasach, syntezę kiewetonu [26,29,47]. Autorzy niniejszych prac uznali, że stosowane regulatory wzrostu wpływały wybiórczo na metabolizm oznaczanych fitoaleksyn poprzez tworzenie mniej lub bardziej korzystnych warunków cytologicznych w badanych biomasach [29,47]. Ze względu na specyfikę prowadzonych doświadczeń, końcowa zawartość kiewetonu i faseoliny była rezultatem nie tylko określonej modyfikacji podłoża w zakresie regulatorów wzrostu, ale również wynikiem zmiennych warunków hodowlanych [26,29,47].

We wszystkich cytowanych powyżej doświadczeniach podchodzono fragmentarycznie do roli określonych składników podłoża w biosyntezie izoflawonów. Nie mniej prezentowane rezultaty wskazują wyraźnie, że skład pożywki a przede wszystkim fitohormony mogą stanowić istotny czynnik regulatorowy w biosyntezie izoflawonów, w warunkach *in vitro*.

Wpływ czynników fizycznych na biosyntezę i akumulację związków izoflawonoidowych w kulturach *in vitro*

Do najważniejszych czynników fizycznych wpływających na biosyntezę oraz metabolizm izoflawonów, w biomasach roślinnych, należą: temperatura środowiska oraz warunki oświetleniowe [16,49,68,108,118,136]. W przypadku tych ostatnich zasadniczą rolę odgrywa zarówno długość fali padającego promieniowania jak i również sam fakt ekspozycji materiału roślinnego na światło dzienne [49,58,59,71,86,105].

Uważa się, że około 16 enzymów podstawowego szlaku fenylopropanoidowego, w tym: amonia-liaza L-fenyloalaniny (PAL) oraz syntaza chalkonowa (CHS), są przejściowo indukowane obecnością światła dziennego [30,58,105,130]. Z tego względu dostęp światła może w istotny sposób regulować biosyntezę pochodnych fenylopropanu, w tym bioflawonoidów, do których należą izoflawony [30,47,130]. Powyższa teoria znalazła potwierdzenie w badaniach nad kulturami zawieszinowymi *Cicer arietinum*, syntetyzującymi znaczne ilości biochaminy A oraz formononetyny, przy dostępie światła dziennego [9,58]. Naświetlanie nie wydaje się natomiast konieczne do inicjacji biosyntezy izoflawonów, na co wskazuje znaczna zawartość tych związków w tkankach podziemnych roślin gruntowych oraz w kulturach *in vitro* roślin motylkowych prowadzonych w całkowitej ciemności [61,78,79,90].

Badania przeprowadzone na kultywowanych, w warunkach *in vitro*, liścieniach *Phaseolus vulgaris* wykazały, że warunki oświetleniowe hodowli mogą również, w sposób wybiórczy, regulować biosyntezę określonych izoflawonów [47]. Cytowane kultury fasoli zawierały wyraźnie podwyższony poziom kiewetonu (5-hydroksyflawon) jedynie w liścieniach inkubowanych w całkowitej ciemności. Przeciwnie, faseolina (5-deoksyizoflawon) syntetyzowana była w znacznych ilościach, przede wszystkim, w biomasie naświetlanej światłem dziennym. Autorzy niniejszej pracy sugerują, że o ile biosynteza faseoliny jest, w tkance fasoli, bezpośrednio indukowana dostępem światła to w przypadku kiewetonu mechanizmy regulatorowe związane z jego powstawaniem są bardziej złożone. Uczestniczy w nich m.in. inhibitor biosyntezy kiewetonu, którym jest kwas abscyzynowy, syntetyzowany w badanej roślinie, właśnie w świetle dziennym [47].

Jak wykazują badania nad kulturami *in vitro* *Phaseolus vulgaris* również naświetlanie biomasy promieniowaniem nadfioletowym może w istotny sposób pobudzać biosyntezę izoflawonów [95,105]. Prezentowana teoria zakłada, że w procesie tym uczestniczy fotochrom aktywowany promieniowaniem UV [30,95]. W wyniku stresu środowiskowego, spowodowanego działaniem ultrafioletu, w kulturze fasoli doszło do wzmożonej biosyntezy izoflawonów, których aktywność biologiczna związana jest z mechanizmami fotoprotektywnymi [95,105]. Ponadto promieniowanie UV stymulowało, w biomasie *Phaseolus vulgaris*, wybiórczą produkcję izoflawonów o wysokim stopniu hydroksylacji [105], charakteryzujących się silnymi własnościami przeciwutleniającymi [11,111,130].

Indukcja biosyntezy izoflawonów zachodzi, w roślinnych kulturach *in vitro*, również na skutek gwałtownych zmian temperatury środowiska doświadczalnego [33,61,142].

Hodowle korzeni nietransformowanych *Glycine max*, wychłodzonych do temp. 10°C, akumulowały nawet kilkakrotnie więcej podstawowych fitoestrogenów niż biomasa kontrolna,

hodowana w temp. 25°C [33,142]. Szczegółowe badania wykazały, że w wyniku zaistniałego stresu temperaturowego, w badanych kulturach zawartość genisteiny i daidzeiny wzrosła około dwukrotnie a genistyny nawet trzykrotnie [61]. Przypuszcza się, że syntetyzowane izoflawony, posiadające znaczne własności przeciwutleniające, pełnią rolę zmiataczy wolnych rodników, będących mediatorami niektórych procesów biochemicznych spowodowanych wychłodzeniem [27,30,61,104,142].

Wpływ zabiegów technologicznych na biosyntezę i akumulację związków izoflawonoidowych w kulturach *in vitro*

Obok potencjału genetycznego kultury roślinnej oraz podstawowych warunków hodowli (skład pożywki, temperatura i oświetlenie) zasadniczy wpływ na zwiększenie produkcji metabolitów wtórnych w warunkach *in vitro* mogą mieć tzw. dodatkowe zabiegi technologiczne [5,16,49,56,87,98,108,118,126-128,136]. Związane są one z dostarczeniem biomasie określonych impulsów ze środowiska, jak również z modyfikacją genomu roślinnego. Poniżej opisano najważniejsze strategie stosowane w kulturach *in vitro* roślin motylkowych mogące znaleźć zastosowanie w celu poprawy produktywności tych biomas w zakresie połączeń izoflawonoidowych.

Elicytacja

Jak już wspomniano większość doniesień literaturowych dotyczących hodowli *in vitro*, których przedmiotem bezpośrednio lub pośrednio są izoflawony to eksperymenty o charakterze modelowym, mające na celu wyjaśnienie roli tych związków w relacjach między określonymi gatunkami roślinnymi a środowiskiem [21,27,28,30-32,34,104].

Szczegółowe badania z zakresu fizjologii roślin wskazują na istotną rolę szeroko rozumianej klasy izoflawonów w odpowiedzi, roślin z rodziny *Fabaceae*, na stres biologiczny, którym mogą być między innymi: trucizny, zranienie, ekstremalne temperatury, atak patogenu bądź też relacje z symbiotycznymi mikroorganizmami [27,34,104]. W celu określenia udziału izoflawonów w odpowiedzi obronnej na wyżej wymienione sytuacje stresowe przeprowadzono szereg doświadczeń w skali *in vitro* z zastosowaniem kultur komórek, tkanek oraz izolowanych organów roślinnych [9,10,30,35,99,129]. Modelowymi roślinami były przede wszystkim wybrane gatunki z rodziny *Fabaceae* takie jak: *Cicer arietinum*, *Medicago sativa*, *Lupinus albus*, *Glycine soja* et *max*, czyli rośliny charakteryzujące się bogatym metabolizmem w zakresie biosyntezy połączeń izoflawonoidowych o charakterze fitoaleksyn bądź fitoantycypin [7-10,24,36,43,51-53,67,77,84,91,92,125,131]. Stres biologiczny wywoływano między innymi stosując elicytory biotyczne w postaci produktów wyizolowanych z mikroorganizmów symbiotycznych bądź patogennych (elicytory egzogenne) lub izolaty roślinne stanowiące źródło elicytorów endogennych (jasmonian metylu, kwas salicylowy, etylen oraz glutation) [1,2,7-10,24,27,30,31,34,36,38,43,51-53,67,77,80,84,91,92,96,99,100,104,125,131]. Wielokrotnie posługiwano się również elicytorami abiotycznymi w postaci soli metali ciężkich [27,30,34,38,43,99,131]. Aczkolwiek wszystkie opisywane doświadczenia miały charakter podstawowy i nie polegały na opracowaniu systemów hodowlanych z przeznaczeniem do produkcji izoflawonów o określonej aktywności farmakologicznej jednak niezwykle interesujące rezultaty cytowanych tu eksperymentów mogą być wykorzystane w badaniach aplikacyjnych.

Bardzo zróżnicowane procedury doświadczalne stosowane w eksperymentach *in vitro* z udziałem roślin z rodziny *Fabaceae* dowiodły, że biosynteza izoflawonoidowych fitoaleksyn, związanych z zaistnieniem reakcji obronnej, jest w badanych materiałach roślinnych bezpośrednio

zależna od rodzaju oraz ilości użytego czynnika stresogenego [1,7-10,24,27,30,31,34,36,38,43,51-53,67,77,80,84,91,92,96,99,100,104,125,131]. Jest to szczególnie widoczne w przypadku elicytorów przygotowanych z mikroorganizmów patogennych bądź symbiotycznych [1,7-10,24,30,31,36,38,43,51-53,67,77,80,84,91,92,96,99,100,125,131].

Podczas inkubacji kultur zawiesinowych *Medicago sativa* z wyciągiem z patogennego grzyba *Phoma medicaginis* Dixon i współpracownicy uzyskali w testowanej kulturze roślinnej, znaczną aktywację szlaku fenylopropanoidowego, wiodącego do biosyntezy podstawowych fitoaleksyn, takich jak: satiwan, medykarpina oraz kumestrol [99]. Zaobserwowano również ponad pięćdziesięciokrotnie zwiększoną ekspresję genów związanych z metabolizmem izoflawonoidowym. Zwiększenie poziomu podstawowych fitoaleksyn poprzedzał ponadto znaczny wzrost aktywności kluczowych enzymów (PAL, CHS, IFR) związanych z odpowiedzią obronną roślin z rodziny *Fabaceae*. Stwierdzono jednoznacznie, że powstające wolne fitoaleksyny, w tym wypadku, nie były syntetyzowane *de novo*, ale pochodziły z hydrolytycznego rozpadu estrowych fitoantycypin, obecnych w nieelicytowanym materiale roślinnym. Bardzo istotnym, z aplikacyjnego punktu widzenia, wydaje się fakt, że zarówno aktywność kluczowych enzymów jak i poziomy satiwanu, kumestrolu oraz medykarpiny spadały w zawiesinie *Medicago sativa*, już po 72 godzinach, do ilości oznaczanych przed elicytacją.

Inkubacja zawiesiny lucerny z symbiotycznym grzybem *Glomus versiforme* doprowadziła natomiast jedynie do 3-4 procentowego wzrostu aktywności PAL, CHS i IFR połączonego z równie niewielkim wzrostem poziomów podstawowych fitoaleksyn. W tym wypadku opisywanemu zjawisku towarzyszyło wyraźne zwiększenie stężenia zestryfikowanych fitoaleksyn w testowanej biomase. Niezależnie od typu elicytora oznaczane metabolity zawsze były magazynowane wewnątrzkomórkowo [99].

Zmienny wpływ kolonizacji szczepem symbiotycznym bądź patogennym na biosyntezę izoflawonów potwierdzono w badaniach nad kulturami *in vitro* odciętych korzeni *Glycine soja* [104]. W wyniku inkubacji materiału roślinnego z patogennym grzybem *Rhizoctonia* Phillips i Kapulnik podobnie jak Dixon [99] zaobserwowali znaczny, aczkolwiek krótkotrwały wzrost aktywności szlaku izoflawonoidowego połączony z biosyntezą znacznej ilości gliceoliny. Stwierdzili oni ponadto, że sam proces powstawania wolnej fitoaleksyny zależny jest bezpośrednio od dawki stosowanego elicytora. Małe stężenia patogenu grzybowego, podobnie jak w publikacji Dixona [99], wywoływały hydrolizę estrowej fitoantycypiny i związane z tym uwalnianie fitoaleksyny, którą była w tym wypadku gliceolina. Duże ilości patogennego grzyba wywoływały natomiast biosyntezę gliceoliny *de novo* [104]. W przeciwieństwie do doświadczeń Dixona [99] gliceolina nie była magazynowana wewnątrzkomórkowo, ale zawsze wyrzucana była do środowiska hodowlanego [104].

Odmienny był również metabolizm izoflawonów po inkubacji kultur korzeniowych soi z takimi szczepami symbiotycznymi jak: *Bradyrhizobium japonicum* oraz *Sinorhizobium fredii*. W początkowej fazie kolonizacji, korzenie syntetyzowały znaczne ilości gliceoliny, wyrzucanej natychmiast z ryzofery do pożywki [104]. Jednocześnie stężenie powyższego związku spadało w tym wypadku znacznie szybciej niż w kulturach lucerny [99] i osiągało nawet poziom niższy niż ten, który oznaczano przed elicytacją. Hipoteza postawiona przez autorów niniejszej pracy wskazuje na bardzo szczególne relacje między mikroorganizmami symbiotycznymi i roślinami. Według niej, w początkowym etapie kolonizacji błona komórkowa grzyba symbiotycznego, będąca źródłem właściwych elicytorów, którymi są lipooligosacharydy bezpośrednio powoduje znaczną biosyntezę fitoaleksyn w biomase roślinnej. Zachodząca równocześnie depolaryzacja roślinnej błony komórkowej prowadzi do wyrzucania na zewnątrz powstałych fitoaleksyn. Związki te aktywują w szczepie symbiotycznym biosyntezę

szeregu czynników nodulacji a następnie ich stężenie w pożywce spada. Tym samym wygaszone zostają mechanizmy obronne gospodarza a symbiont może aktywne skolonizować roślinę [104].

Wygaszanie reakcji obronnej podczas kolonizacji roślin szczepami symbiotycznymi potwierdzono w doświadczeniu z kulturami korzeni lucerny elicytowanymi jednocześnie szczepem patogenym *Rhizoctonia solani* oraz symbiotycznym *Glomus intraradices* [51].

Podczas podwójnego zakażenia oznaczono w badanych tkankach jedynie śladowe ilości 3-O-glukozydu medykarpy oraz niską aktywność syntazy chalkonowej (CHS) oraz reduktazy izoflawonowej (IFR), co wyraźnie wskazuje na zaistnienie supresji systemu obronnego. Do powyższego zjawiska doszło w korzeniach lucerny mimo obecności w kulturze szczepu patogenego, wywołującego podczas pojedynczego zakażenia typową reakcję obronną z 5 do 10 krotnym wzrostem stężenia podstawowej fitoaleksyny- 3-O-glukozydu medykarpy [51].

Stwierdzono ponadto, że do supresji systemu obronnego konieczna jest nie tylko obecność szczepu symbiotycznego w ryzosferze, ale inicjuje ją dopiero bezpośrednia kolonizacja tkanki roślinnej. Podobne spostrzeżenia poczyniono w trakcie zakażenia kultur korzeniowych soi *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium japonicum* i *Azorhizobium japonicum* [116]. Hamowanie, indukowanej obecnością patogenu grzybowego, biosyntezy fitoaleksyn stwierdzono również podczas jednoczesnego zakażenia liścieni soi cyklicznymi glukanami z patogenego grzyba *Phytophthora sojae* oraz symbiotycznej bakterii *Bradyrhizobium japonicum* [92].

Tym samym niniejsze doświadczenia potwierdziły metabolizm izoflawonów podczas kolonizacji rośliny symbiontem, zaproponowany przez Phillipsa i Kapulnika [104].

Wielu autorów w doświadczeniach nad biosyntezą fitoaleksyn w warunkach *in vitro* zajmowało się nie tylko wpływem typu elicytora na poziom syntetyzowanych w biomasach roślinnych izoflawonów, ale przede wszystkim badało sam mechanizm powstawania i metabolizowania fitoaleksyn [1,2,7,9,10,24,36,38,43,52,53,67,77,80,84,91,92,96,99,100,125,131]. W zależności od testowanego materiału roślinnego oraz zastosowanej procedury badawczej poszczególni autorzy zmiennie uważają, że izoflawony, w wyniku reakcji stresowej mogą być syntetyzowane *de novo* bądź też mogą powstawać na skutek hydrolitycznego rozpadu magazynowych form (fitoantycypin) [1,2,7,30,31,35,36,53,67,77,80,84,91,92,96,125,130]. Jak już wcześniej nadmieniono, Phillips i Kapulnik w pracach nad kulturami korzeni soi uznali, że w roślinie aktywne są obydwa mechanizmy powstawania fitoaleksyn, a aktywacja jednego bądź drugiego szlaku metabolicznego zależy bezpośrednio od dawki elicytora [104].

Autorzy publikacji dotyczącej kultur zawieszinowych łubinu uważają natomiast, że w wyniku elicytacji biosynteza fitoaleksyn jest indukowana zawsze *de novo* [24]. W prezentowanym doświadczeniu, w wyniku inkubacji badanej kultury z wyciągiem drożdżowym oznaczono w biomasie znaczne stężenia podstawowej fitoaleksyny – medykarpy z jednoczesnym wzrostem poziomu S-adenozylometioniny (SAM), będącej źródłem grup metylowych w biosyntezie prenylowanych izoflawonów [30]. Dodatek do kultury wybranych inhibitorów *trans*- metylacji (cykloleucyny, synefunginy oraz tuberycydyny) selektywnie zahamował produkcję medykarpy indukowaną elicytacją. Wskazuje to więc, że produkcja medykarpy, w omawianym przypadku zachodziła w wyniku biosyntezy *de novo*. Autorzy niniejszej pracy zauważyli ponadto, że inhibicja podstawowego „izoflawonoidowego” mechanizmu obronnego może uaktywnić biosyntezę innych, nie związanych z flawonoidami, substancji obronnych. W opisywanym przypadku był to likodion należący do retrochalkonów [24]. Podobny proces obserwowano po elicytacji grzybowym naftochinonem zawiesziny *Glycyrrhiza echinata* [96]. Kultury te charakteryzowały się bardzo bogatym metabolizmem fenylopropanoidowym,

stad autorzy proponują zastosowanie hodowli *in vitro Glycyrrhiza echinata* jako układów modelowych do badania odpowiedzi obronnej w roślinach z rodziny *Fabaceae*. W wyniku elicytacji biotycznej doszło, w badanych kulturach, do bardzo szybkiej biosyntezy *de novo* znacznych ilości medykarpiny i formononety, izoflawonów produkowanych w typowej reakcji obronnej [30,31,33,104,129,130]. Stosunkowo późno, bo dopiero po 48 godzinach zaobserwowano nasiloną produkcję charakterystycznych dla badanej rośliny retrochalkonów, takich jak: echinatyna i likodion. Jak już wspomniano, biosynteza tych ostatnich przebiegała znacznie intensywniej po przeprowadzeniu blokady podstawowego szlaku izoflawonoidowego. Na podstawie uzyskanych rezultatów autorzy uznali, że indukowana elicytacją biosynteza izoflawonów *de novo* stanowi jedynie wąski wycinek o wiele bardziej skomplikowanej reakcji obronnej [96].

Biosyntezę fitoaleksyn *de novo* potwierdzono również w kilkudniowych kielkach ciecierzy (*Cicer arietinum*) poddanych działaniu modelowego elicytora – glutationu [7]. Autorzy niniejszej pracy wykluczyli wręcz powstawanie medykarpiny, makkiainy, biochaniny A oraz formononetyny z odpowiednich form magazynowych blokując szlak fenylopropanoidowy na poziomie fenyloalaniny lub kwasu *trans*-cynamonowego. Po zastosowaniu wybranych inhibitorów PAL (AOPP – kwasu- α -aminooksy- β -fenylopropionowego) oraz kwasu cynamonowego (MDCA – kwasu 3,4-metylenodioksycynamonowego), całkowicie zahamowano biosyntezę wszystkich wolnych fitoaleksyn, co świadczy, że w tym przypadku związki te syntetyzowane był w wyniku elicytacji *de novo* a nie poprzez rozpad hydrolityczny malonowych form magazynowych [7].

Podobnie do opisywanych powyżej doniesień, korzenie włośnikowate *Glycine max* inkubowane z zawiesiną patogennej bakterii glebowej *Fusarium solani* produkowały *de novo* znaczne ilości podstawowej fitoaleksyny – glicyteiny. Potwierdzono, że związek ten powstawał zawsze z daidzeiny na skutek bezpośredniej aktywacji podstawowego szlaku fenylopropanoidowego [84].

Hipotezę powstawania fitoaleksyn *de novo* będącej bezpośrednim skutkiem działania czynnika stresogenego zanegowali całkowicie autorzy publikacji dotyczącej kultur zawieszinowych *Cicer arietinum* [9]. Obok dodatku do hodowli takich elicytorów jak zawiesina *A. rabiei* oraz frakcji polisacharydowej z drożdży zastosowano w tym wypadku inhibitor PAL (L-AOPP – kwas β -fenylopropionowy). Przeprowadzona tym samym blokada podstawowego szlaku fenylopropanoidowego całkowicie uniemożliwiła powstawanie fitoaleksyn *de novo*. Pomimo zastosowanej procedury, w wyniku elicytacji, niezależnie od rodzaju czynnika stresogenego uzyskano każdorazowo znaczny wzrost stężenia wolnych fitoaleksyn. Uznano więc, że w wyniku reakcji stresowej dochodzi zawsze do syntezy fitoaleksyn na skutek rozpadu hydrolitycznego form magazynowych [9].

Powyższy model powstawania izoflawonów zdają się potwierdzać badania na siewkach soi infekowanych *Phytophthora megasperma*, które niezależnie od ilości dodawanego elicytora produkowały gliceolinę na drodze hydrolitycznego rozpadu malonianu daidzeiny [48].

Również w liścieniach soi poddanych zmiennie miejscowemu działaniu laktofenu (difenyloeter), będącego aktywnym składnikiem herbicydu *Cobra*, bądź glukanu ze ściany komórkowej *Phytophthora sojae* dochodziło natychmiast do rozpadu malonianu genisteiny i daidzeiny z utworzeniem znacznych ilości odpowiednich aglikonów [77]. Stwierdzono, że o ile genisteina stanowiła produkt końcowy opisywanych reakcji to daidzeina była dalej aktywnie metabolizowana do podstawowej fitoaleksyny soi, którą jest gliceolina. Zaobserwowany ciąg przemian metabolicznych izoflawonów występował zarówno w miejscu działania czynników stresogenych jak i również w komórkach znacznie oddalonych od bezpośredniej strefy elicytacji.

Wskazuje to na istnienie w badanym materiale roślinnym delikatnej równowagi między bliższą i dalszą odpowiedzią obronną. Ponadto autorzy niniejszej pracy zauważyli, że w odpowiedzi obronnej elicytor glukawanowy w znacznie większym stopniu indukował powstawanie gliceoliny niż genisteiny. Zastosowanie laktofenu wiązało się natomiast z przewagą biosyntezy genisteiny nad gliceoliną. Z uwagi na specyficzną aktywność powyższego difenolu, związaną z tworzeniem aktywnych rodników tlenowych, w tym wypadku hydroliza fitoantycypin wymagała obecności światła [77].

Wyczerpujące badania wyjaśniające w znacznym stopniu metabolizm izoflawonów w elicytowanych kulturach *in vitro* przeprowadzono na hodowli zawieszinowej *Pueraria lobata* [100]. Pod wpływem elicytacji wyciągiem drożdżowym oraz frakcją glikoproteinową ze ścianny komórkowej *Phytophthora megasperma*, podobnie jak w cytowanych powyżej doniesieniach [9,48,77], zaobserwowano w badanej kulturze znaczny wzrost poziomu wolnych fitoaleksyn, przy jednoczesnym 10-15% spadku stężenia form magazynowych (malonylogenisteiny i malonylodaidzeiny). Sugeruje to jednoznacznie, że oznaczane wolne fitoaleksyny pochodziły z rozpadu hydrolitycznego a nie były produkowane w wyniku biosyntezy *de novo*. Ponadto osiem godzin po elicytacji zaobserwowano charakterystyczny, dla elicytowanych kultur, spadek stężenia wolnych izoflawonów i co ciekawe znaczną produkcję malonowych pochodnych genisteiny i daidzeiny. Według autorów niniejszej pracy te „wtórne” połączenia magazynowe powstały całkowicie w wyniku biosyntezy *de novo*, a nie poprzez ponowną estryfikację zhydrolizowanych uprzednio fitoaleksyn. Wskazuje na to zupełny brak powstawania malonianów genisteiny i daidzeiny po dodatku do kultur znanego inhibitora translacji – cykloheksymidu. Dodatkowo autorzy sugerują, że obserwowany po ośmiu godzinach spadek zawartości wolnych fitoaleksyn związany jest z wbudowywaniem tych związków w nierozpuszczalne frakcje błonowe, co stanowi wycinek zaistniałego procesu systemowej reakcji obronnej [100]. By udowodnić przedstawione hipotezy, w zawieszinie *Pueraria lobata* przeprowadzono biokonwersję znakowanej ^{14}C egzogennej daidzeiny, która była aktywnie metabolizowana do ^{14}C malonylodaidzeiny. W wyniku elicytacji wyciągiem drożdżowym, po wstępnej hydrolizie estru stwierdzono wzrost radioaktywności we frakcji lignanocelulozowej zawiesiny [100].

Kompletny metabolizm izoflawonów powstających w procesie reakcji obronnej opisali również Edwards i wsp. dla zawiesziny *Medicago sativa* (lucerny) elicytowanej wyciągiem ze ścianny komórkowej drożdży [37]. W ogólnym ujęciu zaproponowany model metabolizmu fitoaleksyn w elicytowanej kulturze nie potwierdza w pełni żadnej z omawianych uprzednio hipotez, a nawet niektóre ich elementy neguje.

Jak wynika z licznych badań naukowych elicytacja kultur *in vitro* lucerny, ciecierzycy oraz łubinu prowadzi przede wszystkim do uaktywnienia tych szlaków metabolizmu fenylopropanoidowego, które związane są ze zwiększoną metylacją i tym samym powstawaniem takich pochodnych izoflawonoidowych jak: medykarpina, makkiaina, satiwan, wariabilina i inne [7,9,10,24,43,51,80,91,99,131]. Wobec powyższego, w celu uzyskania pełnej kontroli metabolizmu izoflawonoidowego, Edwards i wsp. do zawiesziny lucerny, przed elicytacją, dodali znakowaną ^3H metylometioninę, a następnie badali ewentualne pojawianie się radioaktywności w poszczególnych frakcjach fitoaleksyn, bądź fitoantycypin [37]. Autorzy uznali, że mechanizm elicytacji w poszczególnych kulturach, w przeciwieństwie do omawianych powyżej doświadczeń, ma charakter bardzo złożony. Fitoaleksyny powstałe w pierwszych godzinach po elicytacji produkowane były w wyniku hydrolitycznego rozpadu form magazynowych podobnie jak w doświadczeniach nad kulturami *in vitro* *Cicer arietinum* [7] i *Pueraria lobata* [100]. Dalszy wzrost stężenia medykarpiny, satiwanu i wariabiliny związany był natomiast z ich produkcją *de novo*, o czym świadczy znaczna radioaktywność omawianych

produktów. Ta, nazwijmy ją, „druga faza” elicytacji przypomina więc model reakcji obronnej zaproponowany w doświadczeniach nad kulturami *in vitro* łubinu [24], *Glycyrrhiza echinata* [96] i *Cicer arietinum* [7]. Jedynie powstałe w wyniku biosyntezy *de novo* fitoaleksyny, podobnie jak w kulturach *Pueraria lobata* [100] były wyrzucane do pożywki i tam „detoksyfikowane” w procesie estryfikacji do odpowiednich pochodnych malonowych. Związki te magazynowane były natomiast wewnątrzkomórkowo [37]. Ponadto, w przeciwieństwie do zawiesiny *Pueraria lobata* [100] wolne fitoantycypiny w zawiesinie lucerny nie były zupełnie wbudowywane we frakcję błonową [37].

Stosowanie tego samego elicytora w kulturach *in vitro* różnych gatunków z rodziny *Fabaceae* dowiodło, że niezależnie od użytego czynnika stresogenego zakres obserwowanej reakcji obronnej jest każdorazowo bezpośrednio zależny od konkretnego materiału roślinnego [36]. Kultury zawiesinowe *Medicago sativa* poddane działaniu monoetylowego estru glutationu (GSH) zupełnie nie produkowały podstawowej fitoaleksyny – medykarpiny. Nie zaobserwowano w nich również wzrostu aktywności enzymów związanych z biosyntezą izoflawonów. Przeciwnie, w hodowli zawiesinowej fasoli (*Phaseolus vulgaris*) glutation zaktywizował cały szlak syntezy fitoaleksyn, co manifestowało się między innymi 15-20% nasileniem biosyntezy kiewetonu, będącego w fasoli podstawową fitoaleksyną [36]. Identyczny efekt uzyskano po potraktowaniu wyżej wymienionych zawiesin komórkowych preparatem przygotowanym z ściany grzyba *Colletotrichum lindemuthianum*. Autorzy niniejszej pracy prześledzili ponadto metabolizm egzogenne podanego glutationu wraz z frakcją endogenną powyższego tiolu w obydwu kulturach zawiesinowych. Okazało się, że metabolizm znakowanego, egzogenne elicytora w kulturach fasoli i lucerny jest odmienny. W przypadku fasoli zewnętrzny glutation wbudowywał się równomiernie w rozpuszczalną i nierozpuszczalną frakcję tiolową. W lucernie natomiast większość glutationu egzogenne była inkorporowana we frakcję nierozpuszczalnej. Być może zaburzenie wewnętrznej równowagi w poziomach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych tioli jest powodem braku wystąpienia sygnału do zapoczątkowania reakcji obronnej w lucernie. Wewnętrzny glutation w obydwu hodowlach zawiesinowych wydawał się nie uczestniczyć w typowej reakcji obronnej. Mianowicie w badanych kulturach poziomy wewnętrznych tioli rosły zbyt wolno by mówić o typowym udziale tych związków w procesie powstawania fitoaleksyn. Sugeruje się, że być może uczestniczą one w reakcji obronnej poprzez mechanizmy detoksyfikacji rodników elektrofilowych [36].

Typ elicytowanego materiału roślinnego może decydować nie tylko o ewentualnym wystąpieniu reakcji obronnej w odpowiedzi na stres biologiczny. Stwierdzono również bezpośrednią zależność między rodzajem kultury *in vitro* a czasem, po którym następowała w elicytowanej hodowli biosynteza fitoaleksyn [53].

Kultury korzeniowe *Glycine max* inkubowane z zoosporami patogennego grzyba *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* syntetyzowały fitoaleksyny znacznie szybciej niż zawiesina powyższej rośliny poddana identycznej reakcji stresowej [53]. Autorzy niniejszej pracy uważają, że w przypadku kultur korzeniowych zaistniała szybka reakcja obronna związana z ściśle określoną lokalizacją elicytacji i miała ona jednocześnie charakter odpowiedzi miejscowej. Przeciwnie, wydaje się, że w zawiesinie wszystkie komórki, w tym samym czasie, poddawane są działaniu elicytora, w wyniku czego dochodzi do indukcji opóźnionej reakcji obronnej o charakterze systemowym [53].

Z przedstawionych powyżej danych literaturowych wynika, że biosynteza izoflawonoidowych fitoaleksyn indukowana dodatkiem elicytora zależy nie tylko od czynnika stresogenego ale również od typu materiału roślinnego poddanego elicytacji (kultury zawiesinowe, korzeniowe, odcięte liścienie itd.) oraz samego gatunku roślinnego [1,2,7,9,10,24,36,38,43,

52,53,67,77,80,84,91,92,96,99,100,125,131]. Kolejne doniesienia sugerują natomiast, że na proces ten wpływa również wiek biomasy roślinnej [7,109]. Udowodnienie takiej hipotezy umożliwiły między innymi badania nad korzeniami włośnikowatymi *Lotus corniculatus* elicytowanymi glutationem [109]. Korzenie włośniczkowe w przeciwieństwie do zawieszin agregatów komórkowych stanowią układy heterogenne, charakteryzujące się zróżnicowanym wiekiem poszczególnych korzeni w kulturze [46,134]. W efekcie w układzie takim możliwe było prześledzenie zależności między wiekiem odciętego, poddanego elicytacji korzenia a poziomem zaistniałej odpowiedzi obronnej [109]. Ostatecznie stwierdzono, że wraz z wiekiem korzeni *L. corniculatus* rośnie 3-4 krotnie aktywność PAL oraz stężenia westitolu (7,2'-dihydroksy-2',4'-dimetoksyizoflawanu) i satiwanu (7-hydroksy-2',4'-dimetoksyizoflawanu), podstawowych fitoaleksyn oznaczanych po elicytacji kultur glutationem. Obserwowane zjawisko zależało każdorazowo od wieku poszczególnych korzeni a nie od wieku całej kultury. Powstałe po elicytacji wolne fitoaleksyny wyrzucane były w 60-70% do podłoża doświadczalnego [109].

Wiek korzeni był również istotnym czynnikiem wpływającym na biosyntezę fitoaleksyn w krótkotrwałych kulturach siewek ciecierzycy elicytowanych glutationem [7]. Podobnie jak w wyżej opisywanym doniesieniu starsze korzenie syntetyzowały znacznie więcej fitoaleksyn niż organy młode. Dodatkowo autorzy zaobserwowali, że nie tylko ilość syntetyzowanych fitoaleksyn była zależna od wieku kultury ale również ich rodzaj. Podczas, gdy w 1-2 dniowych elicytowanych korzeniach rosły znacznie poziomy medykarpiny, makkiainy, biochaniny A i formononetyny, to 4-6 dniowe siewki syntetyzowały dodatkowo cicerynę i homoferreirynę [7].

Typ stosowanego elicytora oraz jego stężenie mogą wywierać wpływ nie tylko na ilość produkowanych w biomasach fitoaleksyn, ale również na typ syntetyzowanych związków.

Dowodzą tego badania Phillipsa i Kapulnika dotyczące hodowli siewek łubinu białego poddanego działaniu różnych stężeń takich elicytorów jak: ekstrakt drożdżowy, chitosan, zawiesina symbiotycznego szczepu *Rhizobium loti* oraz chlorku miedziowego [43]. Autorzy oznaczali w biomasie oraz pożywkach stężenia szeregu metabolitów izoflawonoidowych, takich jak: prenylowe pochodne genisteiny oraz 2'-hydroksygenisteiny oraz wolne aglikony. W efekcie tak szeroko zaprojektowanego doświadczenia potwierdzono jednoznacznie, że typ elicytora warunkuje poziom zaistniałej reakcji obronnej. W przypadku siewek łubinu najsilniejszym elicytorem okazał się, w całym przedziale stosowanych stężeń, ekstrakt drożdżowy (48 krotny wzrost stężenia wolnych fitoaleksyn). Pozostałe elicytory indukowały biosyntezę izoflawonów znacznie słabiej (3-27 krotny wzrost zawartości). Ponadto autorzy udowodnili, że typ elicytora może wybiórczo indukować biosyntezę określonych fitoaleksyn. W wyniku inkubacji materiału roślinnego z ekstraktem drożdżowym, chitosanem czy też chlorkiem miedziowym w materiale roślinnym oznaczono znaczne stężenia 2'-hydroksygenisteiny oraz jej prenylowych pochodnych. Zawiesina z symbiotycznego grzyba *Rhizobium loti* indukowała natomiast wybiórczo biosyntezę genisteiny i jej prenylowych pochodnych. W oparciu o powyższe spostrzeżenie autorzy uznali, że biosynteza pochodnych genisteiny jest specyficzna dla kolonizacji rośliny szczepem symbiotycznym. Z tego powodu pochodne genisteiny nazwano „fitoaleksynami symbiotycznymi” w przeciwieństwie do pochodnych 2'-hydroksygenisteiny syntetyzowanych podczas typowej reakcji obronnej [43].

Podobne efekty po zastosowaniu elicytora drożdżowego oraz chlorku miedziowego na odciętych liściach łubinu białego uzyskali Wojtaszek i wsp. [131]. Również w tym wypadku bezpośrednio po elicytacji uzyskano kilkukrotny wzrost zawartości 2'-hydroksygenisteiny i jej prenylowych pochodnych, przy braku zmian w stężeniu genisteiny.

Przeciwnie do opisywanych doniesień, Shibuya [114] i Bednarek i wsp. [10] w wyniku elicytacji całych siewek łubinu ekstraktem drożdżowym [10] bądź chlorkiem miedziowym [114] zaobserwowali znaczną kumulację zarówno 2'-hydroksygenisteiny i jej prenylowych pochodnych jak i również samej genisteiny. Zaistniałe rozbieżności są trudne do wytłumaczenia ze względu na zróżnicowane procedury doświadczalne, w tym między innymi zmienny czas trwania elicytacji oraz odstępy czasowe, po których wykonywano pomiary [10,114].

Wszystkie prezentowane powyżej doniesienia literaturowe wskazują na zmienny sposób magazynowania syntetyzowanych, w wyniku stresu, fitoaleksyn [1,2,7-10,24,27,30,31,34,36-38,43,48,51-53,67,77,80,84,91,92,96,99,100,104,109,114,116,125,131]. Z uwagi na różnorodność stosowanych procedur doświadczalnych, w tym różnego materiału roślinnego oraz typu elicytacji trudno jednoznacznie określić przyczynę zaobserwowanej zmienności.

Problem ten starają się częściowo wyjaśnić autorzy doniesienia o elicytacji ciecierzycy wyciągiem drożdżowym [66,67]. W miarę zwiększania stężenia elicytora drożdżowego w kulturze oznaczali oni coraz większe ilości fitoaleksyn w pożywce. Efekt ten wiąże z zaistnieniem, prawdopodobnie na skutek toksycznych, wysokich dawek elicytora, permeabilizacją ścian komórkowych i związanym z tym mechanicznym wyciekami izoflawonów do podłoża. Podobną zależność stopnia wycieku izoflawonów od dawki stosowanego elicytora zaobserwowano również w krótkotrwałych hodowlach siewek łubinu białego [43].

Wydaje się, że nie tylko ilość, ale również typ elicytora wpływa na magazynowanie syntetyzowanych pod jego wpływem fitoaleksyn. Elicytowane chlorkiem miedziowym liścienie łubinu [131] syntetyzowały izoflawonoidowe fitoaleksyny, które tylko w 0,09% wyrzucane były do pożywki. Przeciwnie, ekstrakt drożdżowy wywoływał odpowiedź obronną o charakterze bardziej uogólnionym, w wyniku której 70% syntetyzowanych fitoaleksyn trafiało do podłoża [44,114].

Sposób magazynowania syntetyzowanych fitoaleksyn, w elicytowanych korzeniach soi, zdawał się natomiast zależeć bezpośrednio od rodzaju produkowanych w wyniku stresu izoflawonoidów [84]. W wyniku kokulturywacji omawianej tkanki korzeniowej z bakterią glebową *Fusarium solani*, f. sp. *glycines* dochodziło do znacznej biosyntezy genisteiny, glicyteiny, kumestrolu oraz gliceoliny. Jedyną fitoaleksyną wyrzucaną w 50% do pożywki była gliceolina. Pozostałe związki magazynowane były wewnątrzkomórkowo. Podobną zależność zaobserwowano w kulturach zawieszinowych soi poddanych elicytacji patogenną bakterią glebową z rodzaju *Fusarium* [140]. Autorzy niniejszej pracy uważają, że sposób magazynowania poszczególnych fitoaleksyn związany jest z ich funkcją w systemie obronnym rośliny. W związku z powyższym gliceolina biorąca udział w odpowiedzi systemowej wyrzucana jest do środowiska a proste izoflawony odpowiedzialne za lokalną reakcję obronną magazynowane są wewnątrzkomórkowo, w strefie infekcji [84,140].

Również autorzy publikacji dotyczącej elicytowania kilkudniowych siewek ciecierzycy glutationem szeroko dyskutują problem wewnątrzkomórkowego magazynowania, ewentualnie wycieku syntetyzowanych fitoaleksyn [7]. W zaprojektowanym doświadczeniu uzyskano całkowity wyciek z biomasy korzeniowej syntetyzowanych izoflawonów do środowiska. Uznano więc, że dzieje się tak na skutek samej specyfiki materiału roślinnego użytego do doświadczenia a nie typu bądź ilości stosowanego elicytora. Autorzy przypuszczali także, że w całej hodowli *in vitro* bądź organizmie roślinnym występuje ścisła kompartmentacja syntetyzowanych wtórnych metabolitów i sposobu ich magazynowania. W związku z tym określone kompartmenty (komórki, tkanki, organy) mogą wykazywać różną wrażliwość na elicytację. Przykładowo, syntetyzując i magazynując fitoaleksyny w strefie elicytacji są one jednocześnie odpowiedzialne za lokalną reakcję obronną. Wyrzucanie fitoaleksyn z tkanki jest

natomiast początkiem obronnej reakcji systemowej [24,113]. Pomimo faktu, że oba mechanizmy reakcji obronnej występują w każdej biomasy roślinnej, w większości wypadków mamy do czynienia z dominacją jednego nad drugim. W efekcie tej przewagi, eksperymetatorzy dysponując metodami analitycznymi o określonej czułości oznaczają fitoaleksyny w tkankach bądź w środowisku [7].

Inkubacja kilkudniowych siewek ciecierzycy z elicytorem grzybowym – fusikokcyną sugeruje, że kluczem do aktywnego wycieku fitoaleksyn z biomasy roślinnej może być zaistniała, w wyniku elicytacji, depolaryzacja błony plazmatycznej i zmiana w transporcie jonowym w poprzek plazmolemy [8]. Fusikokcyna należy do znanych inhibitorów H^+ ATPazy błonowej, odpowiedzialnej za utrzymanie wewnątrzkomórkowego pH oraz różnicy potencjału elektrycznego w poprzek błony plazmatycznej [63]. Tym samym mniej lub bardziej modyfikuje ona przepuszczalność jonową. Z tego względu autorzy niniejszej pracy uznali, że ATPaza może pełnić rolę przekaźnika w transdukcji sygnałnej i prowadzić, nie tylko do powstawania fitoaleksyn, ale przede wszystkim wpływać aktywnie na ich wyciek z komórki [8]. Stąd zastosowanie fusikokcyny w siewkach ciecierzycy indukowało wyciek syntetyzowanych izoflawonów do środowiska doświadczalnego. Identyczne efekty uzyskano modelując kwasowość środowiska. pH powyżej 6, każdorazowo warunkowało całkowity wyciek, do podłoża, podstawowych fitoaleksyn, takich jak: medykarpina, biochanina A, makkaina i formononetyna [8].

Omawiane powyżej doświadczenia dotyczące biosyntezy izoflawonów w elicytowanych kulturach roślin z rodziny *Fabaceae* dowodzą jednoznacznie, że całkowity mechanizm powstawania i metabolizmu fitoaleksyn nie jest do końca poznany. Wpływa na to jego złożony charakter i związana z tym różnorodność wyników uzyskanych przez poszczególnych eksperymentatorów. Dotyczy ona nie tylko samego procesu biosyntezy fitoaleksyn, ale również sposobu ich magazynowania. Nie bez znaczenia jest również wpływ na powyższe procesy czynnika zewnętrznego, którym jest sam elicytor oraz wewnętrznego, a mianowicie samego materiału roślinnego.

Dla biotechnologa pracującego nad otrzymaniem w warunkach *in vitro* systemu roślinnego mogącego stanowić bogate źródło izoflawonów o określonej aktywności biologicznej najistotniejszy wydaje się fakt, że w wyniku przeprowadzenia elicytacji możliwe jest znaczne zwiększenie w testowanej biomasy ilości badanych połączeń. Ponadto, co bardzo istotne z technologicznego punktu widzenia, możliwe jest również spowodowanie sterowanego wycieku pożądanych izoflawonów do medium hodowlanego [24,36,38,43,53,77,84,91,92,96,125].

Dodatek prekursorów biosyntezy

Tylko nieliczne prace z zakresu kultur *in vitro* roślin motylkowych dotyczą dokarmiania hodowanych biomas tzw. dalekimi prekursorami izoflawonoidowymi [7,9,23,38,40]. Powyższy zabieg technologiczny stosowany jest przede wszystkim w celu określenia wpływu dodanych prekursorów na biosyntezę oraz metabolizm izoflawonoidów. Tym samym eksperymetatorzy zmierzają raczej do wyjaśnienia pewnych etapów biosyntezy izoflawonów nie zaś do poprawienia produktywności otrzymanych biomas w zakresie badanych połączeń [7,9,23,38]. Najczęściej stosowanymi prekursorami w doświadczeniach nad biosyntezą izoflawonów, w warunkach *in vitro*, są wczesne metabolity szlaku fenylopropanoidowego, takie jak: fenyloalanina oraz kwas *trans*-cynamonowy [7,9,23,38,40]. Z przeprowadzonych badań wynika, że zjawisko ewentualnego włączania tych związków do łańcucha przemian izoflawonoidowych zależy zarówno od rodzaju stosowanego prekursora, jak i również pośrednio od testowanego systemu hodowlanego [9,23,38].

Dodawany do pożywek doświadczalnych kwas *trans*-cynamonowy, niezależnie od stężenia wyjściowego, nie zostawał wykorzystany, przez badane kultury, jako substrat do produkcji izoflawonów [9,38]. Zjawisko to zdawało się być całkowicie niezależne od rodzaju biomasy roślinnej.

W przypadku elicytowanej *Colletotrichum lindemutianum* zawiesiny *Phaseolus vulgaris*, egzogenne kwas cynamonowy nie tylko nie został włączony do przemian biogennych wiodących do powstania izoflawonów, ale zahamował również metabolizm fitoaleksyn warunkowany zaistnieniem procesu stresowego [38]. Dodany prekursor indukował jedynie enzymy biorące udział w metabolizmie kwasu cynamonowego takie jak: hydrolazę kwasu cynamonowego – C4H, oraz specyficzne glukotransferazy. W efekcie, w zawieszynie fasoli, oznaczono znaczne ilości kwasu *trans*-cynamonowego, p-kumarowego i kawowego oraz pochodnych glukozydowych tych związków. Część egzogennej (¹⁴C) kwasu *trans*-cynamonowego wbudowywana była również w nierozpuszczalne frakcje celulozowe i hemicelulozowe biomasy [38].

Podobne efekty dokarmiania kultur *in vitro* kwasem cynamonowym zaobserwowano w przypadku zawiesiny *Cicer arietinum* elicytowanej wyciągiem drożdżowym [38]. Również tu kwas cynamonowy ulegał natychmiastowej glukozydacji, wbudowaniu w nierozpuszczalne frakcje ścian komórkowych i dodatkowo wiązał się z glutationem. Opisywanym procesom towarzyszyło blokowanie aktywności podstawowych enzymów, biorących udział w metabolizmie izoflawonów (PAL oraz IEST-metylotransferazy izoflawonowej) [9,23,38].

Opisywane doświadczenia dotyczą biomas elicytowanych bezpośrednio przed dodaniem prekursora. W związku z tym końcowy metabolizm kwasu *trans*-cynamonowego jest wynikiem zaistniałej w kulturach reakcji stresowej, czego dowodem jest biosynteza fenolokwasów oraz ich glukozydów, charakteryzujących się własnościami przeciwbakteryjnymi i przeciwgrzybiczymi [9,23,38]. Przemiany kwasu *trans*-cynamonowego dodanego do kultur produkujących izoflawony konstytucyjnie mogłyby przedstawiać się zupełnie odmiennie.

W przeciwieństwie do kwasu *trans*-cynamonowego, dodana do kultur korzeniowych *Cicer arietinum* fenyloalanina była aktywnie włączana w przemiany szlaku fenylopropanoidowego, prowadzące do powstania izoflawonów. W efekcie zastosowanej procedury dokarmiania, w kulturach ciecierzycy, uzyskano podwyższone ilości biochaniny A, formononetyny, homoferreiryiny i ciceryny [7].

Dwukrotne podwyższenie całkowitej zawartości izoflawonów uzyskano również w hodowli kalusowej *Maackia amurensis* suplementowanej fenyloalaniną [40]. Stosowany, w doświadczeniu, dodatek kwasu benzoowego, nie biorącego udziału w biosyntezie metabolitów szlaku fenylopropanoidowego [30,129,130], nie wpłynął stymulująco na kumulację badanych związków [40].

Cytowane powyżej doświadczenia biotechnologiczne dowodzą, że problem niskiej wydajności kultur *in vitro* w zakresie połączeń izoflawonoidowych można próbować rozwiązać stosując dokarmianie biomas wybranymi, wczesnymi metabolitami szlaku fenylopropanoidowego, ze wskazaniem na fenyloalaninę [7,40].

Biotransformacja

Sterowaną biosyntezę aktywnych farmakologicznie izoflawonów przeprowadza się, w warunkach *in vitro*, przy udziale wybranych mikroorganizmów oraz kultur roślin motylkowych posiadających układy enzymatyczne zdolne do przemian endogennie występujących izoflawonów jak i również ksenobiotyków o podobnej budowie, dodanych do pożywek

doświadczalnych [3,4,22,30,32,54,57,60,64,69,72,73,76,81,93,100,120,129,137]. Najczęściej jedno lub dwuetapowy proces biotransformacji izoflawonów obejmuje: izomeryzację, odwodornienie, hydrolizę, hydroksylację, estryfikację, demetylację oraz glikozydację odpowiednich substratów i w efekcie uzyskanie połączeń o pożądanej strukturze [30,32,64,129].

Jedna z dwóch podstawowych strategii stosowanych w tego typu doświadczeniach obejmuje izolację wybranych frakcji enzymatycznych lub enzymów z roślinnych lub bakteryjnych kultur *in vitro*, które stosuje się następnie w mieszaninach reakcyjnych z dodatkiem odpowiedniego prekursora i kofaktorów, w celu otrzymania pożądanego izoflawonu [22,54,57,60,73,76,93,137].

Ten typ postępowania, przypominający procedury przyjęte w ściśle chemicznych technologiach, zastosowano m. in. do otrzymania daidzeiny z likwirytygeniny, przy udziale frakcji mikrosomalnej, wyizolowanej z zawiesiny *Pueraria lobata* [54]. Dwuetapowy przebieg reakcji polegał na przekształceniu flawononu – likwirytygeniny do 2,7,4'-trihydroksyizoflawonu, przy udziale monooksygenazy mikrosomalnej. W drugim etapie procesu, powyższy produkt, za pośrednictwem odpowiedniej dehydratazy, ulegał natychmiastowej biokonwersji do daidzeiny.

Podobna do wyżej opisanej strategia uprzedniej izolacji frakcji mikrosomalnej z zawiesiny łubinu i zastosowaniu jej w mieszaninie reakcyjnej z genisteiną i 2'-hydroksygenisteiną doprowadziła do powstania z obydwu związków produktów prenylowanych w pozycjach: 6, 8 i 3' [76]. Biotransformacji nie uległy natomiast stosowane w mieszaninie flawonole oraz uprzednio monoprenylowane izoflawony typu wigteonu. Wskazuje to m. in. na wysoką specyficzność prenylotransferaz łubinu w stosunku do określonych substratów izoflawonoidowych. Fakt ten potwierdza analogiczny eksperyment przeprowadzony z udziałem frakcji mikrosomalnej zawiesiny *Phaseolus vulgaris* prenylującej jedynie izoflawony w pozycji 2 i 4 [137].

Również frakcja mikrosomalna zawiesiny *Cicer arietinum* przy udziale NADPH i tlenu cząsteczkowego katalizowała monohydroksylację w pozycjach 2', 3' i 4' metoksyizoflawonów. W rezultacie w wyniku zaistniałej biokonwersji otrzymano odpowiednio z biochaniny A i formononetyny makkiainę i medykarpinę [57].

Opisane powyżej procedury, z uwagi na proces izolacji frakcji enzymatycznych, są wieloetapowe i tym samym czasochłonne [22,57,60,76,93,137]. Konieczność stosowania drogich i często nietrwałych kofaktorów (np. NADPH) powoduje, że pomimo znacznej wydajności i czystości uzyskanych produktów procesy te są ekonomicznie nieopłacalne. Stosuje się je więc przede wszystkim do otrzymania wzorców rzadkich substancji izoflawonoidowych, bądź też w celu wyjaśnienia pewnych przemian biogennych dla tych związków [22]. Szanse na otrzymanie, na drodze biokonwersji, przemysłowych ilości aktywnych biologicznie izoflawonów budzą raczej technologie oparte na wykorzystaniu aktywnie rosnących kultur roślin motylkowych lub mikroorganizmów zdolnych do przekształcania substratów izoflawonoidowych dodanych bezpośrednio do pożywki wzrostowej [3,4,72,73,93,100,137].

Przykładem tego typu doświadczeń, z wykorzystaniem kultur wybranych mikroorganizmów, są hodowle *Brevibacterium epidermides* i *Micrococcus luteus* prowadzone w obecności glicyteiny, genisteiny bądź daidzeiny [72,73]. Powyższe bakterie, występujące naturalnie w zaczynie fermentacyjnym, stosowanym do przetwarzania pulpy z nasion sojowych w wysokobiałkowy produkt o nazwie *tempe* [73] okazały się zdolne do 6-O-demetylacji glicyteiny oraz 6-O-hydroksylacji daidzeiny, glicyteiny i daidzeiny. Otrzymane z 60% wydajnością,

produkty charakteryzowały się, w porównaniu z substratami, znacznie większą biodostępnością [72].

Interesującym biokatalizatorem wydają się również kultury *Aspergillus niger* przekształcające egzogenne dodaną daidzeinę do 8-hydroksyformononetyny oraz 7,4'-dimetoksyflawon do daidzeiny [93].

Biokonwersję egzogennej formononetyny do, posiadającej znacznie większą aktywność fitoestrogenną, daidzeiny umożliwiło natomiast posłużenie się kulturami *Fusarium pomiferatum* [137].

Również anaerobowe bakterie jelita ludzkiego *Eubacterium limosum* (ATCC 8486), w warunkach kultur *in vitro*, z 90 % wydajnością, zdolne były do demetylacji biochaniny A, formononetyny i glicyteiny z utworzeniem odpowiednio: genisteiny, daidzeiny i 6,7,4'-trihydroksyflawonu [60]. Wszystkie otrzymane, w ciągu 26 dniowego procesu, produkty charakteryzowały się większą aktywnością fitoestrogenną niż wyjściowe substraty. W przeciwieństwie do procesów zachodzących naturalnie w jelicie ludzkim, opisywane kultury *in vitro* nie były jednak zdolne do dalszej demetylacji izoflawonów, z utworzeniem końcowego produktu, którym jest ekwol [60].

Możliwości biokonwersji, w obrębie szeroko rozumianej klasy izoflawonów, stwarzają również aktywnie rosnące kultury *in vitro* roślin motylkowych [3,4,100].

Przykładowo, zawiesina *Glycyrrhiza echinata* zdolna była do przekształcenia egzogenne-go 2,7,4'-trihydroksyizoflawanonu do formononetyny [3]. Produktem pośrednim opisywanej reakcji, w kulturach *in vitro*, był 2,7-dihydroksy-4'-metoksyizoflawon, a nie daidzeina, jak ma to miejsce w roślinie gruntowej. Tym samym, w opisywanym systemie hodowlanym, na skutek dodatku egzogenne-go substratu powstał nowy, alternatywny szlak metaboliczny, wiodący do biosyntezy formononetyny [3].

Rzadki 7-hydroksy-6,4'-dimetoksyizoflawon (aformozyne) uzyskano natomiast w kulturach kilkunastu siewek sparcety (*Onobrichis vicifolia*), suplementowanych znakowanymi [Me-¹⁴C]: formononetyną, daidzeiną i teksazyną [4]. Wszystkie dodawane substraty, w procesie dwu- lub trójetapowej biokonwersji przekształcane były z ponad 90% wydajnością do afromozyny [4].

W przypadku zawiesiny *Pueraria lobata* udało się przeprowadzić, z 70% wydajnością, biotransformację szeregu aglikonów izoflawonoidowych, takich jak: biochaniny A, formononetyny, genisteiny i daidzeiny, otrzymując odpowiednie pochodne glukozydowe i malonowe [100]. Ponadto, obecne w kulturze metylotransferazy i glikozydazy okazały się mało specyficzne wobec egzogenne-yh substratów. Poza izoflawonami, były one zdolne biotransformować flawony takie jak: chryzynę, akacetynę i apigeninę oraz prosty fenol – rezacetofenon [100]. W efekcie przeprowadzonej procedury uzyskano kultury *in vitro* *Pueraria lobata* o znacznie poszerzonym metabolizmie wtórnym.

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy enzymy związane z biosyntezą izoflawonów zorganizowane są w agregaty multienzymowe, które nie tylko umożliwiają interakcje enzym-enzym, ale również warunkują odpowiednie przekierowanie substratów [31,137]. Szeroko rozumiana kompartmentacja metabolizmu izoflawonowego wraz z inhibicją zwrotną ich biosyntezy, związaną m.in. z nagromadzeniem produktów, ogranicza wykorzystanie rosnących kultur *in vitro* do produkcji określonych fitoestrogenów, na drodze biokonwersji.

Modyfikacje genetyczne

Wraz z rozwojem biologii molekularnej i związanych z nią strategii inżynierii genetycznej podjęto badania nad biosyntezą związków izoflawonoidowych w oparciu o kultury transgeniczne [30,31,130,137].

Część omawianych projektów badawczych dotyczy kultur korzeni włośnikowatych wybranych gatunków z rodziny *Fabaceae*. W danym wypadku określa się przede wszystkim wpływ samego procesu agroinfekcji na biosyntezę i metabolizm izoflawonów w otrzymanych uprzednio korzeniach transgenicznym [12,18,28,53,78,79,84,91,109,116,119].

Sterowanej biosyntezie wybranych fitoestrogenów (izoflawonów, pterokarpanów oraz kumestanów) poświęcone są natomiast prace dotyczące transgenicznych biomas roślinnych, w których genom biorcy został uzupełniony o obce geny związane z biosyntezą wybranych enzymów szlaku fenylopropanoidowego (np. syntazy chalkonowej, izomerazy chalkonowej, reduktazy izoflawonowej itd.) [22,41,64,82,102,112,117,119,135,137-139,141,144]. Powyższe transgeny wprowadza się, przy pomocy wektorów bakteryjnych [12,28,32,34,41,82,112,135,144] oraz techniki mikrowstrzeliwania [28,32,82,137,139,141] do biomas pochodzących z roślin motylkowych [12,28,32,41,82,102,112,117,119,135,137,144] lub do gatunków nie syntetyzujących w warunkach naturalnych związków izoflawonoidowych (np. *Arabidopsis thaliana* i *Nicotiana tabacum*) [22,28,82,137,138].

Z punktu widzenia technologicznego proces transformacji genetycznej w roślinach z rodziny *Fabaceae* wydaje się być stosunkowo trudny [10,41,119,141,144]. Przyczynę tego faktu liczni autorzy upatrują w specyficznych mechanizmach obronnych, charakterystycznych dla roślin motylkowych i związanych z procesami symbiotycznymi dotyczącymi tych roślin i bakterii glebowych z rodzaju *Rhizobium* [10,12,119,137,141,144]. Opisywane trudności dotyczą zarówno samego wprowadzenia transgeny do komórek biorcy jak i późniejszego uzyskania, w przypadku transformacji wektorowych, jałowych a jednocześnie żywotnych kultur roślinnych. Istotny problem stanowi ponadto selekcja klonów wykazujących trwałą ekspresję obcych genów strukturalnych i ewentualna regeneracja roślin transgenicznych [10,41,82,102,112,119,135,137,139,141,144]. Z uwagi na opiswane trudności opracowano liczne strategie umożliwiające otrzymanie stabilnego, transformowanego materiału roślinnego [28,41,102,112,135,137,141].

Modelowymi gatunkami w badaniach nad transformacjami genetycznymi roślin z rodziny *Fabaceae* są między innymi: *Glycine max*, *Cicer arietinum*, *Lupinus albus* oraz *Medicago sativa*, czyli podstawowe gatunki użytkowe tej rodziny [41,102,112,135,141,144]. Z przeprowadzonych badań wynika, że o procesie transgenezy w roślinach motylkowych decyduje bezpośrednio dobór techniki transformacji. Stwierdzono, że bezwektorowe metody transformacji są ciągle mało skuteczne bez względu na typ wprowadzanych genów strukturalnych (np. warunkujących mrozoodporność bądź biosyntezę wybranych enzymów szlaku fenylopropanoidowego) [82,102,112,135,137,139,141,144]. Niezależnie od wyjściowego materiału biologicznego (gatunek rośliny, rodzaj tkanki) uzyskano każdorazowo słabą przeżywalność biomas roślinnej oraz niski procent kopii obcego fragmentu DNA włączonego do genomu biorcy [102,137]. Autorzy przytaczanych prac uznali, że przyczyną licznych niepowodzeń jest szok akustyczny, któremu podlegają komórki roślinne, a w mniejszym stopniu późniejsza selekcja transformantów [102]. Z uwagi na powyższe, stosowanie wektorów bakteryjnych w postaci dzikich i przekonstruowanych szczepów z rodzaju *Agrobacterium* ciągle uważa się za najskuteczniejszą metodę transformacji genetycznych roślin z rodziny *Fabaceae*. W tym wypadku efektywność transgenezy zależy zarówno od rodzaju wyjściowego materiału roślinnego

jak również od stężenia zawiesiny bakteryjnej w kokulturze. Ważny jest ponadto czas prowadzenia kokultury oraz ewentualny dodatek „stymulatorów” transformacji [32,41,82,112,117,135,137-139,141,144].

Zarówno w przypadku doświadczeń nad *Glycine max* [135] jak i *Cicer arietinum* [41] proces transformacji wydawał się być znacznie skuteczniejszy, gdy posłużono się młodym, nieuorganizowanym materiałem roślinnym (zawiesina embrionalna lub parenchymatyczna).

Efektywność transgenezy, u roślin z rodziny *Fabaceae* zwiększał ponadto dodatek do kultury acetosyringonu, aktywującego geny *vir* wektora bakteryjnego [41,112,135]. Powyższy fenol hamował jednak wybiórczo późniejsze tworzenie zarodków somatycznych ze transformowanej uprzednio zawiesiny embrionalnej soi [135].

Proces transformacji embrionów sojowych przyspieszał również dodatek, do kokultury, takich antyoksydantów jak: L-cysteina, kwas askorbinowy, poliwinylpirolidon oraz ditiotretitol (DTT) [141].

W doświadczeniach nad liścieniami oraz embrionami soi wykazano, że szanse transformacji materiału roślinnego wzrastają wydatnie po poddaniu kokultury kilkusekundowej sonifikacji [112,135]. Według różnych autorów zabieg ten powoduje powstawanie licznych mikroranek zarówno na powierzchni jak i w głębi tkanek roślinnych. W efekcie zdarzenie to generuje syntezę roślinnych związków fenolowych zwiększających dostępność przypuszczalnych czynników wiążących ściany komórkowe bakterii [62,112,124,135,143].

Proces transformacji *Glycine max* oraz *Cicer arietinum* zależał ponadto od długości kokultury materiału roślinnego z bakteriami [41,112], pH pożywki [112] oraz temperatury środowiska [112,144]. Stwierdzono, że temperatura niższa niż 27 °C oraz ponad dwudniowy okres trwania kokultury wyraźnie redukuje przeżywalność materiału roślinnego [112,144]. pH pożywki wyższe niż 7 hamuje zaś aktywność bakteryjnego genu *vir* [112].

Liczne badania dotyczące transformacji roślin motylkowych wykazały, że są one mało odporne na antybiotyki stosowane do eliminacji szczepów bakterii transformujących z kokultury [41,135,139,141]. Wysoką przeżywalność transformowanego materiału roślinnego uzyskuje się przy pomocy stopniowego usuwania bakterii z kultury. W tym celu potransformacyjne biomasy roślinne hoduje się we wzrastającym gradiencie antybiotyku, co wywołuje powstanie korzystnej tolerancji roślin na czynnik przeciwbakteryjny [41,135,141,144].

Stosując opisane powyżej procedury doświadczalne szeregu eksperymentatorom udało się uzyskać w obrębie rodziny *Fabaceae* materiał biologiczny o zmienionym, w stosunku do roślin macierzystych, metabolizmie izoflawonoidowym [12,28,32,41,102,112,117,119,135,137,138,144].

Poprzez mikrowstrzeliwanie do komórek zawiesiny embrionalnej soi sekwencji kodujących CRC kukurydzy (czynnika transkrypcyjnego CRC) nieswoicie pobudzono szlak fenylpropanoidowy w komórkach biorcy [139]. W transformowanej zawieszynie wzrosła znacznie aktywność podstawowych enzymów szlaku izoflawonoidowego takich jak: PAL, CHS, CHI oraz IFS. W porównaniu z biomasą pierwotną transformanty produkowały czterokrotnie więcej izoflawonów z przewagą pochodnych daidzeiny. Ze względu na potransformacyjną aktywację 3-hydroksylazy flawanonu w omawianej zawieszynie spadła jednak ogólna zawartość genisteiny. Enzym ten konkurował skutecznie z izomerazą flawanonu o wspólny prekursor, którym jest naryngenina. W rezultacie w zawieszynie soi stwierdzono obecność pochodnych flawonolowych przy malejącej zawartości genisteiny [139]. Podobna procedura doświadczalna przeprowadzona na protoplastach lucerny [83] połączona z celową supresją 3-hydroksylazy flawanonu doprowadziła do otrzymania transformantów produkujących wybiórczo bogaty

zespół izoflawonoidów [83]. W obydwu wypadkach uzyskano w materiale roślinnym aktywację wielogenowego szlaku fenylopropanoidowego z jednoczesnym całkowitym przekierowaniem odpowiednich substratów w stronę połączeń izoflawonoidowych o charakterze fitoestrogenów [83,139].

Na drodze transformacji genetycznych uzyskuje się aktywację określonych fragmentów szlaku fenylopropanoidowego nie tylko u roślin motylkowych produkujących konstytucyjnie izoflawonoidy, ale również w gatunkach nie syntetyzujących tych związków w warunkach naturalnych z uwagi na brak odpowiednich układów enzymatycznych [22,28,82,137,138].

Wprowadzenie genów kodujących biosyntezę syntazy izoflawonowej (IFS) do zawiesziny embrionalnej *Arabidopsis thaliana* [28,82,137,138] doprowadziło do powstania w biomacie biorcy niesyntetyzowanej uprzednio genisteiny. W podobnym doświadczeniu [81] Liu i wsp. stwierdzili, że powyższa fitoaleksyna jest w transformowanej zawieszinie *A. thaliana* natychmiast glikozydowana do odpowiedniego ramnozydu, glukozylu oraz glukozylu-ramnozydu. Za powyższy fakt odpowiedzialne są „lokalne” enzymy efektywnie glikozylujące „obcy” metabolit [28,81,137].

W przypadku braku w komórkach biorcy odpowiednich substratów samo wprowadzenie genów kodujących odpowiednie układy enzymatyczne jest często niewystarczające do uzyskania finalnego izoflawonu. Zawieszina *Nicotiana tabacum* wykazująca wysoką potransformacyjną aktywność łubinowej reduktazy izoflawonowej produkowała wistiton dopiero po dodaniu do kultury odpowiedniego prekursora tj. 2'-hydroksyformononetyny [22]. Jednocześnie zarówno substrat jak i produkt ulegały natychmiastowej biokonwersji do odpowiednich glukozylów, przy udziale glikozylaz tytoniu [22].

Jak już wspomniano sam proces agroinfekcji wywiera znaczny wpływ na skład frakcji izoflawonoidowych w transformowanych kulturach roślin motylkowych [12,13,18,28,53,78,79,91,116,119,137].

Korzenie włośnikowate otrzymane na skutek infekcji siewek łubinu *Agrobacterium thizogenes* (15834) produkowały: 7,3'-diglukozyl orobolu, 7,3'-diglukozyl-6-dimetylallilo-orobolu oraz 7,4' diglukozyl genisteiny, połączenia tożsame z izoflawonoidami syntetyzowanymi w korzeniach *de novo* *Lupinus albus*. Omawianych związków było jednak, w kulturach transgenicznym, 10-krotnie więcej [10].

Również korzenie transformowane siedmiu gatunków z rodzaju *Psoralea*, w porównaniu z roślinami macierzystymi, syntetyzowały większe ilości daidzeiny i kumestrolu [18]. Jednocześnie autorzy opisywanego doświadczenia stwierdzili, że korzenie młodsze syntetyzowały wybiórczo daidzeinę, a starsze większe ilości kumestrolu. Informacja ta wydaje się przydatna w przypadku zastosowania korzeni włośnikowatych *Psoralea* do przemysłowej produkcji obydwu fitoestrogenów.

Różnice w poziomie syntetyzowanych izoflawonów stwierdzono również w przypadku korzeni nietransformowanych i włośnikowatych *Glycine max* [84]. W porównaniu z korzeniami *de novo* w kulturze transgenicznej oznaczono znacznie więcej wolnej daidzeiny, przy śladowej zawartości pochodnych estrowych i zglikozylowanych tego związku, dominujących w korzeniach rośliny macierzystej.

Całkowicie nowe połączenia izoflawonoidowe, nie oznaczane w roślinach gruntowych, produkowały korzenie transgeniczne *Glycyrrhiza glabra*, *G. pallidiflora*, *G. ularensis* i *G. aspera* [78,79]. Korzenie włośnikowate powyższych gatunków, otrzymane na skutek infekcji młodych siewek *Agrobacterium rhizogenes* pRi 15834 i pGSGLu1, charakteryzowały się

wysoką zawartością prenylowanych izoflawonów takich jak: likoagroizoflawon, kalikozyna, erytrynina oraz chalkonu-izolikwirytygeniny [78,79].

Opisywane powyżej przykłady doświadczeń biotechnologicznych dowodzą, że praktycznie w sposób nieograniczony możemy kierować biosyntezą izoflawonów, dla których zidentyfikowano odpowiednie prekursory, enzymy oraz geny kodujące, a otrzymanie, przy pomocy nowoczesnych technik inżynierii genetycznej, biomas produkujących wybiórczo znaczne ilości fitoestrogenów jest na wyciągnięcie ręki.

Kultury *in vitro* roślin motylkowych ukierunkowane wybiórczo na produkcję fitoestrogenów

Spośród szeregu badań dotyczących biosyntezy i metabolizmu izoflawonów, w kulturach *in vitro* jedynie nieliczne prace ukierunkowane są bezpośrednio na otrzymanie biomas roślinnych, stanowiących bogate źródło aktywnych fitoestrogenów [6,12,17,18,39,40,66,97].

Kluczową rolę w eksperymentach tego typu odgrywa sam dobór wyjściowego materiału roślinnego. Porównywalną lub większą, niż w roślinach macierzystych, zawartość fitoestrogenów uzyskano w kulturach *in vitro* gatunków, które już w warunkach upraw gruntowych charakteryzowały się bogatym metabolizmem izoflawonoidowym. Znalazły się wśród nich hodowle: *Glycine max*, *Maackia amurensis*, *Cicer arietinum* oraz *Lupinus* i *Psoralea species* [6,12,17,18,39,40,66,97].

Biosynteza i dystrybucja związków izoflawonoidowych w roślinie, w przeciwieństwie do szeregu alkaloidów, nie jest organozależna [6,17,27,32]. Z tego względu typ pierwotnego eksplantatu nie wpływa bezpośrednio na zawartość izoflawonów w biomasach inicjalnych. W kulturach *in vitro* pięciu gatunków z rodzaju *Psoralea* otrzymano wysokoprodukcyjne biomasy zarówno w przypadku kalusów pochodzenia liścieniowego, hypokotylowego oraz korzeniowego [17]. Podobną prawidłowość zaobserwowano w liniach kalusowych *Maackia amurensis*, wyprowadzonych z kwiatów, ogonków liściowych oraz merystemów szczytowych rośliny grunтовой [40].

Z przeprowadzonych badań wynika, że ostateczna zawartość izoflawonów, w kulturach *in vitro* roślin motylkowych, zależna jest bezpośrednio od typu hodowli [17,40].

Dowiedziano, że już kultury kalusowe stwarzają możliwość otrzymania biomas *in vitro* syntetyzujących izoflawony, w ilościach większych niż rośliny macierzyste [17,40]. Wysokie stężenie daidzeiny, genisteiny, formononetyny, retuzyny oraz makkiainy i medykarpiry uzyskano w kalusach *Maackia amurensis* [40]. Średnia ilość fitoestrogenów w badanych liniach komórkowych (2%) przekraczała nawet czterokrotnie zawartość izoflawonów w roślinach macierzystych i utrzymywała się na stałym poziomie, w czasie 13 kolejnych pasażów [40].

Zmienności somaklonalnej, charakterystycznej dla biomas kalusowych, nie obserwowano również w przypadku wysokoprodukcyjnych linii komórkowych *Glycine max* [39]. W wyniku selekcji, spośród 40 linii kalusowych soi, Federico i wsp. uzyskali biomasy syntetyzujące, przez 25 lat, izoflawony na stałym poziomie, wynoszącym około 5% suchej masy. Również wyprowadzona, z powyższego kalusa, zawiesina soi charakteryzowała się wysoką (7%) i stałą zawartością pochodnych genisteiny i daidzeiny [39]. Stabilna, w zakresie produkcji izoflawonów, okazała się też zawiesina *Cicer arietinum*. W przeciwieństwie do biomas sojowej, syntetyzowała ona pochodne biochaniny A i formononetyny jedynie w ilościach zbliżonych do rośliny macierzystej [66].

Znaczną zmienność somaklonalną, w obrębie kalusów, stwierdzono natomiast w kulturach *in vitro* pięciu gatunków z rodzaju *Psolarea*, takich jak: *P. cinerea*, *P. macrostachya*, *P. bituminosa*, *P. tenex* i *P. obtusifolia* [17]. Niezależnie, od macierzystego gatunku, wszystkie otrzymane kalusy syntetyzowały daidzeinę, w ilościach nawet pięciokrotnie przekraczających stężenie tego związku w roślinach z upraw gruntowych. Oznaczana, w kalusach, zawartość daidzeiny była jednak zmienna (0,6-1%) wraz z kolejnymi pasażami [17]. Niekorzystny brak długoterminowej stabilności genetycznej kalusów z rodzaju *Psolarea*, udało się pokonać wprowadzając z badanych gatunków kultury korzeni włóśnikowatych [18,97]. W porównaniu z kalusami, syntetyzowały one nie tylko więcej daidzeiny (ok. 0,8%) ale były to również poziomy stałe, podczas 2-letniego okresu prowadzenia hodowli. Ponadto, korzenie transformowane dostarczały więcej biomasy roślinnej i w przeciwieństwie do kalusów syntetyzowały daidzeinę w całym cyklu hodowlanym, niezależnie od fazy wzrostu [18].

Bezpośredni wpływ typu hodowli, na zawartość izoflawonów w biomasach roślinnych stwierdzono w kulturach *in vitro* *Lupinus polyphyllus* oraz *Lupinus hartwegii* [12]. Autorzy niniejszej pracy porównali, pod kątem produkcji izoflawonów, standardowe hodowle zawieszinowe oraz kultury transgeniczne (korzenie oraz zawiesziny) otrzymane w wyniku transformacji tkanek łubinu dzikimi szczepami *Agrobacterium rhizogenes* i *Agrobacterium tumefaciens*. Niezależnie od typu hodowli, wszystkie badane biomasy syntetyzowały dziesięciokomponentowy zespół pochodnych genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny w ilościach zbliżonych do roślin macierzystych. Stwierdzono, że długoterminowa stabilność w zakresie produkcji izoflawonów związana jest bezpośrednio ze stopniem cytodyferencjacji biomas. Jedynie korzenie włóśnikowate łubinu charakteryzowały się niezmienną zawartością izoflawonów. Zarówno w zawieszinach transgenicznych jak i nietransformowanych, poziom izoflawonów wahał się w granicach od 0,2 do 0,5 % i był zależny od, zmiennego w czasie, stopnia agregacji biomas.

Sam proces transgenezy wpłynął na około czterokrotny wzrost zawartości izoflawonów w tkankach łubinu. Autorzy niniejszej pracy wiązali powyższy fakt z możliwością hodowli biomas transformowanych na pożywkach pozbawionych fitohormonów, wpływających niekorzystnie na biosyntezę określonych fitoestrogenów [12].

W pracach dotyczących biosyntezy izoflawonów, w warunkach *in vitro* próbowano również rozwiązać występujący często problem niskiej zawartości fitoestrogenów w biomasach roślinnych. W tym celu stosowano dodatkowe zabiegi hodowlane polegające na immobilizacji badanych zawieszin na nośnikach z alginianu wapnia [6] oraz sproszkowanej tkance korka [145]. Tym samym starano się stworzyć w systemie hodowlanym warunki biochemiczne zbliżone do tych, które występują w tkankach roślin gruntowych [145]. Stosowany dodatek korka do kultury zawieszinowej *Sophora flavescens* spowodował nawet pięciokrotny wzrost biosyntezy prenylowanych izoflawonów, charakterystycznych dla badanego gatunku. Jednocześnie, w opisywanym przypadku, stosując nośnik korkowy, osiągnięto dodatkowy efekt permeabilizacji biomas, wiążący się z 70% wyrzucaniem metabolitów izoflawonoidowych do tkanki korka [145]. W przeciwieństwie do kultury *in vitro* *Sophora flavescens*, immobilizowanie, na mikrocząsteczkach z alginianu wapnia, zawiesziny *Glycine max* nie wpłynęło na końcową zawartość izoflawonów w biomasie. Powyższy zabieg technologiczny umożliwił jedynie korzystne wydłużenie czasu hodowli [6].

Omówione powyżej doświadczenia, których rezultatem było otrzymanie biomas produkujących znaczne ilości izoflawonów, prowadzone były w skali laboratoryjnej [12,17,18,40,66,97]. Jedyne próby opracowania systemów ciągłych, do produkcji izoflawonów, w oparciu o biomasy roślinne, dotyczą zawieszin *Glycine max* [6,39].

W celu uzyskania znacznej ilości fitoestrogenów sojowych w skali technicznej Tyler i wsp. [6] skonstruowali ciągły system hodowlany, na bazie bioreaktora magnetofluidyzacyjnego (MFB). Na innowacyjność powyższego systemu składa się zarówno konstrukcja „pojemnika hodowlanego” jak i również procedura przygotowania biomasy roślinnej do procesu technologicznego [6]. Właściwą komorę bioreaktora, stanowiła w tym przypadku kolumna szklana obudowana solenoidami, wytwarzającymi pole magnetyczne o określonym natężeniu. Zawiesina sojowa, przed podaniem na kolumnę bioreaktora, była immobilizowana na tzw. dwufazowym nośniku, złożonym z alginianu wapnia oraz sproszkowanego magnetytu [6]. Podczas, gdy rolą alginianu wapnia było stworzenia warunków biochemicznych, sprzyjających zwiększeniu biosyntezy izoflawonów to dodatek magnetytu utrzymywał zawiesinę równomiernie rozproszoną w polu magnetycznym bioreaktora. Tym samym, nie była ona porwana ze strumieniem pożywki tłoczonej na kolumnę. Zadaniem tego typu rozwiązania technologicznego było zabezpieczenie delikatnych komórek zawiesiny roślinnej przed stresem mechanicznym związanym z procesem hodowli. Regulacja natężenia pola magnetycznego umożliwiała okresowe wypuszczenie biokatalizatora do odbieralnika i dozowanie na kolumnę świeżej biomasy. Opisany system hodowlany umożliwił prowadzenie kultury zawiesiny sojowej w sposób ciągły, bez uszczerbku dla żywotności biomasy. Niestety zastosowana procedura hodowlana przyczyniła się do drastycznego spadku zawartości izoflawonów w zawieszynie. W przypadku daidzeiny wynosił on około 50% a genisteiny 20%.

Tak drastycznego zahamowania biosyntezy fitoestrogenów nie obserwowano natomiast w okresowej kulturze zawiesiny sojowej, hodowanej w standardowym bioreaktorze z mieszadłem pneumatycznym (typ *air lift*). Opisywana kultura zachowała zdolność do produkcji izoflawonów na poziomie standardowej hodowli wytrząsanej [39].

Prezentowane powyżej nieliczne doniesienia literaturowe wskazują, że rośliny motylkowe, po wprowadzeniu do kultur *in vitro* są w stanie zachować zdolność do biosyntezy znacznych ilości izoflawonów. Ponadto wydaje się, że w oparciu o nowoczesne procedury hodowlane możliwe jest opracowanie opłacalnego systemu hodowlanego, warunkującego produkcję cennych fitoestrogenów na bazie „naturalnych bioreaktorów”, którymi są biomasy roślinne.

Piśmiennictwo

1. Akashi T., Aoki T., Ayabe S., Identification of a cytochrome P450 cDNA encoding (2S)-flavanone 2-hydroxylase of licorice (*Glycyrrhiza echinata* L.; *Fabaceae*) which represents licodione synthase and flavone synthase II, *FEBS Letters* 432 (1998) 287-290.
2. Akashi T., Aoki T., Takahashi T., Kameya N., Nakamura I., Ayabe S., Cloning of cytochrome P450 cDNAs from cultured *Glycyrrhiza echinata* L. cells and their transcriptional activation by elicitor-treatment, *Plant Sci.* 126 (1997) 39-47.
3. Akashi T., Sawada Y., Aoki T., Ayabe S-I., New Scheme of the Biosynthesis of Formononetin Involving 2,7,4'-Trihydroxyisoflavanone but Not Daidzein as the Methyl Acceptor, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (10) (2000) 2276-2279.
4. Al-Ani H.A.M., Dewick P.M., Isoflavone biosynthesis in *Onobrychis vicifolia*: formononetin and texasin as precursors of afrormosin, *Phytochemistry* 19 (1980) 2337-2339.
5. Alfermann A.W., Petersen M., Natural product formation by plant cell biotechnology, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43 (1995) 199-205.
6. Ames T.T., Worden R.M., Continuous Production of Daidzein and Genistein from Soybean in a Magnetofluidized Bed Bioreactor, *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 336-339.
7. Armero J., Requejo R., Jorriñ J., López-Valbuena R., Tena M., Release of phytoalexins and related isolavonoids from intact chickpea seedlings elicited with reduced glutathione at root level, *Plant Physiol. Biochem.* 39 (2001) 785-795.
8. Armero J., Tena M., Possible role of plasma membrane H⁺-ATPase in the elicitation of phytoalexin and related isoflavone root secretion in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings, *Plant Sci.* 161 (2001) 791-798.
9. Barz W., Mackenbrock U., Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpanes in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 199-211.
10. Bednarek P., Frański R., Kerhoas L., Einhorn J., Wojtaszek P., Stobiecki M., Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor, *Phytochemistry* 56 (2001) 77-85.
11. Beggs C.J., Schneider-Zieberg U., Wellmann E., Isoflavonoid formation as an indicator of UV-B stress in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. The significance of photorepair in assessing potential damage by increasing solar UV-B radiation, *Plant Physiol.* 79 (1985) 630-634.
12. Berlin J., Fecker L., Rügenhagen C., Sator C., Strack D., Witte L., Wray V., Isoflavone Glycoside Formation in Transformed and Non-Transformed Suspension and Hairy Root Cultures of *Lupinus polyphyllus* and *Lupinus hartwegii*, *Z. Naturforsch.* 46 c (1991) 725-734.
13. Berlin J., Rippert M., Mollenschott C., Maywald F., Strack D., Wray V., Sator C., Formation of Isoflavonoid Glucosides in Normal and Transformed Cell Cultures of *Lupin*, *Planta Med.* 55 (1989), 685-686.
14. Bongue-Bartelsman M., Phillips D.A., Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato, *Plant Physiol. Biochem.* 33 (1995) 539-546.
15. Botia J.M., Ortuño A., Sabater F., Acosta M., Sánchez-Bravo J., Uptake and decarboxylation of indole-3-acetic acid during auxin-induced growth in lupin hypocotyl segments, *Planta* 193 (1994) 224-231.
16. Boulter D., Plant Biotechnology: Facts and Public Perception, *Phytochemistry* 40 (1995) 1-9.

17. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A., Production of daidzein by callus cultures of *Psolarea* species and comparison with plant, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 53 (1998) 35-40.
18. Bourgaud E., Bouque V., Guckert A., Production of flavonoids by *Psolarea* hairy root cultures, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56 (1999) 97-104.
19. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, Plant Sci. 161 (2001) 839-851.
20. Brandi M.L., Natural and synthetic isoflavones in the prevention of treatment of chronic diseases, Calcif. Tissue Int. 61 (1997) 55-58.
21. Cen Y.P., Bornman J.F., The response of bean plants to UV-B radiation under different irradiances of background visible light, J. Exp. Bot. 41 (1990) 1489-1495.
22. Cooper J.D., Qiu F., Paiva N.L., Biotransformation of an exogenously supplied isoflavonoid by transgenic tobacco cells expressing alfalfa isoflavone reductase, Plant Cell. Rep. 20 (2002) 876-884.
23. Daniel S., Tiemann K., Wittkamp U., Bless W., Hinderer W., Barz W., Elicitor-induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*, I, Planta 182 (1990) 270-278.
24. Daniell T., O'Hagan D., Edwards R., Alfalfa cell cultures treated with a fungal elicitor accumulate flavone metabolites rather than isoflavones in the presence of the methylation inhibitor tubericidin, Phytochemistry 44 (2) (1997) 285-291.
25. Dhir S.K., Dhir S., Widholm J.M., Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.): genotypic differences in culture response, Plant Cell Rep. 11 (1992) 285-289.
26. Dixon R.A., Bendall D.S., Changes in the levels of enzymes of phenylpropanoid and flavonoid synthesis during phaseollin production in cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*, Physiol. Plant Pathol. 13 (1978) 295-306.
27. Dixon R.A., Natural products and plant disease resistance, Nature 411 (2001) 843-847.
28. Dixon R.A., Ferreira D., Molecules of Interest, Genistein, Phytochemistry, 60 (2002) 205-211.
29. Dixon R.A., Fuller K.W., Effects of synthetic auxin levels on phaseollin production and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L., Physiol. Plant. Pathol. 9 (1976) 299-312.
30. Dixon R.A., Isoflavonoids Biochemistry, Molecular Biology, and Biological Functions, w: D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn (Eds.), Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 1, Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo, 1999, str. 773-823.
31. Dixon R.A., Lamb Ch.J., Masoud S., Sewalt V.J.H., Paiva N.L., Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses – a review, Gene 179 (1996) 61-71.
32. Dixon R.A., Plant tissue culture methods in the study of phytoalexin induction, w: D.S. Ingram, J.P. Helgeson (Eds.), Tissue Culture Methods for Plant Pathologists, Blackwell, Oxford, 1980, str. 185-196.
33. Dixon R.A., Paiva N.L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism, Plant Cell 7 (1995) 1085-1097.
34. Dixon R.A., Steele C.L., Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering, Trends in Plant Sci. 4 (10) (1999) 340-400.

35. Ebel J., Schmidt W.E., Loyal R., Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA and correlation with phytoalexin accumulation, *Arch. Biochem. Biophys.* 232 (1984) 240-248.
36. Edwards R., Blount J.W., Dixon R.A., Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures, *Planta* 184 (1991) 403-409.
37. Edwards R., Daniell T.J., Gregory A.C.E., Methylation reactions and the phytoalexin response in alfalfa suspension cultures, *Planta* 201 (1997) 359-367.
38. Edwards R., Mavandad M., Dixon R.A., Metabolic fate of cinnamic acid in elicitor treated cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*, *Phytochemistry* 29 (1990) 1867-1873.
39. Federici E., Touché A., Choquart S., Avanti O., Fay L., Offord E., Courtois D., High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures, *Phytochemistry* 64 (2003) 717-724.
40. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Glebko L.I., Kulesh N.I., Muzarok T.I., Seletskaya L.D., Bulgakov V.P., Yu.N. Zhuravlev, Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*, *Fitoterapia* 71 (2000) 365-372.
41. Fontana G.S., Santini L., Caretto S., Frugis G., Mariotti D., Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (Chickpea), *Plant Cell Rep.* 12 (1993) 194-198.
42. Fritsche S., Steinhart H., Occurrence of hormonally active compounds in food: a review, *Eur. Food Res. Technol.* 209 (1999) 153-179.
43. Gagnon H., Ibrahim R.K., Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin, *Phytochemistry* 44 (8) (1997) 1463-1467.
44. Gagnon H., Seguin J., Bleichert E., Tahara S., Ibrahim R.K., Biosynthesis of white lupin isoflavonoids from [U-¹⁴C]L-phenylalanine and their release into the culture medium, *Plant Physiol.* 100 (1992) 76-79.
45. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K., Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.* 50 (1968) 151-158.
46. Giri A., Narasu M.L., Transgenic hairy roots: recent trends and applications, *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 1-22.
47. Goossens J.F.V., Vendrig J.C., Effects of abscisic acid, cytokinins, and light on isoflavonoid phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* L., *Planta* 154 (1982) 441-446.
48. Graham T.L., Kim J.E., Graham M.Y., Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of gliceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*, *Molec. Plant-Microbe Interact.* 3 (1990) 157-166.
49. Grajek W., Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*, w: S. Malepszy (Ed.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 306-341.
50. Gryniewicz G., Gadzikowska M., Fitoestrogeny jako selektywne modulatory aktywności receptorów estrogenowych, *Postępy Fitoterapii* 10 (1) (2003) 28-35.
51. Guenoune D., Galili S., Phillips D.A., Volpin H., Chest I., Okon Y., Kapulnik Y., The defense response elicited by the pathogen *Rhizoctonia solani* is suppressed by colonization of the AM-fungus *Glomus intraradices*, *Plant Sci.* 160 (2001) 925-932.
52. Gunia W., Hinderer W., Wittkamp U., Barz W., Elicitor Induction of Cytochrome P-450 Monooxygenases in Cell Suspension Cultures of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Their Involvement in Pterocarpan Phytoalexin Biosynthesis, *Z. Naturforsch.* 46c (1991) 58-66.

53. Haberder H., Schröder G., Ebel J., Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (*Glycine max* L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis, *Planta* 177 (1989) 59-65.
54. Hashim M.F., Hakamatsuka T., Ebizuki Y., Sanakawa U., Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis, *FEBS Lett.* 271 (1/2) (1990) 219-222.
55. Hayashi H., Hiraoka N., Ikeshiro Y., Yamamoto H., Organ specific localization of flavonoids in *Glycyrrhiza glabra* L., *Plant Sci.* 116 (1996) 233-238.
56. Heinsteins P.F., Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures, *J. Nat. Prod.* 48 (1) (1985) 1-9.
57. Hinderer W., Flentje U., Barz W., Microsomal isoflavone 2'- and 3'-hydroxylases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspensions induced for pterocarpan phytoalexin formation, *FEBS Lett.* 214, (1) (1987) 101-106.
58. Hinderer W., Seitz H.U., Flavonoids, w: F. Constabel (Ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, vol. 5, Academic Press. Inc., San Diego, New York, Berkley, Boston, London, Sydney, Tokyo, 1988, str. 23-48.
59. Hirata K., Asada M., Yatani E., Miyamoto K., Miura T., Effects of Near-Ultraviolet Light on Alkaloid Production in *Catharantus roseus* Plants, *Planta Med.* 59 (1993) 46-50.
60. Hur H.G., Rafii F., Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum*, *FEMS Microbiol. Lett.* 192 (2000) 21-25.
61. Janas K.M., Cvikrová M., Pałagiewicz A., Szafrńska K., Posmyk M.M., Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature, *Plant Sci.* 163 (2002) 369-373.
62. Joersbo M., Brunstedt J., Sonication: a new method for gene transfer to plants, *Physiol. Plant* 85 (1992) 230-234.
63. Johansson F., Sommarin M., Larson C., Fusicoccin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain, *Plant Cell* 5 (1993) 321-327.
64. Jung W., Yu O., Lau S.M., O'Keefe D.P., Odell J., Fader G., McGonigle B., Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes, *Nature Biotechnol.* 18 (2000) 208-212.
65. Kaneda Y., Tabei Y., Nishimura S., Harada K., Akihima T., Kitamura K., Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.], *Plant Cell Rep.* 17 (1997) 8-12.
66. Kessmann H., Barz W., Accumulation of isoflavones and pterocarpan phytoalexins in cell suspension cultures of different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Plant Cell Rep.* 6 (1987) 55-59.
67. Kessmann H., Choudhary A.D., Dixon R.A., Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) III. Induction of medicarpin and cytochrome P450 activities in elicitor-treated cell suspension cultures and protoplasts, *Plant Cell Rep.* 9 (1990) 38-41.
68. Kieran P.M., MacLoughlin P.F., Malone D.M., Plant cell suspension cultures: some engineering considerations, *J. Biotechnol.* 59 (1997) 39-52.
69. Kimura Y., Aoki T., Ayabe S., Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy- and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids, *Plant Cell Physiol.* 42 (2001) 1169-1173.

70. Király Z., Cell Wall Composition and Metabolism w: Goodman R.N., Király Z., Wood K.R., (Eds.), The Biochemistry and Physiology of Plant Disease, University of Missouri Press, Columbia, 1986, str. 105-144.
71. Kishima Y., Shimaya A., Adachi T., Evidence of the blue light induces betalain pigmentation in *Portulaca* callus, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 43 (1995) 67-70.
72. Klus K., Börger-Papendorf G., Barz W., Formation of 6,7,4'-trihydroxyisoflavone (factor 2) from soybean seed isoflavones by bacteria isolated from tempe, Phytochemistry, 34 (4) (1993) 979-981.
73. Klus K., Barz W., Formation of polyhydroxylated isoflavones from the soybean seed isoflavones daidzein and glycitein by bacteria isolated from tempe, Arch. Microbiol. 164 (1995) 428-434.
74. Komatsuda T., Lee W., Oka S., Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr., Plant Cell Tiss. Org. Cult. 28 (1992) 103-113.
75. Kuntz S., Wenzel U., Daniel H., Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines, Eur. J. Nutr. 38 (1999) 133-142.
76. Laflamme P., Khouri H., Gulick P., Ibrahim R., Enzymatic prenylation of isoflavones in white lupin, Phytochemistry, 34 (1) (1993) 147-151.
77. Landini S., Graham M.Y., Graham T.L., Lactofen induces isoflavone accumulation and gli-ceollin elicitation competency in soybean, Phytochemistry 62 (2003) 865-874.
78. Li W., Asada Y., Yoshikawa T., Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures, Phytochemistry 55 (2000) 447-456.
79. Li W., Asada Y., Koike K., Hirotani M., Rui H., Yoshikawa T., Nikaido T., Flavonoids from *Glycyrrhiza pallidiflora* hairy root cultures, Phytochemistry 58 (2001) 595-598.
80. Li Z.S., Alfenito M., Rea P.A., Walbot V., Dixon R.A., Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump, Phytochemistry 45 (4) (1997) 689-693.
81. Liu C.J., Dixon R.A., Elicitor-induced association of isoflavone-O-methyltransferase with endomembranes prevents the formation and 7-O-methylation of daidzein during isoflavonoid phytoalexin biosynthesis, Plant Cell 13 (2001) 2643-2658.
82. Liu C. J., Blount J.W., Steele C.L., Dixon R.A., Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in Arabidopsis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 14578-14583.
83. Loake G.J., Faktor O., Lamb C.J., Dixon R.A., Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate *p*-coumaric acid, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (1992) 9230-9234.
84. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M., Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*, Plant Physiol. Biochem. 42 (2004) 671-679.
85. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Optimization of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 65 (2001) 57-68.
86. Łuczkiwicz M., Zárata R., Dembińska-Migas W., Migas P., Verpoorte R., Production of pul-chelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L., Plant Sci. 163 (2002) 91-100.

87. Malepszy S., Wprowadzenie w: Malepszy S. (Ed.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 15-18.
88. Malik K.A., Saxena P.K., Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N⁶-benzylaminopurine and thidiazuron, *Planta* 186 (1992) 384-389.
89. Margna U., Margna E., Vainjarv T., Influence of the nitrogen nutrition on the utilization of L-phenylalanine for building flavonoids in buckwheat seedling tissue, *J. Plant Physiol.* 134 (1989) 697-702.
90. Marita J.M., Ralph J., Hatfield R.D., Guo D., Chen F., Dixon R.A., Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase, *Phytochemistry* 62 (2003) 53-65.
91. Minamisawa K., Onodera S., Tinimura Y., Kobayashi N., Yuhashi K. I., Kubota M., Preferential nodulation of *Glycine max*, *Glycine soja* and *Macroptilium atropurpureum* by two *Bradyrhizobium* species *japonicum* and *elkanii*, *FEMS Microbiol. Ecol.* 24 (1997) 49-56.
92. Mithöfer A., Bhagwat A.A., Feger M., Ebel J., Suppression of fungal β -glucan-induced plant defense in soybean (*Glycine max*. L.) by cyclic 1,3-1,6- β -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*, *Planta* 199 (1996) 270-275.
93. Miyazawa M., Ando H., Okuno Y., Araki H., Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger*, as biocatalyst, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 27 (2004) 91-95.
94. Mueller S.O., Korach K.S., Mechanism of estrogen receptor – mediated agonistic and antagonistic effects w: Metzler M. (Ed), *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 3, Springer, Berlin, Heidelberg, 2001, str.3-11.
95. Murali N.S., Teramura A.H., Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean. VI. Influence of phosphorus nutrition on growth and flavonoid content, *Physiol. Plant.* 63 (1985) 413-416.
96. Nakamura K., Akashi T., Aoki T., Kawaguchi K., Induction of Isoflavonoid and Retrochalcone Branches of the Flavonoid Pathway in Cultured *Glycyrrhiza echinata* Cells Treated with Yeast Extract, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (9) (1999) 1618-1620.
97. Nguyen C., Bourgaud F., Forlot P., Guckert A., Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species, *Plant Cell Rep.* 11 (1992) 424-427.
98. Oksman-Caldentey K.M., Inzé D., Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites, *Trends Plant Sci.* 9 (9) (2004) 433-440.
99. Paiva N.L., Oommen A., Harrison M.J., Dixon R.A., Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 213-220.
100. Park H.H., Hakamatsuka T., Sankawa U., Ebizuka Y., Rapid metabolism of isoflavonoids in elicitor-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*, *Phytochemistry* 38 (2) (1995) 373-380.
101. Parker C.W., Letham D.S., Gollnow B.I., Summons R.E., Duke C.C., MacLeod J.K., Regulators of Cell Division in Plant Tissues. XXV. Metabolism of Zeatin by Lupin Seedlings, *Planta* 142 (1978) 239-251.
102. Pereira L.F., Erickson L., Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment, *Plant Cell Rep.* 14 (1995) 290-293.
103. Philips G.C., Collins G.B., *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover, *Crop Sci.* 19 (1979) 59-64.
104. Phillips D.A., Kapulnik Y., Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts, *Trends Microbiol.* 3 (2) (1995) 58-64.

105. Pinto M.E., Casati P., Hsu T.P., Ku M.S.B., Edwards G.E., Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B-absorbing compounds and NADP-malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different nitrogen conditions, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 48 (1999) 200-209.
106. Qiang Ren M., Kuhn G., Wegner J., Chen J., Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties, Eur. J. Nutr. 40 (2001) 135-146.
107. Radzikowski Cz., Wietrzyk J., Gryniewicz G., Opolski A., Genisteina – izoflawonoid soi o zróżnicowanym mechanizmie działania – implikacje kliniczne w leczeniu i prewencji chorób nowotworowych, Postępy Hig. Med. Dośw. 58 (2004) 128-139.
108. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, Biotechnol. Adv. 20 (2002) 101-153.
109. Robbins M.P., Hartnoll J., Morris P., Phenylpropanoid defence responses in transgenic *Lotus corniculatus* L. Glutathione elicitation of isoflavan phytoalexins in transformed root cultures, Plant Cell Rep. 10 (1991) 59-62.
110. Sakamoto K., Iida K., Sawamura K., Hajiro K., Asada Y., Yoshikawa T., Furuya T., Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*, Phytochemistry, 6 (1993) 357-360.
111. Sallaud C., El-Turk J., Breda C., Buffard D., de Kozak I., Esnault R., Kondorosi A., Differential expression of cDNA coding for chalcone reductase, a key enzyme of the 5-deoxyflavonoid pathway, under various stress conditions in *Medicago sativa*, Plant Sci. 109 (1995) 179-190.
112. Santarém E.R., Trick H.N., Essig J.S., J.J.Finer, Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression, Plant Cell Rep. 17 (1998) 752-759.
113. Schlieper D., Tiemann K., Barz W., Stereospecificity of hydrogen transfer by fungal and plant NADPH: Isoflavone oxidoreductases, Phytochemistry, 29 (5) (2002) 1519-1524.
114. Shibuya Y., Sugimura Y., Tahara S., Mizutani J., Accumulation of isoflavones in lupin seedlings treated with copper chloride, Biosci. Biotech. Biochem. 17 (2002) 4-15.
115. Song J., Sorensen E.L., Liang G.H., Direct embryogenesis from single mesophyll protoplasts in alfalfa (*Medicago sativa* L.), Plant Cell Rep. 9 (1990) 21-25.
116. Stacey G., Sanjuan J., Luka S., Dockendorff T., Carlson R.W., Signal exchanges in the *Bradyrhizobium* -soybean symbiosis, Soil Biol. Biochem. 27 (4/5) (1995) 473-483.
117. Steele C.L., Gijzen M., Qutob D., Dixon R.A., Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean, Arch. Biochem. Biophys. 367 (1999) 147-150.
118. Stöckigt J., Obitz P., Falkenhagen H., Lutterbach R., Endress S., Natural products and enzymes from plant cell cultures, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 43 (1995) 97-109.
119. Stougaard J., Genetics and genomics of root symbiosis, Curr. Opin. Plant Biol. 4 (2001) 328-335.
120. Tahara S., Tanaka M., Barz W., Fungal metabolism of prenylated flavonoids, Phytochemistry, 44(6) (1997) 1031-1036.
121. Tan S.C., Phenylalanine ammonia-lyase and phenylalanine ammonia-lyase inactivating system: effects of light, temperature and mineral deficiencies, Aust. J. Plant Physiol. 7 (1980) 159-167.
122. Thiem B., *In vitro* propagation of isoflavone-producing *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi, Plant Sci. 165 (2003) 1123-1128.

123. Tillberg E., Levels of indol-3yl-acetic acid and acid inhibitors in green and etiolated bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*), *Physiol. Plant.* 31 (1974) 106-111.
124. Trick H.N., Finer J.J., SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation, *Transgenic Res.* 6 (1997) 329-337.
125. van Etten H.D., Smith D.A., Accumulation of antifungal isoflavonoids and 1a-hydroxyphaseollone, a phaseollin metabolite in bean tissue infected with *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Physiol. Plant Pathol.* 5 (1975) 225-237.
126. Verpoorte R., van der Heijden R., ten Hoopen H.J.G., Memmelink G., Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production, *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 4 (1998) 3-19.
127. Verpoorte R., Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production, *Transgenic Res.* 9 (2000) 323-343.
128. Verpoorte R., Plant secondary metabolism, w: R. Verpoorte, A.W. Alfermann (Eds.), *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 2000, str. 1-29.
129. Wink M., Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective, *Phytochemistry* 64 (2003) 3-19.
130. Winkel-Shirley B., Biosynthesis of flavonoids and effects of stress, *Curr. Op. Plant Biol.* 5 (2002) 218-223.
131. Wojtaszek P., Stobiecki M., Differential secretion and accumulation of isoflavonoids in *Lupinus albus* in response to fungal elicitor and CuCl₂, *Plant Physiol. Biochem.* 35 (2) (1997) 129-135.
132. Wright M.S., Koehler S.M., Hinchey M.A., Carnes M.G., Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*, *Plant Cell Rep.* 5 (1986) 150-154.
133. Wuttke W., Jarry H., Becker T., Schultens A., Christoffel V., Gorkow Ch., Seidlová-Wuttke D., Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 44 (supl. 1) (2003) 9-20.
134. Wysockińska H., Chmiel A., Transformed Root Cultures for Biotechnology, *Acta Biotechnol.* 17 (2) (1997) 131-159.
135. Yan B., Srinivasa Reddy M.S., Collins G.B., Dinkins R.D., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants, *Plant Cell Rep.* 19 (2000) 1090-1097.
136. Yeoman M.M., Yeoman C.L., Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells, *New Phytol.* 134 (1996) 553-569.
137. Yu O., McGonigle B., Metabolic Engineering of Isoflavone Biosynthesis, *Adv. Agronom.* 86 (2005) 147-190.
138. Yu O., Jung W., Shi J., Croes R.A., Fader G.M., McGonigle B., Odell J.T., Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues, *Plant Physiol.* 124 (2000) 781-794.
139. Yu O., Shi J., Hession A.O., Maxwell C.A., McGonigle B., Odell J.T., Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seeds, *Phytochemistry*, 63 (2003) 753-763.
140. Zacharius R.M., Kalan E.B., Isoflavonoid changes in soybean cell suspensions when challenged with intact bacteria or fungal elicitors, *J. Plant Physiol.* 135 (1990) 732-736.

141. Zeng P., Vadnais D.A., Zhang Z., Polacco J.C., Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], Plant Cell Rep. 7 (2004) 478-482.
142. Zhang F., Smith D.L., Genistein accumulation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root systems under subtropical root zone temperatures, J. Exp. Bot. 47 (1996) 785-792.
143. Zhang L.J., Cheng L.M., Xu N., Zhao N.M., Li C.G., Jing Y., Jia S.R., Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. Bio. Technol. 9 (1991) 996-997.
144. Zhang Z., Xing A., Staswick P., Clemente T.E., The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56 (1999) 37-46.
145. Zhao P., Hamada Ch., Inoue K., Yamamoto H., Efficient production and capture of 8-prenyl-naringenin and leachianone G-biosynthetic intermediates of sophoraflavanone G- by the addition of cork tissue to cell suspension cultures of *Sophora flavescens*, Phytochemistry 62 (2003) 1093-1099.

5. AKTYWNOŚĆ FARMAKOLOGICZNA IZOFLAWONOIDÓW

Wstęp

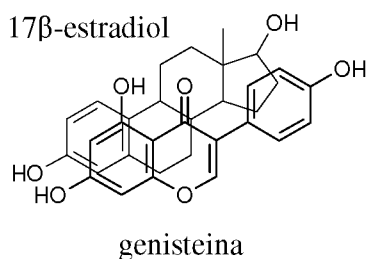
Izoflawonoidy, zaliczane pod względem farmakologicznym do fitoestrogenów, stanowią jedną z najczęściej badanych grup związków naturalnych. Fakt ten wiąże się z szeroko udokumentowaną aktywnością farmakologiczną tych połączeń, zarówno w odniesieniu do organizmów roślinnych [20-22,59], jak i zwierzęcych [13,16,29,33,54,61,62].

Przeprowadzone liczne badania epidemiologiczne populacji wschodnioazjatyckich dowiodły, że dieta sojowa bogata w izoflawony może wiązać się bezpośrednio z niższą zapadalnością Azjatów na nowotwory hormonozależne, z mniejszym zagrożeniem chorobami układu krążenia, osteoporozą oraz, w przypadku kobiet, złagodzeniem skutków menopauzy [13,16,33,54,61,62]. Zainteresowanie fitoestrogenami zaowocowało, w ciągu ostatnich dwudziestu lat, pojawieniem się kilku tysięcy publikacji dotyczących działania farmakologicznego tych związków. Ogrom powszechnie dostępnych danych literaturowych, obejmujących nie tylko prace eksperymentalne nad aktywnością izoflawonów, ale również szereg artykułów o charakterze przeglądowym, spowodował, że w niniejszym rozdziale postanowiono, jedynie w formie krótkiego podsumowania, przedstawić podstawowe kierunki działania tych związków. Tym samym starano się zwrócić uwagę na ważne prozdrowotne znaczenie izoflawonów oraz ich ewentualną rolę w leczeniu, uzasadniającą przyjęty kierunek badań.

Podstawowe typy aktywności związków izoflawonoidowych

Na działanie farmakologiczne izoflawonów składa się zarówno aktywność hormonalna tych związków [16,22,29,33,52,54,61,62,78], jak i również wpływ, jaki wywierają one na procesy związane z różnicowaniem, proliferacją oraz wzrostem komórek [22,33,41,61,62].

Izoflawony, pod względem strukturalnym, wykazują pewne podobieństwo, do endogennych estrogenów zwierzęcych, co wpłynęło na sklasyfikowanie tych związków, w obrębie fitoestrogenów [16,33,62]. Podobieństwo względem estradiolu, w przypadku izoflawonów, wiąże się z przestrzennym rozmieszczeniem grup hydroksylowych w cząsteczce omawianych połączeń. W przypadku genisteiny, grupy hydroksylowe (w tym jedna fenolowa) umieszczone są w odległości 10,8 Å, czyli identycznej jak ma to miejsce w 17 β-estradiolu [75] (ryc. 1).



Ryc. 1 Podobieństwo budowy strukturalnej między fitoestrogenami a endogennym estradiolem.
Fig. 1. Relations in the structure of phytoestrogens and endogenous estradiol.

Z tego względu izoflawony są dobrymi odpowiednikami endogennego estradiolu. Mogą one, w zależności od dawki, wywierać działanie antagonistyczne (duże stężenia) bądź agonistyczne (małe stężenia) w stosunku do receptorów estrogenowych ER α i ER β [52,62,78]. Stwierdzono, że fitoestrogeny, w przeciwieństwie do estradiolu, wiążą się głównie z ER β (87%) i tylko w niewielkim stopniu z ER α (4%). W związku z powyższym, aktywność farmakologiczna izoflawonów determinowana jest nie tylko dawką tych związków, ale również narządem docelowym (receptory ER β , w przeciwieństwie do ER α znajdują się głównie w podwzgórzu, przysadce, płucach i grasicy). Na estrogenne działanie izoflawonów składa się fakt wiązania tych związków z receptorami ER oraz regulacja, przez nie, hormonów płciowych na poziomie transkrypcji. Natomiast poprzez kompetytywne blokowanie dostępu endogennego estradiolu do ER, izoflawony wywierają działanie antyestrogenowe. Ten typ aktywności wiąże się ponadto ze stymulacją, przez omawiane związki, syntezy protein wiążących hormony płciowe [16,22,29,33,52,54,61,62,78].

Efekty opisywanej w literaturze hormonalnej aktywności izoflawonów są często niejednoznaczne, co wiąże się ze zmienną metodyką prowadzonych badań, dotyczącą m. in. dawki i typu podawanych związków oraz czasem trwania eksperymentu [6,41,75].

Jednoznacznie udowodniono, że izoflawony stymulują ogólnie szlak rozrodczy u samic ssaków. Twierdzi się, że na drodze receptorowej mogą one ingerować w proces uwalniania gonadotropin i przerywać sprzężenie zwrotne osi: podwzgórze-przysadka-gonady [33,40,52,62,65,78]. U kobiet w wieku przedmenopauzalnym izoflawony wpływają na długość cyklu menstrualnego i koncentrację hormonów płciowych. Dieta bogata w produkty sojowe, u miesiączkujących kobiet, wiąże się z przedłużeniem fazy folikularnej, obniżeniem poziomu hormonu lutenizującego (LH) i podwyższeniem osocowego stężenia prolaktyny [10,20-22]. Nie stwierdzono natomiast wyraźnego wpływu fitoestrogenów sojowych na równowagę hormonalną u kobiet po menopauzie [24,43]. W tym miejscu należy zaznaczyć, że izoflawony charakteryzują się, w porównaniu z 17 β -estradiolem, niższym powinowactwem do receptorów ER. Stwierdzono, że w równoważnych dawkach wykazują one działanie hormonalne, nawet 100.000- 500.000 razy słabsze niż estradiol. Jednakże regularna dieta, bogata w produkty sojowe, dostarcza do organizmu izoflawony na poziomie 100-1000 razy wyższym niż endogenne estradiol. W opisywanych stężeniach związki te mogą więc konkurować z 17 β -estradiolem i poprzez wiązanie z ER zapobiegać m.in. powstawaniu hormonozależnych nowotworów [16,33,40,41,61,62].

Wśród przebadanych farmakologicznie izoflawonów na szczególną uwagę zasługują takie związki jak: genisteina, daidzeina, glicyteina, formononetyna oraz biochanina A, charakteryzujące się najsilniejszą aktywnością estrogeną [22,29,33,54,62].

W świetle opisywanego działania hormonalnego izoflawonów, pewien niepokój budzi fakt powszechnego stosowania u niemowląt diety wyrównawczej, opartej o preparaty mlekozastępcze, przygotowane na bazie białek sojowych. Stwierdzono mianowicie, że dzieci karmione wyłącznie „mlekiem sojowym” otrzymują dzienną dawkę izoflawonów na poziomie około 20 mg/kg masy ciała. Ilość ta przekracza 13 000 do 20 000 razy poziom estradiolu oznaczany w surowicy u niemowląt kontrolnych. Sądzi się, że długa ekspozycja dzieci na tak wysokie dawki fitoestrogenów może w przyszłości zaburzyć funkcje układu rozrodczego [6,15,17].

Jak już wspomniano na efekty terapeutycznego działania izoflawonów składa się nie tylko ich aktywność hormonalna ale również wpływ jaki wywierają te związki na przekąźnictwo komórkowe [61,62]. Stwierdzono, że izoflawony, w różnych modelach doświadczeń *in vitro*, regulują przewodzenie sygnalizacji komórkowej. Ponadto, genisteina, daidzeina i biochanina A

hamują aktywności: kinazy tyrozyny, transformującego czynnika wzrostowego beta (TGF β) i czynnika wzrostowego dla śródbłonek naczyń (VEGF). Również, w zależności od dawki, związki te hamują ($\geq 25 \mu\text{g/ml}$) lub stymulują ($\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$) wzrost komórek [2,5,6, 61,62,84]. Powyższe typy aktywności wydają się szczególnie istotne w przypadku potencjalnego zastosowania izoflawonów w chorobach nowotworowych.

Opisywana wielokierunkowa aktywność izoflawonów warunkuje bardzo złożone działanie farmakologiczne tych związków. Podstawowe kierunki prozdrowotnego i leczniczego działania fitoestrogenów opisano poniżej.

Działanie przeciwnowotworowe

Rola izoflawonów w prewencji oraz leczeniu chorób nowotworowych została szczegółowo opisana w szeregu pracach przeglądowych, bazujących na ponad tysiącu doniesień o charakterze eksperymentalnym [6,16,22,29,33,54,61,62,78]. W niniejszych publikacjach uwzględniono aktywność przeciwwzrostową izoflawonów, w stosunku do określonych linii komórek nowotworowych pochodzenia ludzkiego oraz zwierzęcego. Z licznych danych eksperymentalnych wynika, że mechanizm przeciwnowotworowego działania izoflawonów jest bardzo złożony. Wiąże się on m. in. z hormonalną aktywnością tych związków, co jest szczególnie istotne w przypadku nowotworów hormonozależnych [6,40,41,61,65,78]. Stwierdzono m.in., że izoflawony w dawkach terapeutycznych wynoszących od 113 do 207 mg/dobę obniżają o 25% poziom krążącego w osoczu 17 β -estradiolu i o 45% stężenie progesteronu [45]. Ponadto, związki te hamują aktywność: dehydrogenazy 3 β - i 17 β -hydroksysteroidowej, 5 α -reduktazy oraz aromatazy, wpływając tym samym na poziomy, krążących w surowicy, aktywnych hormonów steroidowych [32,39,62]. Na działanie hormonalne izoflawonów składa się również selektywne wiązanie tych związków z receptorami estrogenowymi ER (w szczególności ER β). Tym samym fitoestrogeny hamują kompetytywnie wiązanie z ER naturalnego ligandu, którym jest 17 β -estradiol. Ponadto, w dawkach terapeutycznych, izoflawony powodują wzrost ekspresji receptora estrogenowego [6,11,33,40,45,52,53].

Przeprowadzone badania empiryczne dowiodły, że przeciwnowotworowego działania fitoestrogenów nie można w pełni wyjaśnić jedynie na podstawie aktywności hormonalnej tych związków [11,16,33,53,61,62]. Stwierdzono mianowicie, że izoflawony mogą aktywnie zapobiegać procesom nowotworzenia przekształcając genotoksyczne metabolity w formy nieaktywne [79]. Ponadto, związki te wpływają na białka uczestniczące w przekazywaniu sygnałów komórkowych [41,61,62]. Z licznych prac eksperymentalnych wynika, że działanie przeciwnowotworowe genisteiny i daidzeiny może odbywać się na drodze hamowania przez te związki ekspresji receptora EGF (czynnik wzrostowy dla śródbłonek naczyń) na poziomie transkrypcji bądź przez bezpośrednią inhibicję kinazy tyrozyny, aktywnej w wielu tkankach zmienionych nowotworowo [2,5,39,53,61,62,79]. Genisteina indukuje również czynnik transkrypcyjny białka *p53*, uznany za jeden z najważniejszych supresorów karcynogenezy [81]. Ponadto izoflawony hamują aktywność topoizomeraz: I i II DNA, odpowiedzialnych za uszkodzenia DNA [48,64].

Uważa się, że fitoestrogeny ogólnie hamują wzrost komórek nowotworowych. Odbywa się to poprzez stymulację produkcji transformującego czynnika wzrostowego beta (TGF β) oraz indukcję apoptozy komórek, m. in. za pośrednictwem hamowania aktywności kinazy Akt [2,5,41,53,61,62,66].

Na aktywność przeciwnowotworową izoflawonów składa się również antyproliferacyjne działanie tych związków związane z blokadą cyklu komórkowego w fazie G2-M. Ponadto

fitoestrogeny modulują aktywność białek regulujących cykl komórkowy, zmniejszając ekspresję cykazy β i zwiększając ekspresję białka *p 21* [6,41,58,61,84].

W szeregu testach *in vitro* stwierdzono, że izoflawony hamują również angiogenezę [58,62,85,86].

Zastosowanie izoflawonów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych badano w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* na szeregu linii nowotworowych pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego [2,6,11,41,58,61,62]. Ze względu na opisaną szczegółowo aktywność hormonalną tych związków, najwięcej prac dotyczy wybranych linii komórkowych ludzkiego nowotworu sutka z obecnym receptorem estrogenowym (MCF-7 ER+) bądź bez receptora estrogenowego (MDAMB 231-ER-) [6,37,45,50,61,74]. Przedstawione wyniki badań są bardzo niejednoznaczne [6,50,74]. Uogólniając, wydaje się, że efekt działania izoflawonów w modelu raka piersi zależy bezpośrednio od dawki fitoestrogenów oraz schematu i czasu podawania omawianych związków [6,74]. Przykładowo, wykazano, że genisteina w dawkach 10-100 μM hamuje, w warunkach *in vitro*, proliferację i inwazyjność komórek raka piersi. Natomiast badania *in vivo*, przeprowadzone na myszach dowiodły, że związek ten w dawkach niższych niż 5 μM wzmacnia przerzutowanie komórek estrogenozależnego nowotworu MCF-7 [6,50,74].

W wyniku długofalowych badań epidemiologicznych wykazano, że genisteina może pełnić istotną rolę w zapobieganiu powstawania nowotworów sutka jedynie w przypadku podawania jej, za pośrednictwem diety sojowej, u kobiet przed osiągnięciem dojrzałości płciowej [6,14,53]. Zgodnie z opisywanym powyżej mechanizmem działania związek ten stymuluje wtedy różnicowanie komórek w gruczole sutkowym i tym samym redukuje prawdopodobieństwo powstawania zmian nowotworowych [6,74]. Natomiast niskie dawki genisteiny przyjmowane przez chore kobiety z rozpoznaniem nowotworu sutka mogą stymulować proliferację estrogenozależnego nowotworu [6,37,49,56].

Genisteina okazała się również aktywna w przypadku przeszczepionego ortotropowo ludzkiego raka gruczołu krokowego, wrażliwego na androgen [1,2,33,34,61,86]. W opisywanych modelach doświadczalnych związek ten hamował proliferację komórek nowotworowych, wykazując jednocześnie działanie antyandrogenne i antyangiogenne [2,34,86].

Działania protekcyjnego genisteiny nie udało się natomiast wykazać jednoznacznie na linii komórkowej ludzkiego nowotworu jelita grubego SW 620 i HT 29. W opisywanym przypadku odnotowano jedynie obniżoną, pod wpływem izoflawonu, wrażliwość badanych komórek na efekt napromieniowania [41,64].

Genisteina oraz daidzeina hamowały również adhezję komórek czerniaka myszy, do macierzy pozakomórkowej, co wiązało się bezpośrednio z utratą inwazyjności danego nowotworu [61]. Powyższe związki wywierały ponadto działanie antyprzerzutowe i antyproliferacyjne w modelu raka płuc LLC oraz w raku pęcherza moczowego, żołądka oraz przełyku [33,58,61,85].

Przytoczone powyżej dane literaturowe wskazują, że ostateczne wyjaśnienie roli izoflawonów w prewencji oraz leczeniu chorób nowotworowych wymaga przeprowadzenia dalszych badań opartych o ujednolicone schematy doświadczalne. Jednocześnie wydaje się, że omawiane związki, a w szczególności genisteina mogą być stosowane w prewencji pierwotnej, w zapobieganiu powstawania zmian nowotworowych oraz ostrożnie w prewencji wtórnej, w celu ograniczenia powstawania nawrotów i przerzutowania [6,15,17,58,62,84].

Łagodzenie skutków menopauzy

Długoterminowe badania epidemiologiczne, obejmujące kobiety w wieku okołomenopauzalnym, wykazały, że w populacji wschodnioazjatyckiej niezwykle rzadko występują dolegliwości związane z klimakterium [13-15,22,24,29,33,40,43,53,54,62,79]. Stwierdzono, że brak u Azjatek, charakterystycznych dla menopauzy uderzeń gorąca, tachykardii, wahań nastroju, bezsenności, nadpobudliwości oraz suchości pochwy, wiąże się bezpośrednio z dietą bogatą w produkty sojowe, zawierające izoflawony [14,32,33,62]. Dowiedziono, że przyjmowane regularnie fitoestrogeny, w postaci pokarmów składających się na codzienną dietę, bądź w formie preparatów leczniczych, skutecznie uzupełniają naturalny niedobór estrogenów charakterystycznych dla klimakterium. Mechanizm działania izoflawonów w łagodzeniu skutków menopauzy nie został do końca wyjaśniony [14]. Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych na szczurach pozbawionych jajników stwierdzono, że genisteina oraz pochodne izoflawony hamują nadmierną aktywność podwzgórzowego generatora impulsów GnRH, występującą m.in. w przebiegu niedoboru endogennych estrogenów [14,33,62]. Podobną aktywność fitoestrogenów zaobserwowano u kobiet w wieku okołomenopauzalnym, którym podawano preparaty lecznicze zawierające frakcję fitoestrogenową z *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 [12,16,29,32]. Wysłunięto więc hipotezę, że systematyczne stosowanie izoflawonów prowadzi do redukcji, charakterystycznych dla nadmiernej aktywności GnRH, skokowych wyrzutów LH, uderzeń gorąca oraz do ustąpienia nadpobudliwości nerwowej oraz tachykardii. Na tej podstawie zaleca się kobietom, w wieku okołomenopauzalnym, regularne przyjmowanie preparatów zawierających wyciągi z soi oraz pluskwicy groniastej, będących doskonałą alternatywą dla mało bezpiecznej terapii hormonozastępczej [12,14].

Zapobieganie osteoporozie

Badania farmakologiczne przeprowadzone na samicach szczurów pozbawionych jajników wykazały jednoznacznie, że naturalne izoflawony, pochodne genisteiny i daidzeiny wywierają efekt osteoprotekcyjny [13,14,27,80]. Związki te zapobiegały m. in. utracie masy kostnej, stymulując różnicowanie osteoblastów oraz hamując resorpcję kości przez osteoklasty [27,60,80]. Jednocześnie stwierdzono, że izoflawony wywierały pozytywny wpływ na biochemiczne wskaźniki metabolizmu kostnego we krwi u szczurów [27,60,80]. Po zastosowaniu standaryzowanych wyciągów z *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 obserwowano u szczurów z indukowaną osteopenią wielokrotne zwiększenie gęstości i wytrzymałości tkanek kostnych w okolicy lędźwiowej [12].

W przypadku kobiet w wieku okołomenopauzalnym, poddanych terapii fitoestrogenami, nie obserwowano tak jednoznacznych wyników jak w badaniach prowadzonych na zwierzętach [3,13,14,30]. Szereg danych wskazuje, że zapobieganie utracie masy kostnej oraz wywołanie efektu leczniczego w ustalonej osteoporozie możliwe jest jedynie w przypadku jednoczesnego podawania niewielkich dawek estrogenów (ok. 0,3 mg) w połączeniu ze znacznymi ilościami izoflawonów roślinnych [14,31].

Inne eksperymenty wykazały, że fitoestrogeny stosowane w dawce dziennej wynoszącej od 50-90 mg w znacznym stopniu osłabiają utratę masy kostnej w odcinku lędźwiowym. Niestety związki te wykazywały jedynie minimalną aktywność naprawczą u kobiet z ustaloną osteoporozą [31,55].

W wyniku klasycznej syntezy chemicznej otrzymano szereg pochodnych izoflawonoidowych z przeznaczeniem do stosowania zarówno w prewencji osteoporozy jak i również w zaawansowanym stadium tej choroby [3,13,14,30,31,55]. Jednym z najczęściej używanych

związków jest 7-izopropoksy-izoflawon (ipriflawon). Zarówno w badaniach na zwierzętach jak również w testach klinicznych obejmujących kobiety w wieku okołomenopauzalnym związek ten hamował, indukowane hormonami przytarczyc, tworzenie osteoklastów oraz stymulował różnicowanie osteoblastów [3,13,14,30,31,55,70].

Pochodne izoflawonów o ustalonej aktywności anabolicznej, w tym ipriflawon, hamują również obrót masy kostnej w przebiegu choroby Paget'a oraz wydalanie z moczem hydrok-syproliny [4].

Przeprowadzone dotychczas badania farmakologiczne dotyczące izoflawonów wskazują, że stosowanie tych związków jest szczególnie celowe w przypadku nietolerancji terapii estrogenowej w dawkach chroniących kości [3,13,55,70].

Wpływ na układ sercowo-naczyniowy

Długoterminowe badania epidemiologiczne wykazały, że regularne spożywanie produktów sojowych w istotny sposób chroni przed chorobami układu sercowo-naczyniowego [7,8,62,72]. Mechanizm działania fitoestrogenów w prewencji nadciśnienia tętniczego, miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca jest bardzo złożony [7,62,72]. Uważa się, że izoflawony wpływają na metabolizm lipidów, regulując zarówno poziom całkowitego cholesterolu jak również określonych jego frakcji (LDL i VLDL) [10,69]. Ponadto związki te obniżają stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi [35,67]. W badaniach przeprowadzonych na rebusach, po podaniu izoflawonów, stwierdzono redukcję (wątrobowego) poziomu mRNA kodującego apolipoproteinę A-1 [68]. Ponadto, w testach klinicznych, którym poddano mężczyzn i kobiety w wieku okołomenopauzalnym wykazano, że fitoestrogeny powodują zmianę ekspresji genu związanego z lipidami oraz powodują wzrost aktywności receptora LDL [10,54,69]. Izoflawony zapobiegają miażdżycy wpływając bezpośrednio na wzrost syntezy tlenu azotu w komórkach śródbłonna naczyń, powodując tym samym rozkurcz naczyń krwionośnych [62]. Związki z tej grupy chronią również przed oksydacyjną modyfikacją LDL i przez to hamują wychwyt LDL przez makrofagi w ścianie tętnic. W rezultacie dochodzi do blokady tworzenia blaszki miażdżycowej [68].

Stwierdzono, że genisteina i jej pochodne hamują agregację płytek krwi u pacjentów w wieku powyżej 40 lat, redukując jednocześnie poziom serotoniny w trombocytach [76]. Udowodniono również, że dieta sojowa obniża ciśnienie rozkurczowe, wpływa korzystnie na czynniki krzepliwości krwi oraz redukuje przepływ krwi w naczyniach. Ponadto wyizolowane izoflawony podawane regularnie, wpływają na układy regulujące oksytocyny i poziom przed-sionkowego peptydu natriuretycznego [76].

Do wyników badań wykazujących bezpośredni wpływ fitoestrogenów sojowych, na określone schorzenia układu sercowo-naczyniowego należy podchodzić z dużą ostrożnością. Większość doświadczeń była prowadzona nie w oparciu o wyizolowane izoflawony, ale kompleksowe produkty sojowe zawierające znaczne ilości peptydów, mogących wpływać na końcowy wynik eksperymentu [8,10,35,62,67-69,72,76]. Pełne zrozumienie mechanizmów działania fitoestrogenów w prewencji i leczeniu m. in. miażdżycy umożliwią dopiero badania z zastosowaniem izoflawonów wyizolowanych z matryc roślinnych.

Wpływ na ośrodkowy układ nerwowy

Sprzeczne niekiedy dane literaturowe utrudniają ostateczne ustalenie roli izoflawonów w funkcjonowaniu OUN [11,28,77].

W badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych na grupie mężczyzn i kobiet w wieku produkcyjnym stwierdzono zdecydowanie korzystny wpływ izoflawonów sojowych na procesy pamięciowe, koncentrację i dobre samopoczucie. Dowiedziono, że regularna dieta sojowa, poprawiała w grupie ochotników pamięć krótko- i długoterminową, procesy kognitywne oraz usprawniała funkcje przedniego płata kory mózgowej [28]. Fakty te wiążą się z obecnością w mózgu, docelowych dla fitoestrogenów, receptorów estrogenowych ER β [11,23,28,62]. Ponadto obserwowany podczas podawania dużych dawek izoflawonów, spadek aktywności MAO oraz wzrost poziomu serotoniny wskazuje, że fitoestrogeny mogą być stosowane pomocniczo w zespole depresji przebiegającym ze stanami lękowymi [28,77]. Rozważa się również podawanie omawianych związków w chorobie Alzheimera oraz Parkinsona [28].

Pewien niepokój budzą natomiast doniesienia odnośnie bezpośredniego związku między regularnym spożywaniem tofu a starczą atrofią mózgu i przyspieszeniem określonych procesów neurodegradacyjnych. Brak natomiast danych czy opisywany negatywny wpływ diety sojowej zależy właśnie od obecności w produktach fitoestrogenów [77].

Działanie antydipsotropowe

Regularne podawanie wyciągów izoflawonoidowych z korzeni *Pueraria lobata* (Kudzu) chomikom syryjskim, wykazującym wrodzone skłonności do spożywania znacznych ilości etanolu, wiązało się z wystąpieniem u zwierząt doświadczalnych określonego efektu antydipsotropowego [38]. Tym samym potwierdzono zasadność stosowania, w tradycyjnej medycynie chińskiej, ekstraktów z korzeni kudzu w leczeniu uzależnień alkoholowych [38,71]. Stwierdzono, że za efekt działania omawianych wyciągów odpowiedzialne są przede wszystkim takie fitoestrogeny jak daidzeina i daidzina [38,57]. W przeprowadzonych doświadczeniach związki te działały nawet 10 razy silniej, gdy stosowano je w formie surowych wyciągów, niż w przypadku gdy podawano izoflawony w postaci wyizolowanych połączeń. Wskazuje to na występowanie określonych interakcji (synergizm działania lub zmiana biodostępności) między daidzeiną i daidziną a pozostałymi składnikami badanych wyciągów. Opisywane zjawisko, w pewnym stopniu, tłumaczy również unikatową aktywność korzeni *Pueraria lobata*, w terapii uzależnień, w porównaniu z innymi surowcami izoflawonoidowymi [38,57,71].

Uważa się, że molekularny mechanizm działania izoflawonów, w terapii antyalkoholowej, związany jest z silnym hamowaniem, przez zablokowane w pozycji 7 izoflawony, mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej (m ALDH). W efekcie, po podaniu wyciągów z kudzu osiąga się rezultaty zbliżone do genetycznego braku aktywności m ALDH, obserwowanego w pewnym procencie populacji, niepodatnym na uzależnienie alkoholowe [38].

Coraz częstsze skuteczne stosowanie wyciągów z *Pueraria lobata* w leczeniu innych uzależnień (nikotynizm, kokainizm) może natomiast wskazywać na bardziej złożony, niż opisywano powyżej, mechanizm działania fitoestrogenów [57].

Aktywność immunostymulująca i przeciwzapalna

Przeprowadzone badania epidemiologiczne dowiodły, że szereg chorób immunologicznych ma podłoże hormonalne [26,62]. Wskazują na to m. in. dane dotyczące znacznej liczby schorzeń autoimmunologicznych u kobiet z zachwianą równowagą estrogenową (okres powikłania, ciąża, laktacja oraz menopauza) [13,14,24,25]. Znaczna ekspresja receptorów estrogenowych ER β w grasicy i przewodzie pokarmowym dowodzi, że również roślinne fitoestrogeny mogą być wykorzystywane w leczeniu zaburzeń o podłożu autoimmunologicznym [26].

W doświadczeniach przeprowadzonych na karmiących maciorach, w wyniku podania izoflawonów stwierdzono, w grasicach świń znaczną ekspresję genu IGF-1R oraz redukcję ilości eozynofili indukowanych antygenem (tkanka płucna) [62,63,82,83].

Dieta sojowa wpływa również bezpośrednio na układ immunologiczny myszy [82,83]. Pod wpływem izoflawonów, u zwierząt doświadczalnych wykazano zwiększenie aktywności limfocytów oraz komórek NK [83]. Tym samym uzyskano, w badanych organizmach, większy potencjał immunologiczny oraz większą ochronę przed nowotworzeniem [82,83].

Proponuje się również stosowanie izoflawonów w leczeniu oporności wielolekowej o podłożu immunologicznym, obserwowanej podczas leczenia chorób nowotworowych [19]. Stwierdzono, że prenylowane izoflawony zdolne są do hamowania nadmiernej ekspresji P-glikozydazy, odpowiedzialnej za inaktywację szeregu chemioterapeutyków, związanej z aktywnością wielolekowego przenośnika ABC błony cytoplazmatycznej (*ATP-binding cassette*) [19].

Wyizolowane z *Sophora japonica* izoflawony (genisteina, genistyna, sofonykozyd i orobol) hamowały również aktywność interleukiny IL-5, syntetyzowanej w komórkach Th2 pod wpływem antygeny. Związki te okazały się skuteczne w leczeniu alergicznego zapalenia płuc związanego m.in. z eozynofilią [51]. Siła immunologicznego i przeciwzapalnego działania izoflawonów z *Sophora japonica* była bezpośrednio związana z ilością grup hydroksylowych w badanych związkach oraz typem oraz położeniem wiązania glikozydowego [51].

Aktywność przeciwzapalną i antyalergiczną obserwowano również w grupie abruchinonów (izoflawanochinonów) występujących w *Abrus precatorius* (*Fabaceae*). Mechanizm działania powyższych związków jest złożony. Polega on m. in. na hamowaniu aktywności cyklooksygenazy (COX – działanie przeciwzapalne) oraz syntazy TXA₂ (działanie antyagregacyjne). Abruchinony hamują również uwalnianie β -glukuronidazy i histaminy z mastocytów oraz enzymów lizosomalnych z neutrofili, co warunkuje bezpośrednio aktywność przeciwzapalną powyższych związków [42].

Podobny mechanizm działania stwierdzono w przypadku izoprenyloowanych izoflawonów występujących w korzeniach *Derris scandens*, stosowanych w medycynie tajskiej, w terapii stanów zapalnych stawów [36].

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Stwierdzono, że izoflawony, izoflawany, izoflawanony oraz pterokarpany, w zależności od budowy chemicznej, posiadają określoną aktywność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczną oraz przeciwprzeczerniową [9,18,44,46,47,73].

Hamowanie replikacji wirusów: polio-typ 2 oraz HSV-1 zaobserwowano w przypadku wyciągów oraz czystych izoflawonów wyizolowanych z kwiatów *Ulex europaeus* (*Fabaceae*) [18]. Aktywność testowanych pochodnych metylogeniszyny była wielokrotnie niższa niż w przypadku bioflawonoidów z grupy flawonów i nie dotyczyła rino- oraz retrowirusów. Uważa się, że obecność podstawnika fenyloвого bądź metylowego przy C-5 warunkuje hamujące działanie izoflawonów względem wirusów polio i HSV-1. W tym miejscu należy zaznaczyć, że badane izoflawony zupełnie nie działały w testach *in vivo* i w związku z tym nie mogą być stosowane w terapii schorzeń wirusowych [18].

Podstawowe izoflawony *Maclura pomifera* (*Moraceae*), takie jak: osaina oraz pomiferyna, w testach wielokrotnych agarowych rozcieńczeń, wykazywały aktywność przeciwbakteryjną wobec *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Salmonella*

gallinarum oraz *Streptococcus aureus*. Obydwa związki, w teście *in vitro*, charakteryzowały się większą aktywnością niż streptomycyna [46].

Działanie przeciwgrzybicze względem *Cladosporium cladosporioides* i *Cladosporium cucumerianum* stwierdzono natomiast w przypadku izoflawonów otrzymanych z kory *Erythrina berteroana* (Fabaceae) oraz korzenia *Virola surinamensis* (Myristicaceae) [44,47,73].

W bioautograficznych testach na płytkach TLC, aktywność przeciwgrzybicza badanych związków była nawet dziesięciokrotnie wyższa niż w przypadku nystatyny [44,47].

Korzystne działanie terapeutyczne wobec *Leishmania amazonensis* zaobserwowano w przypadku izoflawonów występujących w *Centrolobium sclerophyllum* (Fabaceae). Proponuje się stosowanie 7,3'-dihydroksy-4'-metoksyizoflawonu w leishmaniozie leczonej dotychczas toksycznymi związkami antymonu [9].

Wielokierunkowe działanie farmakologiczne izoflawonoidów, opisane powyżej, budzi szereg nadziei na zastosowanie omawianych połączeń w zapobieganiu oraz leczeniu szeregu schorzeń cywilizacyjnych.

Piśmiennictwo

1. Adlercreutz H., Mazur W., Bartels P., Elomaa V., Watanabe S., Wahala K., Landstrom M., Lundin E., Bergh A., Damber J.E., Aman P., Widmark A., Johansson A., Zhang J.X., Hallmans G., Phytoestrogens and prostate disease, *J. Nutr.* 130 (2000) S658-659.
2. Agarwal R., Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1051-1059.
3. Agnusdei D., Adami S., Cervetti R., Crepaldi G., Di Munno O., Fantasia L., Isaia G.C., Letizia G., Ortolani S., Passeri M., Serni U., Vecchiet L., Gennari C., Effects of ipriflavone on bone mass and calcium metabolism in postmenopausal osteoporosis, *Bone Miner.* 19 (1992) S43-48.
4. Agnusdei D., Camporeale A., Gonnelli S., Gennari C., Baroni M.C., Passeri M., Short-term treatment of Paget's disease of bone with ipriflavone, *Bone Miner.* 19 (1992) S35-42.
5. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y., Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 5592-5595.
6. Allred C.D., Allred K.F., Ju Y.H., Virant S.M., Helferich W.G., Soy diet containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose dependent manner, *Cancer Res.* 61 (2001) 5045-5050.
7. Anderson J.B., Anthony M., Messina M., Garner S., Effects of phyto-oestrogens on tissues, *Nutr. Res. Rev.* 12 (1999) 75-116.
8. Anthony M.S., Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond, *J. Nutr.* 130 (2000) S662-663.
9. Araujo C.A.C., Alegrio L.V., Leon L.L., Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*, *Phytochemistry*, 49 (3) (1998) 751-754.
10. Ashton E., Ball M., Effects of soy as tofu vs meat on lipoprotein concentrations, *Eur. J. Clin. Nutr.* 54 (2000) 14-19.
11. Barnes S., Evolution of the health benefits of soy isoflavones, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217 (1998) 386-392.
12. Borrelli F., Izzo A.A., Ernst E., Pharmacological effects of *Cimicifuga racemosa*, *Life Sci.* 73 (2003) 1215-1229.
13. Brandi M.L., Natural and synthetic isoflavones in the prevention of treatment of chronic diseases, *Calcif. Tissue Int.* 61 (1997) 55-58.
14. Brandi M.L., Phytoestrogens and menopause, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7 (1999) 213-216.
15. Cassidy A., Bingham S., Setchell K.D., Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.* 60 (1994) 333-340.
16. Cos P., de Bruyne T., Apers S., van den Berghe D., Pieters L., Vlietinck A.J., Phytoestrogens: Recent developments, *Planta Med.* 69 (2003) 589-599.
17. Danzo B.J., The effects of environmental hormones on reproduction, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 54 (1998) 1249-1264.
18. de Rodriguez D.J., Chulia J., Simoes C.M.O., Amoros M., Mariotte A.M., Girre L., Search for *in vitro* antiviral activity of a new isoflavonic glycoside from *Ulex europaeus*, *Planta Med.* 56 (1990) 59-62.

19. di Pietro A., Conseil G., Perez-Victoria J.M., Dayan G., Baubichon-Cortay H., Tromprier D., Steinfels E., Jault J.M., de Wet H., Maitrejean M., Comte G., Boumendjel A., Mariotte A.M., Dumontet C., McIntosh D.B., Goffeau A., Castanys S., Gamarro F., Barron D., Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 307-322.
20. Dixon R.A., Steele C.L., Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering, *Trends in Plant Sci.* 4 (10) (1999) 340-400.
21. Dixon R.A., Natural products and plant disease resistance, *Nature* 411 (2001) 843-847.
22. Dixon R.A., Ferreira D., Molecules of Interest, Genistein, *Phytochemistry*, 60 (2002) 205-211.
23. Duka T., Tasker R., McGowan J.F., The effects of 3-week estrogen hormone replacement on cognition in elderly healthy females, *Psychopharmacology* 149 (2000) 129-139.
24. Duncan A.M., Underhill K.E., Xu X., Lavalleur J., Phipps W.R., Kurzer M.S., Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 3479-3484.
25. Eden J.A., Managing the menopause: phyto-oestrogens or hormone replacement therapy? *Ann. Med.* 33 (2001) 4-6.
26. Enmark E., Gustafsson J.A., Oestrogen receptors – an overview, *J. Int. Med.* 246 (1999) 133-222.
27. Fanti P., Monier-Faugere M.C., Geng Z., Schmidt J., Morris P.E., Cohen D., Malluche H.H., The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats, *Osteoporos. Int.* 8 (1998) 274-281.
28. File S.E., Jarrett N., Fluck E., Duffy R., Casey K., Wiseman H., Eating soya improves human memory, 157 (2001) 430-436.
29. Fritsche S., Steinhart H., Occurrence of hormonally active compounds in food: a review, *Eur. Food Res. Technol.* 209 (1999) 153-179.
30. Gambacciani M., Spinetti A., Cappagli B., Taponeco F., Felipetto R., Parrini D., Cappelli N., Fioretti P., Effects of ipriflavone administration on bone mass and metabolism in ovariectomized women, *J. Endocrinol. Invest.* 16 (1993) 333-337.
31. Gambacciani M., Spinetti A., Cappagli B., Taponeco F., Manetti P., Weiss C., Teti G.C., La Commare P., Facchini V., Ipriflavone prevents the bone mass reduction in postmenopausal women treated with gonadotropin hormone-releasing hormone agonists, *Bone Miner.* 26 (1994) 19-26.
32. Gennari C., Calcitonin, bone-active isoflavones and vitamin D metabolites, *Osteoporosis Int.* 2 (1999) S-81-90.
33. Grynkiewicz G., Gadzikowska M., Fitoestrogeny jako selektywne modulatory aktywności receptorów estrogenowych, *Postępy Fitoterapii* 10 (1) (2003) 28-35.
34. Hillman G.G., Forman J.D., Kuck O., Yudelev M., Maughan R.L., Rubio J., Laver A., Tekyi-Mensah S., Abrams J., Sarkar F.H., Genistein potentiates the radiation effects on prostate carcinoma cells, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 382-390.
35. Ho S.C., Woo J.L., Leung S.S., Sham A.L., Lam T.H., Janus E.D., Intake of soy products is associated with better plasma lipid profiles in the Hong Kong Chinese population, *J. Nutr.* 130 (2000) 2590-2593.
36. Houghton P.J., Laupattarakasem P., Robin J., Hoult S., Isoprenylated isoflavones from *Derris scandens* as inhibitors of eicosanoid synthesis, *J. Pharm. Pharmacol.* 40 (1988) 787-792.
37. Hsieh C.Y., Santell R.C., Haslam S.Z., Helferich W.G., Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.* 58 (1998) 3833-3838.

38. Keung W.M., Vallee B.L., Kudzu root: an ancient chinese source of modern antidipsotropic agents, *Phytochemistry* 47 (4) (1998) 499-506.
39. Krazeisen A., Breitling R., Moller G., Adamski J., Phytoestrogens inhibit human 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase typ 5, *Mol. Cell. Endocrinol*, 171 (2001) 151-162.
40. Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B., Gustafsson J.A., Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinol* 139 (1998) 4252-4263.
41. Kuntz S., Wenzel U., Daniel H., Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines, *Eur. J. Nutr.* 38 (1999) 133-142.
42. Kuo S.C., Chen S.C., Chen L.H., Wu J.B., Wang J.P., Teng C.M., Potent antiplatelet, anti-inflammatory and antiallergic isoflavanquinones from the root of *Abrus precatorius*, *Planta Med.* 61 (1995) 307-312.
43. Kurzer M.S., Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women, *J. Nutr* 130 (2000) 660S-661S.
44. Lopes N.P., Kato M.J., Yoshida M., Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*, *Phytochemistry* 51 (1999) 29-33.
45. Lu L.J., Anderson E.K., Grady J.J., Kohen F., Nagamani M., Decreased ovarian hormones during a soy diet: implications for the breast cancer prevention, *Cancer Res.* 60 (2000) 4112-4121.
46. Mahmoud Z.F., Antimicrobial components from *Maclura pomifera* fruit, *Planta Med.* 42 (1981) 299-301.
47. Maillard M., Hamburger M., Gupta M.P., Hostettmann K., An antifungal isoflavanone and a structure revision of a flavanone from *Erythrina berteroana*, *Planta Med.* 53 (1987) 563.
48. Martin-Cordero C., Lopez-Lazaro M., Pinero J., Ortiz T., Cortes F., Ayuso M.J., Glucosylated isoflavones as DNA topoisomerase II poisons, *J. Enzyme Inhib.* 15 (2000) 455-460.
49. Maskarinec G., Meng L., An investigation of soy intake and mammographic densities, *Breast Cancer Res.* 3 (2001) 134-141.
50. Messina M., Barnes S., Setchell K.D., Phyto-oestrogens and breast cancer, *Lancet* 350 (1997) 971-972.
51. Min B., Oh S.R., Lee H.K., Takatsu K., Chang I.M., Min K.R., Kim Y., Sophoricoside analogs as the IL-5 inhibitors from *Sophora japonica*, *Planta Med.* 65 (1999) 408-412.
52. Mueller S.O., Korach K.S., Mechanism of estrogen receptor – mediated agonistic and antagonistic effects w: M. Metzler (Ed), *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 3, Springer, Berlin, Heidelberg, 2001, str. 3-11.
53. Murkies A.L., Wilcox G., Davis S.R., Clinical review 92: phytoestrogens, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 297-303.
54. Murphy P.A., Song T., Buseman G., Barua K., Beecher G.R., Trainer D., Holden J., Isoflavones in retail and institutional soy foods, *J. Agric. Food. Chem.* 47 (1999) 2697-2704.
55. Passeri M., Biondi M., Costi D., Dall`Aglio E., Pedrazzoni M., Bufalino L., Castiglione G.N., Abate G., Effects of 2-year therapy with ipriflavone in elderly women with established osteoporosis, *Ital. J. Mineral Electrolyte Metab.* 9 (1995) 137-144.
56. Peeters P.H., den Tonkelaar I., Van't Veer P., Keinan-Boker L., Arts C.M.J., Adlercreutz H., Thijssen J.H.H., Urinary phytoestrogens and breast cancer risk in a prospective study in postmenopausal Dutch women, *J. Nutr.* 130 (1999) S688.

57. Perfumi M., Massi M., Guerra M., Speroni E., Effect of *Pueraria lobata* (Wild) on ethanol intake of alcohol-preferring rats, *Phytother. Res.* 12 (Suppl. 1) (1998) S35-38.
58. Peterson G., Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells, *J. Nutr.* 125 (1995) S784-789.
59. Phillips D.A., Kapulnik Y., Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts, *Trends Microbiol.* 3 (2) (1995) 58-64.
60. Picherit C., Coxam V., Bennetau-Pelissero C., Kati-Coulibaly S., Davicco M.J., Lebecque P., Barlet J.P., Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy- induced bone loss in rats, *J. Nutr.* 130 (2000) 1675-1681.
61. Radzikowski Cz., Wietrzyk J., Gryniewicz G., Opolski A., Genisteina – izoflawonoid soi o zróżnicowanym mechanizmie działania – implikacje kliniczne w leczeniu i prewencji chorób nowotworowych, *Postępy Hig. Med. Dośw.* 58 (2004) 128-139.
62. Ren M.Q., Kuhn G., Wegner J., Chen J., Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties, *Eur. J. Nutr.* 40 (2001) 135-146.
63. Ren M.Q., Kuhn G., Wegner J., Nürnberg G., Chen J., Ender K., Feeding daidzein to late pregnant sows influences the estrogen receptor beta and type 1 insulin-like growth factor receptor mRNA expression in newborn piglets, *J. Endocrinol.* 170 (2001) 129-135.
64. Salti G.I., Grewal S., Mehta R.R., Das G.T., Boddie A.W., Constantinou A.I., Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 796-802.
65. Santella R.C., Chang Y.C., Nair M.G., Helferich W.G., Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats, *J. Nutr.* 127 (1997) 263-269.
66. Sathyamoorthy N., Gilsdorf J.S., Wang T.T., Differential effect of genistein on transforming growth factor beta 1 expression in normal and malignant mammary epithelial cells, *Anticancer Res.* 18 (1998) 2449-2453.
67. Sirtori C.R., Lovati M.R., Soy proteins and cardiovascular disease, *Curr. Atheroscler. Rep.* 3 (2001) 47-53.
68. Tikkanen M.J., Wahala K., Ojala S., Vihma V., Adlercreutz H., Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 (1998) 3106-3110.
69. Tovar-Palacio C., Potter S.M., Hafermann J.C., Shay N.F., Intake of soy protein and soy protein extracts influences lipid metabolism and hepatic gene expression in gerbils, *J. Nutr.* (1998) 839-842.
70. Valente M., Bufalino L., Castiglione G.N., D'Angelo R., Mancuso A., Galoppi P., Zichella L., Effects of 1-year treatment with ipriflavone on bone in postmenopausal women with low bone mass, *Calcif. Tissue Int.* 54 (1994) 377-380.
71. van der Maesen L.J.G., Revision of genus *Pueraria* DC. with some notes on *Teyleria* Backer, *Agricultural University Wageningen Papers* 85-1 (1985) 37-62.
72. van der Schouw Y.T., de Kleijn M.J., Peeters P.H., Grobbee D.E., Phyto-oestrogens and cardiovascular disease risk, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 10 (2000) 154-167.
73. van Etten H.D., Antifungal activity of pterocarpan and other selected isoflavonoids, *Phytochemistry* 15 (1976) 655-659.
74. Wang C., Kurzer M., Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells, *Nutr. Cancer.* 28 (1997) 236-247.

75. Wang Ch.Ch., Prasain J.K., Barnes S., Review of the methods used in the determination of phytoestrogens, *J. Chromatogr. B* 777 (2002) 3-28.
76. Washburn S., Burke G.L., Morgan T., Anthony M., Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women, *Menopause* 6 (1999) 7-13.
77. Wiseman H., O'Reilly J.D., Adlercreutz H., Mallet A.I., Bowey E.A., Rowland I.R., Sanders T.A., Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 72 (2000) 395-400.
78. Wuttke W., Jarry H., Becker T., Schultens A., Christoffel V., Gorkow Ch., Seidlová-Wuttke D., Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 44 (supl. 1) (2003) 9-20.
79. Xu X., Duncan A.M., Wangen K.E., Kurzer M.S., Soy consumption alters endogenous estrogen metabolism in postmenopausal women, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9 (2000) 781-786.
80. Yamaguchi M., Kakuda H., Gao Y.H., Tsukamoto Y., Prolonged intake of fermented soybean (natto) diets containing vitamin K2 (menaquinone-7) prevents bone loss in ovariectomized rats, *J. Bone Miner. Metab.* 18 (2000) 71-76.
81. Zeimet A.G., Riha K., Berger J., Wildschwendter M., Hermann M., Daxenbichler G., Marth C., New insights into p53 regulation and gene therapy for cancer, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1153-1163.
82. Zhang R., Li Y., Wang W., Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein, *Nutr. Cancer* 29 (1997) 24-28.
83. Zhang Y., Song T.T., Cunnick J.E., Murphy P.A., Hendrich S., Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations, *J. Nutr.* 129 (1999) 399-405.
84. Zhang Z.H., Wang Q., Modulation of a cloned human A-type voltage-gated potassium channel (hKv 1.4) by the protein tyrosine kinase inhibitor genistein, *Pflügers Arch.* 440 (2000) 784-792.
85. Zhou J.R., Mukherjee P., Gugger E.T., Tanaka T., Blackburn G.L., Clinton S.K., Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis, *Cancer Res.* 58 (1998) 5231-5238.
86. Zhou J.R., Gugger E.T., Tanaka T., Guo Y., Blackburn G.L., Clinton S.K., Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice, *J. Nutr.* 129 (1999) 1628-1635.

6. KULTURY KALUSOWE WYBRANYCH GATUNKÓW Z RODZAJU *GENISTA* JAKO WYBIÓRCZE ŹRÓDŁO IZOFLAWONÓW

Wstęp

Narastające zapotrzebowanie na związki izoflawonoidowe, związane m. in. z ich udokumentowaną aktywnością biologiczną [8,9,11,15,29,34,36] spowodowało, że podjęto próby otrzymania tych połączeń w oparciu o syntezę chemiczną [12] bądź biosyntezę *in vitro* z wykorzystaniem biomas roślinnych lub bakteryjnych [1,5,7,13,14,28]. Na drodze syntezy chemicznej udało się dotychczas otrzymać jedynie nieliczne, proste połączenia izoflawonoidowe takie jak genisteina [12], bądź wybrane aglikony z grupy izoflawonów [3], izoflawnonów [43] oraz pterokarpanów [40]. Szanse na otrzymanie bardziej złożonych struktur glikozydowych, estrowych lub związków stereospecyficznych stwarzają natomiast kultury *in vitro* wybranych gatunków z rodziny motylkowych, bogatych w izoflawony [1,5,7,12-14]. Osiągnięcia w tym zakresie przedstawiono szczegółowo w rozdziale 4. W nielicznych pracach eksperymentalnych nad hodowlami *in vitro* *Glycine max*, *Maackia amurensis*, *Cicer arietinum*, *Sophora flavescens* oraz *Lupinus* i *Psoralea species* nie udało się opracować docelowej kultury roślinnej stanowiącej opłacalne źródło fitoestrogenów [1,5,7,13,14]. Badania te dowiodły jednak, że biomasy wybranych gatunków z rodziny *Fabaceae*, hodowane w warunkach *in vitro*, zarówno w postaci kultur kalusowych, zawiesin oraz korzeni transformowanych, zdolne są do zachowania, właściwej dla roślin macierzystych, zdolności do biosyntezy znacznych ilości izoflawonów [1,5,7,13,14,48].

W oparciu o powyższe spostrzeżenie sformułowano nadrzędny cel projektu badawczego, którym było opracowanie w warunkach *in vitro* roślinnego systemu hodowlanego, akumulującego bogaty zespół fitoestrogenów, w ilościach znacznie przewyższających produkty sojowe, uznane za najbogatsze, naturalne źródło tych związków [13]. Cel ten postanowiono osiągnąć w oparciu o wybrane gatunki z rodzaju *Genista* syntetyzujące w warunkach naturalnych wielokrotnie więcej izoflawonów niż *Glycine max* [21,41].

Wstępny etap doświadczeń biotechnologicznych prezentowanych w niniejszym rozdziale obejmował wyprowadzenie kultur kalusowych z sześciu gatunków z rodzaju *Genista*, takich jak: *G. tinctoria* L., *G. radiata* L., *G. sagittalis* L., *G. germanica* L., *G. aethnensis* D.C. oraz *G. monosperma* L. Z uwagi na całkowity brak doniesień literaturowych odnośnie prowadzenia hodowli *in vitro* badanych gatunków niezbędne było wstępne opracowanie warunków do ciągłego wzrostu kalusów roślin z rodzaju *Genista*, umożliwiających uzyskanie znacznych ilości poszczególnych biomas do dalszych doświadczeń biotechnologicznych. Optymalizacji warunków hodowlanych postanowiono dokonać w oparciu o modyfikacje w zakresie podstawowego podłoża wzrostowego oraz reżimu oświetleniowego. Jednocześnie celem powyższego etapu doświadczeń było ustalenie wpływu zmiennych warunków hodowli na wzrost kalusów oraz akumulację izoflawonów w namnażanych biomasach.

Prowadzona równolegle porównawcza analiza fitochemiczna kultywowanych kalusów oraz ziela macierzystych roślin gruntowych, w zakresie połączeń flawonoidowych, miała na celu wyselekcjonowanie biomasy *in vitro* stanowiącej najbogatsze źródło fitoestrogenów, z przeznaczeniem do dalszych badań biotechnologicznych. Analizę fitochemiczną materiału

roślinnego z kultur *in vitro* oraz z upraw gruntowych prowadzono, na wszystkich etapach doświadczeń *in vitro*, z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Optymalizację warunków rozdzielania bogatego zespołu związków izoflawonoidowych występujących w rodzaju *Genista* przedstawiono szczegółowo w rozdziale 13.

Materiały i metody

Materiał roślinny

Inicjalny materiał roślinny, służący do założenia hodowli *in vitro*, stanowiły otrzymane w 2000 roku nasiona: *Genista tinctoria* L., *Genista radiata* L., *Genista aethnensis* D.C., (Botanic Garden-Glasgow), *Genista sagittalis* L., *Genista germanica* L. oraz *Genista monosperulana* L. (Botanischer Garten der Technischer Universität – Braunschweig). Tożsamość poszczególnych gatunków potwierdzono po izolacji DNA roślinnego i porównaniu otrzymanych sekwencji z biblioteką danych GeneBank [24]. Próbkę materiału nasiennego zdeponowano następnie pod numerami: 00-01 (*G. tinctoria*), 00-02 (*G. radiata*), 00-03 (*G. aethnensis*), 00-04 (*G. sagittalis*), 00-05 (*G. germanica*) oraz 00-06 (*G. monosperulana*), w kolekcji nasiennej Ogrodu Roślin Lecznich Katedry i Zakładu Farmakognozji Akademii Medycznej w Gdańsku.

Nasiona, przed wyjałowieniem, poddano wstępnej stratyfikacji, umieszczając je na okres 7 dni w temperaturze + 4 °C, celem przerwania okresu spoczynku. Następnie suchy i mechanicznie oczyszczony materiał nasenny przemywano 1% wodnym roztworem detergentu (płyn „Ludwik”) i po przepłukaniu wodą redestylowaną odtłuszczono 70% roztworem etanolu. Właściwą sterylizację powierzchniową przeprowadzono zanurzając materiał roślinny, na okres 45 min, w 0,1% wodnym roztworze HgCl₂. Po trzykrotnym przepłukaniu nasion jałową wodą redestylowaną wykładano je na szalki Petriego, z krążkami bibuły filtracyjnej, nasączonej sterylnym roztworem wodnym kwasu giberelinowego GA₃ (28,9 μmol l⁻¹) i kinetyny (46 μmol l⁻¹). Szalki umieszczono następnie w cieplarni (23 °C), uzyskując w warunkach pełnego zaciemnienia, w ciągu tygodnia, około 90% kiełkowalność poszczególnych gatunków.

Kultury kalusowe

Inicjalne kultury kalusowe badanych roślin z rodzaju *Genista* wyprowadzano z fragmentów hypocotylowych zmężniałych, dwutygodniowych siewek. Dwumilimetrowe fragmenty wykładano każdorazowo na zestalone agarowo (0,7% w/v) podłoża Gamborga (G-5) [16] oraz Murashige’a i Skooga (MS) [30]. Podstawowe pożywki doświadczalne suplementowano 22,6 μmol l⁻¹ dodatkiem kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), 23,2 μmol l⁻¹ kinetyny oraz 3% (w/v) sacharozy. Eksplantaty inicjalne inkubowano w szklanych pojemnikach hodowlanych z przezroczystą polipropylenową nakrętką (*baby food jars* – „Sigma”), zawierających każdorazowo około 25 ml podłoża eksperymentalnego. Inicjację kalusowania prowadzono w fitotronie, w warunkach oświetlenia ciągłego o natężeniu 88 ± 8 μmol m⁻² s⁻¹ (lampy jarzeniowe Philips TLD 35W x 3), w temp. 25 ± 2 °C. W powyższych warunkach doświadczalnych obserwowano, w okresie 4 tygodni, zdolność fragmentów hypocotylowych poszczególnych gatunków rodzaju *Genista* do tworzenia tkanki przyrannej.

Otrzymane biomasy inicjalne przenoszono na następujące podłoża hodowlane: Gamborga (G-5) [16], Nitscha i Nitscha (NN) [31], Millera (Mill) [27], Mc Cowna (MC) [26], Schenk-Hildebrandta (SH) [37], Murashige’a i Skooga (MS) [30] oraz MS + 100 mg l⁻¹ poliwinylpolidonu (PVP). Powyższe pożywki suplementowano 2,4-D (22,6 μmol l⁻¹), kinetyną (23,2 μmol l⁻¹), 3% (w/v) sacharozy a następnie zestalano agarowo (0,7% w/v). W celu otrzymania stabilnych kultur kalusowych, każdorazowo około 300 mg świeżych biomas inicjalnych

przenoszono aseptycznie do słoiczek hodowlanych zawierających około 25 ml podłoży doświadczalnych. Kultury kalusowe prowadzono, z zastosowaniem wszystkich podłoży eksperymentalnych, w warunkach ciągłego oświetlenia (natężenie $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bądź w całkowitej ciemności (hodowle na pożywkach SH), przez okres 4 tygodni.

Przyrost biomas kalusowych kultywowanych na poszczególnych podłożach hodowlanych kontrolowano po 4-tygodniowym okresie wzrostowym, przez oznaczenie współczynnika przyrostu badanego materiału biologicznego (W_p) według wzoru podanego przez Kleina [39]. Obliczone wskaźniki przyrostu są średnimi arytmetycznymi, uzyskanymi z pomiarów pochodzących z pięciu pojemników hodowlanych $\pm$ S. D. (tab. 1). Namnożone biomasы inicjalne oceniano ponadto makroskopowo pod kątem homogenności, barwy oraz ewentualnych tendencji do redyferencjacji. Zebrane kalusy sześciu gatunków z rodzaju *Genista* suszono przez 48 h, do stałej masy, na drodze liofilizacji (próżnia 1×10^{-3} mbar wytworzona przez liofilizator LYOVAC GT2 firmy FIN-AQUA SANTASALO-SOHLBERG Co – Finlandia). Przeznaczono je następnie do badań fitochemicznych na obecność bioflawonoidów.

Ekstrakcja oraz analiza chromatograficzna frakcji bioflawonoidowych z kultur kalusowych oraz z ziela roślin gruntowych

Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej

Zliofilizowany i sproszkowany materiał roślinny (300 mg ziela roślin gruntowych oraz kalusów poszczególnych gatunków) ekstrahowano 4 godziny, trzema porcjami 80% wodnego roztworu metanolu (200 ml), na łaźni ultradźwiękowej, w temperaturze pokojowej ($\pm 20^\circ\text{C}$).

Połączone, odsączone od resztek surowca, wyciągi zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem (temp. $\pm 35^\circ\text{C}$) do syropowatej konsystencji, rozpuszczano w niewielkiej ilości wody redestylowanej i oczyszczano od lipofilnych substancji balastowych zgodnie z procedurą opisaną szczegółowo w rozdziale 13. Oczyszczone od chlorofilu, wosków oraz żywic frakcje flawonoidowe rozpuszczano ostatecznie w 10 ml 80% wodnego roztworu metanolu (Merck) i po przesączeniu (0,45 μm filtr J.T. Baker) nastrzykiwano bezpośrednio na kolumnę chromatograficzną.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Aparatura i odczynniki

W badaniach stosowano system HPLC firmy Knauer (Berlin, Niemcy) wyposażony w dwie pompy (Model 64-00), dynamiczną komorę mieszania rozpuszczalników, detektor UV (Model 87-00), zawór dozujący (Rheodyne, Cotati, CA, USA-Model 7125) o objętości petli 20 μl . Powyższy system pracował pod kontrolą komputera (Knauer HPLC, wersja 1.2, program EuroChrom 2000).

Rozdziały HPLC w skali analitycznej prowadzono na kolumnie LiChrospher RP-18 (250 x 4 mm, 5 μm , Merck, Darmstadt, Niemcy).

Do sporządzania fazy ruchomej stosowano rozpuszczalniki organiczne, do chromatografii cieczowej (acetonitryl – Merck, kwas octowy – J.T. Baker) oraz wodę redestylowaną (redestylator elektryczny RL 5 – MERA-POLNA – Przemysł). Przygotowane fazy ruchome, przed użyciem, sączono przez filtr 0,45 μm (J. T. Baker, Phillipsburg, NY, USA)

Faza ruchoma

Bioflawonoidy z ziela oraz biomas kalusowych badanych gatunków z rodzaju *Genista* rozdzielano stosując elucję gradientową, z zastosowaniem mieszaniny rozpuszczalników:

A (woda : acetonitryl – 99,9:0,1) oraz B (acetonitryl : kwas octowy – 99,9:0,1) według następującego programu:

- 0 min do 35 min: 10% - 35% B w A (gradient liniowy)
- 35 min do 80 min: 35% - 80% B w A (gradient liniowy)

Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1,0 ml/min. Stosowano detekcję UV, przy długości fali $\lambda = 262$ nm (czułość 0,008 AUFS). Czas kondycjonowania kolumny, pomiędzy poszczególnymi analizami, wynosił 10 min.

Sporządzanie krzywej kalibracji

Roztwór wzorcowy genistyny przygotowano przez rozpuszczenie 5 mg związku w 100 ml metanolu. Ilości genistyny (20 μ l) nastrzykiwane na kolumnę odpowiadały stężeniom związku w zakresie od 0,6 do 4,0 μ g. Krzywą kalibracyjną wykreślono przez korelację pól powierzchni pików (y) do stężenia substancji wzorcowej (x). Równanie regresji dla genistyny wynosiło: $y = 0,0005577 x - 0,00197$; współczynnik korelacji $r = 0,999918$.

Substancje wzorcowe

W analizach chromatograficznych stosowano 0,1% metanolowe roztwory następujących substancji wzorcowych: genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny (genistyna), 7-O-glukozyd daidzeiny (daidzina), daidzeina, pueraryna, 7-O-glukozyd luteoliny, luteolina, 7-O-glukozyd apigeniny, apigenina, 7,3',4'-trihydroksyizoflawon, ononina, ekwol, likwirytygenina, izolikwirytygenina, sisotryna, biochanina A, formononetyna, kumestrol (Extrasynthese, Francja), 7-O-diglukozyd genisteiny, 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny, 6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny (malonylogenistyna) oraz 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny (acetylogenistyna) (LC Laboratories, USA).

Omówienie wyników

W wyniku przeprowadzonych badań biotechnologicznych stwierdzono, że rodzaj *Genista* jest trudny do wprowadzenia do hodowli *in vitro*. Zaobserwowano, że na podłożu G-5 jedynie 20% hypokotyli wszystkich badanych gatunków tworzyło kalus o znacznej tendencji do zamierania. Natomiast na podłożu MS, 45% eksplantatów formowało tkankę przyranną o brunatno-zielonej barwie, umiarkowanej żywotności, nadającą się do dalszego pasażowania (ryc. 1).

Z licznych doniesień literaturowych wiadomo, że dobór podstawowego podłoża, zapewniającego jednocześnie znaczną produkcję wybranej klasy wtórnych metabolitów oraz ciągły i szybki wzrost nieuorganizowanej biomasy kalusowej, zdolnej do odtworzenia homogennej zawiesiny, jest niezwykle trudny [7,22,42]. Przyczyną tego są między innymi konkurujące o substraty i często wykluczające się wzajemnie, szlaki pierwotnego oraz wtórnego metabolizmu [19]. W przypadku rodzaju *Genista* dochodzi tu dodatkowo problem związany z faktem, że rośliny te jako krzewy są trudne w prowadzeniu kultur *in vitro* ukierunkowanych na otrzymanie parenchymatycznej biomasy kalusowej [21]. Szybkie zamieranie kalusów, poprzedzone brunatnieniem biomas, obserwowano uprzednio w badaniach nad rodzajami *Laburnum* i *Cytisus*, blisko spokrewnionymi z rodzajem *Genista* [44-46]. Wstępne doświadczenia nad inicjacją hodowli kalusowych wybranych janowców, opisane powyżej, wskazały na równie niską żywotność biomas z rodzaju *Genista*. Dopiero w wyniku dalszych doświadczeń, udało się opracować optymalne warunki do ciągłego wzrostu namnażanych kalusów, zapewniające jednocześnie znaczną produkcję izoflawonów w poszczególnych biomasach. Na danym etapie badań przetestowano 7 podłoża hodowlanych stosowanych powszechnie w kulturach *in vitro* roślin wyższych [16,26,27,30,31,37]. Podstawowym kryterium doboru pożywki

był jej skład w zakresie soli mineralnych, aminokwasów oraz witamin. By wykluczyć ewentualny wpływ zmiennej zawartości fitohormonów na wzrost i żywotność kalusów badanych gatunków z rodzaju *Genista* wszystkie podłoża hodowlane suplementowano jednakowym dodatkiem regulatorów wzrostu ($22,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2,4-D oraz $23,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny). Obok podstawowej pożywki MS bogatej w jony: NO_3^- , K^+ i NH_4^+ , zapewniających mierny wzrost wszystkich kalusów na etapie inicjalnym, powyższe podłoże stosowano również w wersji modyfikowanej dodatkiem poliwinylpirolidonu (PVP). Opierając się na danych literaturowych, związek ten miał za zadanie ograniczyć brunatnienie kalusów, spowodowane prawdopodobnie tworzeniem związków o charakterze prostych fenoli [33]. W eksperymencie zastosowano ponadto trzy pożywki, należące do ubogich w sole mineralne: NN [31], G-5 [24] i MC [26]. Ostatnia z nich jest często polecana do hodowli *in vitro* roślin drzewiastych. Wydawała się więc odpowiednia do prowadzenia kultur kalusowych janowców. Ubogim w minerały podłożem, wybranym do eksperymentu, jest również pożywka Mill. [27] używana z powodzeniem do prowadzenia kultur *in vitro*, blisko spokrewnionego z janowcami, rodzaju *Cytisus* [17]. Ostatnim, włączonym do doświadczeń podłożem była pożywka SH, z grupy kompozycji bogatych zarówno w sole mineralne jak i związki organiczne (500 mg l^{-1} mezo-inozytolu) [37]. Celem określenia wpływu światła na wzrost badanych kalusów oraz ewentualną produkcję izoflawonów biomasy z rodzaju *Genista* hodowano na pożywce SH w dwóch wersjach: pełnego oświetlenia lub w ciemności.

Przeprowadzone badania wykazały, że podstawowy skład podłoża doświadczalnego oraz warunki hodowli mają znaczny wpływ nie tylko na wzrost namnażanych kalusów (tab. 1), ale również na produkcję bioflawonoidów (tab. 2). Stwierdzono, że biomasy wszystkich badanych gatunków reagują podobnie na zmianę podłoża oraz oświetlenia. Z tego względu, aby uniknąć przytaczania prawie powielających się danych, dotyczących poszczególnych roślin (12 tabel), w prezentowanym rozdziale zdecydowano się przedstawić wpływ podstawowego składu podłoża doświadczalnego oraz oświetlenia na wzrost kalusów oraz produkcję izoflawonów na przykładzie biomasy *G. tinctoria*. Gatunek ten charakteryzował się bowiem najbogatszym, w warunkach hodowli *in vitro*, metabolizmem w zakresie połączeń z grupy izoflawonów. Dane szczegółowe dotyczące wzrostu kalusów pozostałych janowców, na etapie inicjalnym, znajdują się u autorki pracy. W niniejszym rozdziale przedstawiono natomiast porównanie dotyczące produkcji frakcji izoflawonoidowej, w kalusach wszystkich badanych gatunków, rosnących na zoptymalizowanym podłożu hodowlanym, zapewniającym ciągły wzrost biomas oraz maksymalną produkcję badanych wtórnych metabolitów (tab. 3). Jednocześnie dokonano porównania biosyntezy izoflawonów, w kulturach *in vitro* oraz w ziele macierzystych roślin gruntowych, co pozwoliło ustalić czy kultury kalusowe roślin z rodzaju *Genista* mogą służyć jako źródło fitoestrogenów i który z badanych gatunków jest najbardziej właściwy do prowadzenia dalszych doświadczeń biotechnologicznych.

Przeprowadzone badania wykazały, że najodpowiedniejsze, do prowadzenia hodowli kalusowych wszystkich 6 gatunków z rodzaju *Genista*, jest podłoże SH. Uzyskano na nim pukszysty kalus parenchymatyczny, żywozielonej barwy, o braku tendencji do redyferencjacji (ryc. 1). Jednocześnie omawiana biomasa charakteryzowała się znacznym przyrostem ($W_p = 958$, tab. 1).



Ryc. 1. Kalus inicjalny *G. tinctoria* hodowany na pożywce SH wzbogaconej $22,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2,4-D oraz $23,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny.

Fig. 1. *G. tinctoria* callus grown on SH medium supplemented with $22.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2,4-D and $23.2 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetin.

Być może efekt ten wiąże się z dużą zawartością *mezo*-inozytolu w pożywce. Autorka niniejszej pracy stwierdziła uprzednio korzystny wpływ dużych dawek *mezo*-inozytolu na wzrost oraz strukturę kalusów roślin z rodzaju *Caryopteris* [23] oraz biomas *Vaccinium myrtillus* i *Vaccinium corymbosum* var. *bluecrop* [10]. Rośliny te, podobnie jak badane janowce należą do krzewów i są trudne w prowadzeniu doświadczeń *in vitro*, mających na celu otrzymanie kultur kalusowych [10,23].

Stosunkowo znaczny przyrost namnażanych biomas uzyskano również na podłożu MS, stosowanym uprzednio na etapie kalusowania (tab. 1). Pożywka ta, podobnie jak podłoże SH, należy do bogatych w sole mineralne oraz składniki organiczne [30]. Z uwagi na to, że kalusy wszystkich badanych gatunków z rodzaju *Genista* charakteryzowały się wysokimi współczynnikami przyrostu (W_p) na podłożach SH i MS można uznać, że prowadzenie hodowli kalusowych janowców stwarza konieczność stosowania tzw. „podłoży bogatych” podobnie jak badane uprzednio inne gatunki z rodziny *Fabaceae* [1,5,7,13,14]. W tym miejscu należy wspomnieć o korzystnym dodatku PVP do podłoża MS. Zgodnie z danymi literaturowymi [10] związek ten ograniczył brunatnienie biomas kalusowych i związane z tym ich szybkie zamieranie. W efekcie uzyskano kalusy o znacznie wyższym współczynniku przyrostu, niż to miało miejsce na podstawowym podłożu MS, przygotowanym bez dodatku PVP (*G. tinctoria*: $W_{pMS}=499$; $W_{pMS+PVP}=530$ – tab. 1).

Zahamowanie wzrostu badanych kalusów stwierdzono w przypadku stosowania podłoży ubogich w sole mineralne i składniki organiczne (NN, G-5, Mill. i MC – tab. 1). Poszczególne biomas charakteryzowały się niejednorodną strukturą, z wyraźną tendencją do redyferencji oraz stopniowym zamieraniem pod koniec trzeciego tygodnia eksperymentu. Opisywana tendencja była szczególnie widoczna na pożywce MC (*G. tinctoria*: $W_p=30$ – tab. 1).

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że dostęp światła odgrywa istotną rolę we wzroście oraz żywotności badanych kalusów. Przykładowo, biomasa *G. tinctoria*, rosnąca na pożywce SH, w całkowitej ciemności, przyrastała gorzej niż kalus hodowany przy pełnym dostępie do światła ($W_p(\text{ciemność}) = 843$; $W_p(\text{światło}) = 958$ – tab. 1). Należy tu jednak zaznaczyć, że biomasa otrzymana na pożywce SH, przyrastała przy braku dostępu światła i tak lepiej niż kalusy uzyskane na pozostałych podłożach eksperymentalnych, w warunkach pełnego oświetlenia. Potwierdza to spostrzeżenie o wyjątkowo korzystnym wpływie pożywki SH na wzrost oraz strukturę kalusów z rodzaju *Genista*.

Podstawowe podłoża odżywcze wywierały również wpływ na biosyntezę izoflawonów w namnażanych biomasach. Niezależnie od stosowanej pożywki oraz warunków hodowli, we wszystkich kulturach kalusowych badanych janowców, uzyskano znaczną produkcję badanych związków. Skład syntetyzowanej frakcji izoflawonoidowej, co widać na przykładzie kalusa *G. tinctoria*, wydaje się być raczej organiczną cechą biomasy roślinnej, a nie efektem wzrostu kalusa na konkretnym podłożu doświadczalnym (tab. 2). Brak obecności ononiny, ekwolu oraz estrów genisteiny jedynie w kalusach rosnących na pożywkach ubogich w sole mineralne i składniki organiczne, może być związany z faktem, że związki te w porównaniu z glikozydowymi pochodnymi genisteiny i daidzeiny, są raczej elementami śladowymi badanej frakcji izoflawonoidowej (tab. 2). Gdy kalusy produkowały większe ilości izoflawonów, jak to miało miejsce w przypadku pożywki SH (6586,77 mg/100 g suchej masy – tab. 2), również stężenie omawianych związków było na tyle wysokie, że można je było oznaczyć techniką HPLC z zastosowaniem detektora UV-VIS. W przypadku, gdy biomasa syntetyzowała nawet 15-krotnie mniej badanych wtórnych metabolitów (462,49 mg/100 g suchej masy – pożywka MC) ilość związków śladowych prawdopodobnie malała na tyle, że nie było możliwe oznaczenie ich obecności w zespole izoflawonoidowym, przy użyciu HPLC.

Niezależnie od stosowanego podłoża odżywczego głównymi składnikami badanej frakcji izoflawonoidowej były w kalusach: pochodne genisteiny w postaci form mono i diglukozydowych oraz estrowych (6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny oraz 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny (ryc. 2). Pozostałe metabolity, będące pochodnymi daidzeiny (daidzina), formononetyny (sisotryna), biochaniny A (ononina) oraz proste izoflawony występowały w znacznie mniejszych ilościach (tab. 2).

Stwierdzono, że podłoże wzrostowe wpływa znacząco na ilość izoflawonów produkowanych przez biomasę kalusową, przy czym zaobserwowano dodatnią korelację między przyrostem tkanki a biosyntezą analizowanych połączeń (tab. 1 i 2). Zależność ta jest prawdziwa dla wszystkich składników zespołu izoflawonoidowego. Zgodnie z powyższym najwyższą produkcję izoflawonów (6586,77 mg/100 g suchej masy – *G. tinctoria*) stwierdzono na pożywce SH warunkującej jednocześnie największy przyrost kalusa. Najmniej izoflawonów (468,49 mg/100 g suchej masy) produkowała zaś biomasa rosnąca na pożywce MC, powodującej zamieranie kalusów z rodzaju *Genista* (tab. 2). Tym samym nie obserwowano w tym wypadku tzw. „stresu odżywczego” powodującego wzrost akumulacji izoflawonów w kulturach pędowych *Phaseolus vulgaris* prowadzonych na pożywkach z niską zawartością soli mineralnych [40]. Wyjątek stanowi podłoże Mill., na którym biomasę, mimo słabego przyrostu, syntetyzowały znaczne ilości izoflawonów (tab. 2). Podobny, korzystny wpływ pożywki Mill. autorka niniejszej pracy stwierdziła w przypadku akumulacji antocyjanów w kalusie *Rudbeckia hirta* [31]. Być może aminokwasy i ich kompleksy (hydrolizat kazeiny) obecne w znacznych ilościach w pożywce Mill., w obydwu wypadkach zostały włączone, jako prekursorzy, do biosyntezy związków polifenolowych, a nie do budowy podstawowej materii tkankowej. Wynika stąd, obserwowana również w kalusach rodzaju *Genista*, odwrotna korelacja między wzrostem biomasy a biosyntezą izoflawonów na podłożu Mill. (tab. 2).

Analiza wpływu dostępu światła na akumulację izoflawonów w kalusach rodzaju *Genista* wykazała interesującą zmianę stosunku ilościowego między estrem malonowym i octowym genistyny w biomasach hodowanych w całkowitej ciemności bądź przy pełnym oświetleniu.

Przykładowo, kalus *G. tinctoria* utrzymywany na pożywce SH, przy ciągłym oświetleniu, syntetyzował znacznie więcej 6''-O-malonylo-7-O-glukozydu genisteiny (153,12 mg/100 g suchej masy) niż 6''-O-acetylo-7-O-glukozydu genisteiny (2,92 mg/100 g suchej masy). Proporcje te uległy odwróceniu dla biomas utrzymywanych w ciemności, gdzie 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny jest połączeniem dominującym (104,3 mg/100 g suchej masy – tab. 2). Podobną zależność obserwowano dla pozostałych 5 badanych gatunków, co może sugerować, że jest ona wspólna i charakterystyczna dla rodzaju *Genista*. Opisywane powyżej, generowane dostępem światła, zjawisko dotyczyło jedynie izoflawonów o charakterze estrów. W przeprowadzonym cyklu badań nie stwierdzono natomiast, w kalusach janowców, bezpośredniego wpływu reżimu oświetleniowego na akumulację poszczególnych form glikozydowych bądź prostych aglikonów. Podobne zjawisko obserwowano uprzednio w przypadku kultur *in vitro* *Phaseolus vulgaris*, gdzie dostęp światła wpływał jedynie na biosyntezę faseoliny i kiewetonu [18,35]. Może to sugerować, że światło wywiera wybiórczy efekt regulatorowy na poszczególne układy enzymatyczne uczestniczące w biosyntezie określonych fitoestrogenów. Jako, że w ramach badań nad kulturami *in vitro* janowców nie oznaczano aktywności odpowiednich transferaz spostrzeżenie powyższe musi pozostać jedynie w sferze przypuszczeń.

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że zarówno skład podstawowego podłoża wzrostowego jak i również warunki oświetleniowe mają istotny wpływ na wzrost biomas kalusowych roślin z rodzaju *Genista*, jak również na zdolność powyższych kalusów do produkcji zespołu izoflawonów. Zmiana podłoża wpływa w tym wypadku raczej na sumaryczną ilość produkowanych związków, a nie na skład jakościowy kompleksu izoflawonoidowego. Światło natomiast lub jego brak zdaje się wpływać wybiórczo na biosyntezę estrowych pochodnych genistyny, uważanych powszechnie za formę magazynową fitoaleksyn [4,32,38].

Po opracowaniu warunków do hodowli ciągłej kalusów roślin z rodzaju *Genista* porównano zawartość izoflawonów w biomasach wszystkich sześciu badanych gatunków, rosnących na optymalnym podłożu SH. Uzyskane wyniki odnoszono każdorazowo do ziela odpowiednich roślin macierzystych (tab. 3). Tym samym możliwe było określenie atrakcyjności uzyskanych kultur *in vitro* jako alternatywnego źródła fitoestrogenów w porównaniu z materiałem roślinnym występującym w warunkach naturalnych. Analiza HPLC poszczególnych części morfologicznych janowców pochodzących z upraw gruntowych wykazała, że najbogatsze pod względem zawartości fitoestrogenów są kwiaty badanych gatunków. Stanowią one jednak tylko około 2,3% całkowitej biomasy roślinnej (rozdz. 13). Trudno jest więc postrzegać je jako wybiórcze, naturalne źródło izoflawonów. Ze względów ekonomicznych o wiele bardziej opłacalne wydaje się prowadzenie izolacji badanych wtórnych metabolitów z całkowitej biomasy ziela. Z tego względu, w badaniach *in vitro*, właśnie części nadziemne roślin stanowiły swoiste „próby kontrolne”, do których porównywano wyniki doświadczeń biotechnologicznych.

Wykonane badania wykazały, że hodowle tkankowe rodzaju *Genista* mogą służyć jako bogate i wybiórcze źródło metabolitów zaliczanych do fitoestrogenów. Porównując skład roślin macierzystych w zakresie bioflawonoidów, można stwierdzić, że rodzaj *Genista* zawiera proste flawony, pochodne luteoliny oraz apigeniny wraz z bardzo bogatą frakcją izoflawonoidową, z dominacją pochodnych genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A (tab. 3) [20,41]. Wprowadzenie roślin do kultur *in vitro*, niezależnie od badanego gatunku,

spowodowało wyraźną zmianę w szlakach metabolicznych omawianych połączeń polifenolowych. We wszystkich kalusach stwierdzono zupełny zanik biosyntezy prostych flawonów przy jednoczesnej zwiększonej produkcji izoflawonów. Można więc wnioskować, że w szlaku fenylopropanoidowym substraty wspólne dla początkowych etapów przemian wiodących do powstania izoflawonów bądź flawonów [2,20] zostały całkowicie wykorzystane do biosyntezy tych pierwszych. Tym samym uzyskane, w warunkach *in vitro*, biomasy stały się wybiórczym źródłem izoflawonów, a w szczególności 7-O-glukozydu genisteiny, który dominuje w kalusach wszystkich badanych gatunków (tab. 3). W tym miejscu należy zaznaczyć, że czysto chemiczna synteza glukozydowych pochodnych genisteiny jest droga i tym samym nieopłacalna [12].

Niezależnie od badanego gatunku, w ziele roślin gruntowych oraz w odpowiednich biomasach kalusowych, dominującymi składnikami frakcji izoflawonoidowych były związki występujące w szlaku metabolicznym genisteiny: genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny (genistyna), 7-O-diglukozyd genisteiny, 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny oraz 6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny i 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny (tab. 3). Interesujące wydaje się porównanie zawartości estrowych pochodnych genisteiny w ziele roślin gruntowych i biomasach kalusowych. W przeciwieństwie do glukozydowych pochodnych genisteiny, związków tych w kulturach tkankowych było znacznie mniej niż w odpowiednich roślinach macierzystych (tab. 3, ryc. 2). Zahamowanie biosyntezy estrów w kalusach wszystkich gatunków wydaje się związane z faktem wprowadzenia roślin do kultur *in vitro*. Powszechnie uważa się, że w roślinie nieaktywne, występujące konstytucyjnie, pochodne malonowe genisteiny pełnią rolę magazynu związanych fitoantycypin. Dopiero w odpowiedzi na warunki stresowe (np. atak patogenu), na skutek hydrolizy, z połączeń estrowych uwalniane są odpowiednie fitoaleksyny, uczestniczące następnie w reakcji obronnej [4,32,38]. Jeżeli fakt wprowadzenia roślin do kultur *in vitro* (produkcja tkanki przyrannej) uznamy za czynnik stresowy to może on w pewnym stopniu tłumaczyć obserwowaną w kalusach janowców niską zawartość estrowych izoflawonów, połączoną ze znaczną akumulacją prostych glikozydów oraz aglikonów o charakterze fitoaleksyn. Opisany powyżej profil produkcji izoflawonów w kulturach *in vitro* był wspólny dla wszystkich badanych kalusów. Z racji dość dużej populacji badanych roślin (6 gatunków) można stwierdzić, że kultury *in vitro* roślin z rodzaju *Genista* mogą służyć za niezwykle bogate źródło fitoestrogenów.

W trakcie prowadzonego eksperymentu odnotowano znaczące różnice między badanymi kalusami i odpowiednimi roślinami gruntowymi, dotyczące nie tylko braku pochodnych luteoliny i apigeniny w tych pierwszych, ale również istotnych zmian w profilu frakcji izoflawonoidowych.

W przypadku ziela *G. tinctoria* dominującym składnikiem kompleksu izoflawonoidowego był 7-O-glukozyd genisteiny (1454,28 mg/100 g suchej masy). 7-O-glukozyd luteoliny dominował natomiast w kompleksie flawonów (1097,01 mg/100 g suchej masy) obok niższych stężeń 7-O-glukozydu apigeniny (tab. 3). Jak już wspomniano, wprowadzenie powyższej rośliny do kultur *in vitro* spowodowało całkowite zahamowanie produkcji flawonów. Jednocześnie uzyskany kalus *G. tinctoria* jest najbogatszym źródłem izoflawonów (suma związków-6586,77 mg /100 g suchej masy) spośród wszystkich badanych tkanek. Ogromne ilości genistyny (3016,38 mg /100 g suchej masy) w kalusie *G. tinctoria*, ponad dwukrotnie przewyższają zawartość tego związku w roślinie gruntowej, czyniąc z niego niewątpliwie źródło do otrzymania powyższego izoflawonu. Na uwagę zasługuje również obecność w kalusie *G. tinctoria* likwirytygeniny, związku nieobecnego w roślinie gruntowej, a jednocześnie zaliczanego, pod względem biogenezy, do pierwotnych prekursorów izoflawonowych [20].

W ziele *G. radiata* wśród połączeń izoflawonoidowych, zwraca uwagę obecność znacznych ilości sisotryny (440,61 mg /100g suchej masy), będącej pochodną formononetyny (tab. 3). Niestety uzyskana z fragmentów hypokotylowych biomasa powyższego gatunku straciła zdolność do biosyntezy znacznych ilości tego połączenia, utrzymując jego produkcję na poziomie zbliżonym do kalusów pozostałych janowców (tab. 3). Zarówno w ziele jak i biomacie *G. radiata* odnotowano obecność niewielkich stężeń kumestrolu. Powyższa pochodna kumarynowa, zaliczana do aktywnych fitoaleksyn, charakteryzuje się również znaczną aktywnością fitoestrogenną [36]. Ogólnie produkcja izoflawonów w kalusie *G. radiata* jest znacznie niższa (3276,34 mg /100 g suchej masy) niż w biomacie *G. tinctoria* (tab. 3).

Interesujące pod względem składu frakcji bioflawonoidowych są ziele *G. sagittalis* oraz *G. germanica*. Obok prostych flawonów, pochodnych luteoliny oraz apigeniny występują tu niezwykle bogate zespoły izoflawonoidowe (*G. sagittalis* – 3933,37 mg/100 g suchej masy oraz *G. germanica* – 2119,18 mg/100 g suchej masy – tab. 3). W przeciwieństwie do ziela *G. tinctoria* i *G. radiata*, w omawianych gatunkach głównym składnikiem frakcji izoflawonoidowej jest nie 7-O-glukozyd genisteiny, ale genisteina (*G. sagittalis* – 1633,63 mg/100 g suchej masy; *G. germanica* – 711,68 mg/100 g suchej masy). Analiza HPLC kalusów omawianych gatunków wykazała, że w kulturach *in vitro* wystąpiło przestawienie proporcji ilościowych między aglikonem i monoglukozydem genisteiny na korzyść tego ostatniego (tab. 3). Tym samym w kalusach *G. germanica* i *G. sagittalis* uzyskano profil produkcji frakcji izoflawonoidowych zbliżony do kalusów pozostałych gatunków, gdzie zawsze dominował 7-O-glukozyd genisteiny (tab. 3).

W biomasach obydwu gatunków, podobnie jak w kalusie *G. tinctoria*, stwierdzono również obecność likwirytygeniny, prekursora izoflawonoidowego nie występującego w ziele roślin gruntowych. Uzyskane kalusy, podobnie jak biomasa *G. tinctoria* były również bogate w zespoły izoflawonoidowe (*G. sagittalis* – 4940,65 mg/100 g suchej masy; *G. germanica* – 3858,64 mg/100 g suchej masy – tab. 3).

Ziele *G. aethnensis* należy do stosunkowo ubogich w połączenia z grupy bioflawonoidów. Frakcja prostych flawonów składa się, w tym wypadku, jedynie z pochodnych luteoliny przy zupełnym braku apigeniny i jej monoglukozydu. Głównym składnikiem zespołu izoflawonoidowego w janowcu etneńskim jest 7-O-glukozyd genisteiny, który również dominuje w kalusie omawianego gatunku (tab. 3). Charakterystyczna, zarówno dla ziela jak i kalusa *G. aethnensis*, jest natomiast obecność izolikwirytygeniny, nie stwierdzonej w pozostałych janowcach. Należy również zaznaczyć, że ziele i kalus *G. aethnensis*, podobnie jak *G. radiata* syntetyzuje niewielkie ilości kumestrolu (tab. 3). Po wprowadzeniu *G. aethnensis* do kultur *in vitro* uzyskano relatywnie największy, w całej puli badanych gatunków, wzrost produkcji frakcji izoflawonoidowej, w porównaniu z wyjściowym materiałem z upraw gruntowych (271,89 mg/100 g suchej masy – ziele; 2267,67 mg/100 g suchej masy – kalus). Potwierdza to dane literaturowe, że nawet roślina macierzysta syntetyzująca niewielką ilość określonej klasy wtórnych metabolitów może okazać się wartościowym materiałem do uzyskania kultur *in vitro* produkujących znaczne stężenia wybranych połączeń biologicznie aktywnych [7,22,25,42,47].

Ostatni z badanych gatunków, *G. monospessulana*, należy również do stosunkowo ubogich w związki flawonoidowe. We frakcji flawonów odnotowano tu brak pochodnych luteoliny, a w zespole izoflawonów, w przeciwieństwie do pozostałych janowców dominuje 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny (96,66 mg/100 g suchej masy – tab. 3). Dominującym składnikiem frakcji izoflawonoidowej, w badanym kalusie, w przeciwieństwie do rośliny gruntowej, jest charakterystyczny dla biomas wszystkich janowców, 7-O-glukozyd genisteiny.

W kalusie *G. monospessulana* nie odnotowano obecności likwirytygeniny, izolikwirytygeniny oraz kumestrolu. Ze względu na ogólnie niską zawartość izoflawonów w danej kulturze (1317,08 mg/100 g suchej masy) można uznać, że kalus *G. monospessulana* jest najuboższym źródłem fitoestrogenów spośród wszystkich badanych gatunków z rodzaju *Genista*. Należy tu jednak zaznaczyć, że podobnie jak w przypadku *G. aethnensis*, wprowadzenie *G. monospessulana* do kultur *in vitro* spowodowało znaczne zwiększenie produkcji izoflawonów w porównaniu z roślinnym materiałem wyjściowym (tab. 3).

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń uzyskano nowe, bogate źródło związków izoflawonoidowych, przewyższające wielokrotnie nie tylko zawartości tych połączeń w roślinach macierzystych, ale również ilość izoflawonów w dotychczas otrzymanych kulturach *in vitro* szeregu gatunków z rodziny *Fabaceae* [1,5,7,13,14]. Wzrost zawartości izoflawonów w kulturach kalusowych janowców, w porównaniu z odpowiednimi roślinami gruntowymi, dotyczy wszystkich sześciu badanych gatunków. Można więc uznać, że rodzaj *Genista* jest wyjątkowo korzystny do prowadzenia, szeroko zakrojonych, doświadczeń *in vitro* mających na celu uzyskanie bogatego źródła izoflawonów o przewidywanej aktywności fitoestrogennej. Spostrzeżenie to dotyczy przede wszystkim janowca barwierskiego, gatunku, który w warunkach hodowli *in vitro* akumulował największą ilość izoflawonów.

Wszystkie badane biomasy janowców, z racji dużej zawartości pochodnych genisteiny, a w szczególności dominującego 7-O-glukozydu genisteiny mogą być w przyszłości wykorzystywane do izolacji tych połączeń. Należy tu nadmienić, że kalusy badanych gatunków syntetyzowały, poza dominującą genistyną, bogaty zmiennie ponad 14-składnikowy zespół izoflawonów, pochodnych szeregu aglikonów oraz likwirytygeninę nie występującą w roślinach gruntowych. Z tego względu uzyskany materiał ma wartość nie tylko utylitarną, ale również może służyć do badań podstawowych nad mechanizmami biosyntezy izoflawonów. Do badań tych, opartych o kalusy janowców, zachęca ponadto stwierdzenie różnic pomiędzy zawartością bioflawonoidów w roślinach gruntowych i otrzymanych biomasach. Różnice te dotyczą nie tylko braku produkcji flawonów w kulturach *in vitro*, ale zmian w ilości syntetyzowanych izoflawonów (pochodne estrowe). Może to wskazywać na wybiórczy wpływ warunków hodowli na biosyntezę określonych struktur izoflawonoidowych. Badania w tym zakresie mogą ułatwić przeprowadzenie sterowanej biosyntezy izoflawonów w oparciu o roślinne hodowle *in vitro*.

Tab. 1. Wpływ rodzaju podłoża wzrostowego na inicjację kalusowania *Genista tinctoria* L.
 Tab. 1. Influence of the medium type on the initiation and growth of *Genista tinctoria* callus.

Obserwacje makroskopowe biomasy	Rodzaj pożywki							
	SH światło	SH ciemność	MS	MS+PVP	NN	G ₅	Mill.	MC
Barwa	żywo-zielona	żółto-zielona	brunatno-zielona	żywo-zielona	żółto-zielona	żółto-brunatna	żółto-brunatna	szaro-brunatna
Struktura	puszysta-parenchymatyczna	puszysta-parenchymatyczna	zbita-embriogenna	zbita-embriogenna	śluzowata	śluzowata	zbita-„kalafiorowata”	śluzowata
Tendencja do mofrogenezy	brak	brak	brak	brak	spontaniczna ryzogeneza	spontaniczna ryzogeneza	spontaniczna ryzogeneza	primordia pędowe
Współczynnik przyrostu W _p	958	843	499	530	350	320	296	30

Kultury kalusowe prowadzono na szeregu stacjonarnych podłożach hodowlanych, przez 4 tygodnie (natężenie oświetlenia, poza SH_{ciemność} - $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 ± 2 °C). Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 5 pomiarów $\pm$ S. D.
 Callus cultures were grown on various solid media for 4 weeks (light intensity except SH_{dark} - $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\pm 25^\circ \text{C}$). Each value represents the mean of 5 samples $\pm$ S. D.

Tab. 2. Wpływ podłoża wzrostowego na zawartość izoflawonów (w mg/100 g suchej masy) w kulturach kalusowych *Genista tinctoria*.

Tab. 2. Effect of various media on isoflavone content, in mg per 100 g DW, in callus cultures of *Genista tinctoria* L.

Rodzaj pożywki	7-O- diglu- kozyd geniste- iny	puera- ry- na	7-O- glukozyd 2'- hydrok- sygeniste- iny	dai- dzina	geni- styna	malony- lo- geni- styna	7,3',4',- trihy- dro- ksy- isofla- won	acetylo- geni- styna	ono- nina	ekwol	dai- dze- ina	likwi- ryty- genina	siso- tryna	geni- steina	suma izofla- wonów
SH_{światło}	1521,2 ± 0,10	75,42 ± 0,48	1471,4 ± 0,12	114,07 ± 0,12	3016,3 ± 0,08	153,12 ± 0,58	27,23 ± 0,34	2,92 ± 0,44	9,21 ± 0,72	0,2 ± 0,09	8,14 ± 0,33	33,71 ± 0,27	6,77 ± 0,33	147,0 ± 0,12	6586,69
SH_{ciemność}	983,9 ± 0,18	58,38 ± 0,78	892,3 ± 0,16	86,25 ± 0,53	2312,6 ± 0,09	23,16 ± 0,48	4,17 ± 0,42	104,3 ± 0,33	2,14 ± 0,04	0,15 ± 0,08	5,12 ± 0,34	12,94 ± 0,59	1,34 ± 0,19	103,68 ± 0,24	4590,43
MS	264,4 ± 0,64	72,22 ± 0,42	257,7 ± 0,45	72,22 ± 0,42	1388,7 ± 0,09	78,6 ± 0,57	1,04 ± 0,23	1,12 ± 0,54	3,33 ± 0,62	0,1 ± 0,07	4,13 ± 0,23	11,21 ± 0,68	1,21 ± 0,29	102,46 ± 0,31	2258,44
MS+PVP	410,04 ± 0,51	82,48 ± 0,11	390,2 ± 0,44	82,48 ± 0,11	1846,2 ± 0,09	81,5 ± 0,46	2,87 ± 0,29	2,11 ± 0,48	5,54 ± 0,42	0,1 ± 0,08	5,12 ± 0,18	12,81 ± 0,49	1,98 ± 0,14	104,78 ± 0,44	3028,21
NN	328,6 ± 0,47	72,82 ± 0,21	297,1 ± 0,43	72,82 ± 0,21	1386,5 ± 0,09	64,7 ± 0,51	3,22 ± 0,34	1,47 ± 0,39	—	—	5,47 ± 0,28	6,11 ± 0,61	—	103,68 ± 0,40	2342,49
G-5	310,5 ± 0,48	74,22 ± 0,38	321,2 ± 0,28	74,22 ± 0,38	1402,1 ± 0,11	62,2 ± 0,49	2,98 ± 0,31	1,28 ± 0,22	—	—	5,81 ± 0,26	5,88 ± 0,59	—	101,44 ± 0,38	2361,83
Mill.	923,28 ± 0,2	89,20 ± 0,43	911,3 ± 0,28	89,20 ± 0,43	2386,3 ± 0,08	102,21 ± 0,44	5,02 ± 0,27	2,39 ± 0,37	7,14 ± 0,66	0,1 ± 0,01	8,11 ± 0,27	17,0 ± 0,51	3,35 ± 0,21	128,11 ± 0,19	4672,71
MC	26,44 ± 0,48	12,22 ± 0,38	19,8 ± 0,42	12,22 ± 0,38	388,0 ± 0,52	8,26 ± 0,56	—	—	—	—	—	—	—	3,46 ± 0,32	470,40

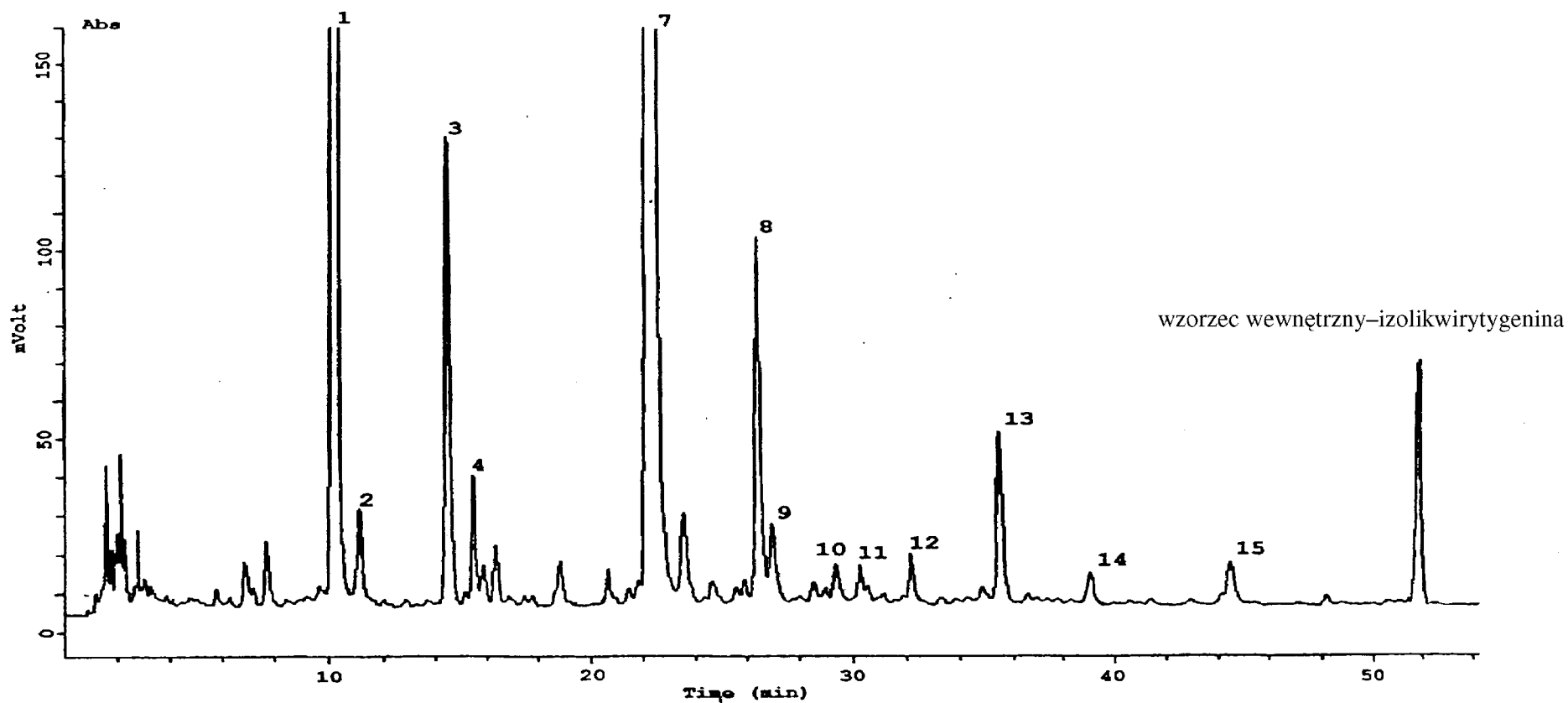
Kultury kalusowe prowadzono na szeregu stacjonarnych podłożach hodowlanych, przez 4 tygodnie (natężenie oświetlenia, poza SH_{ciemność} - $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 5 pomiarów $\pm$ S. D.

Cultures were grown on various solid media for 4 weeks (light intensity: $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\pm 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Each value represents the mean $\pm$ S. D. of 5 samples.

Tab. 3. Analiza ilościowa bioflawonoidów w ziele oraz kalusach roślin z rodzaju *Genista* (zawartość flawonoidów w mg/100 g suchej masy). Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 5 pomiarów $\pm$ S. D.

Tab. 3. *Quantitative analysis of flavonoids in herbs and callus cultures of several Genista species (flavonoid content in mg per 100g DW plant material). Each value represents the mean $\pm$ SD of 5 samples.*

Związek	MATERIAŁ ROŚLINNY											
	<i>Genista tinctoria</i>		<i>Genista sagittalis</i>		<i>Genista germanica</i>		<i>Genista radiata</i>		<i>Genista aethnensis</i>		<i>Genista monospeulana</i>	
	ziele	kalus	ziele	kalus	ziele	kalus	ziele	kalus	ziele	kalus	ziele	kalus
7-O-diglukozyd genisteiny	437,94 $\pm$ 01	1521,2 $\pm$ 0,10	528,7 $\pm$ 0,18	1748,2 $\pm$ 0,10	102,5 $\pm$ 0,11	313,6 $\pm$ 0,09	278,0 $\pm$ 0,08	671,1 $\pm$ 0,07	64,2 $\pm$ 0,12	151,6 $\pm$ 0,14	13,1 $\pm$ 0,01	140,1 $\pm$ 0,01
pueraryna	5,4 $\pm$ 0,09	75,4 $\pm$ 0,48	_____	_____	3,7 $\pm$ 0,19	15,4 $\pm$ 0,24	43,2 $\pm$ 0,22	82,7 $\pm$ 0,32	3,8 $\pm$ 0,07	42,3 $\pm$ 0,11	_____	_____
7-O-glukozyd 2'-hydroksy-genisteiny	420,6 $\pm$ 0,11	1471,4 $\pm$ 0,10	21,7 $\pm$ 0,17	44,6 $\pm$ 0,08	198,2 $\pm$ 0,08	425,9 $\pm$ 0,11	458,5 $\pm$ 0,09	860,1 $\pm$ 0,13	123,3 $\pm$ 0,24	378,2 $\pm$ 0,06	96,6 $\pm$ 0,22	139,6 $\pm$ 0,09
daidzina	42,8 $\pm$ 0,21	114,1 $\pm$ 0,12	47,3 $\pm$ 0,29	128,1 $\pm$ 0,34	10,4 $\pm$ 0,25	47,4 $\pm$ 0,27	41,9 $\pm$ 0,28	47,7 $\pm$ 0,21	11,2 $\pm$ 0,09	39,1 $\pm$ 0,08	27,8 $\pm$ 0,13	49,7 $\pm$ 0,09
7-O-glukozyd apigeniny	169,6 $\pm$ 0,15	_____	13,1 $\pm$ 0,05	_____	488,1 $\pm$ 0,12	_____	34,9 $\pm$ 0,19	_____	_____	_____	14,1 $\pm$ 0,17	_____
7-O-glukozyd luteoliny	1097,0 $\pm$ 0,10	_____	52,5 $\pm$ 0,05	_____	571,2 $\pm$ 0,19	_____	46,5 $\pm$ 0,15	_____	6,1 $\pm$ 0,08	_____	_____	_____
genistyna	1454,2 $\pm$ 0,10	3016,3 $\pm$ 0,10	1058,2 $\pm$ 0,20	2370,8 $\pm$ 0,20	217,8 $\pm$ 0,09	1921,7 $\pm$ 0,10	1194,1 $\pm$ 0,1	1399,2 $\pm$ 0,20	845,2 $\pm$ 0,19	1537,4 $\pm$ 0,10	74,6 $\pm$ 0,16	921,3 $\pm$ 0,08
malonylogenistyna	303,7 $\pm$ 0,09	153,1 $\pm$ 0,28	405,2 $\pm$ 0,19	274,7 $\pm$ 0,28	533,1 $\pm$ 0,20	475,2 $\pm$ 0,14	137,4 $\pm$ 0,31	51,6 $\pm$ 0,12	42,7 $\pm$ 0,01	16,1 $\pm$ 0,09	28,1 $\pm$ 0,14	24,5 $\pm$ 0,09
7,3',4'-trihydroksyizoflawon	11,5 $\pm$ 0,18	27,2 $\pm$ 0,34	_____	_____	10,2 $\pm$ 0,17	25,1 $\pm$ 0,32	_____	_____	3,6 $\pm$ 0,08	11,2 $\pm$ 0,07	0,3 $\pm$ 0,09	_____
acetylogenistyna	68,3 $\pm$ 0,19	2,9 $\pm$ 0,44	215,9 $\pm$ 0,38	137,8 $\pm$ 0,35	315,7 $\pm$ 0,32	120,1 $\pm$ 0,31	54,6 $\pm$ 0,16	10,1 $\pm$ 0,09	1,2 $\pm$ 0,09	0,14 $\pm$ 0,04	6,8 $\pm$ 0,25	9,8 $\pm$ 0,23
ononina	6,2 $\pm$ 0,28	9,2 $\pm$ 0,32	18,1 $\pm$ 0,15	25,4 $\pm$ 0,23	13,1 $\pm$ 0,09	52,3 $\pm$ 0,11	8,1 $\pm$ 0,25	13,5 $\pm$ 0,10	4,9 $\pm$ 0,03	9,1 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,09	2,3 $\pm$ 0,09
ekwol	6,42 $\pm$ 0,21	0,2 $\pm$ 0,09	_____	_____	_____	_____	_____	_____	1,4 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,09	6,8 $\pm$ 0,08	ślady
daidzeina	0,3 $\pm$ 0,01	8,1 $\pm$ 0,23	3,1 $\pm$ 0,19	22,7 $\pm$ 0,48	1,1 $\pm$ 0,08	8,4 $\pm$ 0,08	3,5 $\pm$ 0,10	6,8 $\pm$ 0,09	2,1 $\pm$ 0,04	7,3 $\pm$ 0,03	3,1 $\pm$ 0,09	19,8 $\pm$ 0,01
likwirytygenina	_____	33,7 $\pm$ 0,27	_____	17,9 $\pm$ 0,33	_____	12,4 $\pm$ 0,07	_____	_____	_____	3,4 $\pm$ 0,02	_____	_____
sisotryna	1,4 $\pm$ 0,08	6,7 $\pm$ 0,13	1,4 $\pm$ 0,09	7,1 $\pm$ 0,34	1,4 $\pm$ 0,07	7,8 $\pm$ 0,09	440,6 $\pm$ 0,09	3,7 $\pm$ 0,08	0,5 $\pm$ 0,07	1,1 $\pm$ 0,04	_____	_____
genisteina	32,7 $\pm$ 0,13	147,0 $\pm$ 0,11	1633,6 $\pm$ 0,10	163,2 $\pm$ 0,15	711,7 $\pm$ 0,44	433,2 $\pm$ 0,38	38,8 $\pm$ 0,11	129,5 $\pm$ 0,18	3,2 $\pm$ 0,09	48,1 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,04	9,8 $\pm$ 0,02
luteolina	5,4 $\pm$ 0,07	_____	_____	_____	_____	_____	2,1 $\pm$ 0,09	_____	_____	_____	_____	_____
kumestrol	_____	_____	_____	_____	_____	_____	55,4 $\pm$ 0,14	ślady	2,1 $\pm$ 0,04	13,1 $\pm$ 0,06	_____	_____
izolikwirytygenina	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	1,1 $\pm$ 0,09	22,1 $\pm$ 0,09	_____	_____
suma izoflawonów	2791,46	6586,5	3933,2	4940,5	2118,9	3858,5	2700,8	3276,0	1108,4	2267,24	258,5	1316,9
suma flawonów	1272,00	_____	65,6	_____	1059,3	_____	81,4	_____	6,1	_____	14,1	_____
suma bioflawonoidów	4063,46	6586,5	3998,8	4940,5	3178,2	3858,5	2782,2	3276,0	1114,5	2267,24	272,6	1316,9



Ryc. 2. Chromatogram HPLC wyciągu metanolowego z kalusa *Genista tinctoria* L.: 1 – 7-O-diglukozyd genisteiny; 2 – pueraryna; 3 – 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny; 4 – daidzina; 7 – genistyna; 8 – 6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny; 9 – 7, 3',4'-trihydroksyflawon; 10 – 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny; 11 – ononina; 12 – 7,4'-dihydroksyizoflawan; 13 – daidzeina; 14 – sisotryna; 15 – genisteina; wzorzec wewnętrzny-izolikwirytygenina.

Fig. 2. HPLC of isoflavones from callus culture of *Genista tinctoria* L: 1 – genistein-7-O-diglucoside; 2 – puerarin; 3 – 2'-hydroxygenistein-7-O-glucoside; 4 – daidzin; 7 – genistin; 8 – genistein-7-O-(6''-malonyl)-glucoside; 9 – 7,3',4',-trihydroxyflavone; 10 – genistein-7-O-(6''-acetyl)-glucoside; 11 – ononin; 12 – 7,4'-dihydroxyisoflavane; 13 – daidzein; 14 – sissotrin; 15 – genistein; internal standard – isoliquiritigenin.

Piśmiennictwo

1. Ames T.T., Worden R.M., Continuous Production of Daidzein and Genistein from Soybean in a Magnetofluidized Bed Bioreactor, *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 336-339.
2. Aoki T., Akashi T., Ayabe S., Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity and biosynthesis, *J. Plant Res.* 113 (2000) 475-488.
3. Balasubramanian S., Nair M.G., An efficient "one pot" synthesis of isoflavones, *Synthetic Communications* 30 (2000) 469-484.
4. Barz W., Mackenbrock U., Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpanes in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 199-211.
5. Berlin J., Fecker L., Rügenhagen C., Sator C., Strack D., Witte L., Wray V., Isoflavone Glycoside Formation in Transformed and Non-Transformed Suspension and Hairy Root Cultures of *Lupinus polyphyllus* and *Lupinus hartwegii*, *Z. Naturforsch.* 46 c (1991) 725-734.
6. Bourgaud E., Bouque V., Guckert A., Production of flavonoids by *Psolarea* hairy root cultures, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56 (1999) 97-104.
7. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Sci.* 161 (2001) 839-851.
8. Brandi M.L., Natural and synthetic isoflavones in the prevention of treatment of chronic diseases, *Calcif. Tissue Int.* 61 (1997) 55-58.
9. Danzo B.J., The effect of environmental hormones on reproduction, *Cell. Mol. Life Sci.* 54 (1998) 1249-1264.
10. Dembińska-Migas W., Łuczkiwicz M., Migas P., Cisowski W., Conditions for efficient induction and maintenance of callus cultures *Vaccinium corymbosum* var. Bluecrop and its accumulation of polyphenolic compounds, *Biotechnologia* 2 (41) (1998) 174-185.
11. Dixon R.A., Steele C.L., Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering, *Trends in Plant Sci.* 4 (10) (1999) 340-400.
12. Dixon R.A., Ferreira D., Molecules of Interest, Genistein, *Phytochemistry*, 60 (2002) 205-211.
13. Federici E., Touché A., Choquart S., Avanti O., Fay L., Offord E., Courtois D., High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures, *Phytochemistry* 64 (2003) 717-724.
14. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Glebko L.I., Kulesh N.I., Muzarok T.I., Seletskaya L.D., Bulgakov V.P., Yu.N. Zhuravlev, Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*, *Fitoterapia* 71 (2000) 365-372.
15. Fritsche S., Steinhart H., Occurrence of hormonally active compounds in food: a review, *Eur. Food Res. Technol.* 209 (1999) 153-179.
16. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K., Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.* 50 (1968) 151-158.
17. George E.F., Puttock D.J.M., George H.J., *Plant Culture Media: Formulation and Uses*, vol. 1, Exegetics Ltd, Edington, UK, 1987, str. 347.
18. Goossens J.F.V., Vendrig J.C., Effects of abscisic acid, cytokinins, and light on isoflavonoid phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* L., *Planta* 154 (1982) 441-446.

19. Hagendoorn M.J.M., van der Plas L.H.W., Segers G.J., Accumulation of antraquinones in *Morinda citrifolia* cell suspensions. A model system for the study of the interaction between secondary and primary metabolism, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1999) 227-234.
20. Harborne J.B., Chemosystematics of the *Leguminosae*. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe *Genisteeae*, *Phytochemistry* 8 (1969) 1449-1456.
21. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Gryniewicz G., Bączek T., Kaliszan R., Isoflavonoids of estrogenic activity in tissue cultures of *Glycine max*. L. and *Genista tinctoria* L., European Scientific Conference on bioactive compounds in plant foods. Health Effect and Perspectives for the Food Industry 26- 28th April, Tenerife, Congress Book of Abstracts, vol. 177, 2001.
22. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Optimization of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65 (2001) 57-68.
23. Łuczkiwicz M., Dembińska-Migas W., Migas P., Cisowski W., Parchowska A., Zárata R., Mardarowicz M., Volatile fraction from *in vitro* and *iv vivo* biomass of several *Caryopteris* plants, 35th International Symposium on Essential Oils (ISEO 2004), 29th Sept.-2nd Oct., Giardini Naxos, Congress Book of Abstracts, 2004.
24. Łuczkiwicz M., Piotrowski A., Two-Stage System for Micropropagation of Several *Genista* Plants Producing Large Amounts of Phytoestrogens, *Z. Naturforsch.* 60c (2005) 557-566.
25. Łuczkiwicz M., Zárata R., Dembińska-Migas W., Migas P., Verpoorte R., Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L., *Plant Sci.* 163 (2002) 91-100.
26. McCown B., Lloyd G., Woody plant medium (WMP) – a mineral nutrients formulation for microculture of woody plant species, *Hort. Sci.* 16 (1981) 453.
27. Miller C.O., Kinetin and kinetin-like compounds, w: Linskens S. Tracey (Eds.), *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, vol. 6, Berlin, Gottingen, Heidelberg, 1963, str. 194-202.
28. Miyazawa M., Ando H., Okuno Y., Araki H., Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger*, as biocatalyst, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 27 (2004) 91-95.
29. Mueller S.O., Korach K.S., Mechanism of estrogen receptor –mediated agonistic and antagonistic effects w: M. Metzler (Ed), *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 3, Springer, Berlin, Heidelberg, 2001, str. 3-11.
30. Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 475-497.
31. Nitsch C., Nitsch J.P., The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. The production of vegetative buds. *Planta* 72 (1967) 355-370.
32. Paiva N.L., Oommen A., Harrison M.J., Dixon R.A., Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 213-220.
33. Perl A., Lotan O., Abu-Abied M., Holland D., Establishment of an *Agrobacterium mediated* transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape – *Agrobacterium interactions*, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 624- 628.
34. Phillips D.A., Kapulnik Y., Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts, *Trends Microbiol.* 3 (2) (1995) 58-64.
35. Pinto M.E., Casati P., Hsu T.P., Ku M.S.B., Edwards G.E., Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B-absorbing compounds and NADP- malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different nitrogen conditions, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 48 (1999) 200-209.

36. Qiang Ren M., Kuhn G., Wegner J., Chen J., Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties, *Eur. J. Nutr.* 40 (2001) 135-146.
37. Schenk R.U., Hildebrandt A.C., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.* 50 (1972) 199-204.
38. Shimada N., Akashi T., Aoki T., Ayabe S., Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis, *Plant Sci.* 160 (2000) 37-47.
39. Street H.E., Henshaw G.G., Introduction and Methods Employed in Plant Tissue Cultures, w E.N. Wilmer (Eds.), *Cell and Tissue Culture*, Vol. 3, Academic Press, London, New York, 1966.
40. van Aardt T.G., van Rensburg H., Ferreira D., Synthesis of isoflavonoids. Enantiopure *cis*- and *trans*-6a-hydroxypterocarpan and a racemic *trans*-pterocarpan, *Tetrahedron* 56 (2001) 455-460.
41. van Rensen I., Veit M., von Rensen U.R., Cantó P., Vogt H., Greinwald R., Czygan F.C., Line-scatter plots in chemotaxonomy of *Genista* L. section *Spartenoides* SPACH in Western Europe, *Biochem. Syst. Ecol.* 27 (1993) 687-708.
42. Verpoorte R., van der Heijden R., ten Hoopen H.J.G., Memmelink G., Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production, *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 4 (1998) 3-19.
43. Waldemar A., Rao P.B., Degen H.G., Levai A., Patonay T., Saha-Moeller C.R., Asymmetric Weitz-Scheffer epoxidation of isoflavones with hydroperoxides mediated by optically active phase-transfer catalysts, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 259-264.
44. Wink M., Hartmann T., Witte L., Biotransformation of cadaverine and potential biogenetic intermediates of lupanine biosynthesis by plant cell suspension cultures, *Planta Med.* 40 (1980) 31-39.
45. Wink M., Witte L., Hartmann T., Quinolizidine alkaloid composition of plants and of photomixotropic cell suspension cultures of *Sarothamnus scoparius* and *Orobancha rapum*, *Planta Med.* 43 (1981) 342-352.
46. Wink M., Witte L., Schiebel H.M., Hartmann T., Alkaloid pattern of cell suspension cultures and differentiated plants of *Lupinus polyphyllus*, *Planta Med.* 38 (1980) 238-245.
47. Yu O., Shi J., Hession A.O., Maxwell C.A., McGonigle B., Odell J.T., Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed, *Phytochemistry* 63 (2003) 753-763.
48. Zhao P., Hamada Ch., Inoue K., Yamamoto H., Efficient production and capture of 8-prenylnaringenin and leachianone G-biosynthetic intermediates of sophoraflavanone G- by the addition of cork tissue to cell suspension cultures of *Sophora flavescens*, *Phytochemistry* 62 (2003) 1093-1099.

7. DWUFAZOWY SYSTEM HODOWLANY W MIKRO-ROZMNAŻANIU WYBRANYCH GATUNKÓW Z RODZAJU *GENISTA*, PRODUKUJĄCYCH ZNACZNE ILOŚCI FITOESTROGENÓW

Wstęp

Rodzaj *Genista* stanowi ponad kilkaset gatunków długo rosnących drzew i krzewów, charakteryzujących się nie tylko walorami ozdobnymi, ale przede wszystkim znaczną zawartością wtórnych metabolitów o wielokierunkowej aktywności farmakologicznej [22].

Obok toksycznych alkaloidów chinolizydynowych rośliny te zawierają bogaty zespół flawonoidów, w tym izoflawonów o interesującej aktywności fitoestrogennej [9,15,22].

Przeprowadzone dotychczas badania biotechnologiczne na sześciu wybranych gatunkach z rodzaju *Genista* (*G. tinctoria* L., *G. sagittalis* L., *G. radiata* L., *G. monosperma* L., *G. aethnensis* D.C. i *G. germanica* L.) wykazały, że otrzymane z powyższych roślin biomasy kalusowe syntetyzują wybiórczo bogaty zespół fitoestrogenów, pochodnych genisteiny i daidzeiny, wielokrotnie przekraczający ilości tych związków oznaczonych w roślinach gruntowych (rozdz. 6). Jednocześnie otrzymane w kalusach ilości genisteiny i jej pochodnych były znacznie większe od zawartości tych związków w produktach sojowych, uważanych dotychczas za źródło tych połączeń (rozdz. 6) [10].

Z uwagi na powyższe oraz fakt zahamowania biosyntezy toksycznych alkaloidów chinolizydynowych w testowanych biomasach (rozdz. 14) można uznać, że w oparciu o otrzymane kalusy roślin z rodzaju *Genista* możliwe jest opracowanie bogatego, alternatywnego źródła fitoestrogenów zarówno z przeznaczeniem dla przemysłu farmaceutycznego jak również do badań nad aktywnością farmakologiczną tych związków. Ponadto, otrzymane kalusy, w przeciwieństwie do ziela roślin gruntowych, nie syntetyzowały prostych flawonów pochodnych luteoliny i apigeniny, wykazując również zmianę w profilu produkcji izoflawonowych aglikonów, glikozydów i estrów (rozdz. 6). Zachodzi więc pytanie, czy zmiana w akumulacji związków flawonoidowych w kalusach badanych janowców związana jest z wprowadzeniem roślin do kultur *in vitro* (element stresu abiotycznego) [2], czy też dotyczy zmiany statusu morfologicznego otrzymanych biomas. Zważywszy na dalsze badania biotechnologiczne rodzaju *Genista*, których celem było opracowanie roślinnego systemu *in vitro* syntetyzującego wybiórczo przemysłowe ilości fitoestrogenów, odpowiedź na powyższe pytanie wydaje się niezwykle istotna. W toku badań prezentowanych w niniejszym rozdziale, postanowiono więc otrzymać kultury pędowe z sześciu wybranych gatunków rodzaju *Genista*, a następnie porównać, w trakcie analizy fitochemicznej, profil ich produkcji w zakresie bioflawonoidów (flawony i izoflawony) z zieleń roślin macierzystych oraz z wcześniej wyprowadzonymi biomasami kalusowymi. Tym samym możliwe było dokonanie wyboru, co do rodzaju roślinnego materiału *in vitro*, który w przyszłości zostanie poddany dalszym modyfikacjom, w celu zoptymalizowania biosyntezy izoflawonów.

Większość badanych janowców to gatunki nie występujące na terenie Polski, a w przypadku *G. aethnensis* mamy do czynienia z gatunkiem endemicznym [3,5,7,19,21,22]. Do tej pory rośliny z rodzaju *Genista* były standardowo rozmnażane generatywnie z nasion [6]. Ze względu na słabą kiełkowalność nasion oraz niską przeżywalność otrzymanych, w warunkach *in*

vivo, siewek [6,17] wydawało się celowym opracowanie metody efektywnego mikrorozmnażania badanych gatunków. Dotychczas jedynie Damiano i wsp. [6] oraz Ruffoni i wsp. [17] zaproponowali dla *Genista monosperma* Lam. metodę mikrorozmnażania drogą somatycznej embriogenezy [6,17]. Powtórzenie opisanej procedury, przez autorkę niniejszej pracy, w przypadku badanych janowców przyniosło zmienne rezultaty, dotyczące zarówno przeżywalności jak i rozwoju pierwotnych, kulistych embrionów, zależne bezpośrednio od testowanego gatunku (badania wstępne). Postanowiono więc opracować uniwersalną metodę mikrorozmnażania, która mogłaby być stosowana dla wszystkich sześciu badanych gatunków, a być może również dla całego rodzaju *Genista*. Umożliwiłaby ona, w porównaniu z metodą tradycyjną, szybkie otrzymanie znacznych ilości materiału roślinnego, służącego do pozyskiwania aktywnych farmakologicznie połączeń. Cel ten postanowiono osiągnąć przez bezpośrednią mikropropagację eksplantatów, stanowiących wybrane fragmenty pędowe, na pożywkach wzbogaconych o zmienną kompozycję regulatorów wzrostu, ustalając tym samym wpływ poszczególnych auksyn i cytokinin na produkcję kultur primordialnych, wydłużanie pędów i ukorzenianie roślin z rodzaju *Genista*.

Jako, że planowany eksperyment biotechnologiczny obejmował aż sześć gatunków możliwe stało się wysunięcie ogólnych wniosków dotyczących mikrorozmnażania rodzaju *Genista*. Ponadto, w toku prowadzonych doświadczeń, ustalono wyraźny wpływ cytodyferencjacji i statusu morfologicznego biomas na akumulację bioflawonoidów w badanych biomasach roślinnych.

Materiały i metody

Materiał roślinny

Inicjalny materiał roślinny, służący do założenia hodowli *in vitro* stanowiły, otrzymane w 2000 roku, nasiona: *Genista tinctoria* L., *Genista radiata* L., *Genista aethnensis* D.C., (Botanic Garden – Glasgow), *Genista sagittalis* L., *Genista germanica* L. oraz *Genista monosperma* L. (Botanischer Garten der Technischer Universität – Braunschweig). Tożsamość poszczególnych gatunków potwierdzono po izolacji DNA roślinnego i porównaniu otrzymanych sekwencji z biblioteką danych GeneBank [11]. Próbkę materiału nasiennego zdeponowano następnie pod numerami: 00-01 (*G. tinctoria*), 00-02 (*G. radiata*), 00-03 (*G. aethnensis*), 00-04 (*G. sagittalis*), 00-05 (*G. germanica*) oraz 00-06 (*G. monosperma*), w kolekcji nasiennej Ogrodu Roślin Leczniczych Katedry i Zakładu Farmakognozji, Akademii Medycznej w Gdańsku.

Z powyższego materiału nasiennego otrzymano sterylne siewki, według metody opisanej szczegółowo w rozdziale 6. Po dwóch tygodniach od wykiełkowania przenoszono je na podłoże Schenk-Hildebrandta (SH) [18] pozbawione regulatorów wzrostu, zawierające 3% w/v sacharozy i zestalone 0,7% w/v dodatkiem agaru (SH₀). Do hodowli sterylnych roślin zastosowano szklane pojemniki hodowlane z przezroczystą polipropylenową nakrętką (*baby food jars* – „Sigma”), zawierające każdorazowo około 30 ml podłoża doświadczalnego. Eksperyment prowadzono w fitotronie, w warunkach oświetlenia ciągłego o natężeniu $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lampy jarzeniowe Philips TLD 35W x 3), w temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Otrzymane w powyższych warunkach czterotygodniowe sterylne roślinki posłużyły do izolacji fragmentów pędów, zawierających węzeł z parą liści oraz pączkiem bocznym, wykorzystywanych następnie jako inicjalne eksplantaty, w cyklu doświadczeń związanym z mikrorozmnażaniem janowców.

Podłoża wzrostowe oraz procedury doświadczalne stosowane w mikrorozmnażaniu

Przygotowane, jak opisano wyżej, inicjalne fragmenty pędów, wszystkich sześciu badanych gatunków, przenoszono na stacjonarne podłoża SH [18], w wersji do proliferacji, modyfikowanej zmiennym dodatkiem regulatorów wzrostu zarówno z grupy auksyn jak i cytokinin (tab.1).

Po pięcioletnim okresie hodowli eksplantaty złożone głównie z „mikroroślinek” oraz w różnym stopniu wykształconych struktur pędowych przenoszono na podłoże SH [18] ze zmiennym dodatkiem auksyn, celem wydłużenia struktur primordialnych oraz słabiej wykształconych pędów (tab. 2). Pięcioletnie, dłuższe niż 1 cm, pędy oddzielano od tkanki macierzystej i kultywowano, przez okres 4 tygodni, na stacjonarnych podłożach SH [18], w wersjach modyfikowanych do ryzogenezy (tab. 3).

Wszystkie pożywki wzrostowe, stosowane w doświadczeniu, doprowadzano do pH 5,8, a następnie zestalano 0,7% w/v dodatkiem agaru. Eksperymenty hodowlane prowadzono w fitotronie, w warunkach oświetlenia ciągłego o natężeniu $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, w temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Pojemniki hodowlane typu „baby food jars” (Sigma) zawierały każdorazowo 25 ml modyfikowanych pożywek wzrostowych.

Eksperymenty biotechnologiczne, związane z mikrorozmnażaniem, powtórzono pięciokrotnie. Uzyskane rezultaty są średnimi arytmetycznymi uzyskanymi z pomiarów pochodzących z pięciu pojemników hodowlanych $\pm$ S. D.

Ukorzenione, czterotygodniowe pędy janowców delikatnie przemyto w wodzie wodociągowej a następnie przenoszono do plastikowych doniczek zawierających torf z 10% dodatkiem perlitu. W celu utrzymania stałej wilgotności, doniczki przykrywano szklanymi kloszami, które cyklicznie uchylano aż do pełnej aklimatyzacji roślinek (3 tygodnie). Hodowle, na danym etapie, prowadzono w fitotronie, w warunkach oświetlenia i temperatury podanych powyżej. Młode rośliny podlewano wodą wodociągową, w odstępach 5-dniowych i po wstępnym zaaklimatyzowaniu przenoszono na cztery tygodnie do szklarni, a następnie do gruntu. Sześciomiesięczne, zregenerowane rośliny gruntowe, hodowane w Ogrodzie Roślin Leczniczych Akademii Medycznej w Gdańsku, wraz z materiałem pędowym pochodzącym z kultur *in vitro*, przeznaczono do badań fitochemicznych.

Jakościową oraz ilościową analizę frakcji flawonoidowych, występujących w biomasach pędowych oraz częściach nadziemnych, zregenerowanych sześciu badanych gatunków, przeprowadzono techniką HPLC według procedury opisanej szczegółowo w rozdziale 6.

Uzyskane wyniki porównano z zawartością bioflawonoidów w ziele odpowiednich roślin macierzystych (tab. 4).

Omówienie wyników

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń opracowano metodę mikrorozmnażania dla sześciu wybranych gatunków z rodzaju *Genista*. Stwierdzono, że eksplantaty pędowe wszystkich badanych janowców reagują podobnie na zmianę podłoża eksperymentalnych w zakresie regulatorów wzrostu. Zjawisko to obserwowano zarówno na poziomie powstawania hodowli „mikroroślinek” (I etap mikrorozmnażania), wydłużania pędów, jak również ukorzeniania. Z tego powodu zdecydowano się przedstawić opracowanie optymalnej procedury mikrorozmnażania, dla badanych janowców, na przykładzie najbogatszego w flawonoidy gatunku – *G. tictoria* L. Tym samym uniknięto prezentacji ogromnej ilości powielających się danych

(18 tabel). Informacje szczegółowe, dotyczące mikrorozmnażania pozostałych janowców znajdują się u autorki pracy.

W niniejszym rozdziale porównano natomiast produkcję flawonoidów w kulturach pędowych, wszystkich badanych gatunków, rosnących na zoptymalizowanym do proliferacji podłożu SH (I etap mikrorozmnażania – tab. 1). Uzyskane wyniki porównano z zawartością bioflawonoidów w częściach nadziemnych odpowiednich roślin gruntowych oraz z zielem gatunków zregenerowanych, powstałych w wyniku mikrorozmnażania (tab. 4).

Inicjacja kultur pędowych – I etap mikrorozmnażania

Bezpośrednimi eksplantatami służącymi do wyprowadzenia kultur pędowych były fragmenty łodyg, zawierające węzeł z parą liści oraz pączek boczny, otrzymane ze sterylnych roślinek poszczególnych gatunków, rosnących na pożywce SH bez regulatorów wzrostu (SH₀). Zmodyfikowane podłoże SH stosowano uprzednio z powodzeniem do prowadzenia kultur kalusowych badanych janowców (rozdz. 6). W celu określenia wpływu regulatorów wzrostu na powstawanie i rozwój kultur pędowych, poszczególne eksplantaty wykładano na pożywki SH suplementowane zmiennym dodatkiem cytokinin, stosowanych bez dodatku auksyny lub w połączeniu z kwasem indolilo-3-octowym (IAA). W tym miejscu należy zaznaczyć, że IAA w przeciwieństwie do innych auksyn, w najmniejszym stopniu indukował, na etapie badań wstępnych, kalusowanie eksplantatów roślin z rodzaju *Genista* [10].

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że inicjacja, a następnie wzrost kultur pędowych roślin z rodzaju *Genista*, w warunkach *in vitro*, wymaga użycia pożywki z dodatkiem cytokininy. Stosowanie podłoża SH zawierającego tylko IAA powodowało, że jedynie 3% eksplantatów *G. tinctoria* tworzyło pędy boczne (tab. 1). Ilość pędów z pojedynczego eksplantatu ($1,0 \pm 0,09$) wskazuje jednocześnie, że proces ten był raczej spontaniczny i prawdopodobnie związany z obecnością endogennych cytokinin. Stwierdzono ponadto, że wszystkie eksplantaty w ciągu 5 tygodni odtwarzały kalafiorowaty kalus, który przetrwał wydłużając się pędy, wpływając niekorzystnie na efektywność mikrorozmnażania [12].

Eksplantaty inicjalne, na pożywkach suplementowanych wyłącznie cytokininami, nie zamierały, w różnym stopniu różnicując się w kultury pędowe. Zjawisko to wyraźnie zależało zarówno od typu jak i ilości stosowanego regulatora wzrostu (tab. 1). Pomimo, że utworzone pierwotne kultury pędowe wykazywały całkowitą anergizację w stosunku do stosowanej auksyny, ostatecznie w próbach z dodatkiem pojedynczej cytokininy (6- $\{\gamma\}$ -dimetyloallilo}-aminopuryna – 2iP; 6-benzyloaminopuryna – BAP; kinetyna – KIN; zeatyna – ZEA) nie zdecydowano się na usunięcie IAA z podłoża SH. Brak auksyny w pożywce wprowadził prawie całkowicie zahamował proces kalusowania eksplantatów jednak powstałe pędy były postrzępione, o zmiennej, w stosunku do roślin macierzystych, morfologii. Ponadto, pędy janowców hodowane na pożywkach SH, zawierających wysokie stężenia BAP i 2iP, bez jednoczesnego dodatku IAA, charakteryzowały się znacznym „szkleniem” (*hyperhydricity*) obserwowanym często przy dużej zawartości cytokinin w pożywkach. Powyższe zjawisko, stanowiące istotne ograniczenie w przypadku mikrorozmnażania roślin i opisywane uprzednio m. in. przez Wysokińską [23] zasadniczo redukowało obecność IAA w poszczególnych pożywkach.

Spośród wszystkich testowanych cytokinin, kinetyna i w mniejszym stopniu zeatyna wyraźnie hamowały różnicowanie się eksplantatów w kultury pędowe (tab. 1). W przypadku kinetyny, niezależnie od stężenia powyższego regulatora wzrostu w pożywce, eksplantaty inicjalne janowca barwierskiego praktycznie w ogóle nie tworzyły pędów bocznych (tab. 1). Zjawisko to jest szczególnie zauważalne na podłożu SH z pojedynczym $4,65 \mu\text{mol l}^{-1}$ dodatkiem kinetyny. W tym wypadku obserwowano prawie całkowite zahamowanie kalusowania

eksplantatów, jako wynik braku IAA w podłożu, z jednoczesnym sporadycznym wydłużaniem inicjalnych fragmentów pędowych (około 1% eksplantatów – tab. 1).

Jedynie nieznacznie lepsze rezultaty uzyskano w hodowlach, gdzie stosowaną cytokininą była zeatyna. Powyższy regulator wzrostu, w podłożu SH bez dodatku auksyny, powodował, że tylko około 4% fragmentów inicjalnych *G. tinctoria* tworzyło pędy boczne (tab. 1). Ponadto z pojedynczego eksplantatu otrzymano około 2,7 pędów, czyli ilość, która wyraźnie dyskwalifikuje pożywkę z dodatkiem zeatyny do mikrorozmnażania roślin z rodzaju *Genista*. Zwiększenie zawartości zeatyny w pożywce do $9,12 \mu\text{mol l}^{-1}$, przy jednoczesnym dodatku IAA ($5,7 \mu\text{mol l}^{-1}$) w niewielkim stopniu poprawiło uzyskane wyniki (około 10% eksplantatów odtwarzających pędy boczne; $3,4 \pm 0,2$ pędów przypadających na eksplantat – tab. 1).

BAP, cytokinina powszechnie stosowana w kulturach *in vitro* roślin motylkowych [20] inicjowała powstawanie kultur pędowych roślin z rodzaju *Genista* w znacznie większym stopniu niż uprzednio omówione regulatory wzrostu. Stwierdzono, że zmiana stężenia BAP w podłożu proliferacyjnym w niewielkim stopniu wpływała na procent kultur tworzących pędy boczne. Natomiast ilość pędów otrzymanych z pojedynczego eksplantatu rosła wyraźnie wraz ze wzrostem zawartości powyższej cytokininy w pożywce (tab. 1). W związku z powyższym $2,22 \mu\text{mol l}^{-1}$ dodatek BAP spowodował, że średnio 15% fragmentów inicjalnych tworzyło pędy boczne, a ilość pędów przypadających na pojedynczy eksplantat wyniosła około 3. Zastosowanie $8,87 \mu\text{mol l}^{-1}$ danej cytokininy w podłożu warunkowało natomiast 21% różnicowanie eksplantatów inicjalnych, z końcową obecnością około 8,6 pędów przypadających na pojedynczy fragment (tab. 1). Podobnie jak w opisywanych uprzednio przypadkach usunięcie IAA z podłoża hamowało niekorzystne pojawianie się tkanki przyrannej. Opisywane zjawisko połączone było niestety ze „szkleniem” kultury i występowaniem pędów o znacznie zmienionej, w porównaniu z roślinami macierzystymi, morfologii.

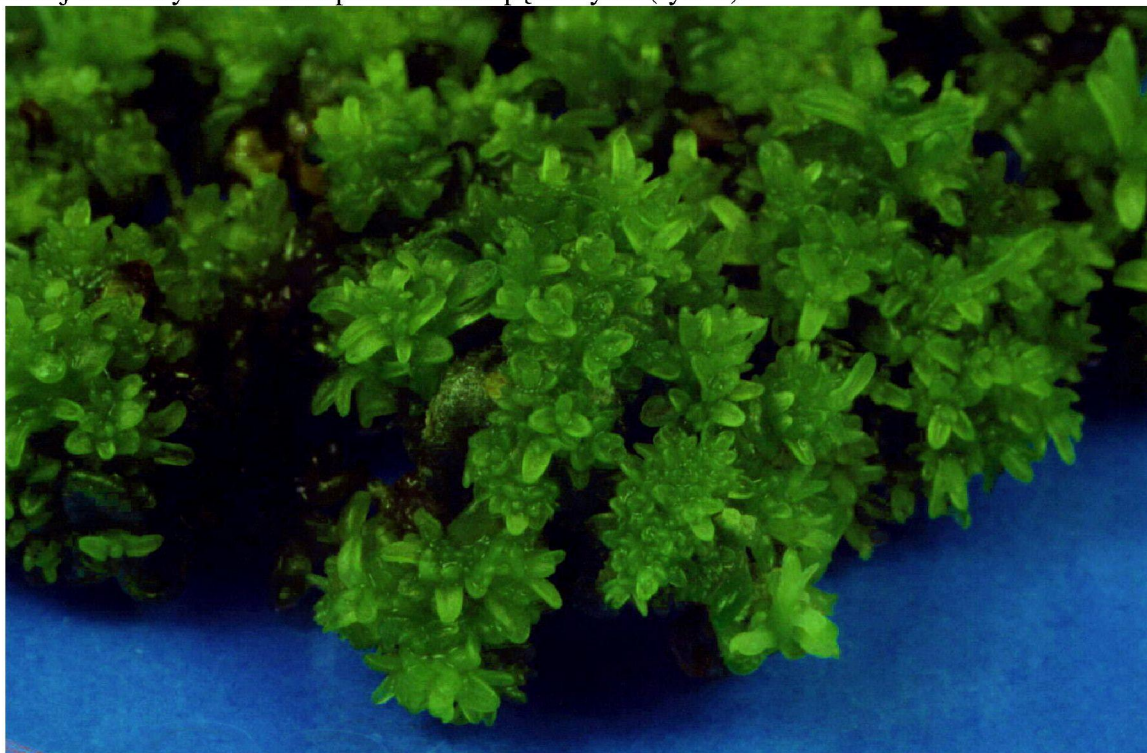
Rezultaty badań przedstawione w tab. 1 i na ryc. 1 wskazują, że spośród wszystkich przetestowanych pożywek proliferacyjnych najskuteczniejsze, w pierwszym etapie mikrorozmnażania wybranych janowców, okazały się podłoża SH z dodatkiem 2iP.

2iP jest cytokininą stosowaną z wyboru, przede wszystkim, przy mikrorozmnażaniu roślin z rodziny *Ericaceae* [24]. Jednocześnie należy zaznaczyć, że powyższy regulator wzrostu nie był do tej pory z sukcesem stosowany do mikropropagacji roślin motylkowych [20].

W toku prowadzonych badań stwierdzono, że 2iP wraz ze wzrostem zawartości w podłożu, w znacznym stopniu, zwiększała procent eksplantatów inicjalnych tworzących kultury pędowe, jak również ilość pędów powstających z pojedynczego *inoculum* (tab. 1). Omawiany regulator wzrostu ograniczał ponadto, w przeciwieństwie do pozostałych cytokinin, zależne bezpośrednio od obecności IAA, powstawanie tkanki przyrannej. Już niewielki ($2,46 \mu\text{mol l}^{-1}$) dodatek 2iP do podłoża spowodował, że tylko 54 % eksplantatów formowało kalus (tab. 1). Jednocześnie, w powyższych warunkach, 34% fragmentów inicjalnych odtwarzało pędy boczne, a ilość pędów otrzymanych z pojedynczego *inoculum* wynosiła średnio 10,6 (tab. 1). Efekt ten jest znacznie lepszy niż w przypadku stosowania maksymalnej zawartości BAP w podłożu SH (tab. 1).

Na pożywce SH z $5,70 \mu\text{mol l}^{-1}$ IAA i $9,84 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP już 97% fragmentów inicjalnych *G. tinctoria* tworzyło kultury pędowe, ze znaczną ilością pędów przypadających na pojedynczy eksplantat (około 29,7 – tab. 1). 2iP jest jedyną ze stosowanych cytokinin, warunkującą w opisywanym doświadczeniu, powstawanie kultur „mikroroślinek”, korzystnych z ekonomicznego punktu widzenia. Kultury pędowe wszystkich badanych gatunków hodowanych na

pożywce SH, z dodatkiem 2iP, składały się z dwóch rodzajów tkanek: „mikroroślinek” oraz zwartej biomasy z wieloma primordiami pędowymi (ryc. 1).



Ryc.1. Kultura „mikroroślinek” *G. tinctoria* na podłożu proliferacyjnym SH wzbogaconym $9,84 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP oraz $0,99 \mu\text{mol l}^{-1}$ TDZ.

Fig.1. Multiple microshoot formation of *Genista tinctoria* from shoot tip explants after 5 weeks on SH medium containing $9.84 \mu\text{M}$ 2iP and $0.99 \mu\text{M}$ TDZ.

Podobny typ kultur *in vitro* otrzymała Wysokińska dla *Penstemon serrulatus*, wyjaśniając, że zjawisko to jest związane ze znaczną ilością cytokinin w podłożu eksperymentalnym [23]. W przypadku roślin z rodzaju *Genista* uzyskany rezultat jest natomiast wypadkową zastosowania konkretnej cytokininy (2iP) jak również jej wysokiego stężenia w podłożu. Próba usunięcia IAA z pożywki, tak jak w przypadku podłoży z pozostałymi cytokininami, wprawdzie zupełnie hamowała tworzenie kalusa, powodowała jednak „szklenie” tkanek i powstawanie liści anormalnych.

W celu wyeliminowania powyższej auksyny, która jak stwierdzono była całkowicie zbędna do zainicjowania powstawania pędów bocznych, zastosowano pożywki SH, do których obok zasadniczej cytokininy wprowadzono niewielki dodatek ($0,99 \mu\text{mol l}^{-1}$ – tab. 1) tidiazuronu (TDZ). Powyższy regulator wzrostu, będący pod względem chemicznym podstawioną pochodną mocznika [1], warunkował tworzenie się kultur pędowych o prawidłowej morfologii m. in. w doświadczeniach nad mikropropagacją *Cajanus cajana* [8]. Podczas mikrorozmnażania badanych janowców tidiazuron, wykazując aktywność cytokinino-podobną, stosowany już w minimalnym stężeniu, zwiększał zarówno procent fragmentów inicjalnych odtwarzających pędy boczne jak również liczbę pędów powstających z pojedynczego eksplantatu (tab. 1). Wydaje się jednak, że efekt ten był w równym stopniu związany z obecnością 2iP jak i TDZ w podłożu proliferacyjnym. Próba usunięcia 2iP z pożywki i stosowania podłoża SH wzbogaconego jedynie o tidiazuron powodowała drastyczny spadek ilości pędów powstających na jednym eksplantacie (około 1,5 – tab. 1). Być może większe stężenia TDZ w pożywce zahamowałyby powyższą tendencję, ale procedura taka wydaje się nieopłacalna z ekonomicznego punktu widzenia, ze względu na wysoką cenę omawianego regulatora wzrostu [1].

Co najistotniejsze, tworzące się na pożywkach SH z dodatkiem 2iP i TDZ kultury pędowe, pomimo braku IAA, nie wykazywały „szklenia” i charakteryzowały się właściwą, dla poszczególnych gatunków, morfologią (ryc. 1). W rezultacie podłoże SH z $9,84 \mu\text{mol l}^{-1}$ dodatkiem 2iP i $0,99 \mu\text{mol l}^{-1}$ zawartością TDZ warunkowało, w przypadku badanych janowców, najlepszy efekt w postaci 100% tworzenia kultur pędowych, przy średnio 30 pędach powstających z jednego eksplantatu (tab. 1). Uzyskany wynik niewątpliwie spowodowany jest synergistyczną aktywnością obydwu stosowanych cytokinin.

Tab. 1. Wpływ regulatorów wzrostu na tworzenie pędów bocznych w eksplantatach pędowych *Genista tinctoria*.

Tab. 1. Effect of different growth regulator treatments on shoot proliferation in shoot tips of *Genista tinctoria*.

Regulatory wzrostu ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Ilość eksplantatów tworzących pędy boczne (%)	Ilość, w eksplantacie, pędów bocznych dłuższych niż 3 mm	Ilość kultur tworzących mikroślinki (%)	Ilość pędów tworzących kalus (%)
IAA (5,70)	3,0	$1,0 \pm 0,09$	brak	100,0
IAA (5,70) + BAP (2,22)	15,0	$3,0 \pm 0,1$	brak	100,0
IAA (5,70) + BAP (4,44)	19,0	$8,2 \pm 0,4$	brak	100,0
IAA (5,70) + BAP (8,87)	21,0	$7,4 \pm 0,5$	brak	73,0
BAP (4,44)	22,0	$8,6 \pm 0,2$	brak	5,0
IAA (5,70) + KIN (2,32)	2,0	$1,0 \pm 0,1$	brak	100,0
IAA (5,70) + KIN (4,65)	3,0	$1,0 \pm 0,08$	brak	100,0
IAA (5,70) + KIN (9,29)	1,0	$1,2 \pm 0,1$	brak	100,0
KIN (4,65)	1,0	$1,0 \pm 0,09$	brak	4,0
IAA (5,70) + ZEA (2,28)	3,0	$1,6 \pm 0,09$	brak	100,0
IAA (5,70) + ZEA (4,56)	5,0	$3,0 \pm 0,1$	brak	100,0
IAA (5,70) + ZEA (9,12)	10,0	$3,4 \pm 0,2$	brak	97,0
ZEA (4,56)	4,0	$2,7 \pm 0,1$	brak	10,0
IAA (5,70) + 2iP (2,46)	34,0	$10,6 \pm 0,4^a$	11,0	54,0
IAA (5,70) + 2iP (4,92)	59,0	$17,8 \pm 1,4^a$	34,0	19,0
IAA (5,70) + 2iP (9,84)	97,0	$29,7 \pm 2,1^a$	68,0	4,0
2iP (4,92)	74,0	$19,1 \pm 1,3^a$	78,0	2,0
IAA (5,70) + 2iP (9,84) + TDZ (0,99)	100,0	$31,0 \pm 2,8^a$	67,0	2,0
2iP (9,84) + TDZ (0,99)	100,0	$30,8 \pm 2,4$	91,0	brak
TDZ (0,99)	100,1	$1,5 \pm 0,09$	brak	brak

Kultury pędowe prowadzono na stacjonarnych, modyfikowanych podłożach SH, przez okres 5 tygodni (natężenie oświetlenia - $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temperatura - $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Wartości przedstawione w tabeli są średnimi arytmetycznymi wyników pochodzących z dziesięciu prób $\pm$ S. D.; a = fragmenty z międzywęzłami.

Shoot cultures were grown on various modified solid SH media for 5 weeks (light intensity $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temperature - $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of ten samples; a = nodal segments.

Wydłużanie pędów – II etap mikrorozmnażania

W opisywanych powyżej warunkach większość powstających pędów roślin z rodzaju *Genista* była krótka (poniżej 1 cm) a tym samym trudna do izolacji i ukorzeniania. Powodem tego zjawiska było znaczne stężenie cytokinin w poszczególnych podłożach [23]. Próba obniżenia zawartości wybranych cytokinin w pożywkach proliferacyjnych wiązała się zawsze ze zmniejszoną częstością różnicowania inicjalnych eksplantatów w kultury pędowe oraz z większym procentem fragmentów inicjalnych tworzących tkankę przyranną (tab.1). W związku z tym zdecydowano się na zastosowanie dwustopniowego systemu mikrorozmnażania. Pierwszy etap inicjalny obejmował otrzymanie kultur „mikroślinek”, które następnie

przenoszono na świeże podłoża SH, zmodyfikowane tak by uzyskać wydłużenie poszczególnych pędów w kulturach (II etap mikrorozmnażania – tab. 2). W tym celu, w pożywkach SH zastąpiono cytokininy stosowane na etapie proliferacji (2iP oraz TDZ) kwasem giberelinowym (GA₃) lub kwasem indolilo-3-masłowym (IBA). Testowano również pożywki, w których nowe regulatory wzrostu stosowano wspólnie z 2iP i TDZ (tab. 2).

Pomimo, że GA₃ był z powodzeniem wykorzystywany do elongacji primordiów pędowych roślin z rodziny *Fabaceae* [20], w przypadku rodzaju *Genista* jedynie nieliczne pędy uległy wydłużeniu pod wpływem stosowanego regulatora wzrostu. Na podłożu SH z 2,89 $\mu\text{mol l}^{-1}$ dodatkiem GA₃ tylko 14% inicjalnych kultur pędowych *G. tinctoria* reagowało pozytywnie, na powyższy regulator wzrostu, tworząc pędy wyraźnie dłuższe niż w przypadku hodowli „mikroroślinek”. Jednocześnie, w opisywanym wariacie hodowlanym, jedynie 31% powstałych pędów było dłuższych od 1 cm (tab. 2). Podobnie niezadowolające efekty uzyskano, gdy w pożywce, GA₃ stosowano wspólnie z TDZ i 2iP (tab. 2).

Tab. 2. Wpływ IBA oraz GA₃ na wydłużanie pędów *Genista tinctoria*.

Tab. 2. Effect of IBA and GA₃ on shoot elongation of *Genista tinctoria*.

Regulatory wzrostu ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Ilość pędów ulegających wydłużeniu (%)	Ilość pędów w jednym eksplancie	Ilość pędów dłuższych niż 1 cm (%)
2iP (9,84) + TDZ (0,99)	7,0	32,7 $\pm$ 2,9 ^b	2,0
2iP (9,84) + TDZ (0,99) + IBA (4,92)	99,0	29,5 $\pm$ 3,1 ^b	57,0
2iP (9,84) + IBA (4,92)	98,0	29,8 $\pm$ 2,4 ^b	59,0
IBA (4,92)	100,0	21,4 $\pm$ 2,1	64,0
2iP (9,84) + TDZ (0,99) + GA ₃ (2,89)	15,0	24,0 $\pm$ 1,2 ^b	27,0
2iP (9,84) + GA ₃ (2,89)	12,0	27,6 $\pm$ 1,9 ^b	24,0
GA ₃ (2,89)	14,0	19,7 $\pm$ 1,0	31,0

Kultury pędowe prowadzono na stacjonarnych, modyfikowanych podłożach SH, przez okres 4 tygodni (natężenie oświetlenia - 88 $\pm$ 8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temperatura 25 $\pm$ 2°C). Wartości przedstawione w tabeli są średnimi arytmetycznymi wyników pochodzących z dziesięciu prób $\pm$ S. D.; b = kultury z mikropędami.

Shoot cultures were grown on various modified solid SH media for 4 weeks (light intensity 88.8 $\pm$ 8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temperature - 25 $\pm$ 2°C). Each value represents the mean $\pm$ S.D. of ten samples; b = cultures with multiple shoots.

Dobre rezultaty przyniosło natomiast stosowanie IBA, jako pojedynczej auksyny, bądź w kombinacji z cytokininami. W przeciwieństwie do kwasu indolilo-3-octowego (IAA), IBA na danym etapie hodowli nie inicjował powstawania kalusa oraz nie obniżał ilości pędów utworzonych na pojedynczym eksplancie (tab. 1 i 2). Zastosowanie pożywki SH pozbawionej cytokinin i suplementowanej jedynie 4,92 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA spowodowało, że 100% primordiów pędowych *G. tinctoria* ulegało wydłużaniu, a w całej masie kultury otrzymano 64% pędów o długości większej niż 1 cm i morfologii charakterystycznej dla rośliny macierzystej (ryc. 2). Stworzyło to możliwość całkowitej rezygnacji z cytokinin (2iP i TDZ) na etapie elongacji i znacznie obniżyło koszty dwustopniowego procesu mikrorozmnażania badanych janowców.

„Mikroroślinki”, rozwinięte w dobrze wykształcone, długie pędy były w tym wypadku łatwe do oddzielenia od biomasy podstawowej i pozostałych krótkich struktur primordialnych (ryc. 2).



Ryc. 2. Wydłużanie kultur pędowych *G. tinctoria* na pożywce SH wzbogaconej $4,92 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA.
Fig. 2. *Genista tinctoria* shoot elongation on SH medium containing $4.92 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA.

Oszacowanie wydajności opracowanej metody mikrorozmnażania wydaje się dosyć trudne. Wynika to z faktu, że w pierwszym etapie procesu, obejmującego powstanie kultury „mikroroślinek”, trudno było policzyć rzeczywistą liczbę primordiów pędowych na pojedynczym fragmencie mikrokultury. Uwzględniając w obliczeniach jedynie drugi etap doświadczenia można powiedzieć, że w ciągu pół roku, z pojedynczego eksplantatu, możliwe było otrzymanie około 130 dobrze wykształconych pędów, gotowych do ukorzeniania. Liczba ta uległaby oczywiście zwielokrotnieniu biorąc pod uwagę, że na pożywce proliferacyjnej (I etap mikrorozmnażania), w optymalnych warunkach, z jednego eksplantatu otrzymywano około 30 primordiów pędowych, dłuższych niż 3 mm (możliwych do dokładnego policzenia) oraz znacznie mniejsze „mikroroślinki”.

Ukorzenianie i aklimatyzacja

Pędy poszczególnych gatunków rodzaju *Genista*, otrzymane w wyniku II-stopniowej procedury mikrorozmnażania (dłuższe niż 1 cm), przenoszono na świeże podłoże SH, wzbogacone wybranymi auksynami (IAA, IBA, NAA) lub pozbawione regulatorów wzrostu (tab.3). Stuprocentową ryzogenezę obserwowano już na pożywce bez dodatku auksyn (SH_0), ale otrzymane korzenie były długie, nitkowate i nie tworzyły korzeni bocznych.

IBA, regulator wzrostu często stosowany w procesie ukorzeniania roślin z rodziny *Fabaceae* [20] wraz ze wzrostem stężenia w pożywce zupełnie hamował ryzogenezę pędów *G. tinctoria* (tab. 3). Nielicznie powstające korzenie wydawały się być raczej efektem aktywności endogennych regulatorów wzrostu w biomasie niż rezultatem modyfikacji podłoża doświadczalnego.

Podobnie jak kwas indolilo-3-masłowy (IBA) również IAA wraz ze wzrostem stężenia w podłożu hamował ryzogenezę pędów badanych janowców (tab. 3). Ponadto już $2,85 \mu\text{mol l}^{-1}$ zawartość IAA w pożywce powodowała, że nielicznie powstającym korzeniom towarzyszyły

sferyczne, jasno-zielone struktury kalusowe. Zjawisko to było uprzednio szeroko opisywane m. in. przez Pitta-Alvares i wsp. i dotyczyło kultur korzeni transformowanych, rosnących w pożywce z dodatkiem auksyn, w warunkach oświetlenia dziennego [14]. Na pożywce z dodatkiem IAA obserwowano ponadto niską przeżywalność ukorzenionych pędów janowca barwierskiego (żółknięcie i gubienie liści).

Spośród wszystkich przetestowanych auksyn jedynie niewielka ilość ($2,68 \mu\text{mol l}^{-1}$) NAA (kwas naftylo-1-octowy) warunkowała, podobnie jak na pożywce bez regulatorów wzrostu, 100% ryzogenezę eksplantatów pędowych *G. tinctoria* (tab. 3). Powstałe korzenie miały jednak „lepszą” morfologię od utworzonych na podłożu SH₀. Były krótsze, bardziej zwarte, ze znaczną ilością korzeni bocznych, bez towarzyszącej tkanki przyrannej. Ponadto, co najistotniejsze, ilość powstających korzeni na jednym eksplantacie, była w tym wypadku, znacznie większa (około 13,2) niż w przypadku stosowania pożywki bez regulatorów wzrostu (9,5 - tab. 3). Z powyższych względów, ostatecznie do ukorzeniania pędów roślin z rodzaju *Genista* stosowano każdorazowo podłoże SH z dodatkiem $2,68 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA (ryc. 3).



Ryc. 3. Ukorzenianie pędów *G. tinctoria* na pożywce SH wzbogaconej $2,68 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA.

Fig. 3. Rhizogenesis of *G. tinctoria* shoots on SH medium supplemented with $2.68 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA.

Ukorzenione, jednomiesięczne pędy przenoszono następnie do wysterylizowanej mieszanki torfu z perlitem. W warunkach kontrolowanej wilgotności, temperatury i oświetlenia (Materiały i metody) obserwowano, w zależności od gatunku, około 70-80% przeżywalność inkubowanych roślinek. Po półrocznej hodowli w gruncie wszystkie rośliny, pod względem morfologicznym, były tożsame z gatunkami macierzystymi (ryc. 3).

Analiza fitochemiczna badanych biomas roślinnych w zakresie frakcji flawonoidowych

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono znaczne różnice, dotyczące akumulacji związków flawonoidowych, w ziele roślin macierzystych, częściach nadziemnych roślin zregenerowanych w wyniku mikrorozmnażania i w pędach namnożonych w warunkach *in vitro* (tab. 4). Spostrzeżenie to dotyczy wszystkich badanych gatunków. Części nadziemne zregenerowanych oraz macierzystych roślin gruntowych zawierały proste flawony, pochodne luteoliny i apigeniny oraz bogatą frakcję izoflawonoidową, zawierającą pochodne genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A. Różnice pomiędzy poszczególnymi gatunkami w zakresie produkcji flawonoidów, podobnie jak akumulację fitoestrogenów w kulturach kalusowych roślin z rodzaju *Genista* opisano szczegółowo w rozdziale 6. Stwierdzono, między innymi, że w wyniku hodowli *in vitro* biomas kalusowych wybranych janowców, otrzymano materiał roślinny różniący się znacznie od roślin gruntowych w zakresie produkcji bioflawonoidów. Podobną obserwację poczyniono w przypadku kultur „mikroroślinek” opisanych w niniejszym rozdziale. Niezależnie od badanego gatunku, we wszystkich pędach namnożonych *in vitro*, zaobserwowano zupełny zanik produkcji prostych flawonów charakterystycznych dla części nadziemnych roślin gruntowych. Rezultat ten jest więc identyczny do zaobserwowanego uprzednio w kulturach kalusowych janowców (tab. 4; rozdz. 6). Uzyskane wyniki wskazywały, że zanik produkcji prostych flawonów, w kalusach badanych gatunków, może być rezultatem zmian statusu morfologicznego biomas *in vitro* w stosunku do ziela roślin gruntowych (rozdz. 6). Z szeregu opracowań naukowych wiadomo, że poziom wtórnych metabolitów w roślinach zależy bezpośrednio od zróżnicowania morfologicznego tkanek. Tłumaczy się to faktem, że do biosyntezy połączeń wtórnych niezbędny jest odpowiedni układ przestrzenny enzymów i substratów bądź obecność wyspecjalizowanych organelli. Tkanki o dużym stopniu zróżnicowania zawierają właśnie takie specyficzne organelle bądź charakteryzują się większą agregacją komórek niż ma to miejsce w niezróżnicowanej biomasie kalusowej. Tym samym w wielu przypadkach zawierają metabolity często nieobecne w kalusie [4,13,16].

W opisywanym przypadku zarówno hodowle „mikroroślinek” (tab. 4) jak i biomas kalusowej janowców (rozdz. 6) przestały syntetyzować proste flawony, co świadczy, że proces ten jest bezpośrednio zależny od wprowadzenia roślin do kultur *in vitro*. Jednocześnie wszystkie hodowane w warunkach *in vitro* biomas produkowały znacznie więcej izoflawonów niż rośliny macierzyste. W obrębie związków izoflawonowych, glikozydy i aglikony akumulowane były w większych ilościach w kalusach roślin z rodzaju *Genista* (rozdz. 6) niż w kulturach pędowych (tab. 4). Przeciwnie, połączenia estrowe (malonylo- i acetylogenistyna) występowały w wyższych stężeniach w pędach. Można więc stwierdzić, że biosynteza tych związków jest bezpośrednio zależna od stopnia organogenezy namnażanych tkanek. O ile produkcja aglikonów i glikozydów isoflawonowych wydawała się być odwrotnie proporcjonalna do stopnia dyferencjacji badanych biomas, to w przypadku połączeń estrowych obserwowano zależność wprost proporcjonalną. W roślinach zregenerowanych zarówno flawony jak i izoflawony oznaczano na poziomach porównywalnych z roślinami macierzystymi (tab. 4). Świadczy to, że do biosyntezy flawonów, w gatunkach z rodzaju *Genista*, niezbędny jest status hormonalny właściwy dla roślin nienaruszonych, rosnących w gruncie. Hodowla samych pędów, bez systemu korzeniowego, hamowała akumulację omawianych związków. Z biotechnologicznego punktu widzenia jest to efekt bardzo korzystny, jako że pędy *in vitro*, podobnie jak uprzednio namnożone kalusy roślin z rodzaju *Genista*, stały się wybiórczym, bogatym źródłem izoflawonów o określonej aktywności fitoestrogennej [15]. Przykładowo, w pędach *G. tinctoria*, genistyna, będąca głównym składnikiem frakcji izoflawonoidowej,

występowała w ilości 3281,4 mg/100 g suchej masy, co stanowi prawie trzykrotną zawartość określoną dla tego związku w ziele rośliny gruntowej (1454,2 mg /100 suchej masy – tab. 4).

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych badań, opracowano efektywny sposób mikrorozmnażania roślin z rodzaju *Genista*. W przeciwieństwie do opisanego dla *G. monosperma* mikrorozmnażania na drodze somatycznej embriogenezy jest to metoda prosta, dostarczająca, dodatkowo w warunkach *in vitro*, materiału biologicznego bogatego w farmakologicznie aktywne fitoestrogeny. Zregenerowane rośliny nie różniły się morfologicznie od gatunków macierzystych, zachowując zbliżony profil biosyntezy związków flawonoidowych, co wskazuje na skuteczność przedstawionego powyżej sposobu mikrorozmnażania. Zważywszy na fakt, że badane wolno rosnące gatunki są, z uwagi na znaczną zawartość fitoestrogenów, cenne z medycznego punktu widzenia, opisywana metoda może być szerzej wykorzystana do produkcji biomasy będącej źródłem pochodnych genisteiny i daidzeiny z przeznaczeniem dla przemysłu farmaceutycznego.

Posłużenie się dwustopniowym systemem mikrorozmnażania z fragmentów pędów umożliwiło otrzymanie, na pierwszym etapie badań, bardzo dużej ilości struktur primordialnych, które następnie efektywnie wydłużano w drugiej fazie. Zastosowanie szeregu modyfikacji podłoża SH ze zmiennymi regulatorami wzrostu pozwoliło na określenie roli poszczególnych auksyn i cytokinin na różnych etapach mikrorozmnażania roślin z rodzaju *Genista*. W rezultacie, po raz pierwszy, ustalono pozytywny wpływ na indukcję pędów roślin z rodzaju *Genista* dwóch skojarzonych cytokinin: 2iP i TDZ. Być może przedstawiony protokół mikrorozmnażania okaże się efektywny również dla innych gatunków z rodziny *Fabaceae*.

Zgodnie z celem pracy otrzymanie pędów *in vitro* roślin z rodzaju *Genista* pozwoliło poznać rolę procesu morfogenezy w biosyntezie izoflawonów (aglikonów, glikozydów oraz estrów) w warunkach *in vitro*. Pędy *in vitro* janowców, podobnie jak wcześniej otrzymane biomasy kalusowe, mogą posłużyć jako układy modelowe do badań szlaków metabolicznych prowadzących do powstawania fitoestrogenów.

Tab. 3. Wpływ auksyn na ukorzenianie pędów *Genista tinctoria* w warunkach *in vitro*.

Tab. 3. Effect of auxins on *in vitro* rooting of *Genista tinctoria* shoots.

Rodzaj auksyny	Stężenie auksyny ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Ilość pędów tworzących korzenie (%)	Ilość korzeni w jednym eksplantacie
brak	-	100,0	$0,5 \pm 0,1$
NAA	5,37	87,0	$5,4 \pm 0,2$
	2,68	100,0	$13,2 \pm 0,9$
IBA	4,92	0,0	$0,0 \pm 0,01$
	2,46	5,0	$1,2 \pm 0,07$
IAA	5,70	0,0	$0,0 \pm 0,0$
	2,85	32,0	$1,7 \pm 0,1$

Kultury *in vitro* prowadzono na stacjonarnych, modyfikowanych podłożach SH przez okres 5 tygodni (natężenie oświetlenia - $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Wartości przedstawione w tabeli są średnimi arytmetycznymi wyników pochodzących z dziesięciu prób $\pm$ S.D.

The cultures were grown on various modified solid SH media for 5 weeks (light intensity $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temperature - $25 \pm 2^\circ\text{C}$). Each value represents the mean $\pm$ S.D. of ten samples.

Tab. 4. Analiza ilościowa flawonów i izoflawonów w ziele i kulturach pędowych szeregu gatunków z rodzaju *Genista* (stężenie flawonoidów w mg/100 g suchego materiału roślinnego).

Tab. 4. *Quantitative analysis of major flavones and isoflavones in herb and shoot cultures of several Genista species (flavonoid content in mg per 100 g DW plant material).*

Materiał roślinny		7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksy genisteiny	Daidzina	7-O-glukozyd apigeniny	7-O-glukozyd luteoliny	Genistyna	Malonylo genistyna	Acetylo genistyna	Daidze-ina	Sisotry-na	Geni-steina	Luteo-lina
<i>Genista tinctoria</i>	Roślina gruntowa	437,94±0,1	420,6±0,11	42,8±0,21	169,6±0,15	1097,0±0,1	1454,2±0,11	303,7±0,91	68,3±0,19	0,3±0,01	1,4±0,08	32,7±0,13	5,4±0,07
	Pędy <i>in vitro</i>	858,5±0,91	374,3±0,27	74,8±0,12	-	-	3281,4±0,9	528,2±0,72	114,0±0,25	3,17±0,19	-	61,8±0,24	-
	Roślina zregenerowana	397,2±0,24	417,3±0,19	38,2±0,42	154,8±0,21	997,0±0,19	1405,1±0,24	342,4±0,54	72,3±0,31	0,2±0,01	2,2±0,1	33,2±0,21	4,4±0,19
<i>Genista sagittalis</i>	Roślina gruntowa	528,7±0,18	21,7±0,17	47,3±0,29	13,1±0,05	52,5±0,05	1058,2±0,21	405,2±0,19	215,9±0,38	3,1±0,19	1,4±0,09	1633,6±0,1	-
	Pędy <i>in vitro</i>	1002,3±0,34	22,2±0,4	67,5±0,17	-	-	2372,3±0,7	498,3±0,3	274,1±0,24	4,8±0,15	2,3±0,12	153,2±0,15	-
	Roślina zregenerowana	514,2±0,2	23,6±0,14	48,2±0,36	5,9±0,09	47,6±0,13	1101,8±0,31	441,6±0,41	232,7±0,28	3,0±0,09	1,3±0,1	989,2±1,4	-
<i>Genista germanica</i>	Roślina gruntowa	102,5±0,11	198,2±0,08	10,4±0,25	488,1±0,12	571,2±0,19	217,8±0,09	533,1±0,2	315,7±0,32	1,1±0,1	1,4±0,07	711,7±0,44	-
	Pędy <i>in vitro</i>	217,6±0,24	47,3±0,14	31,2±0,15	-	-	2437,1±0,11	731,6±0,15	412,5±0,48	7,4±0,18	5,6±0,11	427,2±0,38	-
	Roślina zregenerowana	98,2±0,17	205,3±0,09	10,1±0,34	477,3±0,18	564,6±1,24	248,3±0,24	528,2±0,23	321,3±0,17	1,5±0,09	2,0±0,19	704,5±0,35	-
<i>Genista radiata</i>	Roślina gruntowa	278,0±0,08	458,5±0,09	41,9±0,28	34,9±0,19	46,5±0,15	1194,1±0,1	137,4±0,31	54,6±0,16	3,5±0,1	440,6±0,09	38,8±0,11	2,1±0,09
	Pędy <i>in vitro</i>	347,5±0,11	781,0±0,15	46,7±0,21	-	-	1298,1±0,1	498,6±0,21	77,2±0,24	5,8±0,14	41,3±0,11	94,7±0,21	-
	Roślina zregenerowana	242,3±0,19	432,3±0,16	39,6±0,19	35,2±0,14	48,2±0,20	1104,5±0,19	202,7±0,34	49,7±0,13	3,1±0,11	351,5±0,2	30,5±0,22	1,8±0,4
<i>Genista aethnensis</i>	Roślina gruntowa	64,2±0,12	123,3±0,24	11,2±0,09	-	6,1±0,08	845,2±0,19	42,7±0,01	1,2±0,09	2,1±0,04	0,5±0,07	3,2±0,09	-
	Pędy <i>in vitro</i>	153,8±0,21	75,4±0,18	27,8±0,14	-	-	1234,4±0,21	170,7±0,11	2,7±0,08	5,3±0,03	-	34,0±0,2	-
	Roślina zregenerowana	71,2±0,18	119,2±0,11	12,0±0,13	-	2,9±0,07	838,8±0,24	58,3±0,09	1,8±0,1	2,2±0,07	0,1±0,01	4,5±0,18	-
<i>Genista monosperma</i>	Roślina gruntowa	13,1±0,01	96,6±0,22	27,8±0,13	14,1±0,17	-	74,6±0,16	28,1±0,14	6,8±0,25	3,1±0,09	-	0,9±0,04	-
	Pędy <i>in vitro</i>	21,4±0,09	87,6±0,15	41,3±0,20	-	-	834,4±0,24	75,9±0,22	17,4±0,19	11,2±1,1	-	7,8±0,09	-
	Roślina zregenerowana	14,4±0,02	92,2±0,21	25,5±0,15	10,2±0,09	-	453,5±0,18	27,3±0,19	7,0±0,11	4,0±0,08	-	1,2±0,01	-

Wartości przedstawione w tabeli są średnimi arytmetycznymi wyników uzyskanych z pięciu prób $\pm$ S.D./ Each value represents the mean $\pm$ S.D. of five samples.

Piśmiennictwo

1. Bach A., Rozmnażanie wegetatywne, w: Malepszy S. (Ed.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 261-305.
2. Barz W., Mackenbrock U., Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpanes in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 199-211.
3. Bocquet G., Wilder B., Kiefer H., The Messinian Model – a new outlook for the floristics and systematics of the Mediterranean area, *Candollea* 33 (1978) 269-287.
4. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant. Sci.* 161 (2001) 839-851.
5. Cronquist A., *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia Univ. Press, New York, 1981, str. 457-592.
6. Curir P., Ruffoni B., Massabó F., Damiano C., Induction of somatic embryogenesis in *Genista monosperma* Lam., *Acta Hort.* 280 (1990) 113-116.
7. de Castro O., Cozzolino S., Jury S.L., Caputo P., Molecular relationships in *Genista* L. Sect. *Spartocarpus* Spach (Fabaceae), *Plant Syst. Evol.* 231 (2002) 91-108.
8. Eapen S., Tivarekar S., George L., Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeon-pea (*Cajanus cajan* L.), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53 (1998) 217-220.
9. Frische S., Steinhart H., Occurrence of hormonally active compounds in food: a review, *Eur. Food Res. Technol.* 209 (1999) 153-179.
10. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Gryniewicz G., Bączek T., Kaliszan R., Isoflavonoids of estrogenic activity in tissue cultures of *Glycine max.* L. and *Genista tinctoria* L., European Scientific Conference on bioactive compounds in plant foods. Health Effect and Perspectives for the Food Industry 26 – 28th April, Tenerife, Congress Book of Abstracts, vol. 177, 2001.
11. Łuczkiwicz M., Piotrowski A., Two-Stage System for Micropropagation of Several *Genista* Plants Producing Large Amounts of Phytoestrogens, *Z. Naturforsch.* 60c (2005) 557-566.
12. Marcotrigiano M., Mc Glew S.P., Hackett G., Chawla B., Shoot regeneration from tissue cultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36(1996) 21-26.
13. Oksman-Caldentey K.M., Inzé D., Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites, *Trends Plant Sci.* 9 (9) (2004) 433-440.
14. Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M., Advances and limitation in the use of hairy root cultures for the production of tropane alkaloids: use of anti-auxins in the maintenance of normal root morphology, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31 (1995) 215-220.
15. Qiang Ren M., Kuhn G., Wegner J., Chen J., Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties, *Eur. J. Nutr.* 40 (2001) 135-146.
16. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 101-153.
17. Ruffoni B., Rabaglio M., Semeria L., Allavena A., Improvement of micropropagation of *Genista monosperma* Lam. by abscisic acid treatment, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57 (1999) 223-225.

18. Schenk R.U., Hildebrandt A.C., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.* 50 (1972) 199-204.
19. Szafer W., Pawłowski B., *Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych*, PWN, Warszawa, 1959.
20. Thiem B., *In vitro* propagation of isoflavone-producing *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi., *Plant Sci.* 165 (2003) 1123-1128.
21. Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., (1964), *Flora Europaea*, Univ. Press, Cambridge, 1964.
22. van Rensen I., Veit M., van Rensen U.R., Cantó P., Vogt H., Greinwald R., Czygan F.C., Linescatter plots in Chemotaxonomy of *Genista* L. section *Spartenoides* SPACH in Western Europe, *Biochem. Syst. Ecol.* 27 (1993) 687-708.
23. Wysokińska H., Micropropagation of *Penstemon serrulatus* and iridoid formation in regenerated plants, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33 (1993) 181-186.
24. Zimmerman R.H., Broome O.C., Bluberry micropropagation. *Proc. Conf. Nursery*, w: R.H. Zimmerman (Ed.), *Production of Fruit Plants Through Tissue Culture-Application and Feasibility*, Kluwer Academic Publishers, Bersville, 1980, str. 44- 47.

8. WPŁYW REGULATORÓW WZROSTU NA AKUMULACJĘ IZOFLAWONÓW W KULTURACH KALUSOWYCH *GENISTA TINCTORIA*

Wstęp

Badania doświadczalne z zakresu inicjalnych kultur kalusowych, wybranych 6 gatunków z rodzaju *Genista* wykazały, że wszystkie otrzymane biomasy zdolne są do akumulacji wysokich stężeń związków izoflawonoidowych, znacznie przewyższając w tym względzie rośliny macierzyste (rozdz. 6). Jednocześnie blokada, w kalusach janowców, biosyntezy prostych flawonów (rozdz. 6) oraz toksycznych alkaloidów chinolizydynowych (rozdz. 14) czyni z omawianych kultur doskonały materiał wyjściowy do otrzymania, w hodowlach *in vitro*, roślinnych systemów, z przeznaczeniem do produkcji znacznych ilości fitoestrogenów pochodzenia izoflawonoidowego. W obrębie kultur kalusowych roślin z rodzaju *Genista*, biomasy janowca barwierskiego charakteryzowały się najwyższą zawartością izoflawonów (6586,5 mg/100 g suchej masy), przewyższając nawet 6-krotnie stężenia omawianych metabolitów w kalusach pozostałych gatunków (rozdz. 6). Z tego względu oraz z uwagi na fakt, że kalusy *G. tinctoria* wyróżniały się znaczną juwenilnością oraz intensywnym przyrostem (ryc.1 – rozdz. 6) postanowiono dalsze doświadczenia nad akumulacją izoflawonów w kulturach *in vitro* zawęzić właśnie do powyższego gatunku.

Jak już wspomniano, opisane w rozdziale 6 doświadczenia miały charakter wstępny, a ich celem było określenie potencjału kultur *in vitro* janowców do produkcji połączeń izoflawonoidowych. Właściwe eksperymenty biotechnologiczne zmierzające do opracowania wysoko wydajnych hodowli roślinnych, zdolnych do produkcji znacznych stężeń fitoestrogenów w warunkach *in vitro*, postanowiono przeprowadzić w oparciu o kultury wytrząsane, w tym również zawiesiny rozproszonych komórek. Jak wynika z danych literaturowych, płynne kultury zawiesinowe, w przeciwieństwie do hodowli stacjonarnych kalusów, charakteryzują się większą stabilnością genetyczną (niższy procent zmienności somaklonalnej) [7,38,41,42]. Ponadto umożliwiają one pełną kontrolę eksperymentów biotechnologicznych tak na poziomie wzrostu biomas jak i również w zakresie akumulacji wtórnych metabolitów [1,7,13,20,27,38,41,42,54].

Eksperymenty opisywane w niniejszym rozdziale obejmowały przygotowanie biomas kalusowych janowca barwierskiego oraz pożywek hodowlanych do doświadczeń na poziomie kultur zawiesinowych.

Kalusy *G. tinctoria* otrzymane na etapie inicjalnym charakteryzowały się zwartą, „kalafiorowatą” strukturą (rozdz. 6), trudną do zdyspergowania w pożywce płynnej [7]. Optymalne *inoculum* hodowlane, stanowiące puszystą biomasę kalusową, złożoną z agregatów luźno połączonych komórek parenchymatycznych [7,27,42] postanowiono uzyskać poprzez modyfikację pożywki wzrostowej w zakresie regulatorów wzrostu [2,7,20,24,27,45,47,50,52]. Jednocześnie omawiany etap doświadczeń miał doprowadzić do optymalizacji podłoża hodowlanego, warunkującego maksymalny przyrost badanej biomasy wraz ze znaczną akumulacją połączeń izoflawonoidowych.

Z danych literaturowych wynika, że rodzaj oraz stężenie regulatorów wzrostu wpływają istotnie na przyrost, strukturę oraz ewentualną redyferencjacje biomas roślinnych w hodowlach

in vitro [7,27,47]. Stwierdzono ponadto, że poszczególne auksyny oraz cytokininy mogą w znacznym stopniu regulować biosyntezę wtórnych metabolitów w kulturach tkankowych [7-10,13,14,16-18,20,21,25-27,30,32,33,35-37,39,43,45,52,53,55]. Ogólnie ujmując, zagadnienie wpływu regulatorów wzrostu na wtórny metabolizm tkankowy jest stosunkowo słabo poznane [43]. Z doświadczeń dotyczących akumulacji substancji biologicznie aktywnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych wynika, że fitohormony mogą stwarzać korzystne, dla produkcji i magazynowania metabolitów wtórnych, warunki histologiczne (wpływ na organogenezę) oraz cytologiczne (zwiększenie zdolności akumulacyjnych wakuoli) [2,9,10,17,18,21,24,33,35,36,45,47,52,53,55]. Ponadto są one odpowiedzialne za blokowanie enzymów bądź ich kompleksów, biorących udział w powstawaniu szeregu związków o charakterze prekursorów bądź metabolitów końcowych (antocyjany oraz flawonoidy) [8,14,20,25,26,30,43].

Badania odnośnie wpływu auksyn oraz cytokinin na biosyntezę izoflawonów są stosunkowo fragmentaryczne. Tylko nieliczne prace, dotyczące hodowli *in vitro* roślin z rodziny *Fabaceae*, poświęcone są roli fitohormonów w procesie akumulacji połączeń izoflawonoidowych [4,6,11,12,15,19]. Omawiane badania wskazują jednak, że zarówno cytokininy, jak i auksyny mogą w sposób istotny regulować produkcję izoflawonów w warunkach *in vitro* oraz wpływać na przyrost i strukturę namnażanych roślin motylkowych [12,15,19].

Z uwagi na powyższe, optymalizację warunków hodowlanych, umożliwiających otrzymanie biomas *G. tinctoria* o puszystej strukturze i znacznym potencjale do produkcji izoflawonów, postanowiono przeprowadzić właśnie w oparciu o modyfikację podstawowego podłoża wzrostowego (pożywka Schenk-Hildebrandt'a) w zakresie regulatorów wzrostu z klasy auksyn oraz cytokinin. W prezentowanych doświadczeniach przetestowano 17 różnych fitohormonów, stosowanych w kulturach *in vitro* roślin wyższych [2,7,20,30,41]. Wszystkie regulatory wzrostu dodawano do pożywek w dwóch skrajnych stężeniach ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$ i $5,0 \text{ mg l}^{-1}$). Stosowana procedura doświadczalna umożliwiła ustalenie wpływu rodzaju oraz stężenia fitohormonów na wzrost kalusów *G. tinctoria* oraz produkcję izoflawonów w namnażanych biomasach. Szereg spośród analizowanych cytokinin oraz auksyn przetestowano, po raz pierwszy, pod kątem ewentualnego wpływu na akumulację określonych wtórnych metabolitów, w kulturach *in vitro* roślin wyższych.

Materiały i metody

Materiał roślinny

Eksperymenty mające na celu przygotowanie biomas *G. tinctoria* do doświadczeń w warunkach hodowli zawieszinowych prowadzono w oparciu o juwenilne kultury kalusowe janowca barwierskiego, namnażane na stacjonarnej pożywce Schenk-Hildebrandt'a (SH) [44], zawierającej $22,6 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), $23,2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny oraz 3% (w/v) sacharozy (rozdz. 6).

Podłoża doświadczane oraz warunki hodowlane stosowane do prowadzenia kultur kalusowych *G. tinctoria*

Wpływ cytokinin na akumulację izoflawonów w kalusach janowca barwierskiego oraz przyrost biomas badanego gatunku określano wprowadzając, do podstawowego podłoża SH, zawierającego 2,4-D ($0,5$ lub $5,0 \text{ mg l}^{-1}$), kolejno: zeatynę (**ZEA**), kinetynę (**KIN**), 6-benzylaminopurynę (**BAP**), 6- $\{\gamma\text{-}\gamma\text{-dimetyloallilo}\}$ -aminopurynę (**2iP**), N-(2-chloro-4-pirydylo)-N'-fenylocznik (**4-CPPU**), 1,3-difluoromocznik (**1,3-DFM**) oraz 1-fenyl-3-(1,2,3-tiazolo-5-yl)mocznik /tidiazuron/ (**TDZ**). Wymienione cytokininy dodawano do podstawowej

pożywki SH w dwóch skrajnych stężeniach, wynoszących 0,5 lub 5,0 mg l⁻¹. W opisywanej serii doświadczeń próby kontrolne stanowiły biomasy *G. tinctoria* namnażane na pożywce SH, zawierającej jedynie 0,5 bądź 5,0 mg l⁻¹ 2,4-D (odpowiednio dla modyfikacji z 5,0 lub 0,5 mg l⁻¹ dodatkiem cytokininy – tab. 1 - 4).

W celu określenia wpływu auksyn na akumulację izoflawonów w kalusach janowca barwierskiego oraz na przyrost badanych biomas, podstawowe podłoże hodowlane SH, zawierające kinetynę (0,5 lub 5,0 mg l⁻¹) suplementowano stosując wymiennie następujące regulatory wzrostu: kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (**2,4-D**), kwas naftylo-1-octowy (**NAA**), kwas indolilo-3-masłowy (**IBA**), kwas indolilo-3-propionowy (**IPA**), kwas indolilo-3-octowy (**IAA**), kwas p-chlorofenoksyoctowy (**4-CPA**), pikloram (**PICL**), kwas β-naftoksyoctowy (**β-NOA**), kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (**2,4,5-T**) oraz kwas 2,3,5-trijodobenzoesowy (**TIBA**). Powyższe auksyny, podobnie jak w przypadku doświadczeń ze zmiennymi cytokininami, dodawano do podstawowej pożywki SH w dwóch skrajnych stężeniach, wynoszących 0,5 lub 5,0 mg l⁻¹. Próbę kontrolną dla serii biomas namnażanych na pożywkach z 5,0 mg l⁻¹ dodatkiem wybranej auksyny stanowiło podłoże SH, zawierające jedynie 0,5 mg l⁻¹ kinetyny.

Podobnie, w przypadku kalusów kultywowanych na pożywkach suplementowanych 0,5 mg l⁻¹ zmiennej auksyny, kontrolą było podłoże SH z dodatkiem 5,0 mg l⁻¹ kinetyny (tab. 1 - 4).

Wszystkie 38 modyfikacji hodowlanych otrzymano na bazie podłoża SH [44], zawierających 3% (w/v) sacharozy i zestalonych agarem (0,7% w/v). Regulatory wzrostu o charakterze substancji termolabilnych (IAA, TIBA, ZEA, 2iP, 4-CPPU, 1,3-DFM i TDZ) [2,40] dodawano, do wcześniej wyjałowionych w autoklawie pożywek, metodą jałowego sączenia (filtry Schleicher & Schuell, FP 3070, 2 CA-S, 0,2 μm). Pozostałe fitohormony sterylizowano w autoklawie, po uprzednim rozpuszczeniu w podłożach eksperymentalnych [2,40].

W celu otrzymanie szybkorosnących kultur kalusowych, akumulujących wysokie stężenia izoflawonów, każdorazowo, około 300 mg świeżych biomas inicjalnych przenoszono aseptycznie do słoiczków hodowlanych, zawierających około 25 ml pożywki eksperymentalnej. Kultury kalusowe prowadzono w pojemnikach szklanych z przezroczystą polipropylenową nakrętką (*baby food jars* – „Sigma”), w fitotronie, w warunkach oświetlenia ciągłego o natężeniu $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lampy jarzeniowe Philips TLD 35W x 3), w temp. $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, przez okres 4 tygodni.

Przyrost kalusów *G. tinctoria*, kultywowanych na poszczególnych podłożach hodowlanych, kontrolowano po 4-tygodniowym okresie wzrostu, przez oznaczenie współczynnika przyrostu badanego materiału biologicznego (W_p), według wzoru podanego przez Kleina [49]. Obliczone wskaźniki przyrostu są średnimi arytmetycznymi, uzyskanymi z pomiarów pochodzących z piętnastu pojemników hodowlanych, zawierających biomasy kultywowane na pożywkach SH, modyfikowanych regulatorami wzrostu.

Zebrane biomasy kalusowe janowca barwierskiego suszono przez 48 h, do stałej masy, na drodze liofilizacji (próżnia 1×10^{-3} mbar wytworzona przez liofilizator LYOVAC GT2 firmy FIN-AQUA SANTASALO-SOHLBERG Co – Finlandia). Wysuszone surowce roślinne przeznaczono do badań chromatograficznych na zawartość izoflawonów.

Jakościową oraz ilościową analizę frakcji izoflawonoidowych, występujących w kalusach *G. tinctoria* przeprowadzono techniką HPLC, według procedury opisanej szczegółowo w rozdziale 6. Uzyskane stężenia poszczególnych izoflawonów są średnimi arytmetycznymi, pochodzącymi z analiz piętnastu próbek biomas kalusowych, namnożonych na poszczególnych pożywkach, modyfikowanych regulatorami wzrostu z klasy auksyn i cytokinin (tab. 1-4, ryc. 1-21).

Tab. 1. Wpływ określonych auksyn dodanych w ilości 5,0 mg l⁻¹ na biosyntezę izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.*

Tab. 1. The effect of the various auxins added in the amount of 5.0 mg l⁻¹ on the biosynthesis of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.*

	genisteina	genistyna	7-0-diglukozyd genisteiny	7-0-glukozyd 2'-hydroksy- genisteiny	daidzeina	daidzina	malonylo- genistyna	acetylo- genistyna	suma izoflawonów
2,4-D	147,51 ± 6,56	3018,09 ± 196,42	1523,63 ± 86,25	1468,49 ± 83,61	8,1 ± 0,5	114,01 ± 7,6	153,54 ± 8,78	2,9 ± 0,21	6436,26 ± 389,35
NAA	96,57 ± 5,43	1576,1 ± 103,04	984,51 ± 51,54	438,29 ± 24,38	7,11 ± 0,41	110,01 ± 11,36	19,56 ± 5,7	14,31 ± 0,61	3246,44 ± 201,65
IBA	80,53 ± 4,46	1551,61 ± 73,62	780,31 ± 45,27	209,07 ± 13,84	14,47 ± 0,76	82,42 ± 4,85	19,61 ± 0,92	30,39 ± 1,89	2768,42 ± 143,71
IPA	54,41 ± 2,21	309,49 ± 19,61	155,71 ± 11,45	61,46 ± 3,24	5,77 ± 0,36	7,5 ± 0,6	21,56 ± 1,62	6,07 ± 0,33	621,97 ± 39,22
IAA	48,33 ± 7,26	1423,75 ± 61,92	670,43 ± 38,1	282,01 ± 15,42	10,03 ± 0,54	121,89 ± 7,53	29,47 ± 1,22	23,09 ± 1,58	2608,99 ± 132,62
4-CPA	59,11 ± 2,89	622,44 ± 44,52	95,06 ± 4,71	65,08 ± 1,86	6,92 ± 0,35	34,19 ± 1,95	14,24 ± 1,11	16,26 ± 0,51	913,29 ± 57,53
PICL	14,53 ± 1,32	620,51 ± 38,03	156,51 ± 10,89	47,89 ± 3,3	3,55 ± 0,27	34,39 ± 1,26	19,4 ± 1,18	4,34 ± 0,44	901,12 ± 56,26
β-NOA	29,28 ± 1,51	1294,6 ± 69,82	615,7 ± 35,22	178,15 ± 8,85	4,28 ± 0,16	102,69 ± 4,67	49,63 ± 2,55	24,44 ± 1,06	2298,77 ± 123,12
2,4,5-T	21,33 ± 0,84	1066,29 ± 50,7	190,36 ± 12,42	62,48 ± 3,97	1,87 ± 0	24,74 ± 1,49	37,11 ± 1,32	9,66 ± 0,42	1413,84 ± 70,25
TIBA	75,57 ± 4,44	1256,81 ± 75,47	786,94 ± 43,7	355,71 ± 23,15	14,7 ± 0,85	167,72 ± 9,68	63,59 ± 4,13	62,03 ± 4,05	2783,08 ± 164,85
0	18,72 ± 0,73	721,91 ± 32,32	503,07 ± 30,57	171,05 ± 9,17	1,86 ± 0,06	31,25 ± 1,6	24,66 ± 1,44	13,53 ± 0,7	1486,05 ± 76,03

*Wszystkie hodowle prowadzono na modyfikowanych stacjonarnych podłożach SH z dodatkiem 0,5 mg l⁻¹ kinetyny. Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi, pochodzącymi z 15 pomiarów ± S. D./ All cultures used modified stationary SH media supplemented with 0.5 mg l⁻¹ kinetin. The respective values are arithmetic averages for 15 measurements ± S. D.

Tab. 2. Wpływ określonych auksyn dodanych w ilości 0,5 mg l⁻¹ na biosyntezę izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.*

Tab. 2. The effect of the various auxins added in the amount of 0.5 mg l⁻¹ on the biosynthesis of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.*

	genisteina	genistyna	7-0-diglukozyd genisteiny	7-0-glukozyd 2'-hydroksy- genisteiny	daidzeina	daidzina	malonylo- genistyna	acetylo- genistyna	suma izoflawonów
2,4-D	141,2 ± 9,27	542,24 ± 29,7	355,98 ± 18,74	56,47 ± 2,74	11,21 ± 0,52	21,27 ± 1,01	51,35 ± 2,84	11,41 ± 0,61	1191,13 ± 65,09
NAA	105,32 ± 6,81	476,86 ± 26,52	281,48 ± 13,68	43,19 ± 2,35	9,19 ± 0,54	17,23 ± 0,89	23,87 ± 1,4	10,22 ± 0,66	967,36 ± 65,24
IBA	83,68 ± 5,6	367,09 ± 20,6	145,62 ± 7,43	71,46 ± 4,56	6,2 ± 0,26	17,41 ± 0,81	22,05 ± 1,11	17,09 ± 0,76	739,61 ± 40,98
IPA	157,44 ± 7,73	357,44 ± 20,75	222,49 ± 9,81	71,09 ± 3,27	7,0 ± 0,4	12,4 ± 0,74	67,71 ± 3,66	17,54 ± 0,6	913,09 ± 46,72
IAA	105,96 ± 6,27	497,0 ± 24,58	359,17 ± 18,44	54,22 ± 2,61	7,01 ± 0,35	9,52 ± 0,61	26,35 ± 1,42	0,24 ± 0,04	1059,46 ± 53,88
4-CPA	34,68 ± 1,99	363,07 ± 22,47	82,7 ± 3,66	47,02 ± 3,16	3,26 ± 0,16	20,41 ± 1,3	11,37 ± 1,38	11,48 ± 1,75	573,97 ± 24,44
PICL	13,26 ± 1,17	289,34 ± 11,64	146,36 ± 6,2	38,53 ± 1,84	2,77 ± 0,12	11,12 ± 0,41	18,0 ± 1,06	9,15 ± 0,9	528,53 ± 17,93
β-NOA	18,1 ± 1,07	945,36 ± 58,6	596,1 ± 28,57	66,64 ± 3,51	1,71 ± 0,13	28,53 ± 1,55	39,08 ± 2,06	7,02 ± 0,39	1702,53 ± 95,74
2,4,5-T	15,56 ± 1,09	271,91 ± 16,67	161,18 ± 9,27	21,31 ± 0,93	1,34 ± 0,06	18,41 ± 0,75	5,53 ± 0,17	4,65 ± 0,15	499,91 ± 28,8
TIBA	265,49 ± 18,24	5528,69 ± 304,48	2441,65 ± 95,94	1569,54 ± 98,11	61,17 ± 3,81	551,21 ± 39,17	42,25 ± 2,51	14,23 ± 1,04	10474,23 ± 561,24
0	150,5 ± 7,19	613,84 ± 25,99	479,89 ± 23,02	77,76 ± 3,2	12,53 ± 0,72	49,48 ± 2,05	53,1 ± 3,0	15,58 ± 1,59	1452,68 ± 66,37

* Wszystkie hodowle prowadzono na modyfikowanych stacjonarnych podłożach SH z dodatkiem 5,0 mg l⁻¹ kinetyny. Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi, pochodzącymi z 15 pomiarów ± S.D./ All cultures used modified stationary SH media supplemented with 5.0 mg l⁻¹ kinetin. The respective values are arithmetic averages for 15 measurements ± S.D.

Tab. 3. Wpływ określonych cytokinin dodanych w ilości 5,0 mg l⁻¹ na biosyntezę izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.*

Tab. 3. The effect of the various cytokinins added in the amount of 5.0 mg l⁻¹ on the biosynthesis of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.*

	genisteina	genistyna	7-0-diglukozyd genisteiny	7-0-glukozyd 2'-hydroksy- genisteiny	daidzeina	daidzina	malonylo- genistyna	acetylo- genistyna	suma izoflawonów
KIN	141,2 ± 9,27	542,24 ± 29,7	355,98 ± 18,74	56,47 ± 2,74	11,21 ± 0,52	21,27 ± 1,01	51,35 ± 2,84	11,41 ± 0,61	1191,13 ± 65,09
ZEA	58,54 ± 2,36	536,65 ± 32,84	195,01 ± 12,35	21,62 ± 0,87	9,03 ± 0,52	2,15 ± 0,07	22,66 ± 1,01	9,71 ± 0,56	855,37 ± 50,4
BAP	201,3 ± 12,08	1170,12 ± 74,82	547,38 ± 30,25	64,52 ± 3,2	26,67 ± 1,35	55,14 ± 8,53	37,48 ± 2	19,4 ± 0,77	2122,01 ± 132,58
2iP	116,01 ± 6,85	607,39 ± 39,53	405,81 ± 22,61	44,82 ± 2,3	14,29 ± 0,72	17,97 ± 1,09	29,84 ± 1,52	9,21 ± 0,45	1245,35 ± 74,89
4-CPPU	120,92 ± 7,89	509,11 ± 34,87	374,58 ± 24,22	94,55 ± 4,85	15,91 ± 1,15	19,24 ± 1,35	18,56 ± 1,18	10,93 ± 0,58	1163,81 ± 75,64
1,3-DFM	40,15 ± 2,2	342,53 ± 22,1	34,7 ± 2,22	21,67 ± 1,24	4,81 ± 0,31	8,91 ± 0,51	14,43 ± 0,6	6,21 ± 0,32	473,41 ± 29,4
TDZ	119,09 ± 7,84	965,72 ± 60,44	661,21 ± 37,18	50,09 ± 2,89	21,13 ± 1,16	16,59 ± 0,91	31,4 ± 1,72	14,0 ± 0,76	1879,23 ± 112,56
0	110,89 ± 7,05	540,29 ± 29,59	308,6 ± 19,64	40,37 ± 2,45	6,9 ± 0,35	16,25 ± 1,07	36,63 ± 2,17	16,93 ± 0,86	1076,85 ± 62,65

* Wszystkie hodowle prowadzono na modyfikowanych stacjonarnych podłożach SH z dodatkiem 0,5 mg l⁻¹ 2,4-D. Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi, pochodzącymi z 15 pomiarów ± S. D.

* All cultures used modified stationary SH media supplemented with 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D. The respective values are arithmetic averages for 15 measurements ± S.D.*

Tab. 4. Wpływ określonych cytokinin dodanych w ilości 0,5 mg l⁻¹ na biosyntezę izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.*

Tab. 4. The effect of the various cytokinins added in the amount of 5.0 mg l⁻¹ on the biosynthesis of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.*

	genisteina	genistyna	7-0-diglukozyd genisteiny	7-0-glukozyd 2'-hydroksy- genisteiny	daidzeina	daidzina	malonylo- genistyna	acetylo- genistyna	suma izoflawonów
KIN	147,51 ± 6,56	3018,09 ± 196,42	1523,63 ± 86,25	1468,49 ± 83,61	8,1 ± 0,5	114,01 ± 7,6	153,54 ± 8,78	2,9 ± 0,21	6436,26 ± 389,35
ZEA	7,3 ± 0,38	752,37 ± 34,14	250,78 ± 13,31	30,06 ± 1,54	0,32 ± 0,02	3,58 ± 0,21	29,24 ± 2	5,22 ± 0,3	1078,87 ± 51,77
BAP	93,9 ± 4,57	2155,96 ± 123,06	613,19 ± 38,47	155,19 ± 8,79	9,15 ± 0,67	180,72 ± 12,21	54,61 ± 2,58	20,3 ± 1,27	3283,02 ± 190,5
2iP	51,67 ± 2,91	1162,36 ± 71,66	638,31 ± 41,92	103,87 ± 7,61	10,13 ± 0,49	114,51 ± 6,56	21,37 ± 1,18	8,82 ± 0,4	2111,05 ± 132,33
4-CPPU	34,01 ± 2,08	2733,44 ± 127,25	859,57 ± 52,95	130,92 ± 7,18	11,17 ± 0,75	429,71 ± 27,6	29,87 ± 1,8	9,9 ± 0,62	4238,59 ± 219,78
1,3-DFM	16,01 ± 0,99	416,3 ± 27,12	254,35 ± 14,89	34,11 ± 1,56	1,65 ± 0,07	48,93 ± 2,51	16,63 ± 1,16	4,21 ± 0,27	792,18 ± 48,49
TDZ	65,32 ± 3,52	2243,51 ± 120,7	718,11 ± 43,04	133,95 ± 7,6	11,71 ± 0,48	365,16 ± 20,36	23,95 ± 1,59	12,63 ± 0,95	3574,34 ± 197,68
0	97,51 ± 5,02	986,55 ± 57,16	547,39 ± 38,42	58,43 ± 3,02	8,61 ± 0,41	55,17 ± 3,26	20,69 ± 0,75	9,1 ± 0,48	1783,46 ± 108,23

* Wszystkie hodowle prowadzono na modyfikowanych stacjonarnych podłożach SH z dodatkiem 5,0 mg l⁻¹ 2,4-D. Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi, pochodzącymi z 15 pomiarów ± S. D.

* All cultures used modified stationary SH media supplemented with 5.0 mg l⁻¹ 2,4-D. The respective values are arithmetic averages for 15 measurements ± S. D.*

Metodyka badań statystycznych

Celem analizy statystycznej była ilościowa ocena wpływu regulatorów wzrostu z klasy auksyn i cytokinin na akumulację izoflawonów w kalusach *G. tinctoria* oraz na przyrost badanych biomas. Powyższe badania przeprowadzono z zastosowaniem analizy dynamiki [34], poprzez wprowadzenie indeksów dynamiki, zdefiniowanych w sposób następujący: niech x_0 oznacza średnią z serii pomiarów wartości stężenia badanego izoflawonu w doświadczeniu kontrolnym, a x_n – średnią wartość tego samego parametru w kolejnych doświadczeniach. Wielkość $i = x_n / x_0$ określono jako indeks dynamiki o następujących własnościach:

1. jest liczbą niemianowaną;
2. jest liczbą nieujemną ($i \geq 1$);
3. jest równy 1, gdy wartości analizowanych parametrów są w obu przypadkach jednako-
we ($x_n = x_0$);
4. jest większy od jedności ($i > 1$), gdy wartość parametru w doświadczeniu n - tym jest
większa niż w doświadczeniu kontrolnym;
5. jest mniejszy od jedności ($i < 1$) gdy wartość parametru w doświadczeniu n - tym jest
mniejsza niż w doświadczeniu kontrolnym.

Tak zdefiniowany wskaźnik pozwala na przeprowadzenie porównania pomiędzy kolejnymi doświadczeniami, a więc na określenie, jaki wpływ na akumulację izoflawonów mają poszczególne modyfikacje pożywek hodowlanych w zakresie regulatorów wzrostu. Założono przy tym, iż wartość wskaźnika $i = 1 \pm 0,05$ oznacza brak zmiany stężenia poszczególnych metabolitów wtórnych, wartość $i < 0,95$ wskazuje na działanie hamujące danej modyfikacji doświadczalnej, a wartość $i > 1,05$ – działanie stymulujące. Przyjęcie przedziału $(-0,5 \div 0,5)$ faktycznie wiąże się założeniem 5 % poziomu istotności w porównywaniu wyników poszczególnych doświadczeń. Wyniki analiz statystycznych, dotyczących wpływu fitohormonów na produkcję izoflawonów w kalusach *G. tinctoria* podano w tabelach 5 - 8. Według opisanej powyżej metody analizy dynamiki i przy identycznych założeniach [34] określono wpływ regulatorów wzrostu na przyrost (wartość współczynnika przyrostu W_p) kalusów janowca barwierskiego (tab. 9-12).

Kolejnym krokiem analizy statystycznej było wyznaczenie współczynników korelacji liniowej pomiędzy stężeniami analizowanych wtórnych metabolitów w biomasach, a współczynnikami wzrostu (W_p) poszczególnych kalusów *G. tinctoria*, namnażanych na pożywkach modyfikowanych regulatorami wzrostu (porównanie wyników doświadczeń przedstawionych w tabelach: 5 i 9, 6 i 10, 7 i 12 oraz 8 i 11). Powyższa analiza pozwoliła na ustalenie ewentualnych zależności między przyrostem kalusów janowca barwierskiego a stężeniem izoflawonów, oznaczonym w kulturach hodowanych na podłożach ze zmiennym dodatkiem fitohormonów (tab. 13 i 14). W prezentowanych doświadczeniach przyjęto skalę, zwykle stosowaną w analizach statystycznych [48]:

$r_{xy} = 0$	zmienne nie są skorelowane
$0 < r_{xy} < 0,1$	korelacja nikła
$0,1 < r_{xy} < 0,3$	korelacja słaba
$0,3 < r_{xy} < 0,5$	korelacja przeciętna
$0,5 < r_{xy} < 0,7$	korelacja wysoka
$0,7 < r_{xy} < 0,9$	korelacja bardzo wysoka
$0,9 < r_{xy} < 1$	korelacja prawie pełna

Wyznaczone dodatnie współczynniki korelacji liniowej wskazują na istnienie (lub nie) zależności pomiędzy dwoma badanymi parametrami. Tak samo dla współczynników ujemnych, uzyskane wartości oznaczają korelację odwrotną, czyli zwiększanie się jednego powoduje zmniejszanie się drugiego z rozpatrywanych parametrów [22,48].

Opisane powyżej analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu *STATISTICA PL*.

Tab. 5. Wpływ podłoża Schenk-Hildebrandt'a zawierających 5,0 mg l⁻¹ KIN i 0,5 mg l⁻¹ wybranej auksyny, na akumulację izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.*

Tab. 5. The effect of Schenk - Hildebrandt media containing 5.0 mg l⁻¹ KIN and 0.5 mg l⁻¹ of the selected auxin on the accumulation of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.*

Typ związków	Wpływ modyfikacji fitohormonalnych na akumulację izoflawonów		
	stymulujący	hamujący	bez zmian
glikozydy	TIBA (3) β-NOA (1)	2,4,5 – T (2) PICL (2) 4-CPA (2) IBA (2) IPA (1) NAA (1) IAA (1) 2,4 – D (1)	
estry	IPA (1)	2,4,5 – T (3) 4-CPA (3) IAA (2) PICL (2) NAA (2) IBA (1) β -NOA (1) TIBA (1) 2,4 – D (1)	
aglikony	TIBA (2)	2,4,5 – T (3) PICL (3) β-NOA (3) 4-CPA (3) IBA (1) IAA (1) NAA (1) 2,4 – D (1)	IPA
suma związków	TIBA (3) β-NOA (1)	2,4,5 – T (2) PICL (2) 4-CPA (2) IBA (1) IPA (1) NAA (1) IAA (1) 2,4 – D (1)	

* oznaczenia wartości liczbowych podanych w tabeli:

* the quantifiers of the numerical values quoted in the table:

działanie stymulujące – w kolejności od największego	działanie hamujące – w kolejności od najmniejszego
(1) – mniej niż dwukrotnie: $1,05 < i < 2$	(1) – mniej niż dwukrotnie: $0,5 < i < 0,95$
(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: $2 \leq i \leq 3$	(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: $0,33 \leq i \leq 0,5$
(3) – więcej niż trzykrotnie: $i > 3$	(3) – więcej niż trzykrotnie: $i < 0,33$

Tab. 6. Wpływ podłoża Schenk - Hildebrandt'a zawierających 0,5 mg l⁻¹ KIN i 5,0 mg l⁻¹ wybranej auksyny, na akumulację izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.*

Tab. 6. The effect of Schenk - Hildebrandt media containing 0.5 mg l⁻¹ KIN and 5.0 mg l⁻¹ of the selected auxin on the accumulation of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.*

Typ związków	Wpływ modyfikacji fitohormonalnych na akumulację izoflawonów		
	stymulujący	hamujący	bez zmian
glikozydy	2,4 – D (3) NAA (2) IBA (1) TIBA (1) IAA (1) β-NOA (1)	IPA (2) 4-CPA (1) PICL (1) 2,4,5 – T (1)	
estry	2,4 – D (3) TIBA (3) β-NOA (1) IAA (1) IBA (1) 2,4,5 – T (1)	PICL (1) IPA (1) 4CPA (1) NAA (1)	
aglikony	2,4 – D (3) NAA (3) IBA (3) TIBA (3) 4CPA (3) IPA (2) IAA (2) β-NOA (1) 2,4,5 – T (1)	PICL (1)	
suma związków	2,4 – D (3) NAA (2) TIBA (1) IBA (1) IAA (1) β-NOA (1)	IPA (2) PICL (1) 4-CPA (1)	2,4,5 – T

* oznaczenia wartości liczbowych podanych w tabeli:

* the quantifiers of the numerical values quoted in the table:

działanie stymulujące – w kolejności od największego	działanie hamujące – w kolejności od najmniejszego
(1) – mniej niż dwukrotnie: 1,05 < i < 2	(1) – mniej niż dwukrotnie: 0,5 < i < 0,95
(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: 2 ≤ i ≤ 3	(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: 0,33 ≤ i ≤ 0,5
(3) – więcej niż trzykrotnie: i > 3	(3) – więcej niż trzykrotnie: i < 0,33

Tab. 7. Wpływ podłoży Schenk - Hildebrandt'a zawierających 0,5 mg l⁻¹ 2,4-D i 5,0 mg l⁻¹ wybranej cytokininy, na akumulację izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.*

Tab. 7. The effect of Schenk - Hildebrandt media containing 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D and 5.0 mg l⁻¹ of the selected cytokinin on the accumulation of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.*

Typ związków	Wpływ modyfikacji fitohormonalnych na akumulację izoflawonów		
	stymulujący	hamujący	bez zmian
glikozydy	BAP (2) TDZ (1) 2iP (1) 4-CPPU (1) KIN (1)	1,3 -DFM (2) ZEA (1)	
estry	KIN (1) BAP (1)	1,3-DFM (2) 4-CPPU (1) ZEA (1) 2iP (1) TDZ (1)	
aglikony	BAP (1) KIN (1) TDZ (1) 4-CPPU (1) 2iP (1)	1,3 -DFM (2) ZEA (1)	
suma związków	BAP (1) TDZ (1) 2iP (1) KIN (1) 4-CPPU (1)	1,3-DFM (2) ZEA (1)	

* oznaczenia wartości liczbowych podanych w tabeli:

* the quantifiers of the numerical values quoted in the table:

działanie stymulujące – w kolejności od największego	działanie hamujące – w kolejności od najmniejszego
(1) – mniej niż dwukrotnie: $1,05 < i < 2$	(1) – mniej niż dwukrotnie: $0,5 < i < 0,95$
(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: $2 \leq i \leq 3$	(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: $0,33 \leq i \leq 0,5$
(3) – więcej niż trzykrotnie: $i > 3$	(3) – więcej niż trzykrotnie: $i < 0,33$

Tab. 8. Wpływ podłoża Schenk - Hildebrandt'a zawierających 5,0 mg l⁻¹ 2,4-D i 0,5 mg l⁻¹ wybranej cytokininy, na akumulację izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.*

Tab. 8. The effect of Schenk - Hildebrandt media containing 5.0 mg l⁻¹ 2,4-D and 0.5 mg l⁻¹ of the selected cytokinin on the accumulation of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.*

Typ związków	Wpływ modyfikacji fitohormonalnych na akumulację izoflawonów		
	stymulujący	hamujący	bez zmian
glikozydy	KIN (3) 4-CPPU (2) TDZ (2) BAP (1) 2iP (1)	1,3 -DFM (2) ZEA (1)	
estry	KIN (3) BAP (2) 4-CPPU (1) TDZ (1) ZEA (1)	1,3- DFM (1)	2iP
aglikony	KIN (1)	ZEA (3) 1,3- DFM (3) 4-CPPU (2) 2iP (1) TDZ (1)	BAP
suma związków	KIN (3) 4-CPPU (2) TDZ (2) BAP (1) 2iP (1)	1,3- DFM (2) ZEA (1)	

* oznaczenia wartości liczbowych podanych w tabeli:

* the quantifiers of the numerical values quoted in the table:

działanie stymulujące – w kolejności od największego	działanie hamujące – w kolejności od najmniejszego
(1) – mniej niż dwukrotnie: $1,05 < i < 2$	(1) – mniej niż dwukrotnie: $0,5 < i < 0,95$
(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: $2 \leq i \leq 3$	(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: $0,33 \leq i \leq 0,5$
(3) – więcej niż trzykrotnie: $i > 3$	(3) – więcej niż trzykrotnie: $i < 0,33$

Tab. 9. Wpływ podłoży Schenk - Hildebrandt'a zawierających 5,0 mg l⁻¹ KIN i 0,5 mg l⁻¹ wybranej auksyny, na przyrost biomas kalusowych *Genista tinctoria*.*

Tab. 9. The effect of Schenk - Hildebrandt media containing 5.0 mg l⁻¹ KIN and 0.5 mg l⁻¹ of the selected auxin on the growth of *Genista tinctoria* callus biomass.*

Przyrost biomas	Wpływ modyfikacji fitohormonalnych na przyrost biomas janowca barwierskiego		
	stymulujący	hamujący	bez zmian
Współczynnik przyrostu W _p	TIBA (3) β -NOA (3) 2,4,5 – T (2) 2,4 – D (1) 4-CPA (1) PICL (1)	IAA (1) IBA (1) IPA (1)	NAA

Tab.10. Wpływ podłoży Schenk- Hildebrandt'a zawierających 0,5 mg l⁻¹ KIN i 5,0 mg l⁻¹ wybranej auksyny, na przyrost biomas kalusowych *Genista tinctoria*.*

Tab.10. The effect of Schenk - Hildebrandt media containing 0.5 mg l⁻¹ KIN and 5.0 mg l⁻¹ of the selected auxin on the growth of *Genista tinctoria* callus biomass.*

Przyrost biomas	Wpływ modyfikacji fitohormonalnych na przyrost biomas janowca barwierskiego		
	stymulujący	hamujący	bez zmian
Współczynnik przyrostu W _p	2,4 – D (1) TIBA (1)	IPA (3) 2,4,5 – T (3) PICL (3) 4CPA (2) β-NOA (2)	NAA

* oznaczenia wartości liczbowych podanych w tabeli:

* the quantifiers of the numerical values quoted in the table:

działanie stymulujące – w kolejności od największego	działanie hamujące – w kolejności od najmniejszego
(1) – mniej niż dwukrotnie: 1,05 < i < 2	(1) – mniej niż dwukrotnie: 0,5 < i < 0,95
(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: 2 ≤ i ≤ 3	(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: 0,33 ≤ i ≤ 0,5
(3) – więcej niż trzykrotnie: i > 3	(3) – więcej niż trzykrotnie: i < 0,33

Tab.11. Wpływ podłoży Schenk - Hildebrandt'a zawierających 5,0 mg l⁻¹ 2,4 - D i 0,5 mg l⁻¹ wybranej cytokininy, na przyrost biomas kalusowych *Genista tinctoria*.*

Tab.11. The effect of Schenk - Hildebrandt media containing 5.0 mg l⁻¹ 2,4 - D and 0.5 mg l⁻¹ of the selected cytokinin on the growth of *Genista tinctoria* callus biomass.*

Przyrost biomas	Wpływ modyfikacji fitohormonalnych na przyrost biomas janowca barwierskiego		
	stymulujący	hamujący	bez zmian
Współczynnik przyrostu W _p	KIN (2) 2iP (1) ZEA (1)		1,3 - DFM 4 -CPPU TDZ BAP

Tab. 12. Wpływ podłoża Schenk- Hildebrandt'a zawierających 0,5 mg l⁻¹ 2,4- D i 5,0 mg l⁻¹ wybranej cytokininy, na przyrost biomas kalusowych *Genista tinctoria*.*Tab. 12. The effect of Schenk - Hildebrandt media containing 0.5 mg l⁻¹ 2,4 - D and 5.0 mg l⁻¹ of the selected cytokinin on the growth of *Genista tinctoria* callus biomass.*

Przyrost biomas	Wpływ modyfikacji fitohormonalnych na przyrost biomas janowca barwierskiego		
	stymulujący	hamujący	bez zmian
Współczynnik przyrostu W _p	2iP (3) 4 -CPPU (3) BAP (1) TDZ (1) 1,3-DFM (1) KIN (1)	ZEA (1)	

* oznaczenia wartości liczbowych podanych w tabeli:

* the quantifiers of the numerical values quoted in the table:

działanie stymulujące – w kolejności od największego	działanie hamujące – w kolejności od najmniejszego
(1) – mniej niż dwukrotnie: 1,05 < i < 2	(1) – mniej niż dwukrotnie: 0,5 < i < 0,95
(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: 2 ≤ i ≤ 3	(2) – dwukrotnie do trzykrotnie: 0,33 ≤ i ≤ 0,5
(3) – więcej niż trzykrotnie: i > 3	(3) – więcej niż trzykrotnie: i < 0,33

Omówienie wyników

Podstawowym celem opisywanego eksperymentu było określenie wpływu regulatorów wzrostu z klasy auksyn oraz cytokininy na wzrost kultur kalusowych *G. tinctoria* oraz akumulację izoflawonów w namnażanych biomasach.

W wyniku przeprowadzonych badań zoptymalizowano, w zakresie fitohormonów, skład podstawowego podłoża Schenk-Hildebrandt'a [44] stymulujący, w kalusach janowca barwierskiego, zarówno produkcję analizowanych metabolitów, jak i również warunkujący znaczny przyrost puszystych, nieuorganizowanych biomas. Tym samym otrzymano optymalne, do wyprowadzenia hodowli zawieszinowych, *inoculum* kalusowe oraz pożywkę produkcyjną, stosowaną docelowo w cyklu eksperymentów z zakresu wytrząsanych kultur zawieszinowych *G. tinctoria* (rozdz. 9).

Liczne dane literaturowe wskazują na bezpośredni wpływ regulatorów wzrostu na biosyntezę wtórnych metabolitów w roślinnych kulturach *in vitro* [4,6,8-12,14-19,21,25,26,30,32,33,35-37,39,43,53,55] oraz na przyrost namnażanych tkanek [7,18,20,21,27,45,47,52,53]. Stwierdzono m. in., że fitohormony mogą stymulować bądź hamować produkcję związków aktywnych w kultywowanych biomasach, co niestety nie zawsze jest skorelowane z jednoczesną indukcją, bądź inhibicją przyrostu tkankowego [7,20,21,30,35,45,52,53]. W efekcie, niekiedy niezwykle trudno jest dobrać pożywkę eksperymentalną, która warunkowałaby zarówno zadawalający wzrost określonych kultur roślinnych jak również akumulację w hodowanych biomasach znacznej ilości wybranych wtórnych metabolitów [7,30,33,35]. Problem ten rozwiązuje się stosując II-fazowe systemy produkcyjne, w których wzrost a następnie znaczna akumulacja związków aktywnych biologicznie realizowane są w dwóch odrębnych etapach, na różnych pożywkach doświadczalnych. Procedury tego typu stosowano m.in. w kulturach *in*

vitro Catharantus roseus, ukierunkowanych na produkcję alkaloidów indolowych [35] oraz w hodowlach kalusowych *Rudbeckia hirta*, syntetyzujących znaczne ilości antocyjanów [30]. Posługiwanie się II-fazowymi systemami produkcyjnymi jest stosunkowo kosztowne oraz stwarza określone trudności technologiczne [7,30,35]. Z tego względu wydaje się niezwykle istotnym dobranie pożywki doświadczalnej, m. in. w zakresie regulatorów wzrostu, tak by możliwe było uzyskanie intensywnego przyrostu biomas, akumulujących jednocześnie znaczne ilości wtórnych metabolitów, w jednym etapie hodowlanym [7,17,30,33,35,45,52,53].

W przeprowadzonym eksperymencie, w jednej serii doświadczeń, przetestowano 17 związków z klasy auksyn i cytokinin (tab. 1 - 4, ryc. 20 i 21). Tym samym przebadano, po raz pierwszy, na jednym modelu hodowlanym tak dużą grupę regulatorów wzrostu, określając ich bezpośredni wpływ na wzrost kalusów *G. tinctoria* oraz produkcję izoflawonów w kulturach *in vitro* badanego gatunku.

Jak wskazują dane literaturowe, wpływ fitohormonów na biosyntezę wtórnych metabolitów w warunkach *in vitro*, zależny jest nie tylko od rodzaju regulatora wzrostu, ale również od jego stężenia w podłożu hodowlanym [2,4,8,14,15,17,30,33,35,53]. Z tego względu, na opisywanym etapie doświadczeń, poszczególne auksyny oraz cytokiny dodawano do pożywki w dwóch stężeniach (0,5 oraz 5,0 mg l⁻¹). Wybór stosowanych w eksperymencie wartości ilościowych poszczególnych fitohormonów w podłożu SH podyktowany był doświadczeniami własnymi nad kulturami *in vitro* roślin wyższych [28,30-33] oraz badaniami wstępnymi z zakresu hodowli tkankowych janowca barwierskiego [29]. Omawiane eksperymenty wskazały, że stosowanie regulatorów wzrostu w stężeniach niższych niż 0,5 mg l⁻¹ oraz wyższych niż 5,0 mg l⁻¹ hamuje wybiórczo wzrost namnażanych biomas lub warunkuje ich szybką nekrozę [29].

Próby kontrolne stosowane w opisywanych doświadczeniach stanowiły kalusy janowca barwierskiego kultywowane na podłożu SH zawierającym jedynie określony dodatek kinetyny (eksperymenty z pożywkami modyfikowanymi zmienną auksyną), bądź 2,4-D (eksperymenty z pożywkami modyfikowanymi zmienną cytokininą). Okazało się niemożliwym kultywowanie biomas *G. tinctoria* na tzw. „podłożach 0”, czyli pożywkach zupełnie pozbawionych regulatorów wzrostu i tym samym stosowanie powyższego wariantu hodowlanego jako najbardziej optymalnej próby kontrolnej. Pasażowane na podłożu SH₀ kalusy janowca barwierskiego bardzo szybko zamierały (całkowity brak anergizacji kultury w stosunku do regulatorów wzrostu [29]). W rezultacie, stosowanie w pożywce jakiegokolwiek fitohormonu zawsze „pozornie” stymulowałoby przyrost badanych kultur i tym samym uniemożliwiłoby wysunięcie właściwych wniosków, co do roli poszczególnych auksyn oraz cytokinin w procesie wzrostu biomas *G. tinctoria* oraz w produkcji izoflawonów w namnażanych kalusach. Wstępne doświadczenia wykazały natomiast, że kalusy janowca barwierskiego zdolne są do ciągłego wzrostu na pożywkach zawierających jedynie określoną ilość auksyn lub cytokinin [29]. W oparciu o powyższe oraz fakt, że 2,4-D i kinetyna używane były z powodzeniem na etapie powstawania kultur inicjalnych badanych janowców (rozdz. 6), właśnie biomas *G. tinctoria* namnażane na podłożach suplementowanych wymiennie niniejszymi fitohormonami stosowano jako swoiste próby kontrolne w opisywanej serii doświadczeń.

Szeroko zaplanowane badania w zakresie kultur *in vitro* janowca barwierskiego dotyczyły nie tylko wpływu poszczególnych regulatorów wzrostu oraz ich stężenia w pożywce na sumaryczną zawartość izoflawonów w namnażanych biomasach. Po raz pierwszy określono wybiórczy wpływ fitohormonów na akumulację połączeń o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów izoflawonoidowych (ryc. 1-9,11-19). W analizach porównawczych uwzględniono

poходne genisteiny oraz daidzeiny, czyli główne metabolity 14-składnikowego zespołu izoflawonów, obecnych w badanym gatunku (rozdz. 6).

Obszerny materiał analityczny, uzyskany z omawianego etapu doświadczeń wymusił zastosowanie statystyki jako narzędzia oceny uzyskanych wyników (Materiały i metody).

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono statystycznie istotny wpływ regulatorów wzrostu na przyrost kalusów *G. tinctoria* (tab. 9-12, ryc. 20 i 21) oraz na akumulację izoflawonów w poszczególnych biomasach (tab. 5-8, ryc. 1-9, 11-19). Wpływ ten był zależny od rodzaju oraz stężenia stosowanego fitohormonu (zmienny w grupie auksyn oraz cytokinin) i dotyczył ilościowej zawartości poszczególnych metabolitów w kulturach, a nie rodzaju syntetyzowanego połączenia (tab. 1-11). W związku z powyższym, niezależnie od stosowanej modyfikacji fitohormonalnej, kalusy janowca barwierskiego akumulowały zawsze 14-składnikowy zespół izoflawonów, pochodnych genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A (rozdz. 6 - ryc. 2), różniący się jedynie w zakresie ilości poszczególnych związków w kulturze (tab. 1 - 4).

Analiza statystyczna wyników uzyskanych w opisywanym eksperymencie pozwoliła ponadto na określenie korelacji między wzrostem kalusów *G. tinctoria* a zawartością izoflawonów w biomasach namnażanych na pożywkach modyfikowanych regulatorami wzrostu (tab. 13 i 14).

Wpływ podłoża o zmiennej zawartości auksyn na wzrost kalusów *G. tinctoria* oraz produkcję izoflawonów w namnażanych biomasach

W niniejszym eksperymencie przetestowano 10 naturalnych oraz syntetycznych auksyn o różnej sile działania, stosowanych powszechnie w kulturach *in vitro* roślin wyższych (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy /2,4-D/, kwas naftylo-1-octowy /NAA/, kwas indolilo-3-masłowy /IBA/, kwas indolilo-3-propionowy /IPA/, kwas indolilo-3-octowy /IAA/, kwas p-chlorofenoksyoctowy /4-CPA/, pikloram /PICL/, kwas β -naftoksyoctowy / β -NOA/, kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy /2,4,5-T/ oraz kwas 2,3,5-trijodobenzoowy /TIBA/ [2,51].

Za wyjątkiem 2,4-D, NAA i IAA, po raz pierwszy, oceniono rolę pozostałych 8 regulatorów wzrostu w procesie produkcji izoflawonów, w roślinnych kulturach tkankowych [4,6,11,12,15,19].

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono istotny wpływ auksyn na wzrost biomas *G. tinctoria* oraz akumulację izoflawonów, pochodnych genisteiny oraz daidzeiny. Obserwowane zależności warunkowane były bezpośrednio rodzajem stosowanego fitohormonu, jak również jego ilością w podłożu hodowlanym (tab. 1,2,5,6). Ustalono, że auksyny dodawane do pożywki SH w niskim stężeniu, wynoszącym $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ogólnie hamowały produkcję izoflawonów w kalusach janowca barwierskiego (tab. 2 i 5). Stwierdzenie to dotyczy zarówno sumarycznej zawartości izoflawonów jak również połączeń o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów (ryc. 1-9, tab. 5). Wyjątkiem od powyższej reguły są: β -NOA oraz TIBA, które w niskich stężeniach warunkowały wzrost zawartości w badanych kalusach aglikonów i glikozydów izoflawonoidowych oraz IPA stymulujący wybiórczo produkcję związków o charakterze estrów (tab. 5).

Porównanie wartości współczynników przyrostu (W_p) dla biomas namnożonych na pożywkach modyfikowanych $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ zawartością poszczególnych auksyn wykazało, że testowane związki, w niskich stężeniach, w istotnym stopniu stymulują przyrost kalusów *G. tinctoria* (tab. 9, ryc. 20). Stwierdzenie to jest prawdziwe dla: TIBA, β -NOA, 2,4,5-T, 2,4-D, 4-CPA i PICL. Jedynie IAA, IBA i IPA w stosowanej ilości nieznacznie hamowały wzrost oraz juwenilność kultur janowca barwierskiego (tab. 9).

Wyznaczenie współczynników korelacji liniowej pomiędzy sumaryczną zawartością izoflawonów oraz współczynnikami przyrostu kalusów kultywowanych na podłożach modyfikowanych $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ dodatkiem auksyn pozwoliło na stwierdzenie niskiej, odwrotnie proporcjonalnej zależności między powyższymi parametrami (wsp. korelacji liniowej $r_{xy} = -0,39$ - tab. 13).

Tab.13. Wartości współczynników korelacji liniowej pomiędzy stężeniami izoflawonów w kulturach kalusowych *G. tinctoria* a współczynnikami przyrostu (W_p) dla biomas hodowanych na pożywkach SH modyfikowanych wybranymi auksynami.

Tab.13. The value of linear correlation ratios between isoflavone concentrations in callus cultures of *G. tinctoria* and the growth factors (W_p) for biomasses grown on SH media modified with the selected auxins.

Modyfikacja podłoża hodowlanego w zakresie wybranych auksyn	Współczynnik korelacji r_{xy}
$0,5 \text{ mg l}^{-1}$ KIN + $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ auksyny	-0,31
$5,0 \text{ mg l}^{-1}$ KIN + $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ auksyny	-0,39

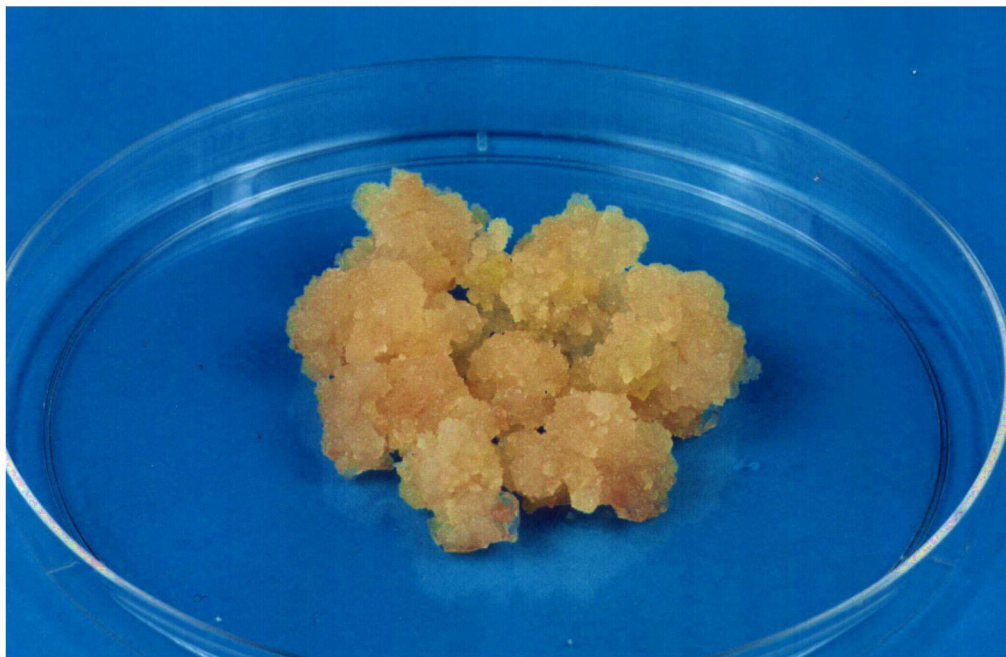
W przeciwieństwie do wyżej opisanych doświadczeń, wysoka ($5,0 \text{ mg l}^{-1}$) zawartość auksyn w podłożach eksperymentalnych wiązała się, w przypadku większości testowanych fitohormonów, ze wzrostem stężenia izoflawonów w kalusach *G. tinctoria* (tab. 1 i 6, ryc. 1-9). Zjawisko to dotyczyło zarówno związków o charakterze aglikonów, glikozydów, estrów oraz sumarycznej ilości badanych połączeń (pożywki modyfikowane 2,4-D, NAA, IBA, TIBA, IAA, β -NOA - tab. 6). Ponadto, stosowane auksyny, za wyjątkiem 2,4-D i TIBA, hamowały wzrost kalusów janowca barwierskiego, w ilości $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ dodatku do pożywki (tab. 10, ryc. 20). W związku z powyższym, podobnie jak w przypadku serii doświadczeń z $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ zawartością auksyn w podłożach, stwierdzono tu odwrotnie proporcjonalną zależność między wzrostem biomas a produkcją izoflawonów, stanowiącą bezpośredni rezultat stosowanej modyfikacji fitohormonalnej (wsp. korelacji liniowej $r_{xy} = -0,31$ – tab. 13). Powyższe wyniki potwierdziły tym samym dane literaturowe odnośnie trudności w opracowaniu podłoża hodowlanego, warunkującego jednocześnie znaczny przyrost badanych biomas kalusowych oraz intensywną produkcję określonych wtórnych metabolitów [7,13,20,24,30,33,35,45,52,53]. Problem ten jest związany z konkurencyjnością szlaków pierwotnego i wtórnego metabolizmu tkankowego w stosunku do połączeń o charakterze prekursorów [24,45,52]. Z tego względu warunki sprzyjające znacznemu przyrostowi biomasy roślinnej tylko w nielicznych przypadkach są odpowiednie do jednoczesnego uzyskania kultur syntetyzujących znaczne ilości związków biologicznie aktywnych (np. sterole, triterpeny) [7,17,20,33,43,53].

O ile auksyny stymulowały bądź hamowały wzrost kalusów *G. tinctoria* oraz produkcję izoflawonów w badanych biomasach, w zależności od stosowanego stężenia, o tyle „siła działania” omawianych fitohormonów zależna była bezpośrednio od rodzaju stosowanego regulatora wzrostu (tab. 1,2,5,6). W tym miejscu należy zaznaczyć, że w grupie związków stymulujących akumulację izoflawonów w wysokich stężeniach znalazły się: IAA, NAA i 2,4-D (tab. 5 i 6). Dane literaturowe wskazują, że powyższe fitohormony, w wybranych modelach doświadczalnych, hamowały biosyntezę bioflawonoidów, w tym również niektórych izoflawonów, w roślinnych kulturach *in vitro* [11,12,23,30,46]. W przypadku IAA uznano, że omawiany regulator wzrostu, w procesie hodowlanym, został rozłożony przez oksydazy IAA, obecne w biomasach roślinnych. Stąd, w stosowanych zakresach stężeń, nie obserwowano korzystnego wpływu powyższej auksyny na akumulację badanych wtórnych metabolitów

[23,30,53]. W doświadczeniach obejmujących kultury kalusowe *Maackia amurensis*, namnażanych na pożywce z dodatkiem NAA, stwierdzono spadek zawartości izoflawonów w kulturowanych biomasach [15]. Uznano, że powyższe zjawisko wiąże się bezpośrednio z obecnością omawianej auksyny, która nie stworzyła prawdopodobnie korzystnych warunków cytologicznych, sprzyjających biosyntezie i magazynowaniu badanych izoflawonów [15]. Wyniki doświadczeń nad kulturami kalusowymi *G. tinctoria*, hodowanymi na pożywkach z dodatkiem IAA i NAA nie potwierdziły powyższych doniesień.

Na szczególną uwagę, w grupie testowanych auksyn zasługuje 2,4-D. Powyższy fitohormon obok TIBA był jedynym regulatorem wzrostu z klasy auksyn, który w ilości 5,0 mg l⁻¹ nie hamował przyrostu biomas janowca barwierskiego (tab. 10, ryc. 20). Jednocześnie, w połączeniu z 0,5 mg l⁻¹ kinetyny warunkował otrzymanie szybko rosnących kalusów (W_p - 892,46 – ryc. 20), syntetyzujących największe, w danej serii doświadczeń, ilości izoflawonów (6436,26 mg/100 g suchej masy – tab. 1, ryc. 9). Ze względu na fakt, że pozostałe auksyny w ilości 5,0 mg l⁻¹ hamowały produkcję izoflawonów (tab. 1 i 6), uzyskany rezultat wydaje się zaskakujący. W doniesieniach literaturowych dotyczących akumulacji szeroko rozumianej grupy roślinnych polifenoli w kulturach *in vitro*, stwierdzono, że 2,4-D pełni funkcję inhibitora liazy fenyloalaniny oraz syntazy chalkonowej, będących m. in. kluczowymi enzymami, biorącymi udział w biosyntezie bioflawonoidów [23,46]. Z tego względu uznano, że powyższa auksyna może hamować produkcję bioflawonoidów w kulturach tkankowych roślin wyższych [23,46]. Stanowisko to nie zostało potwierdzone w badaniach nad akumulacją antocyjanów w biomasach kalusowych *R. hirta* [30]. Ponadto dowiedziono, że 2,4-D stymuluje biosyntezę wolnej oraz zglikozydowanej biochaniny A oraz formononetyny w zawieszynie *Cicer arietinum* [3,5]. Korzystną rolę omawianej auksyny określono również w kulturach kalusowych *Maackia amurensis* [15] oraz *Psolarea sp.* [6] produkujących pod wpływem 2,4-D większe stężenia daidzeiny, maakiainy, medykarpiny, formononetyny oraz retuzyny. Uzyskane w projekcie habilitacyjnym wyniki wskazują również na korzystną rolę omawianego fitohormonu w procesie akumulacji związków izoflawonoidowych (ryc. 1-10), potwierdzając tym samym wyniki badań nad kulturami *in vitro* wybranych gatunków z rodziny *Fabaceae* [3,5,15].

Spośród wszystkich stosowanych w eksperymencie auksyn, najbardziej zaskakujące wyniki uzyskano na podłożach wzbogacanych TIBA (tab. 1,2,5,6,9,10). Niniejsza auksyna, w przeciwieństwie do pozostałych regulatorów wzrostu z tej klasy, najsilniej stymulowała produkcję izoflawonów, w kulturach kalusowych janowca, w stężeniu 0,5 mg l⁻¹ (tab. 2 i 5). Opisany efekt był skorelowany, podobnie jak w przypadku 2,4-D, z intensywnym przyrostem badanej biomas (W_p - 983,07 – ryc. 20). Jednocześnie stężenia poszczególnych izoflawonów, uzyskanych na podłożach suplementowanych 0,5 mg l⁻¹ TIBA były znacznie wyższe niż na pożywkach modyfikowanych 2,4-D (tab. 2, ryc. 1-9). W opisywanych warunkach (0,5 mg l⁻¹ TIBA oraz 5,0 mg l⁻¹ KIN) otrzymano kalusy syntetyzujące maksymalne, na etapie kultur stacjonarnych, stężenia izoflawonów (10474,23 mg/100 g suchej masy – tab. 2, ryc. 9). Interpretacja uzyskanego wyniku na obecnym etapie badań wydaje się być bardzo trudna. Po pierwsze, w danych literaturowych brak informacji odnośnie wpływu TIBA na biosyntezę bioflawonoidów, w kulturach *in vitro* roślin wyższych, z którymi można by było porównać otrzymane wyniki. Ponadto w niniejszym projekcie habilitacyjnym nie prowadzono badań na poziomie molekularnym, mogących wyjaśnić rolę omawianej auksyny w biosyntezie izoflawonów. Uzyskane rezultaty skłaniają natomiast do podjęcia tego typu doświadczeń.



Ryc.22. Kalus *G. tinctoria* hodowany na pożywce SH wzbogaconej 0,5 mg l⁻¹ TIBA oraz 5,0 mg l⁻¹ kinetyny.

Fig.22. *G. tinctoria* callus grown on SH medium supplemented with 0.5 mg l⁻¹ TIBA and 5.0 mg l⁻¹ kinetin.

W wyniku hodowli kalusów *G. tinctoria* na zoptymalizowanym podłożu SH (0,5 mg l⁻¹ TIBA oraz 5,0 mg l⁻¹ KIN) uzyskano biomasy o puszystej strukturze (ryc. 22), otrzymując tym samym optymalne *inocoulum* do wyprowadzenia hodowli zawieszinowych [7,47].

Wpływ podłoża o zmiennej zawartości cytokinin na wzrost kalusów *G. tinctoria* oraz produkcję izoflawonów w namnażanych biomasach

W opisywanej serii doświadczeń przebadano 7 związków sklasyfikowanych jako naturalne bądź syntetyczne cytokininy: (zeatynę /ZEA/, kinetynę /KIN/, 6-benzyloaminopurynę /BAP/, 6-{γ-γ-dimetyloallilo}-aminopurynę /2iP/, N-(2-chloro-4-pirydylo)-N`-fenylo mocznik /4-CPPU/, 1,3-difluoromocznik /1,3-DFM/ oraz 1-fenilo-3-(1,2,3,-tiazolo-5-yl)mocznik /tidiazuron /TDZ/) [2,51], określając ich wpływ na wzrost kalusów *G. tinctoria* oraz akumulację izoflawonów w hodowanych biomasach. Za wyjątkiem BAP, KIN i ZEA, pozostałe regulatory wzrostu ujęte w niniejszym eksperymencie przetestowano, po raz pierwszy, pod kątem ewentualnego wpływu na produkcję szeroko rozumianej klasy bioflawonoidów w kulturach *in vitro* [3-6,11,12,14,15,19,23,46].

Podobnie jak w przypadku auksyn stwierdzono, że cytokininy mogą w sposób istotny regulować akumulację izoflawonów w kalusach *G. tinctoria* (tab. 3,4,7,8). Wpływ omawianych fitohormonów, na wzrost oraz zawartość badanej klasy wtórnych metabolitów, w kulturach janowca barwierskiego, uzależniony był nie tylko od rodzaju stosowanego regulatora wzrostu, ale również od jego ilości w pożywce eksperymentalnej (tab. 3,4,7,8, ryc. 11-19). Ponadto, w przeciwieństwie do auksyn, był on wybiórczy w stosunku do połączeń o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów (tab. 7 i 8, ryc. 12-19).

Ustalono, że cytokininy w niskich stężeniach, wynoszących 0,5 mg l⁻¹ stymulują znacząco, za wyjątkiem zeatyny oraz 1,3-DFM, produkcję glikozydów oraz estrów izoflawonoidowych (tab. 4 i 8, ryc. 13-15,17). W opisywanych warunkach doświadczalnych stwierdzono ponadto istotny wzrost sumarycznej zawartości badanych wtórnych metabolitów w kalusach

janowca barwierskiego (tab. 4 i 8, ryc. 11). Pożywki eksperymentalne zawierające $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ wybranych cytokinin wpływały natomiast hamująco na akumulację izoflawonów o charakterze aglikonów (tab. 8, ryc. 12 i 16). Stwierdzenie to jest prawdziwe dla wszystkich omawianych fitohormonów, za wyjątkiem kinetyny (tab. 4 i 8).

Tab. 14. Wartości współczynników korelacji liniowej pomiędzy stężeniami izoflawonów w kulturach kalusowych *G. tinctoria* a współczynnikami przyrostu (W_p) dla biomas hodowanych na pożywkach SH modyfikowanych wybranymi cytokininami.

Tab. 14. The value of linear correlation ratios between the concentrations of isoflavones in *G. tinctoria* callus cultures and growth factors (W_p) for biomasses grown on SH media modified with the selected cytokinins.

Modyfikacja podłoża hodowlanego w zakresie wybranych cytokinin	Współczynnik korelacji r_{xy}
$0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D + $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ cytokininy	0,13
$5,0 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ cytokininy	0,61

Analiza porównawcza współczynników przyrostu (W_p) poszczególnych biomas namnażanych na pożywkach suplementowanych niskimi stężeniami cytokinin wykazała, że powyższe regulatory wzrostu, bądź nie wpływały istotnie na wzrost kalusów *G. tinctoria* (1,3-DFM, 4-PPU, TDZ, BAP) lub też wykazywały działanie stymulujące (KIN, 2iP, ZEA – tab. 11, ryc. 21).

Wyznaczone współczynniki korelacji liniowej między stężeniami izoflawonów w biomasach janowca, a współczynnikami przyrostu analizowanych kalusów, wskazały na istnienie bardzo słabej, wprost proporcjonalnej zależności (wsp. korelacji liniowej $r_{xy} = 0,61$ – tab. 14) między badanymi parametrami.

W opisywanej serii doświadczeń, największy, bo aż 5-krotny wzrost zawartości izoflawonów, w kalusach janowca, obserwowano na pożywce z $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ dodatkiem kinetyny ($6436,26 \text{ mg/100 g}$ suchej masy – tab. 4, ryc. 11). Jednocześnie opisywana modyfikacja hodowlana, zawierająca również $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D, warunkowała najintensywniejszy przyrost badanych kalusów (W_p – $892,46$ – tab. 11, ryc. 21).

Cytokinin dodawane do pożywek w ilości $5,0 \text{ mg l}^{-1}$, za wyjątkiem 1,3-DFM i ZEA, stymulowały akumulację połączeń izoflawonoidowych o charakterze glikozydów, podobnie jak to miało miejsce w przypadku niskiej zawartości omawianych fitohormonów w podłożach eksperymentalnych (tab. 3,4,7,8). Opisywane zjawisko dotyczyło również sumarycznej zawartości połączeń izoflawonoidowych w biomasach (tab. 7, ryc. 11). Obserwowana indukcja, w zakresie produkcji izoflawonów, pod wpływem $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ stężeń poszczególnych cytokinin, była jednak znacznie słabsza (max. zawartość badanych metabolitów – $2122,01 \text{ mg/100 g}$ suchej masy – $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP – tab. 3) niż to miało miejsce w przypadku pożywek zawierających jedynie $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ omawianych regulatorów wzrostu (max. zawartość badanych metabolitów – $6436,26 \text{ mg/100 g}$ suchej masy – $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ KIN – tab. 4). W przeciwieństwie do wariantów eksperymentalnych obejmujących pożywki z $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ dodatkiem cytokinin, wysokie stężenia omawianych regulatorów wzrostu stymulowały istotnie produkcję aglikonów izoflawonoidowych w badanych biomasach (tab. 7, ryc. 12,16). Ponadto, stosowany reżim hodowlany, za wyjątkiem podłoży z dodatkiem KIN i BAP, hamował akumulację połączeń o charakterze estrów (tab. 7, ryc. 18,19).

Podobnie jak w serii doświadczeń ze zmiennymi auksynami, również na opisywanym etapie eksperymentu stwierdzono, że bezpośredni wpływ cytokinin na akumulację połączeń

isoflawonoidowych w biomasach janowca („siła działania” fitohormonu) zależał w znacznej mierze od rodzaju stosowanego regulatora wzrostu (tab. 3,4,7,8). Spośród wszystkich przetestowanych cytokinin najsilniej indukowała produkcję izoflawonów kinetyna oraz 4-CPPU (tab. 7, 8). Z uwagi na brak porównawczych danych literaturowych, dotyczących roli powyższych fitohormonów w biosyntezie izoflawonów, na opisanym etapie doświadczeń, trudno ocenić mechanizm opisywanego zjawiska.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono również, że wszystkie testowane cytokiny, za wyjątkiem ZEA, w ilości $5,0 \text{ mg l}^{-1}$, stymulowały przyrost kalusów janowca, na poziomie porównywalnym do wyników uzyskanych przy $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ zawartości omawianych regulatorów wzrostu w pożywkach (tab. 11,12, ryc. 21). W niniejszym przypadku najintensywniej przyrastające biomasy uzyskano na podłożu SH, suplementowanym $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ 2iP ($W_p - 974,4$ – ryc. 21). Niestety opisywana modyfikacja fitohormonalna tylko nieznacznie stymulowała produkcję izoflawonów w badanych biomasach ($1245,35 \text{ mg/100 g}$ suchej masy – tab. 3).

Porównanie stężeń izoflawonów w kalusach *G. tinctoria* namnażanych na pożywkach zawierających $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ dodatek cytokinin, ze współczynnikami przyrostu odpowiednich biomas, nie wykazało korelacji między analizowanymi parametrami (wsp. korelacji liniowej $r_{xy} = 0,13$ – tab. 14).

Wyniki serii eksperymentów obejmujących podłoża ze zmienną zawartością cytokinin wskazały na wybiórczy wpływ powyższej klasy regulatorów wzrostu na akumulację izoflawonów o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów. Ponadto, w przeciwieństwie do auksyn, stwierdzono w omawianym przypadku występowanie wprost proporcjonalnej zależności między przyrostem badanych biomas a poziomem izoflawonów w kultywowanych kalusach. Opisywana zależność w całej grupie testowanych cytokinin jest jednak bardzo słaba (wsp. korelacji liniowej $r_{xy} = 0,13 - 0,61$; tab. 14). Należy sobie jednak zdawać sprawę, iż współczynnik korelacji jest tylko miarą zależności badanych parametrów i przy jego interpretacji nie należy mylić zależności ze związkiem przyczynowym. Dowód, iż dwie grupy zmiennych są zależne, wcale nie jest dowodem, iż zmiana zmiennych jednej grupy jest bezpośrednią przyczyną zmiany drugiej, czy też odwrotnie. Wobec tego znaczenie współczynników korelacji powinno być zawsze dokładnie rozważone, aby sprawdzić, czy zależność jest bezpośrednia, czy też jest spowodowana wzajemnym oddziaływaniem innych wspólnych czynników. Jest niesłychanie łatwo założyć, iż wzajemna zależność jest takiego rodzaju, jak przyczyny i skutki; uzasadnienie prawdziwości lub nie takiego założenia jest najczęściej zadaniem nadzwyczaj skomplikowanym [22,34,48]. Z tego względu wysunięcie wiarygodnych wniosków, co do dodatniej korelacji między akumulacją izoflawonów a przyrostem kalusów *G. tinctoria* możliwe jest jedynie w przypadku poszczególnych cytokinin (tab. 5-12).

W wyniku analizy porównawczej wyników uzyskanych z doświadczeń obejmujących 7 cytokinin stwierdzono, że pożywką łączącą cechy podłoża wzrostowego ($W_p - 892,4$) oraz produkcyjnego ($6436,28 \text{ mg}$ izoflawonów/ 100 g suchej masy), w danym wypadku, jest modyfikacja $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D i $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ kinetyny (tab. 3, ryc. 21).

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych badań ustalono wpływ regulatorów wzrostu z klasy auksyn oraz cytokinin na akumulację izoflawonów w kalusach *G. tinctoria* oraz na przyrost biomas badanego gatunku. Udowodniono, że końcowy wynik eksperymentu, w postaci intensywnie przyrastającej biomasy janowca barwierskiego, syntetyzującego wysokie stężenia izoflawonów, jest wypadkową optymalizacji podłoża hodowlanego tak w zakresie rodzaju fitohormonów jak również ich stężenia. Wyznaczenie współczynników korelacji liniowej między stężeniami akumulowanych związków a współczynnikami przyrostu dla

odpowiednich biomas pozwoliło na określenie zależności między powyższymi parametrami, stanowiącymi bezpośredni rezultat stosowanych modyfikacji doświadczalnych.

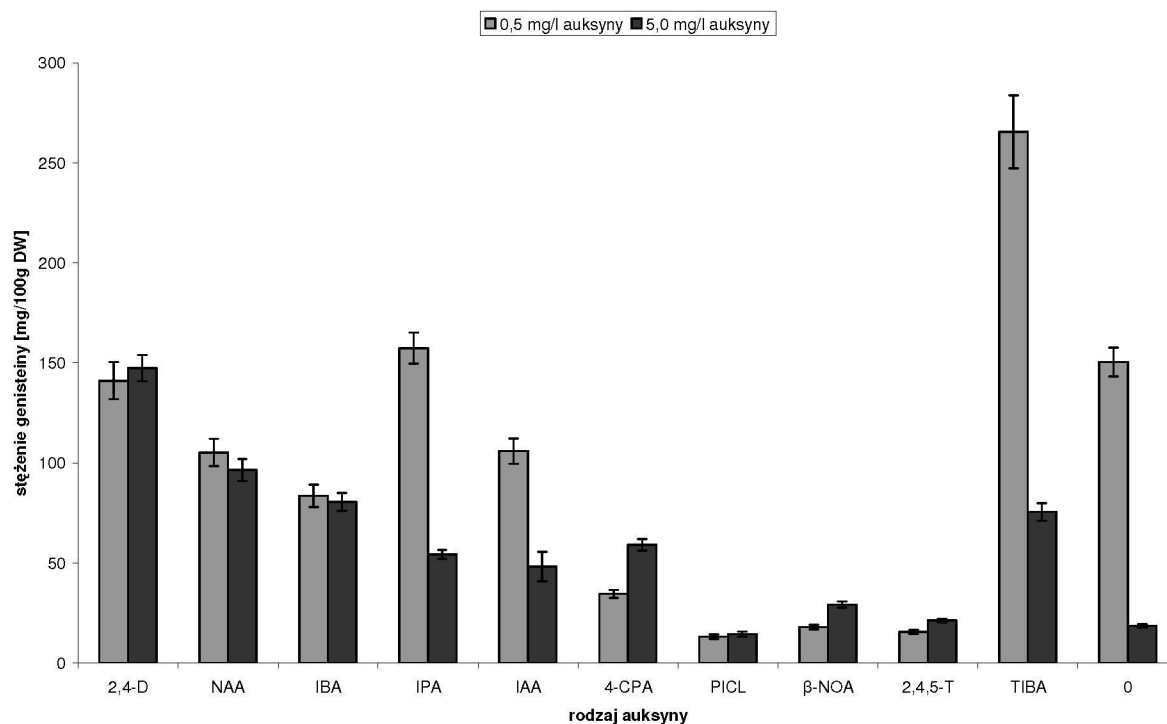
W efekcie przeprowadzonych badań dokonano wyboru podłoża hodowlanego, łączącego w sobie cechy pożywki wzrostowej (W_p - 983,072) oraz produkcyjnej (max. zawartość izoflawonów - 10474,23 mg/100 g suchej masy – tab. 2). Na powyższej modyfikacji doświadczalnej (podstawowa pożywka SH), złożonej z 0,5 mg l⁻¹ TIBA i 5,0 mg l⁻¹ kinetyny, uzyskano największe, w całej serii opisywanych doświadczeń, stężenie analizowanych wtórnych metabolitów, przewyższające 3-krotnie zawartość izoflawonów w roślinie gruntowej (3073,54 mg/100 g suchej masy – rozdz. 6). Tym samym osiągnięto zasadniczy cel eksperymentu, którym było opracowanie pożywki produkcyjnej, z przeznaczeniem do prowadzenia kultur zawieszinowych janowca barwierskiego, ukierunkowanych na wybiórczą akumulację fitoestrogenów pochodzenia izoflawonoidowego. Ponadto, w zoptymalizowanych warunkach hodowlanych otrzymano puszystą biomasę kalusową, łatwą do zdyspergowania w pożywcę płynnej.

Przeprowadzone doświadczenia, obejmujące 17 regulatorów wzrostu z klasy auksyn oraz cytokinin, pozwoliło na wysunięcie wniosków natury ogólnej, dotyczących wpływu poszczególnych fitohormonów na wybiórczą akumulację izoflawonów o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów. Dotychczas, w praktyce roślinnych kultur *in vitro*, ukierunkowanych na produkcję wybranych wtórnych metabolitów, przebadano po raz pierwszy, tak dużą grupę regulatorów wzrostu.

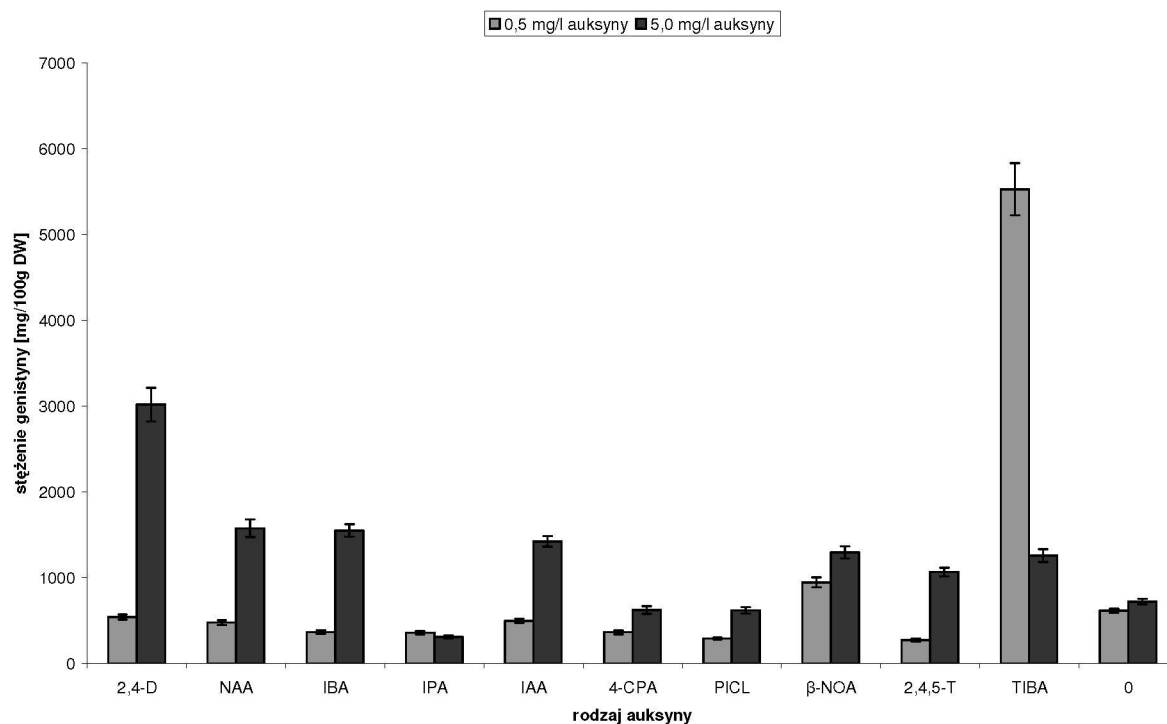
Zważywszy na skąpe dane literaturowe, dotyczące roli regulatorów wzrostu w biosyntezie wtórnych metabolitów, w tym izoflawonów, uzyskane wyniki wydają się szczególnie istotne. Zakres prowadzonych badań (brak doświadczeń na poziomie molekularnym) nie pozwolił na wysunięcie wniosków, co do mechanizmów odpowiedzialnych za hamowanie bądź stymulację biosyntezy izoflawonów, pod wpływem określonych fitohormonów. Udowodniono jednak istnienie bezpośrednich relacji: regulator wzrostu — metabolit końcowy, które można uwzględnić w eksperymentach biotechnologicznych ukierunkowanych na produkcję aktywnych leczniczo substancji, w kulturach *in vitro* roślin z rodziny *Fabaceae*.

Wyniki opisanych eksperymentów wskazują, że optymalizacja podłoża hodowlanych w zakresie regulatorów wzrostu, stanowiąca stosunkowo prosty zabieg technologiczny, może zasadniczo determinować końcowy wynik eksperymentu, którym jest biomasa akumulująca wysokie stężenia związków biologicznie aktywnych.

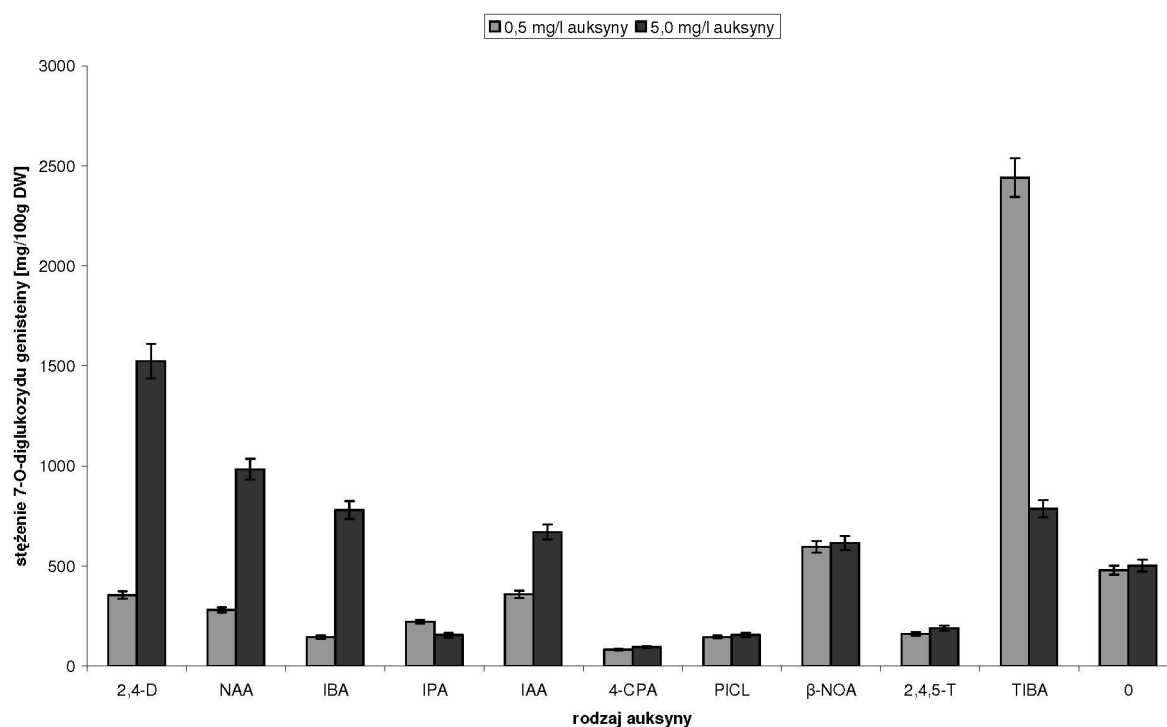
Stwierdzenie, w omawianym projekcie, określonych zależności między wybranymi regulatorami wzrostu a końcową zawartością izoflawonów, w kalusach *G. tinctoria*, było niekiedy sprzeczne z wynikami eksperymentów, cytowanych w literaturze, dotyczących roli fitohormonów w biosyntezie bioflawonoidów. Zaobserwowane różnice mogą wiązać się ze zmiennymi modelami doświadczalnymi stosowanymi w poszczególnych badaniach (zróżnicowane procedury hodowlane, testowane biomasy oraz gatunki roślinne). Uzyskane rezultaty wskazują jak istotne jest ustalenie roli fitohormonów w biosyntezie metabolitów wtórnych i zachęcają do dalszych badań w tym zakresie. Być może ustalenie mechanizmów rządzących relacjami między metabolizmem wtórnych a określonymi fitohormonami pozwoliłoby ostatecznie na uniknięcie problemów związanych z niską produkcją aktywnych biologicznie substancji, w kulturach *in vitro* roślin wyższych.



Ryc.1. Wpływ określonych auksyn oraz ich stężenia na zawartość genisteiny w kalusie *Genista tinctoria*.
 Fig. 1. The effect of the various auxins and their concentrations on the accumulation of genistein in *Genista tinctoria* callus.

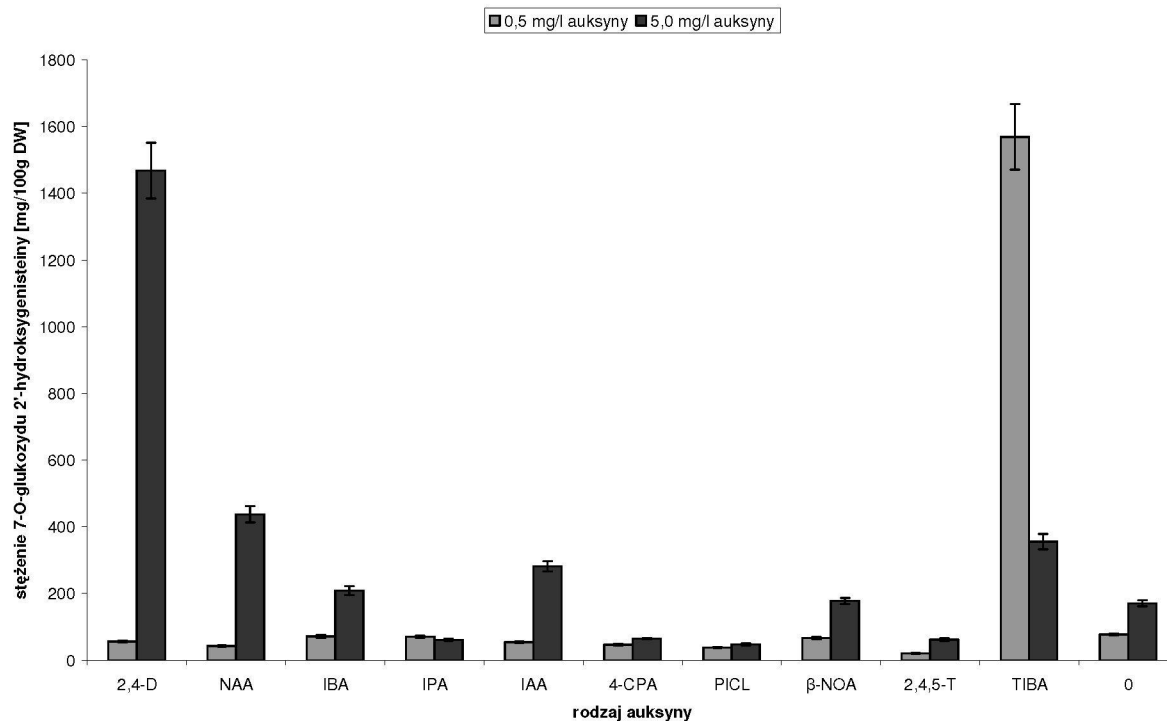


Ryc. 2. Wpływ określonych auksyn oraz ich stężenia na zawartość genistyny w kalusie *Genista tinctoria*.
 Fig. 2. The effect of the various auxins and their concentrations on the accumulation of genistin in *Genista tinctoria* callus.



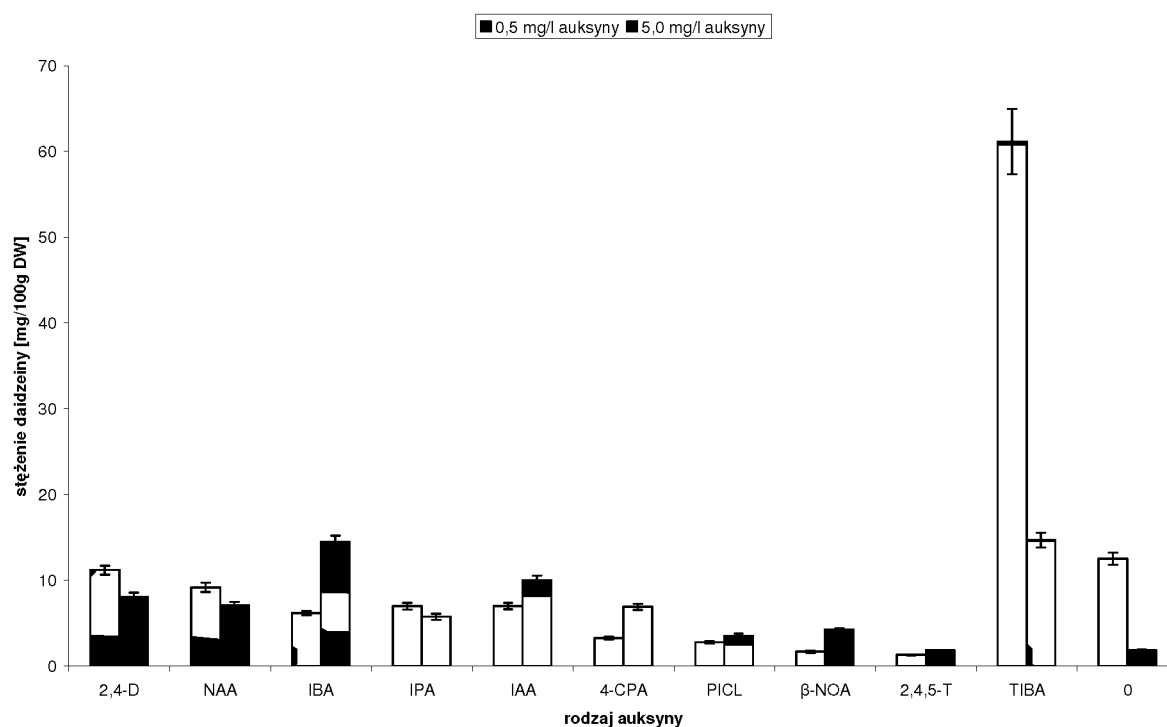
Ryc. 3. Wpływ określonych auksyn oraz ich stężenia na zawartość 7-O-diglukozydu genisteiny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 3. The effect of the various auxins and their concentrations on the accumulation of genistein-7-O-diglucozide in *Genista tinctoria* callus.

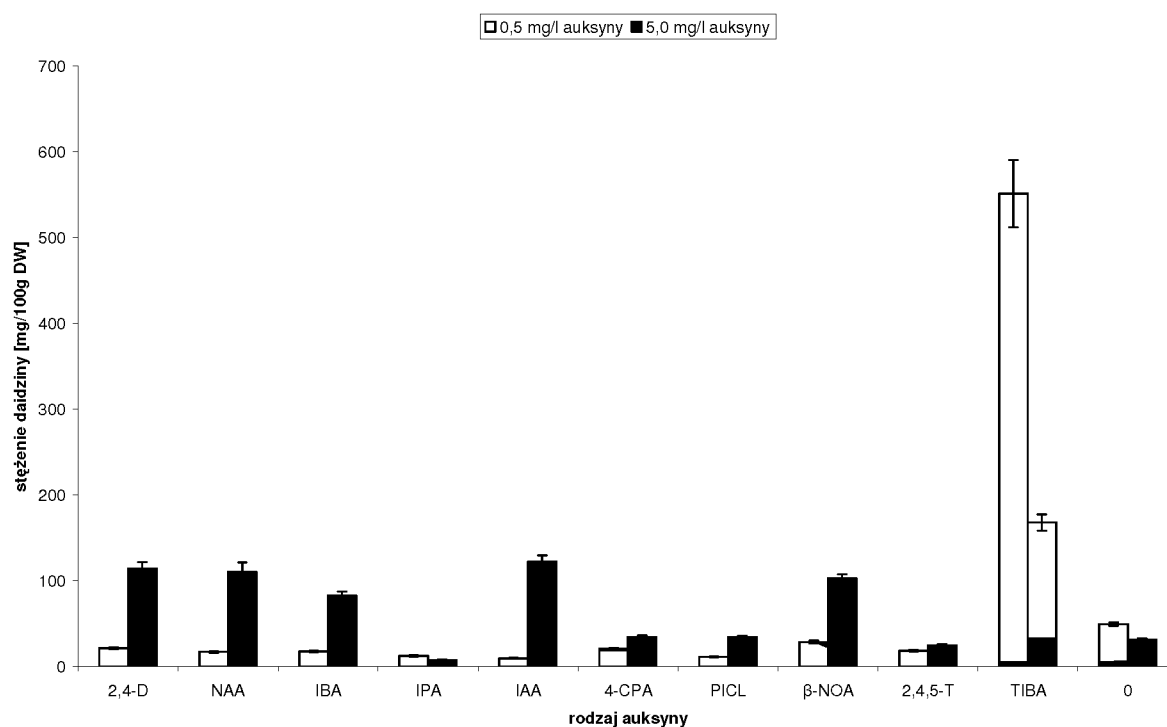


Ryc. 4. Wpływ określonych auksyn oraz ich stężenia na zawartość 7-O-glukozydu 2'-hydroksygenisteiny w kalusie *Genista tinctoria*.

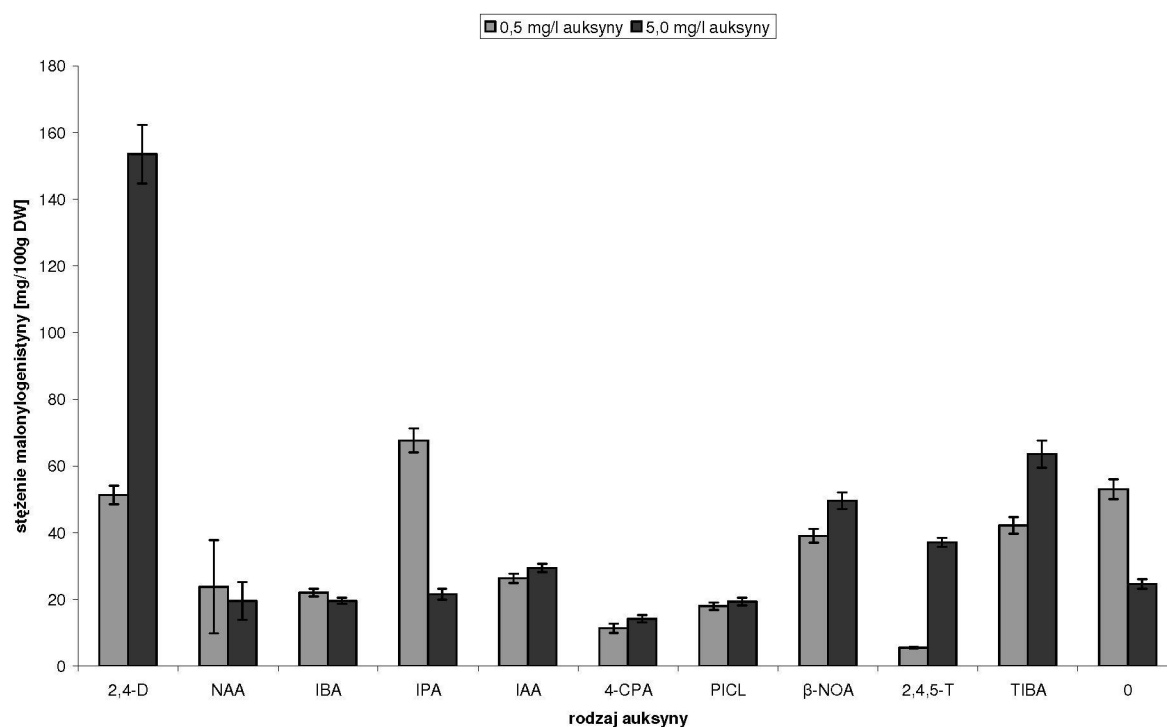
Fig. 4. The effect of the various auxins and their concentrations on the accumulation of 2'-hydroxygenistein-7-O-glucoside in *Genista tinctoria* callus.



Ryc. 5. Wpływ określonych auksyn oraz ich stężenia na zawartość daidzeiny w kalusie *Genista tinctoria*.
 Fig. 5. The effect of the various auxins and their concentrations on the accumulation of daidzein in *Genista tinctoria* callus.

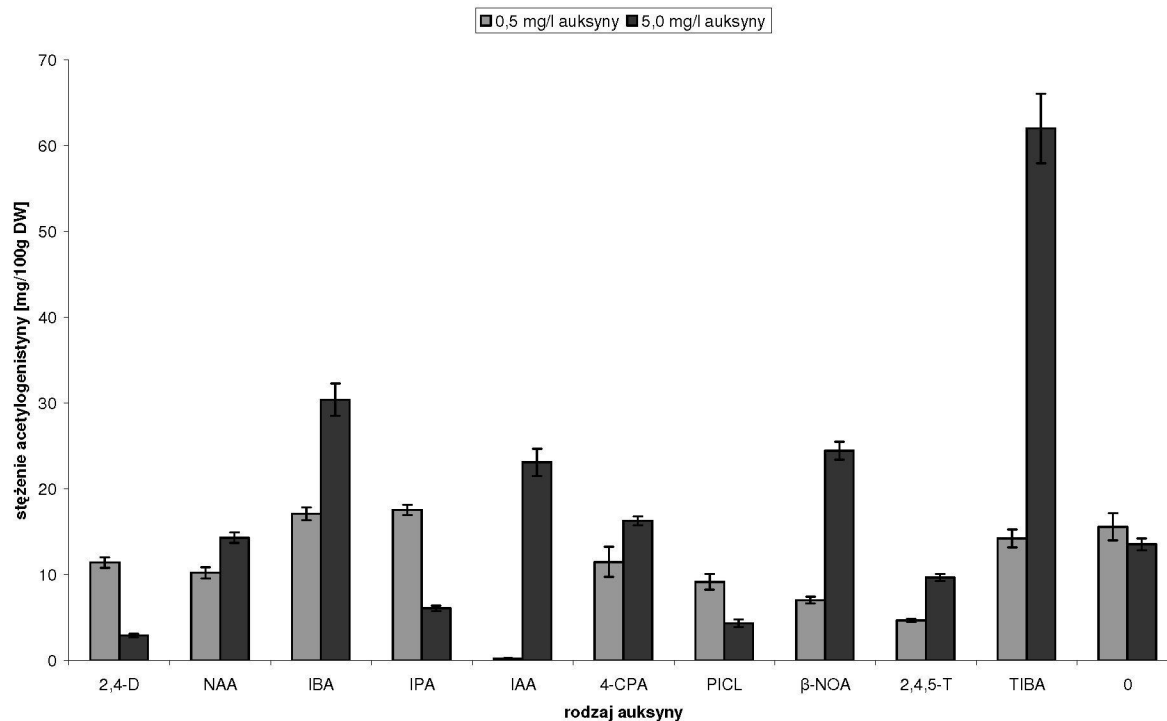


Ryc. 6. Wpływ określonych auksyn oraz ich stężenia na zawartość daidziny w kalusie *Genista tinctoria*.
 Fig. 6. The effect of the various auxins and their concentrations on the accumulation of daidzin in *Genista tinctoria* callus.



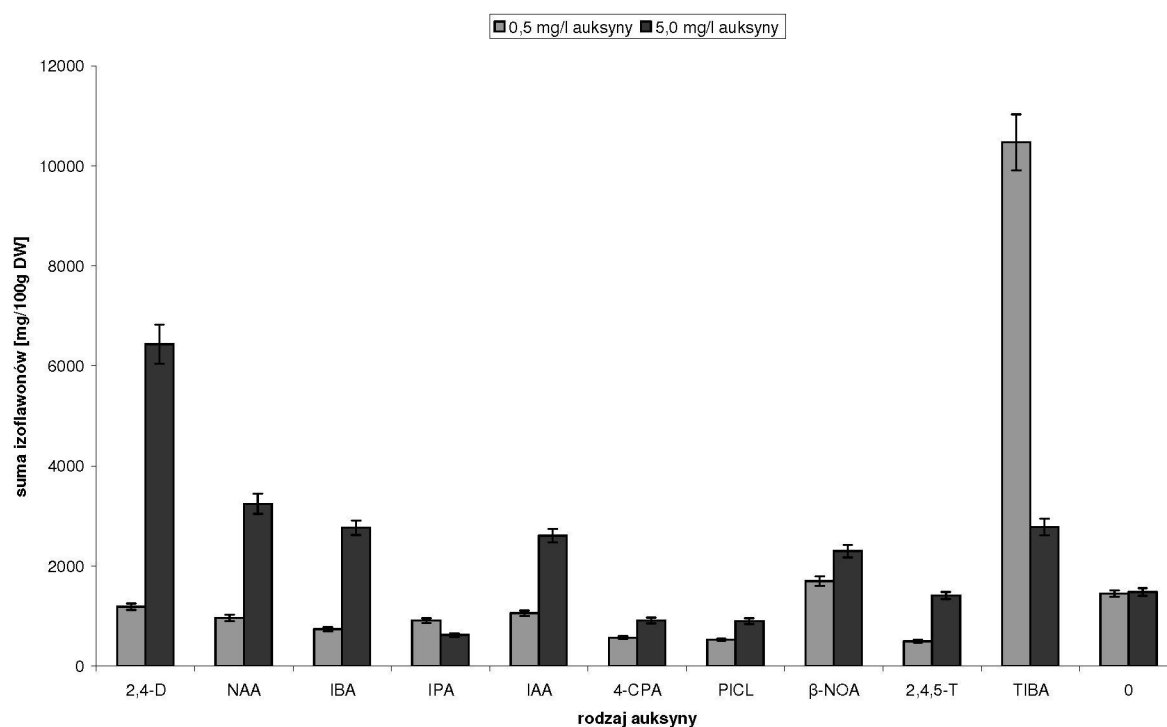
Ryc. 7. Wpływ określonych auxyn oraz ich stężenia na zawartość malonylogenistyny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 7. The effect of the various auxins and their concentrations on the accumulation of genistin malonate in *Genista tinctoria* callus.



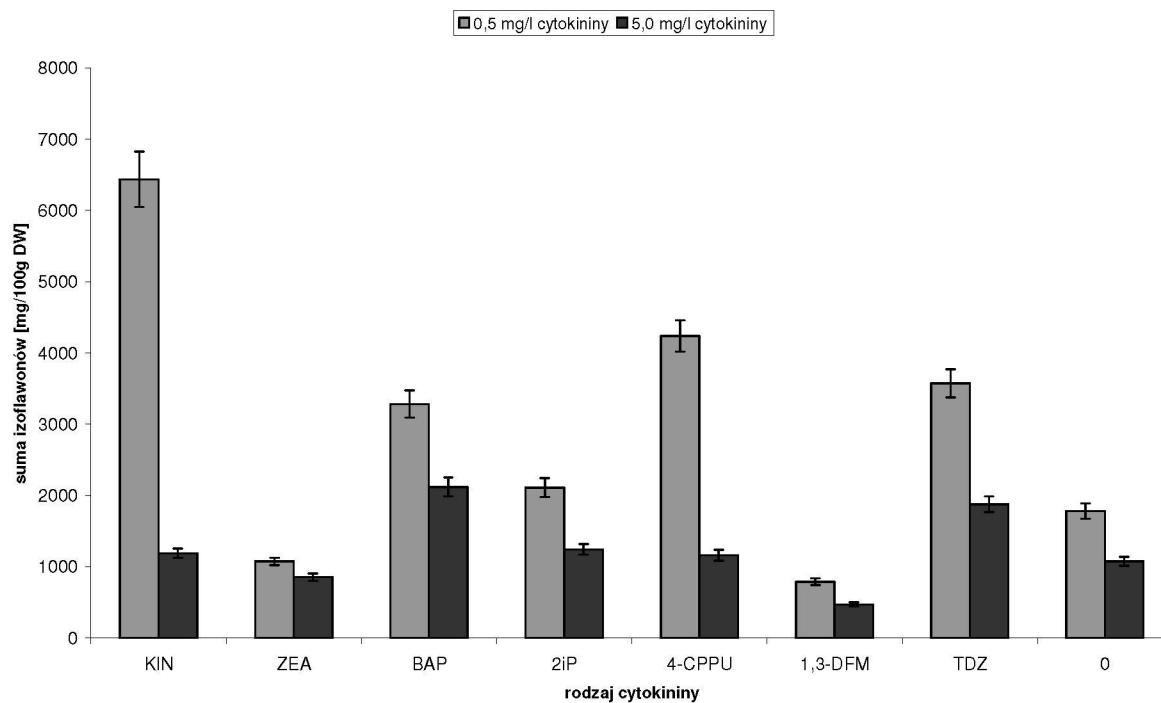
Ryc. 8. Wpływ określonych auxyn oraz ich stężenia na zawartość acetylogenistyny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 8. The effect of the various auxins and their concentrations on the accumulation of genistin acetate in *Genista tinctoria* callus.



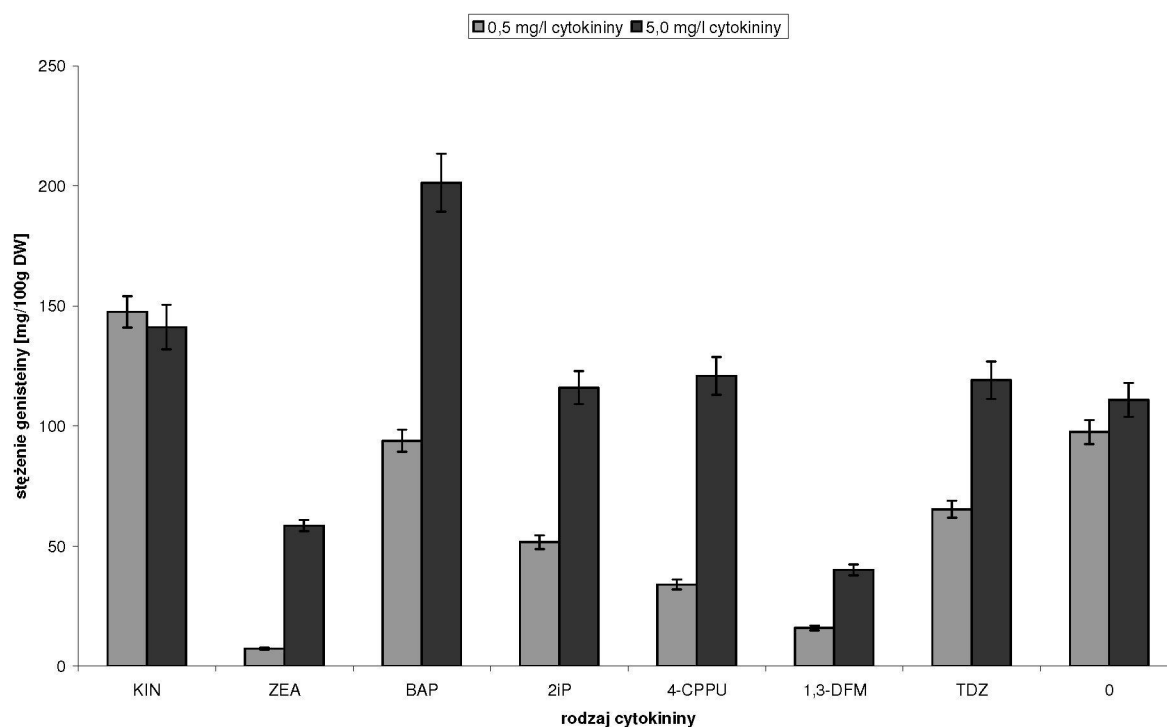
Ryc. 9. Wpływ określonych auxyn oraz ich stężenia na sumaryczną zawartość izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 9. The effect of the various auxins and their concentrations on the total accumulation of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.



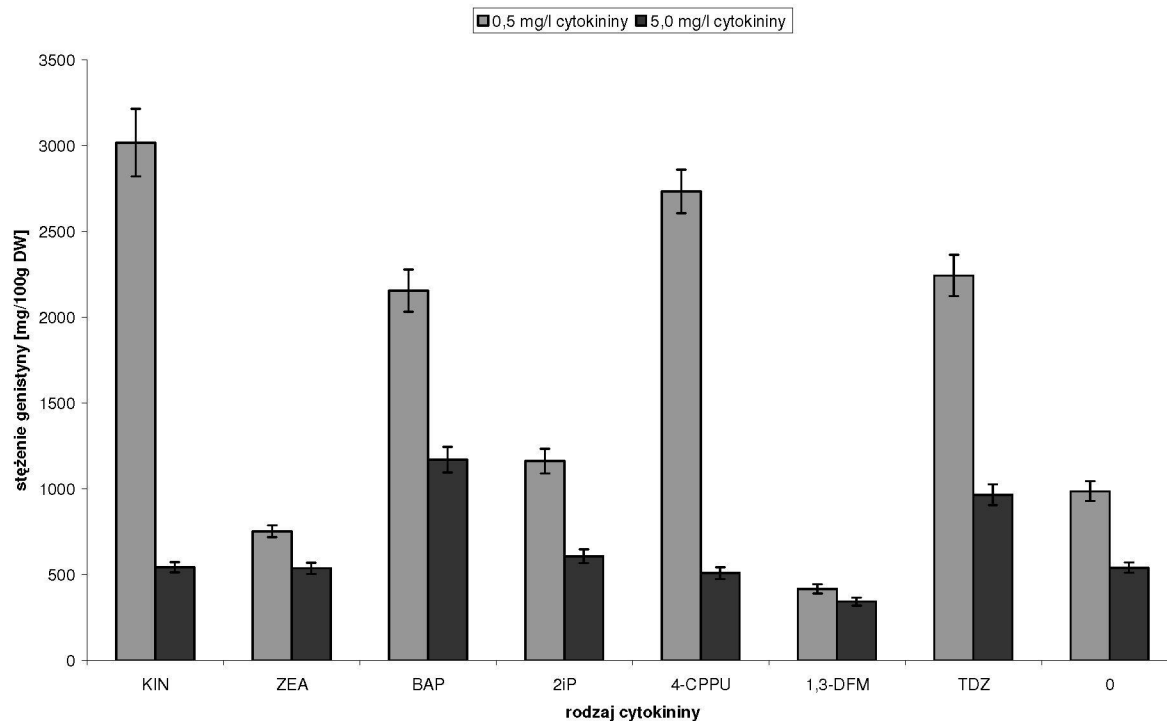
Ryc. 10. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na sumaryczną zawartość izoflawonów w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 10. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the total accumulation of isoflavones in *Genista tinctoria* callus.



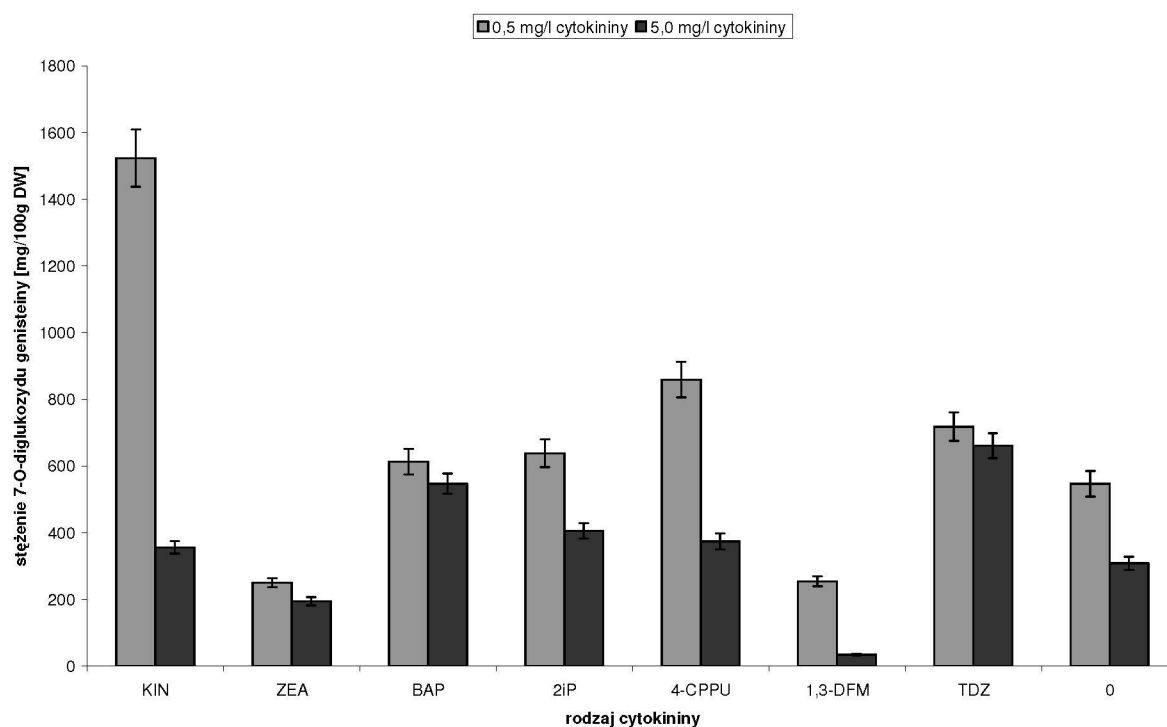
Ryc. 11. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na zawartość genisteiny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 11. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the accumulation of genistein in *Genista tinctoria* callus.



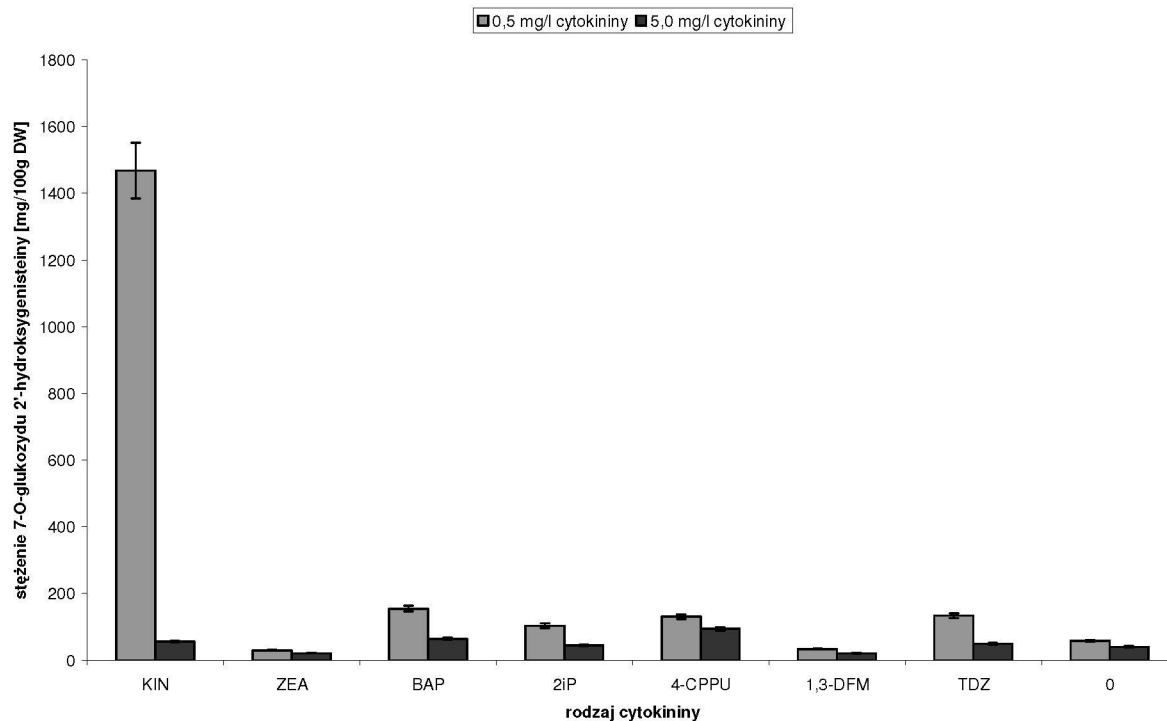
Ryc. 12. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na zawartość genistyny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 12. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the accumulation of genistin in *Genista tinctoria* callus.



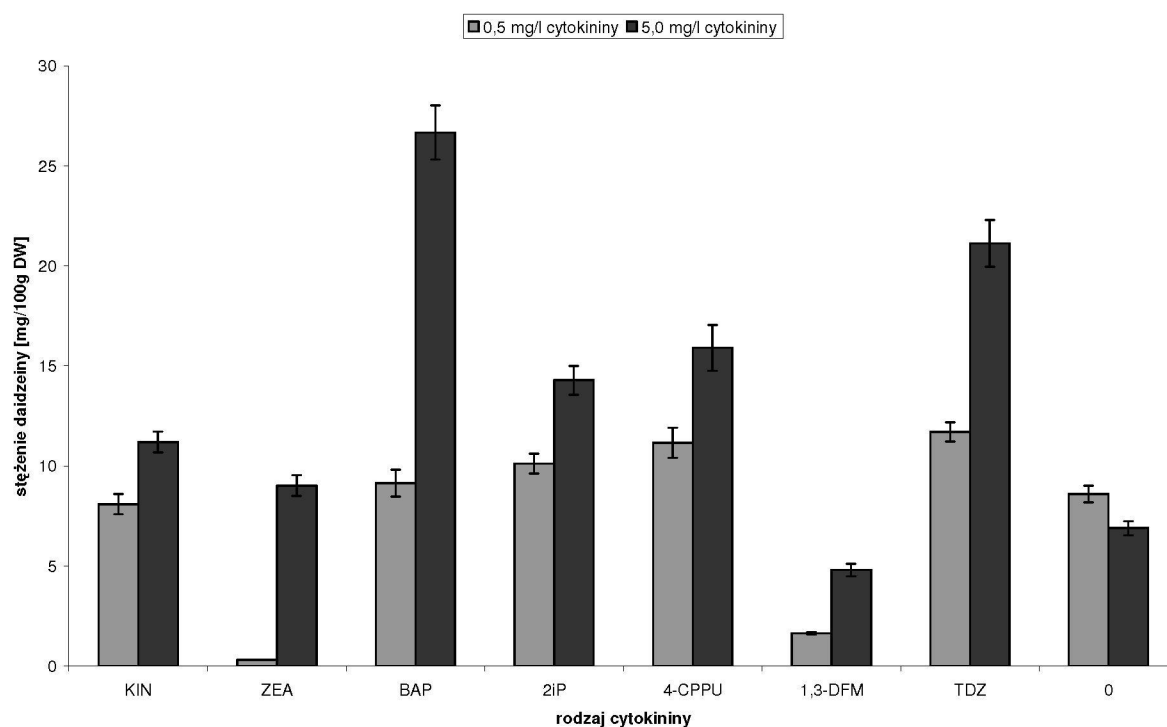
Ryc. 13. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na zawartość 7-O-diglukozydu genisteiny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 13. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the accumulation of genistein-7-O-diglucoside in *Genista tinctoria* callus.



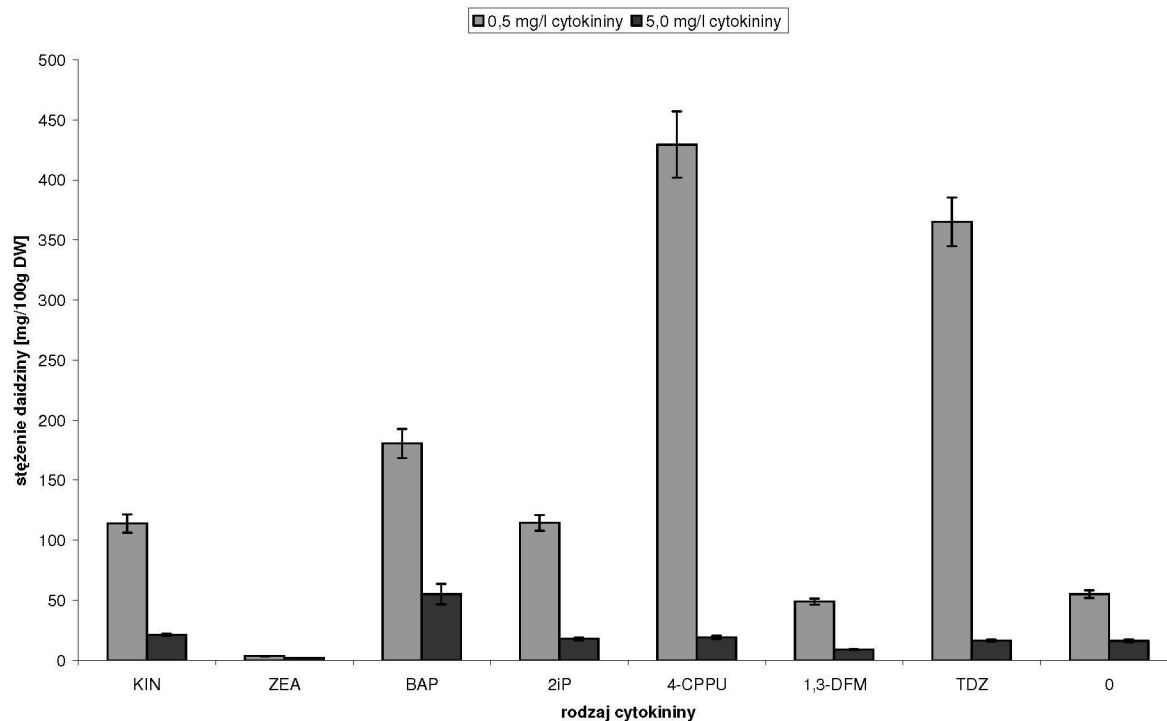
Ryc. 14. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na zawartość 7-O-glukozydu 2'-hydroksygenisteiny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 14. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the accumulation of 2'-hydroxygenistein-7-O-glucoside in *Genista tinctoria* callus.



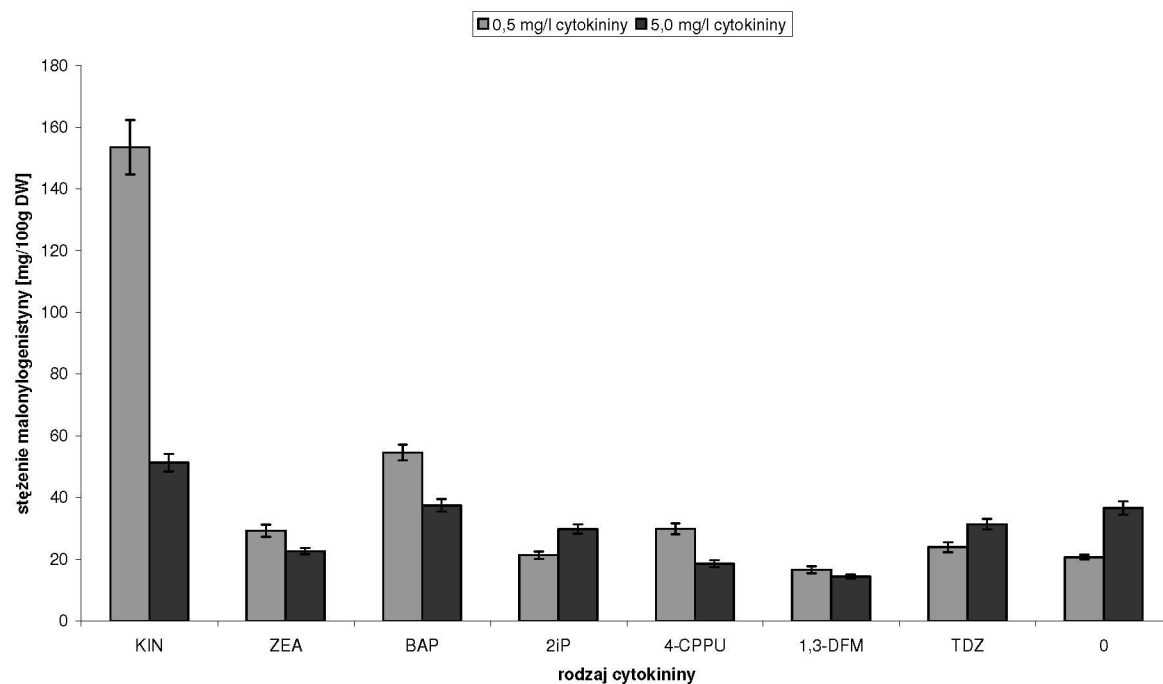
Ryc. 15. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na zawartość daidzeiny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 15. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the accumulation of daidzein in *Genista tinctoria* callus.



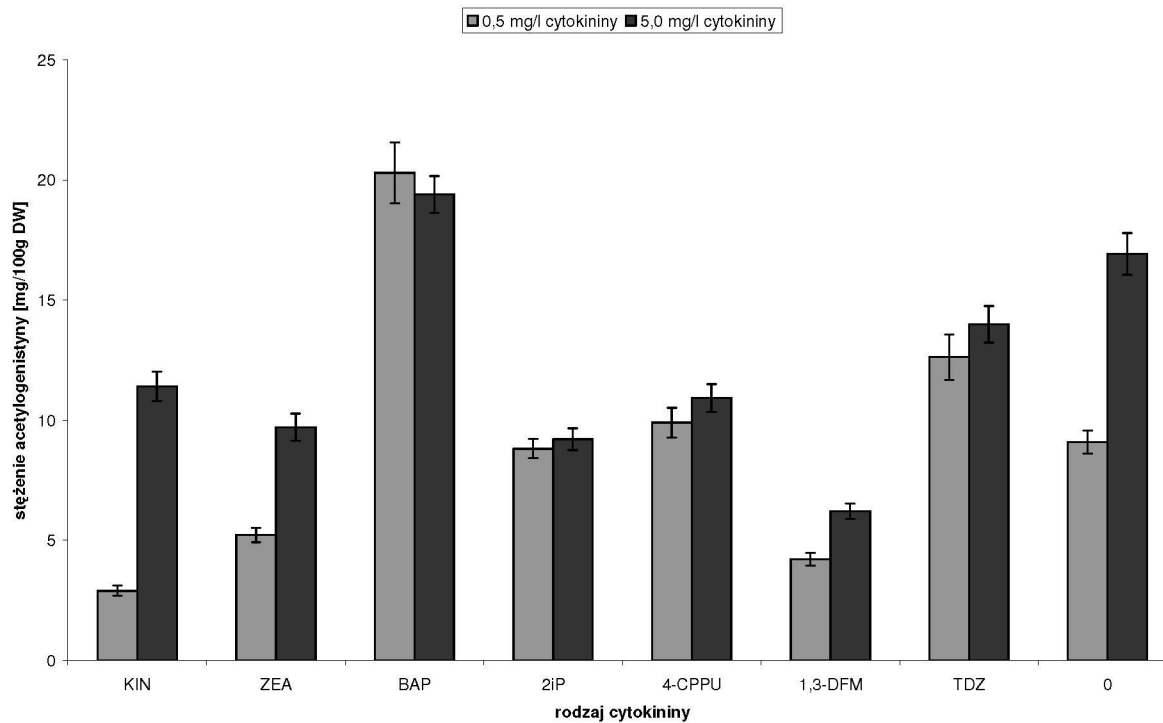
Ryc. 16. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na zawartość daidziny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 16. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the accumulation of daidzin in *Genista tinctoria* callus.



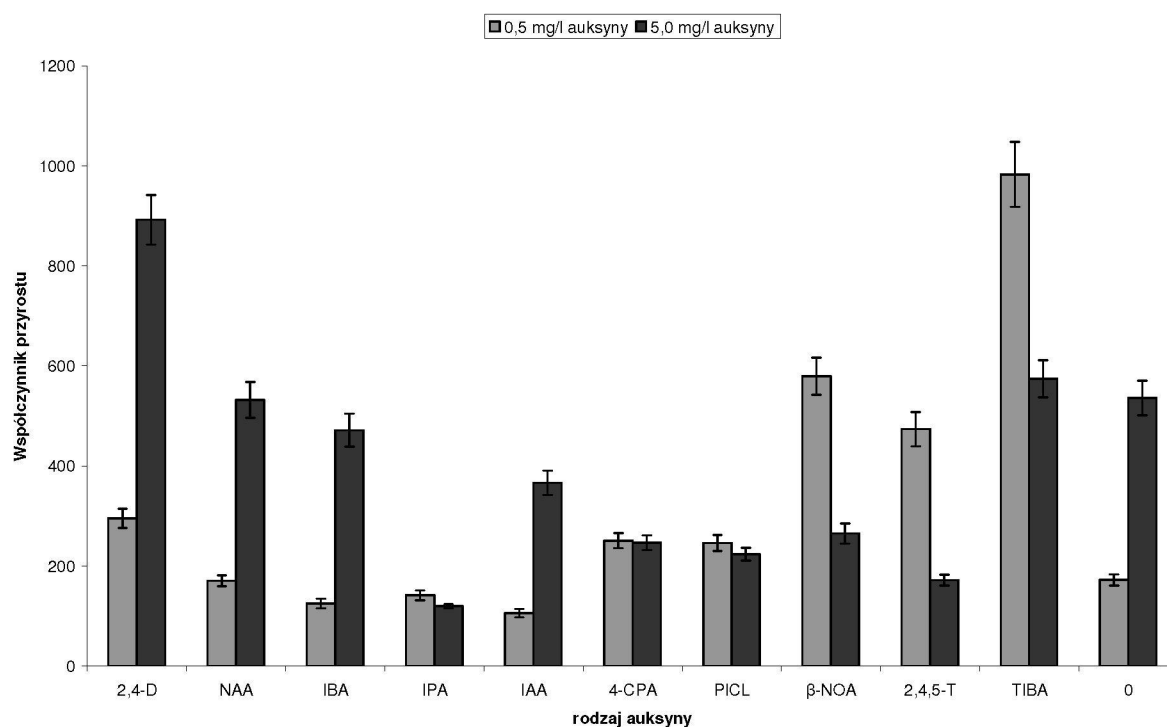
Ryc. 17. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na zawartość malonylogenistyny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 17. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the accumulation of genistin malonate in *Genista tinctoria* callus. *



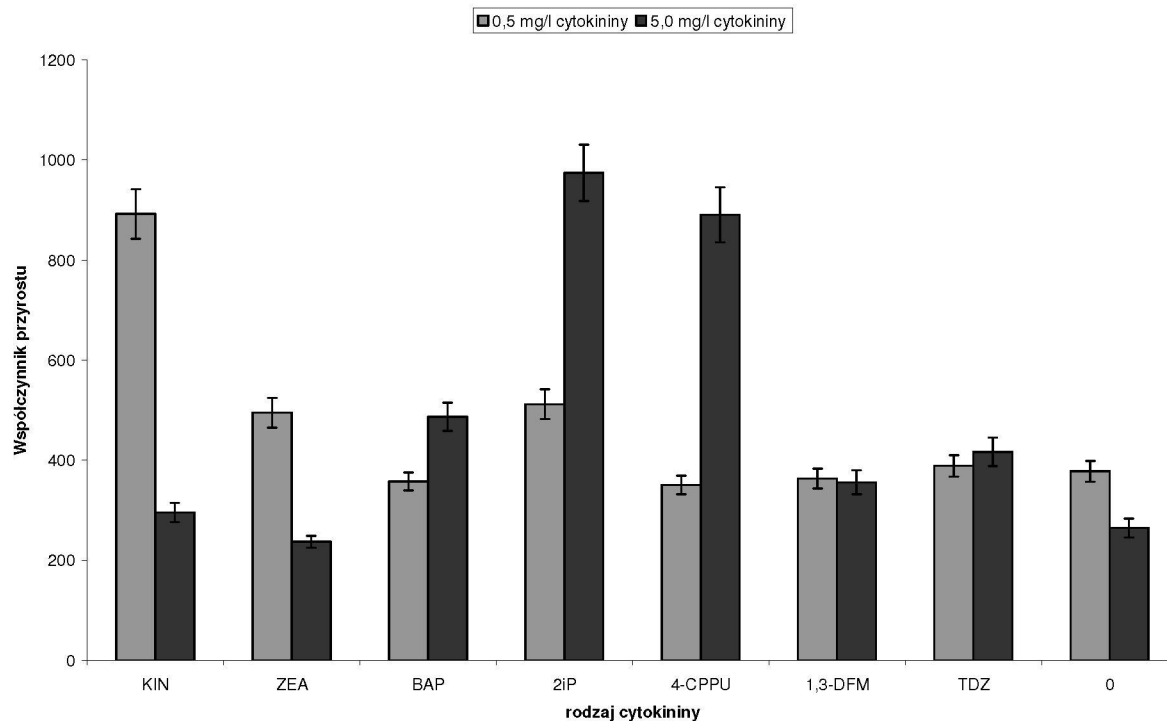
Ryc. 18. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na zawartość acetylogenistyny w kalusie *Genista tinctoria*.

Fig. 18. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the accumulation of genistin acetate in *Genista tinctoria* callus.



Ryc. 19. Wpływ określonych auksyn oraz ich stężenia na wartość współczynnika przyrostu kalusa *Genista tinctoria*.

Fig. 19. The effect of the various auxins and their concentrations on the value of the growth factor of *Genista tinctoria* callus.



Ryc. 20. Wpływ określonych cytokinin oraz ich stężenia na wartość współczynnika przyrostu kalusa *Genista tinctoria*.

Fig. 20. The effect of the various cytokinins and their concentrations on the value of the growth factor of *Genista tinctoria* callus.

Piśmiennictwo

1. Alfermann A.W., Petersen M., Natural product formation by plant cell biotechnology, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43 (1995) 199-205.
2. Arteca R.N., Chemistry, biological effects, and mechanism of action of plant growth substances, w Arteca R.N. (Ed.), *Plant growth substances- principles and application*, Chapman & Hall, New York, U.S.A., 1996, str. 47-95.
3. Barz W., Mackenbrock U., Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpanes in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 199-211.
4. Berlin J., Fecker L., Rügenhagen C., Sator C., Strack D., Witte L., Wray V., Isoflavone Glycoside Formation in Transformed and Non-Transformed Suspension and Hairy Root Cultures of *Lupinus polyphyllus* and *Lupinus hartwegii*, *Z. Naturforsch.* 46 c (1991) 725-734.
5. Botia J.M., Ortuño A., Sabater F., Acosta M., Sánchez-Bravo J., Uptake and decarboxylation of indole-3-acetic acid during auxin-induced growth in lupin hypocotyl segments, *Planta* 193 (1994) 224-231.
6. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A., Production of daidzein by callus cultures of *Psolarea* species and comparison with plant, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53 (1998) 35-40.
7. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant. Sci.* 161 (2001) 839-851.
8. Cacho M., Morán M., Corchete P., Fernández-Tárrago J., Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silybum marianum* (L.) Gaertn, *Plant Sci.* 144 (1999) 63-68.
9. Cotton C.M., Gramshaw J.W., Evans L.V., The effect of α -naphthalene acetic acid (NAA) and benzylaminopurine (BAP) on the accumulation of volatile oil components in cell cultures of Tarragon (*Artemisia dracunculus*), *J. Exp. Botany* 42 (1991) 377-386.
10. Dias A.C.P., Seabra R.M., Andrade P.B., Ferreres F., Fernands-Ferreira M., Xantone biosynthesis and accumulation in *calli* and suspended cells of *Hypericum androsaemum*, *Plant Sci.* 150 (2000) 93-101.
11. Dixon R.A., Bendall D.S., Changes in the levels of enzymes of phenylpropanoid and flavonoid synthesis during phaseollin production in cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*, *Physiol. Plant Pathol.* 13 (1978) 295-306.
12. Dixon R.A., Fuller K.W., Effects of synthetic auxin levels on phaseollin production and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L., *Physiol. Plant. Pathol.* 9 (1976) 299-312.
13. Dörnenburg H., Knorr D., Strategies for improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures, *Enz. Microbiol. Technol.* 17 (1995) 674-684.
14. Fang Y., Smith M.A.L., Pépin M.F., Benzyl adenine restores anthocyanin pigmentation in suspension cultures of wild *Vaccinium pahalae*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54 (1998) 113-122.
15. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Glebko L.I., Kulesh N.I., Muzarok T.I., Seletskaya L.D., Bulgakov V.P., Zhuravlev Yu.N., Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*, *Fitoterapia* 71 (2000) 365-372.
16. Fernandes-Ferreira M., Novais J.M., Pais M.S.S., Hormonal control of triterpenols synthesis in *Euphorbia characias* calli, *Bioresource Technol.* 39 (1992) 31-37.

17. Furmanowa M., Głowniak K., Sykłowska-Baranek K., Zgórk G., Józefczyk A., Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus cultures of *Taxus media* var. *Hatfieldii*, Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 49 (1997) 75-79.
18. Garnier F., Label P., Hallard D., Chenieux J.C., Rideau M., Hamdi S., Transgenic periwinkle tissues overproducing cytokinins do not accumulate enhanced levels of indole alkaloids, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45 (1996) 223-230.
19. Goossens J.F.V., Vendrig J.C., Effects of abscisic acid, cytokinins, and light on isoflavonoid phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* L., Planta 154 (1982) 441-446.
20. Grajek W., Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*, w: S. Malepszy (Ed.), Biotechnologia roślin, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 306-341.
21. Hagendoorn M.J.M., van der Plas L.H.W., Segers G.J., Accumulation of anthraquinones in *Morinda citrifolia* cell suspensions. A model system for the study of the interactions between secondary and primary metabolism, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38 (1994) 227-234.
22. Hill A.B., Statystyka dla lekarzy, PWN, Warszawa, 1961.
23. Hinderer W., Seitz H.U., Flavonoids, w: F. Constable (Ed.), Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol. 5, Academic Press. Inc. San Diego, U.S.A. 1988, pp. 23-48.
24. Holme I.B., Growth characteristics and nutrient depletion of *Miscanthus × ogiformis* Honda "Giganteus" suspension cultures, Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 53 (1998) 143-151.
25. Ilan A., Dougall D.K., The effect of growth retardants on anthocyanin production in carrot cell suspension cultures, Plant Cell Rep. 11 (1992) 304-309.
26. Ilan A., Zanewich K.P., Rood S.B., Dougall D.K., Gibberelic acid decreases anthocyanin accumulation in wild carrot cell suspension cultures but does not alter 3'-nucleotidase activity, Physiol. Plant. 92 (1994) 47-52.
27. Kieran P.M., MacLoughlin P.F., Malone D.M., Plant cell suspension cultures: some engineering considerations, J. Biotechnol. 59 (1997) 39-52.
28. Lucumi E., Łuczkiwicz M., Vera A., Hallard D., van der Heijden R., Verpoorte R., Alkaloid formation in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* after feeding of tryptamine and loganin, Biotechnol. Lett. 23 (20) (2001) 1694-1696.
29. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Gryniewicz G., Bączek T., Kaliszan R., Isoflavones of estrogenic activity in tissue cultures of *Glycine soja* and *Genista tinctoria*, w: R. Amado i in. (Ed.), Bioactive compounds in plant foods: health effects and perspectives for the food industry, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002, str. 147-148.
30. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Optimisation of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 65 (2001) 57-68.
31. Łuczkiwicz M., Zárate R., Dembińska-Migas W., Migas P., Verpoorte R., Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L., Plant Sci. 163 (2002) 91-100.
32. Merillon J.M., Quelhaz L., Doireau P., Chenieux J.C., Rideau M., Metabolic changes and alkaloid production in habituated and non-habituated cells of *Catharanthus roseus* grown in hormone free medium comparing hormone-deprived non-habituated cells with habituated cells, J. Plant Physiol. 134 (1989) 54-60.
33. Migas P., Łuczkiwicz M., Cisowski W., The influence of auxins on the biosynthesis of isoprene derivatives in callus cultures of *Vaccinium corymbosum* var. *bluecrop*, Z. Naturforsch. 61c (2006) 565-570.

34. Miller T., Orzeszyna S., Elementy Statystyki Medycznej, PZWL, Warszawa, 2004.
35. Moreno P.R.H., van der Heijden R., Verpoorte R., Cell and tissue cultures of *Catharantus roseus*: A literature survey, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 42 (1995) 1-25.
36. Mulder - Krieger Th., Verpoorte R., Svendsen A.B., Scheffer J.J.C., Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 13 (1988) 85-154.
37. Nakagawa K., Fukui H., Tabata M., Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus*, *Plant Cell Rep.* 5 (1986) 69-71.
38. Oksman-Caldentey K.M., Inzé D., Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites, *Trends Plant Sci.* 9 (9) (2004) 433-440.
39. Ortuño A., Oncina R., Botia J.M., Del Rio J.A., Regulation of the diosgenin expression in *Trigonella foenum-graecum* plants by different plant growth regulators, *Food Chem.* 65 (1999) 227-232.
40. Plant culture catalogue, products, equipment and technical information, Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A. 1996, str. 58-62.
41. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 101-153.
42. Roberts S.C., Shuler M.L., Large-scale plant cell culture, *Curr. Op. Biotechnol.* 8 (1997) 154-159.
43. Rout G.R., Samantaray S., Das P., In vitro manipulation and propagation of medicinal plants, *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 91-120.
44. Schenk R.U., Hildebrandt A.C., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.* 50 (1972) 199-204.
45. Scragg A.H., The problems associated with high biomass levels in plant cell suspensions, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 43 (1995) 163-170.
46. Seitz H.U., Hinderer W., Anthocyanins, w: F. Constable (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, vol. 5, Academic Press. Inc. San Diego, U.S.A. 1988, str. 49-69.
47. Skucińska B., Metoda kultury *in vitro*, w: S. Malepszy (Ed.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 19-84.
48. Stanisław A., Przystępny kurs statystyki w oparciu o program *STATISTICA PL* na przykładach z medycyny. Tom I. StatSoft Polska, Kraków, 1998.
49. Street H.E., Henshaw G.G., Introduction and Methods Employed in Plant Tissue Cultures, w E.N. Wilmer (Eds.), *Cell and Tissue Culture*, Vol. 3, Academic Press, London, New York, 1966.
50. Takami S., Takio S., Establishment of cell suspension cultures of *Hedwigia ciliata* and *Heteroscyphus bescherelei*, *J. Plant Physiol.* 130 (1987) 267-272.
51. Tucker G.A., Roberts J.A., Plant hormone protocols, w: J.M. Walker (Ed.), *Methods in molecular biology*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2000, str. 49-101.
52. van der Plas L.H.W., Eijkelboom C., Hagendoorn M.J.M., Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspension. Competition between secondary metabolite production and growth in a model system (*Morindia citrifolia*), *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 43 (1995) 111-116.
53. Wysockińska H., *Penstemon serrulatus* Menz. w hodowlach *in vitro*; wytwarzanie irydoidów oraz ocena ich właściwości antyproliferacyjnych – rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna w Łodzi, 1993, str. 102-104.

54. Yeoman M.M., Yeoman C.L., Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells, *New Phytol.* 134 (1996) 553-569.
55. Zhong J.J., Bai Y., Wang S.J., Effect of plant growth regulators on the growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*, *J. Biotechnol.* 45 (8) (1996) 227-234.

9. WPŁYW MORFOGENEZY NA AKUMULACJĘ FITOESTROGENÓW W KULTURACH *IN VITRO* *GENISTA TINCTORIA*

Wstęp

W wyniku doświadczeń biotechnologicznych opisanych szczegółowo w rozdz. 8, dotyczących modyfikacji pożywek eksperymentalnych w zakresie regulatorów wzrostu, opracowano optymalne warunki hodowli kalusów *G. tinctoria*, umożliwiające intensywny przyrost biomas z puszystej struktury, właściwych do wyprowadzenia kultur zawieszinowych.

Trzyletnia, stabilna, parenchymatyczna biomasa kalusowa *G. tinctoria*, hodowana na zoptymalizowanym podłożu Schenk-Hildebrandt'a, syntetyzowała jedną z największych ilości fitoestrogenów (10,45%), uzyskanych dotychczas w kulturach *in vitro* roślin wyższych [1,4,5,7,8,10,11,27,29].

Jak już wspomniano w poprzednim rozdziale, w ramach zasadniczego celu projektu habilitacyjnego, którym było opracowanie roślinnego systemu hodowlanego zdolnego do wybiórczej produkcji znacznych ilości fitoestrogenów, postanowiono wyprowadzić hodowle wytrząsane z kultur stacjonarnych *G. tinctoria*. Powyższa technika hodowlana, w porównaniu z kulturami agarowymi, stwarza możliwość pełniejszej kontroli i sterowania procesem doświadczalnym (dokarmianie, elicytacja oraz permeabilizacja biomas), a tym samym częściowo zapewnia zwiększenie akumulacji pożądaných wtórnych metabolitów w namnażanych tkankach [6,17,21]. Ponadto kultury wytrząsane, po adaptacji do hodowli w bioreaktorach, mogą być wykorzystywane, na skalę przemysłową, do produkcji połączeń biologicznie aktywnych [14,22,30]. W przypadku biomas *G. tinctoria* postanowiono otrzymać, w oparciu o odpowiednie kultury stacjonarne, hodowle płynne różniące się stopniem morfogenezy.

Wstępne badania nad kulturami *in vitro* roślin z rodzaju *Genista* dowiodły, że otrzymane biomasy kalusowe oraz pędowe zawierały nawet 3-5 krotnie więcej fitoestrogenów niż części nadziemne odpowiednich roślin gruntowych (rozdz. 6 i 7). Fakt ten związany był bezpośrednio z wprowadzeniem roślin do kultur *in vitro* i dotyczył zarówno aglikonów jak i glikozydów izoflawonoidowych. W przypadku estrowych połączeń genisteny, w kalusach roślin z rodzaju *Genista* oznaczono mniejsze stężenia omawianych związków niż w odpowiednich roślinach gruntowych (rozdz. 6). Stacjonarne kultury pędowe janowców syntetyzowały natomiast więcej estrów niż biomasy kalusowe oraz części nadziemne roślin macierzystych (rozdz. 7). Wydaje się więc wysoce prawdopodobnym, że stopień cytodyferencjacji materiału roślinnego, na równi z wprowadzeniem janowców do kultur *in vitro*, wpłynął na ilość oraz typ syntetyzowanych połączeń izoflawonoidowych.

Wobec powyższego uznano, że możliwa jest regulacja przebiegu biosyntezy izoflawonów, w kulturach *in vitro* *G. tinctoria*, poprzez zmianę statusu morfologicznego badanego materiału roślinnego. Postanowiono więc otrzymać płynne hodowle *G. tinctoria* różniące się zasadniczo stopniem cytodyferencjacji, tj. kultury organowe (pędowe i korzeniowe) oraz zawieszinowe (biomasa parenchymatyczna oraz embrionalna). Realizacja zaplanowanego doświadczenia umożliwiłaby nie tylko ewentualne zwiększenie produkcji izoflawonów, ale również przebadanie wpływu morfogenezy na biosyntezę poszczególnych izoflawonów, różniących się stopniem aktywności fitoestrogennej [8,15,20].

Dla wyprowadzonych kultur wytrząsanych postanowiono opracować profile wzrostowe oraz prześledzić kinetykę produkcji poszczególnych izoflawonów w cyklu hodowlanym, z uwzględnieniem powiązań między metabolitami znajdującymi się w tym samym łańcuchu przemian biogennych. Ponadto kultury organowe i zawiesinowe porównano w zakresie produktywności oraz specyficznej produktywności badanych połączeń. W efekcie możliwe było wyselekcjonowanie kultury *G. tinctoria* charakteryzującej się największym potencjałem w zakresie produkcji biomasy tkankowej oraz połączeń izoflawonoidowych.

Materiały i metody

Kultury zawiesinowe

W celu wyprowadzenia kultur zawiesinowych *G. tinctoria* około 2g mechanicznie rozdrobnionej, puszystej biomasy kalusowej (rozd. 8), umieszczano w 250 ml kolbach Erlenmeyer'a zawierających 50 ml płynnej pożywki doświadczałnej. W hodowli zawiesinowej janowca barwierskiego posłużono się podłożem Schenk - Hildebrandt'a (SH) [23] zawierającym 3% (w/v) sacharozy, $1,0 \mu\text{mol l}^{-1}$ TIBA (kwas 2,3,5-trijodobenzoesowy) i $23,23 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny. Kolby z zainokulowaną biomasą umieszczono następnie na wytrząsarce rotacyjnej i kultywowano, w warunkach standardowych dla wszystkich hodowli płynnych *G. tinctoria*, przez okres trzech tygodni. Powstałą homogeną zawiesinę oddzielano następnie od większych agregatów komórkowych na drodze sedimentacji, mieszano w stosunku 1:1 ze świeżym podłożem doświadczalnym i umieszczano na wytrząsarce na okres 7 dni. Przygotowana w ten sposób podstawowa zawiesina janowca barwierskiego posłużyła do dalszych eksperymentów biotechnologicznych.

Doświadczenie mające na celu określenie profilu wzrostowego oraz kinetyki produkcji poszczególnych związków izoflawonoidowych w kulturze zawiesinowej *G. tinctoria* prowadzono w cyklu 32-dniowym, wykorzystując płynne, zmodyfikowane podłoże SH, o składzie podanym powyżej. Każdorazowo, w 250 ml kolbach Erlenmayer'a, zawierających po 100 ml zmodyfikowanej pożywki SH, umieszczano około 5 g biomasy parenchymatycznej *G. tinctoria* (3 serie – 17 kolb w każdej) i kultywowano w warunkach standardowych dla wszystkich kultur wytrząsanych *G. tinctoria*.

Wytrząsane kultury embrionów

Biomasa inokularną, służącą do wyprowadzenia wytrząsanej hodowli embrionalnej, był embriogeny kalus *G. tinctoria* hodowany na stacjonarnej pożywce SH [23] suplementowanej sacharozą (3%), $2,46 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA (kwas indolilo-3-masłowy) oraz $22,19 \mu\text{mol l}^{-1}$ BAP (6-benzyloaminopuryna) [12]. W celu zainicjowania hodowli wytrząsanej około 2g kalusa embriogenego umieszczano w 250 ml kolbach Erlenmeyer'a zawierających 50 ml zmodyfikowanego, płynnego podłoża SH, o składzie podanym powyżej. Kolby z zainokulowaną biomasą umieszczono następnie na wytrząsarce rotacyjnej i kultywowano w warunkach standardowych dla wszystkich hodowli płynnych *G. tinctoria*. Powstające globularne embriony oddzielano mechanicznie od zwartej biomasy kalusowej i pasażowano do świeżego podłoża SH, w odstępach czterotygodniowych, aż do momentu uzyskania zawiesiny złożonej jedynie z kulistych embrionów (cztery miesiące).

Podobnie jak w przypadku kultury zawiesinowej, doświadczenie mające na celu określenie profilu wzrostowego oraz kinetyki produkcji poszczególnych związków izoflawonoidowych w hodowli embrionalnej *G. tinctoria* prowadzono w cyklu 32-dniowym, wykorzystując płynne, zmodyfikowane podłoże SH, o składzie podanym powyżej. Każdorazowo, w 250 ml

kolbach Erlenmeyer'a, zawierających po 100 ml zmodyfikowanej pożywki SH, umieszczano około 5 g biomasy embrionalnej *G. tinctoria* (3 serie – 17 kolb w każdej) i kultywowano w warunkach standardowych dla wszystkich kultur wytrząsanych *G. tinctoria*.

Wytrząsane kultury pędowe

Do wyprowadzenia wytrząsanych hodowli pędowych posłużyły stacjonarne kultury mikrośrodków *G. tinctoria* kultywowane na zmodyfikowanym podłożu SH [23], zawierającym $9,84 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP (6- $\{\gamma\text{-}\gamma\text{-dimetyloallilo}\}$ -aminopuryna), $0,99 \mu\text{mol l}^{-1}$ TDZ (tidiazuron) oraz 3% sacharozy (rozd. 7). W 250 ml kolbach Erlenmeyer'a, zawierających 50 ml płynnej pożywki SH [23] suplementowanej $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA (kwas indolilo-3-masłowy) oraz 3% sacharozy, umieszczano ok. 5 g pędowej kultury stacjonarnej (fragmenty złożone z ok. 20 primordów pędowych) i wytrząsano, w warunkach standardowych dla kultur wytrząsanych *G. tinctoria*, przez okres czterech tygodni. Powstała w tym czasie podstawowa, płynna hodowla janowca barwierskiego, złożona z długich, dobrze rozgałęzionych, kilkunastocentymetrowych pędów wykorzystywana była do dalszych doświadczeń biotechnologicznych.

Profil wzrostowy oraz kinetykę produkcji poszczególnych związków izoflawonoidowych, w płynnej hodowli pędowej *G. tinctoria*, określano w cyklu 76-dniowym, wykorzystując płynne, zmodyfikowane podłoże SH, zawierające $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz 3% sacharozy. Każdorazowo, w 250 ml kolbach Erlenmeyer'a, zawierających po 100 ml zmodyfikowanej pożywki SH, umieszczano około 5 g 2 cm fragmentów pędowych *G. tinctoria* (3 serie po 39 kolb w każdej) i kultywowano w warunkach standardowych dla wszystkich kultur wytrząsanych *G. tinctoria*.

Wytrząsane kultury korzeniowe

Podstawowe, wytrząsane hodowle korzeniowe wyprowadzono z kalusa *G. tinctoria*, wykazującego spontaniczną tendencję do ryzogenezy (rozd. 6). W tym celu odcięte od biomasy kalusowej, 2 cm fragmenty korzeniowe przenoszono do 250 ml kolb Erlenmeyer'a zawierających 50 ml płynnego podłoża SH [23] suplementowanego $80,55 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA (kwas naftylo-1-octowy), $0,46 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny, $260,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ kwasu cytrynowego i 3% (w/v) sacharozy [12]. Wytrząsane, inicjalne hodowle korzeniowe pasażowano w odstępach czterotygodniowych aż do momentu powstania aktywnie rosnącej kultury, złożonej z jasnobrunatnej, zwartej matrycy z wyrastającymi jasnokremowymi korzeniami, posiadającymi liczne odgałęzienia boczne (trzy miesiące). Otrzymana, pierwotna kultura korzeniowa *G. tinctoria* wykorzystywana była do dalszych doświadczeń biotechnologicznych.

W celu określenia profilu wzrostowego oraz produkcji związków izoflawonoidowych w wytrząsanej kulturze korzeniowej, ok. 5 g biomasy (fragmenty macierzy z korzeniami bocznymi) inokulowano do 250 ml kolb Erlenmeyer'a zawierających 100 ml płynnego, zmodyfikowanego podłoża SH, o składzie podanym powyżej (3 serie – 17 kolb w każdej). Biomasy korzeniowe kultywowano w warunkach standardowych dla wszystkich kultur wytrząsanych *G. tinctoria*.

Kultury organowe (pędy i korzenie) oraz zawiesinowe (embriony i biomasa parenchymatyczna) *G. tinctoria* prowadzono w szklanych kolbach Erlenmeyer'a, zamykanych korkami z pianki silikonowej (*Shine-Etsu-Polymer Co.* – Japonia), na wytrząsarce rotacyjnej (INNOVA 2300 – New Brunswick Scientific – 150 rpm), w warunkach oświetlenia ciągłego (natężenie światła- $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – lampy jarzeniowe Philips TLD 35W x 3), w temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Rosnące aktywnie biomasy janowca barwierskiego zbierano w odstępach dwudniowych (każdorazowo po trzy kolby), aż do zakończenia cyklu hodowlanego. Po odsączeniu od podłoża

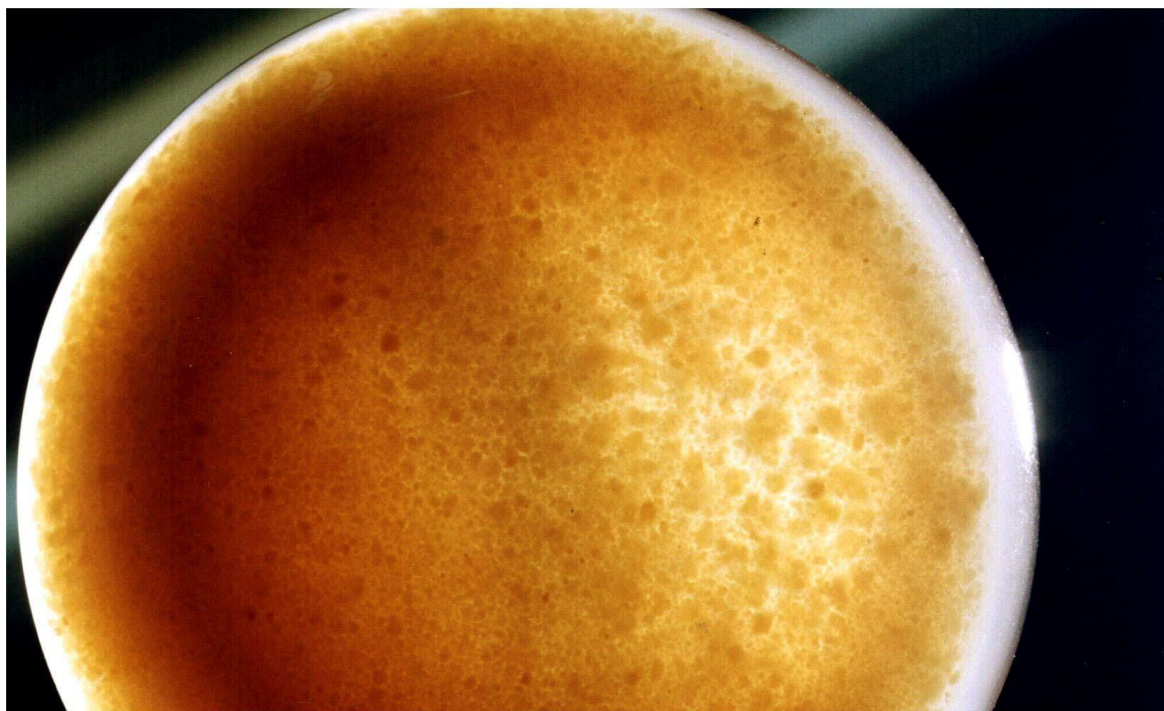
wzrostowego i przemyciu wodą redestylowaną biomasy *G. tinctoria* przeznaczono do badań biotechnologicznych (oznaczenie świeżej i suchej masy tkankowej) oraz fitochemicznych (jakościowa i ilościowa analiza frakcji izoflawonoidowej). Otrzymany, w wyniku badań biotechnologicznych, materiał roślinny wraz z płynnymi pożywkami, pochodzącymi z poszczególnych dni eksperymentu, suszono przez 48 h, do stałej masy, na drodze liofilizacji (próżnia 1×10^{-3} mbar wytworzona przez liofilizator LYOVAC GT2 firmy FIN-AQUA SANTASALO-SOHLBERG Co – Finlandia). Zliofilizowane biomasy janowca oraz podłoża hodowlane przeznaczono do badań fitochemicznych na obecność bioflawonoidów. Uzyskane wyniki (świeża masa – FW, sucha masa – DW oraz zawartość izoflawonów w materiale roślinnym i pożywkach) stanowią średnie arytmetyczne pochodzące z trzech próbek hodowlanych $\pm$ S. D.

Jakościową oraz ilościową analizę frakcji izoflawonoidowych, występujących w poszczególnych kulturach wytrząsanych *G. tinctoria*, przeprowadzono techniką HPLC według procedury opisanej szczegółowo w rozdziale 6.

Omówienie wyników

Wzrost oraz produkcja izoflawonów w zawieszynie parenchymatycznej G. tinctoria

Produkcję związków izoflawonoidowych oraz profil wzrostowy zawieszyny *G. tinctoria* określono w kulturze wytrząsanej, prowadzonej w cyklu 32 dniowym (ryc. 1).

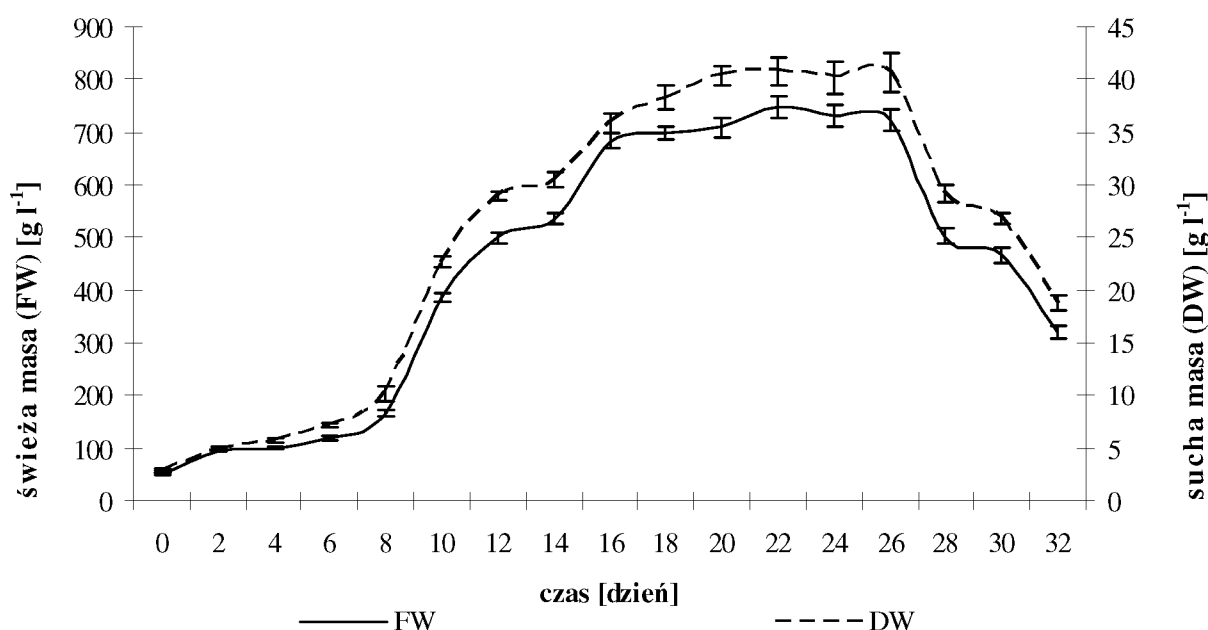


Ryc. 1. Wytrząsana kultura zawieszinowa *Genista tinctoria*.

Fig. 1. *Genista tinctoria* suspension culture.

Pożywką z wyboru było zmodyfikowane podłoże SH [23] zawierające 3% (w/v) sacharozy, $1,0 \mu\text{mol l}^{-1}$ TIBA oraz $23,23 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny. Warunkowało ono, w przypadku stacjonarnej kultury kalusowej janowca barwierskiego, maksymalną produkcję izoflawonów oraz intensywny przyrost namnażanej biomasy (rozdz. 8).

Na podstawie ilości świeżej (FW) i suchej (DW) masy tkankowej, otrzymanej w poszczególnych dniach 32-dniowego eksperymentu, można stwierdzić, że zawiesina *G. tinctoria* charakteryzuje się szybkim wzrostem i znacznym przyrostem biomasy (ryc. 2). Maksymalną ilość zawiesiny, równą $748,6 \text{ g l}^{-1}$ FW i $40,8 \text{ g l}^{-1}$ DW uzyskano w 22 dniu hodowli, otrzymując około 15-krotny wzrost masy w stosunku do *inoculum* (50 g l^{-1} FW). Rezultat ten wskazuje, że biomasa *G. tinctoria* jest interesująca z technologicznego punktu widzenia. Niestety między 28 i 32 dniem eksperymentu kremowo-biała zawiesina wyraźnie zamierała, co przejawiało się spadkiem masy tkankowej i wyraźnym brunatnieniem hodowli (ryc. 2). W profilu wzrostowym kultury można wyróżnić wszystkie charakterystyczne etapy [25], z dość długą fazą wzrostu logarytmicznego (4 dni), co prawdopodobnie wynika z wielkości *inoculum* [24]. W tym miejscu należy zaznaczyć, że profile wzrostowe zawiesiny *G. tinctoria* wykreślone zarówno na podstawie świeżej (FW) jak i suchej (DW) masy wyraźnie się pokrywały (ryc. 2).



Ryc. 2. Profil wzrostowy zawiesiny *Genista tinctoria* rosnącej w cyklu 32-dniowym (pożywka SH z dodatkiem $1,0 \mu\text{mol l}^{-1}$ TIBA, $23,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny i 3% (m/v) sacharozy; oświetlenie ciągłe $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temp, $25 \pm 2^\circ \text{C}$).

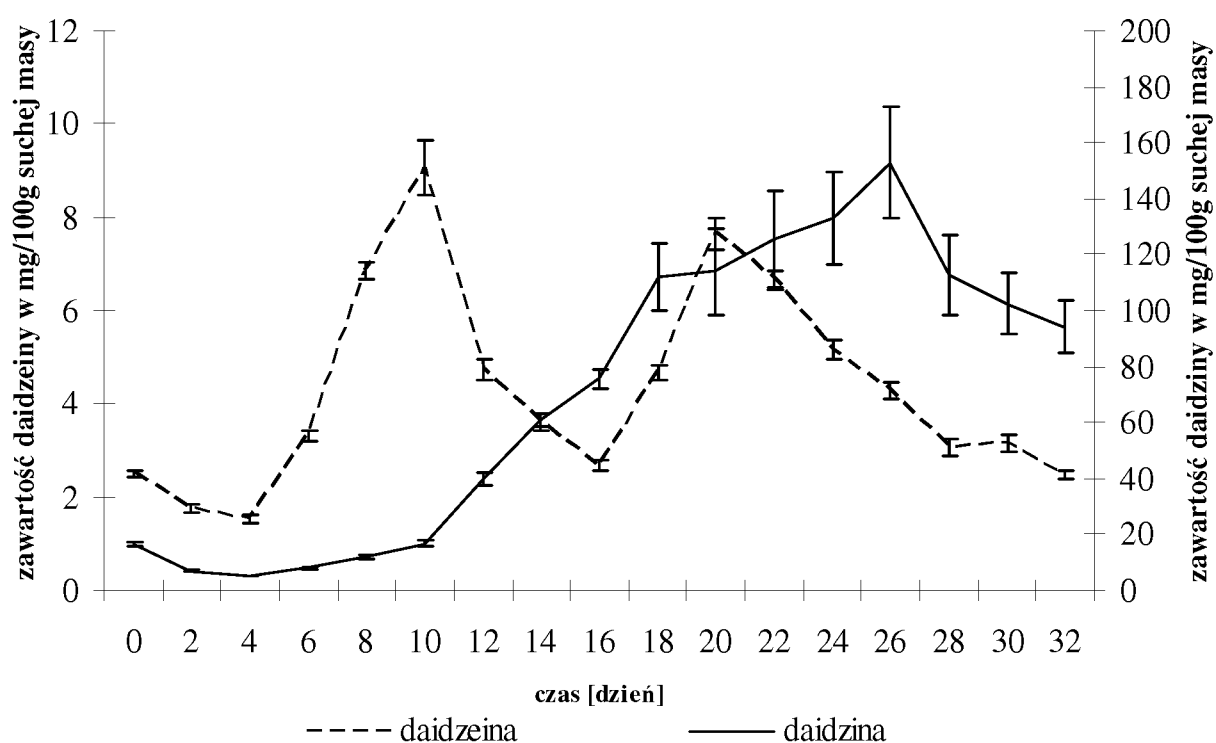
Fig. 2. Changes in fresh (FW) and dry (DW) weight of *Genista tinctoria* suspension cultures grown in liquid SH medium, supplemented with $1.0 \mu\text{mol l}^{-1}$ TIBA, $23.23 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetin and 3% (w/v) sucrose, for 32 days, under continuous light.

W wyniku przeprowadzonego doświadczenia stwierdzono, że przeniesienie kalusa janowca barwierskiego z hodowli stacjonarnej do płynnej kultury wytrząsanej wpłynęło stymulująco na produkcję poszczególnych połączeń izoflawonoidowych w badanej biomacie (tab. 1) (rozdz. 8). Rosnąca aktywnie zawiesina syntetyzowała zespół 14 izoflawonów, tożsamy z związkami zidentyfikowanymi uprzednio w biomacie kalusowej (rozdz. 8). Jednocześnie z opisywanej kultury uzyskano znacznie więcej izoflawonów niż z płynnych hodowli pędowych i embrionalnych *G. tinctoria* (tab. 1-4).

Analiza chromatograficzna HPLC pożywek pochodzących z poszczególnych dni eksperymentu wykazała, że wszystkie analizowane wtórne metabolity były, w przypadku zawiesiny

janowca barwierskiego, magazynowane wewnątrzkomórkowo. Podstawowymi składnikami zespołu izoflawonoidowego w badanej kulturze były: genisteina, genistyna, 7-O-diglukozyd genisteiny, 2'-hydroksy-7-O-glukozyd genisteiny, 6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny, 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny, daidzeina i daidzina (tab. 1). Zawartość powyższych związków oznaczano w biomasach janowca w 32 dniowym cyklu hodowlanym, ustalając zależności między metabolitami znajdującymi się w tym samym łańcuchu przemian biogenych [2].

W początkowych dniach eksperymentu wszystkie oznaczane izoflawony występowały, w zawiesinie, w mniejszych stężeniach niż w *inoculum* (tab. 1). Wiąże się to prawdopodobnie z przystosowaniem biomasy do nowych warunków hodowlanych [26]. Zawiesinę *G. tinctoria* charakteryzują dwa maksima akumulacji podstawowych aglikonów zespołu tj. daidzeiny i genisteiny (ryc. 3 i 4). Podczas gdy pierwsze z nich przypada, dla obydwu związków, na 10 dzień hodowli (142,7 mg genisteiny w 100 g DW i 9,08 mg daidzeiny w 100 g DW) to drugie dla daidzeiny (20 dzień – 7,65 mg/100 g DW) występuje z dwudniowym wyprzedzeniem w stosunku do genisteiny (26 dzień – 91,2 mg/100 g DW; tab. 1).

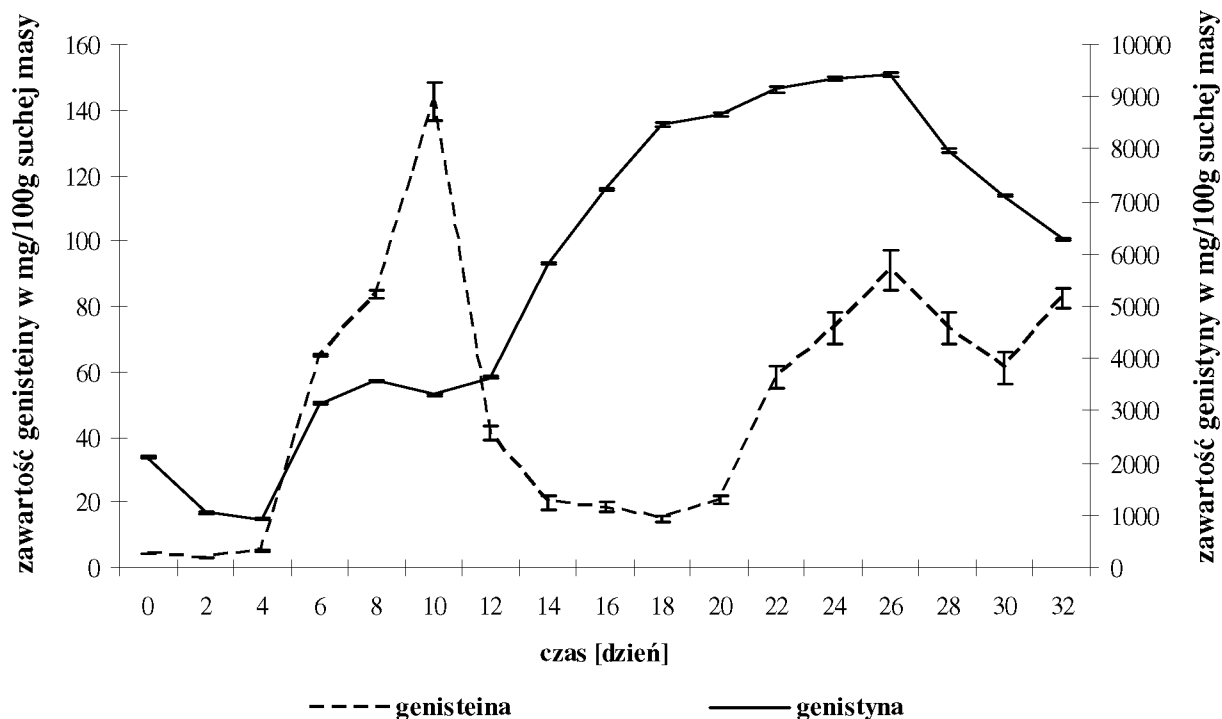


Ryc. 3. Zawartość daidzeiny i daidziny w kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* (stężenie metabolitów w mg/100g suchej masy roślinnej).

Fig. 3. Daidzein and daidzin concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Interesująca wydaje się również zależność między stężeniami daidzeiny i genisteiny a odpowiednimi monoglikozydami, w kolejnych dniach hodowli. W przypadku obydwu par związków na uwagę zasługuje fakt znacznego wzrostu stężenia glikozydów w dniach od 12 do 18, kiedy to zawartość aglikonów w zawiesinie maleje (ryc. 3 i 4). Z uwagi na powyższe można przypuszczać, że w omawianym przedziale czasowym, biosynteza aglikonów *de novo* przebiega znacznie wolniej niż ich glikozydacja do odpowiednich monoglikozydów. Najintensywniejszą akumulację daidziny i genistyny zaobserwowano pod koniec fazy stacjonarnej

i na początku fazy zamierania (ryc. 2-4). Następnie, w zawiesinie, stwierdzono niewielki spadek stężenia obydwu związków, trwający aż do końca eksperymentu (ryc. 3 i 4).

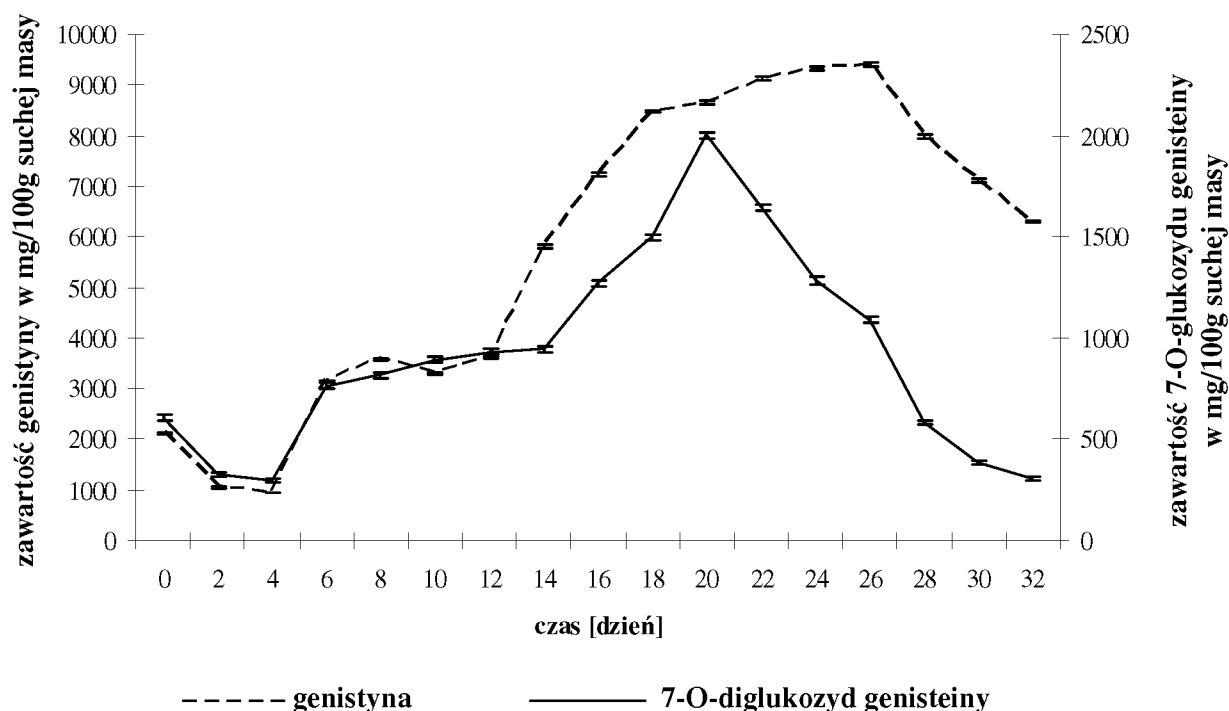


Ryc. 4. Zawartość genisteiny i genistyny w kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* (stężenie metabolitów w mg/100g suchej masy roślinnej).

Fig. 4. Genistein and genistin concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Opisywane zjawisko wskazuje, że proces biosyntezy izoflawonów, w zawiesinie *G. tinctoria* realizowany był przede wszystkim od momentu ustania intensywnego przyrostu podstawowej materii roślinnej, co wiązało się prawdopodobnie ze specyfiką magazynowania badanych związków w wakuolach [8]. W związku z powyższym, obok daidziny (152 mg/100 g DW), w 26 dniu hodowli osiągnięto maksymalne stężenie podstawowego metabolitu kultury zawiesinowej *G. tinctoria*, a mianowicie genistyny (9414,7 mg/100 g DW – tab. 1). W tym miejscu należy zaznaczyć, że uzyskana, w zawiesinie *G. tinctoria*, zawartość genistyny jest znacznie wyższa od stężeń pojedynczych połączeń izoflawonoidowych, otrzymanych dotychczas w kulturach *in vitro* roślin wyższych [10].

Drugim, pod względem ilości, metabolitem zawiesiny *G. tinctoria* był 7-O-diglukozyd genisteiny syntetyzowany intensywnie w fazie wzrostu liniowego i początkowych dniach fazy stacjonarnej (2003 mg/100 g DW – tab. 1). Stwierdzono wyraźną zależność w stężeniach mono- i diglukozydu genisteiny między 20 i 26 dniem eksperymentu. Spadek ilości diglukozydu genisteiny w biomacie był wtedy wyraźnie skorelowany ze wzrostem stężenia genistyny (monoglukozyd) (ryc. 5). Porównując powyższe dane z produkcją genisteiny (aglikon) można zauważyć, że maksymalna akumulacja genistyny, obserwowana w dniu 26 (9414,7 mg/100 g DW) wiąże się prawdopodobnie nie tylko z pierwotną glikozydacją aglikonu, ale również z hydrolitycznym rozpadem diglukozydu. Jako, że w opisywanych doświadczeniach nie określano aktywności odpowiednich enzymów stwierdzenie takie może pozostać jedynie w sferze przypuszczeń.



Ryc. 5. Zawartość genistyny i 7-O-diglukozydu genisteiny w kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* (stężenie metabolitów w mg/100g suchej masy roślinnej).

Fig. 5. Genistin and genistein-7-O-diglucoside concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

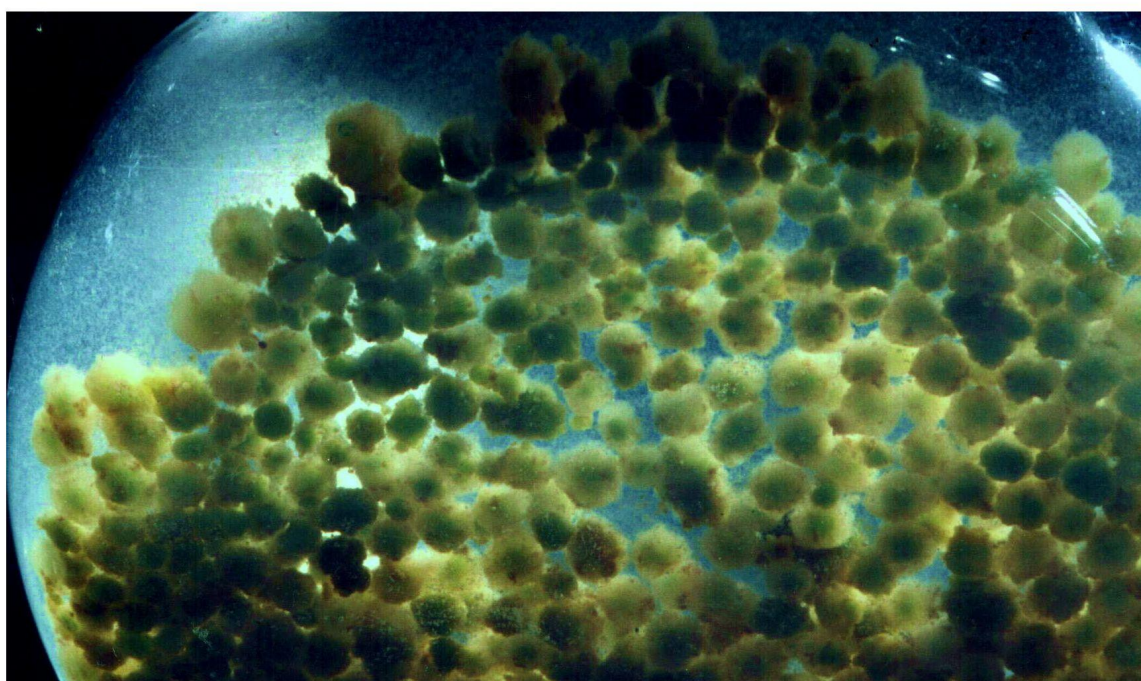
Estrowe pochodne genisteiny tj. 6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny (malonylogenistyna) i 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny (acetylogenistyna), akumulowane były, w największych stężeniach, w końcowych dniach fazy stacjonarnej (tab. 1). Ilość ich była jednak znacznie niższa niż w przypadku ziela rośliny gruntowej i stacjonarnych kultur pędowych *G. tinctoria* (rozdz. 7 i 8). Na uwagę zasługuje drastyczny spadek stężenia malonylogenistyny w ostatnich dwóch dniach doświadczenia (z 74,4 mg do 41,3 mg/100 g DW) skorelowany z niewielkim wzrostem zawartości genisteiny (32 dzień – 82,5 mg/100 g DW; tab.1).

Jak powszechnie wiadomo malonian genistyny, w roślinach z rodziny *Fabaceae*, jest formą magazynową genisteiny, która jako fitoaleksyna jest uwalniana, na drodze hydrolizy, z połączenia estrowego, w sytuacjach biotycznego lub abiotycznego stresu [2,3,18]. Jeżeli gwałtowne zamieranie tkanki (dzień 28-32) będziemy rozpatrywać w kategoriach warunków stresowych to wzajemne relacje między aglikonem i estrem malonowym genistyny można wytłumaczyć właśnie jako skutek wystąpienia mechanizmu o charakterze elicytacji abiotycznej [3].

2'-hydrokso-7-O-glukozyd genisteiny, będący metabolitem pośrednim, w szlaku biogenym, między prostymi izoflawonami a kumestanami [2,8,9], akumulowany był w największych ilościach również w końcowych dniach doświadczenia (447,65 mg/100 g DW – 30 dzień; tab. 1). Obecność powyższego metabolitu wskazuje, że kultury zawiesinowe *G. tinctoria* posiadają znaczny potencjał biogeny w kierunku biosyntezy zarówno prostych, jak i złożonych fitoestrogenów [3].

Wzrost oraz produkcja izoflawonów w wytrząsanej kulturze embrionalnej *G. tinctoria*

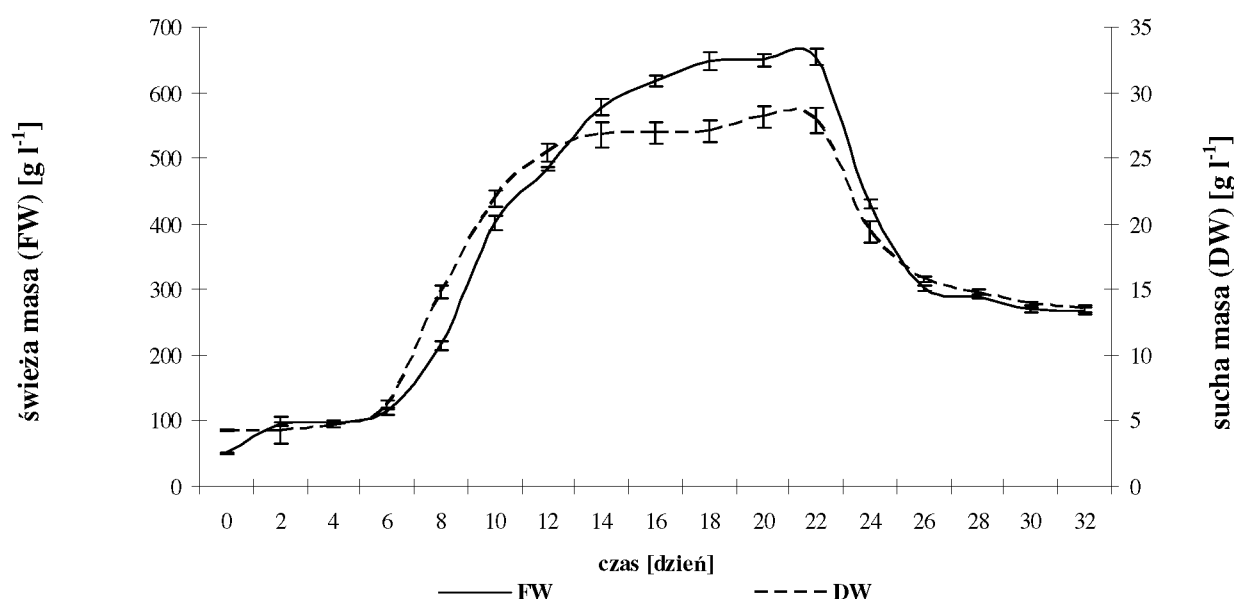
Płynną kulturę embrionów *G. tinctoria* wyprowadzono z kalusa powyższej rośliny, rosnącego na stacjonarnej pożywce SH [23] z dodatkiem sacharozy (3%), 2,46 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz 22,19 $\mu\text{mol l}^{-1}$ BAP. Na podłożu o takim składzie pierwotna, parenchymatyczna biomasa kalusowa różnicowała się w drobne, jasnozielone globularne embriony, tracąc jednocześnie kremową barwę i puszystą strukturę [12]. Wysokie stężenie BAP w połączeniu z IBA obniżyło tendencję powstających embrionów do dalszej morfogenezy w kierunku odtwarzania tkanki pędowej. Ponadto, na powyższym podłożu, otrzymane embriony nie przekształcały się ponownie w puszysty kalus parenchymatyczny [12]. W rezultacie, zgodnie z celem badań, uzyskano biomasę będącą pod względem cytodyferencjacji, stadium pośrednim między zawiesiną parenchymatyczną a hodowlą organową [16]. Składała się ona z pierwotnych embrionów globularnych oraz sercowatych w stosunku 90:10 (ryc. 6).



Ryc. 6. Wytrząsana kultura embrionalna *Genista tinctoria*.

Fig. 6. *Genista tinctoria* embryo culture.

W 32 dniowym cyklu hodowlanym kolejne fazy wzrostu, przypadające na poszczególne dni hodowli pokrywały się niemal zupełnie z profilem wzrostowym zawiesiny *G. tinctoria* (ryc. 2 i 7). Opisywana kultura embrionalna dostarczyła jednak znacznie mniej biomasy. Jest to szczególnie widoczne w przypadku suchej masy roślinnej (40,8 g l^{-1} zawiesina; 27,9 g l^{-1} embriony) (ryc. 2 i 7). Zaobserwowane zjawisko wskazuje na to, że w przypadku kultury embrionalnej namnażane komórki przestały rosnąć wcześniej niż to miało miejsce w hodowli zawiesinowej. Dalszy wzrost ilości świeżej masy w kulturze embrionów, nie skorelowany z przyrostem suchej masy tkankowej, związany był prawdopodobnie z powiększaniem rozmiaru poszczególnych komórek hodowli i tym samym ich płynnej zawartości. W rezultacie, kultura embrionalna *G. tinctoria*, dostarczająca dwukrotnie mniej suchej masy tkankowej niż zawiesina, jest mniej interesująca z technologicznego punktu widzenia.

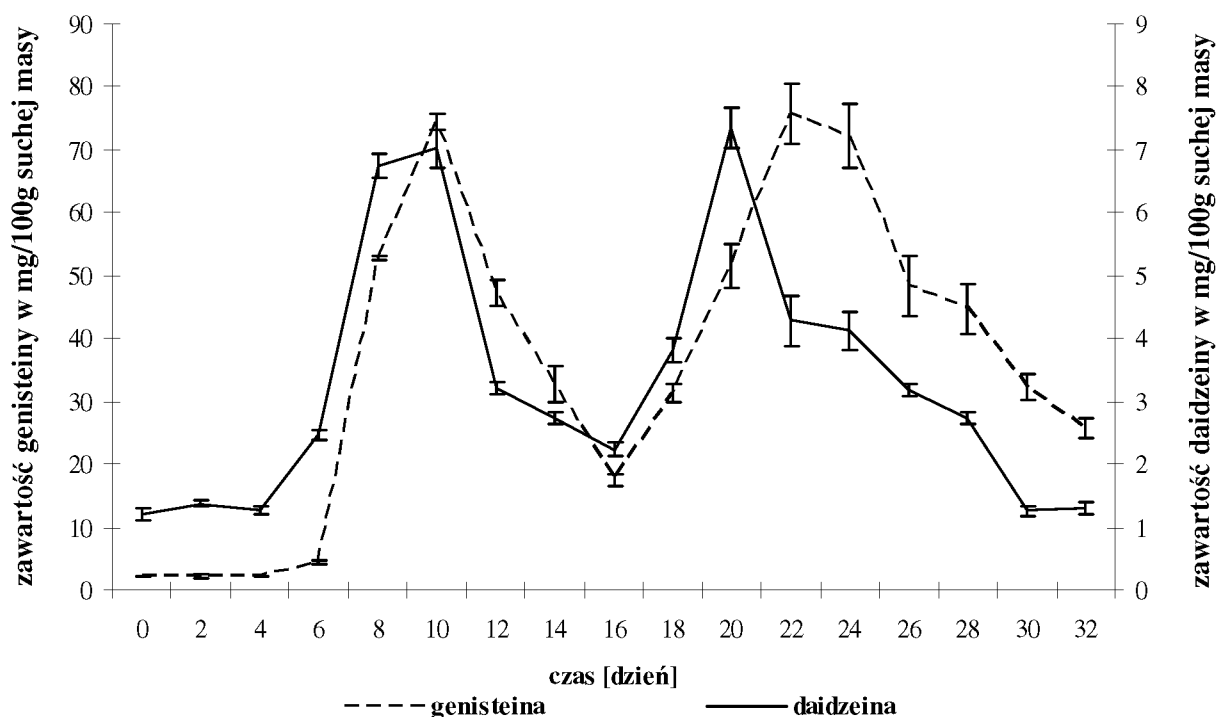


Ryc. 7. Profil wzrostowy wytrząsanej kultury embrionalnej *Genista tinctoria* rosnącej w cyklu 32-dniowym (pożywka SH z dodatkiem $2,46\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, $22,19\mu\text{mol l}^{-1}$ BAP i 3% (m/v) sacharozy; oświetlenie ciągłe $88\pm 8\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$; temp. $25\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Fig. 7. Changes in fresh (FW) and dry (DW) weight of *Genista tinctoria* embryo cultures grown in liquid SH medium, supplemented with $2.46\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, $22.19\mu\text{mol l}^{-1}$ BAP and 3% (w/v) sucrose, for 32 days, under continuous light.

Analiza fitochemiczna biomas pochodzących z kolejnych dni hodowli wykazała, że kultura embrionów, podobnie jak zawiesina *G. tinctoria* syntetyzowała 14 izoflawonów akumulowanych wyłącznie w wakuolach (brak oznaczanych związków w pożywkach). Również kinetyka produkcji poszczególnych metabolitów szlaku genisteiny i daidzeiny była porównywalna z obserwowaną wcześniej w zawieszynie parenchymatycznej *G. tinctoria* (tab.1 i 2). Na szczególną uwagę zasługuje identyczna zależność między genisteiną i daidzeiną a odpowiednimi monoglikozydami. Biosynteza związków, znajdujących się w szlaku metabolicznym genisteiny i daidzeiny, wydaje się zachodzić równolegle, niezależnie od siebie, nie konkurując o prekursor biosyntezy (ryc. 8). Fakt ten potwierdza dane literaturowe, zgodnie z którymi ilość grup fenolowych w pierścieniu izoflawonoidowym jest determinowana na etapie powstawania chalkonu, a nie podczas hydroksylacji pierścienia A izoflawonu [9].

W kulturze embrionalnej wszystkie metabolity izoflawonoidowe, za wyjątkiem estrów genistyny, syntetyzowane były wprawdzie w większych ilościach niż w ziele rośliny macierzystej (rozdz. 7), ale jednocześnie były to stężenia niższe niż w kulturze zawiesinowej (tab. 1 i 2). Przykładowo, podstawowy metabolit zespołu – genistyna występowała, w embrionach, w ilości $7742,8\text{ mg}/100\text{ g DW}$ (26 dzień hodowli), podczas gdy w zawieszynie *G. tinctoria* stężenie tego związku oznaczono na poziomie $9414,7\text{ mg}/100\text{ g DW}$. Embriony *G. tinctoria* syntetyzowały natomiast znacznie więcej estrowych pochodnych genistyny niż kultura zawiesinowa. Maksymalne stężenie malonianu genistyny wyniosło w tym wypadku $134,27\text{ mg}/100\text{ g DW}$ i było ponad dwa razy większe niż w zawieszynie (tab. 1 i 2). Obserwowany wzrost stężenia estrów izoflawonoidowych w kulturze embrionalnej sugeruje, że biosynteza malonylo- oraz acetylogenistyny jest w biomasach *G. tinctoria* bezpośrednio związana z procesem morfogenezy.



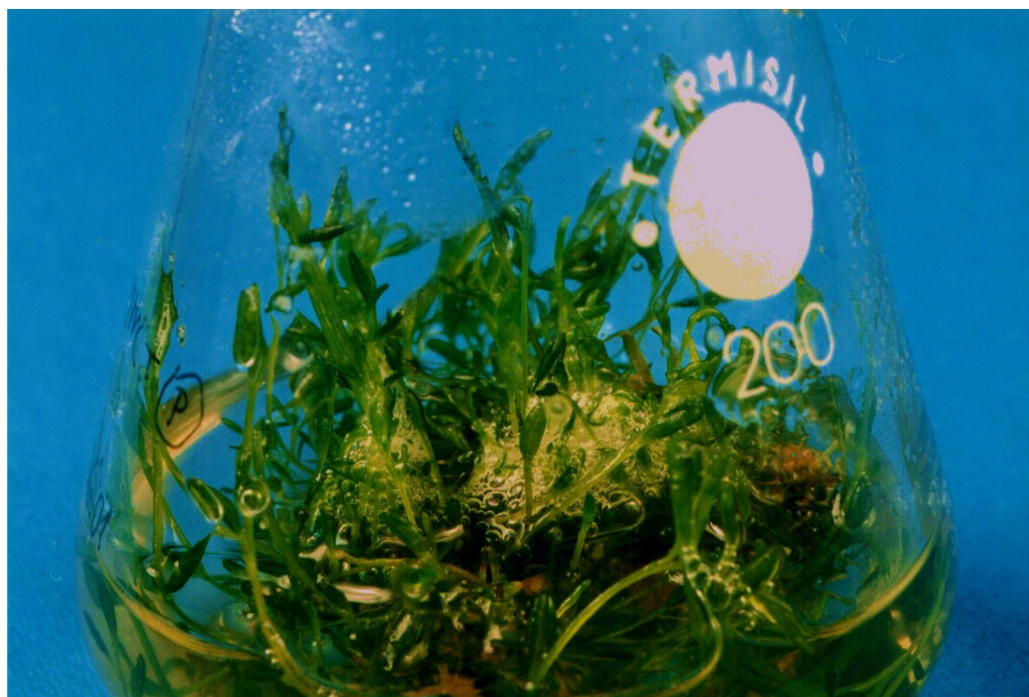
Ryc. 8. Zawartość genisteiny i daidzeiny w wytrząsanych kulturach embrionalnych *Genista tinctoria* (stężenie metabolitów w mg/100g suchej masy roślinnej).

Fig. 8. Daidzein and genistein concentration in *Genista tinctoria* embryo cultures (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Wzrost oraz produkcja izoflawonów w wytrząsanej kulturze pędowej *G. tinctoria*

Płynną hodowlę pędową *G. tinctoria* uzyskano ze stacjonarnej kultury mikroroślinek janowca, rosnącej na pożywce SH [23] z dodatkiem $9,84 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP, $0,99 \mu\text{mol l}^{-1}$ TDZ oraz 3% sacharozy (rozdz. 7). Na podłożu o takim składzie embriogenny kalus różnicował się w primordia pędowe a następnie w kultury mikroroślinek nie wykazujące tendencji do szklenia i tworzenia struktur anormalnych (rozdz. 7). Podstawowe, płynne kultury pędowe, hodowane w pożywce SH z dodatkiem $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz 3% sacharozy, w trakcie 76 dniowego cyklu hodowlanego, rozgałęziały się krzaczasto i wykazywały anergizację w stosunku do cytokinin, obserwowaną uprzednio na etapie wydłużania pędów, w procesie mikrorozmnażania janowców (ryc. 9) (rozdz. 7).

W wyniku przeprowadzonego doświadczenia stwierdzono, że kultura pędowa *G. tinctoria* charakteryzuje się długim i niezbyt intensywnym przyrostem (ryc. 10). Maksymalna ilość świeżej biomasy, uzyskana z eksperymentu ($354,2 \text{ g l}^{-1}$ FW w 48 dniu hodowli) była niższa niż otrzymana uprzednio w kulturach zawiesinowych i embrionalnych (ryc. 2,7,10). Należy jednak zaznaczyć, że pędy *G. tinctoria* charakteryzowały się znacznie niższym uwodnieniem ($\text{FW}_{\text{max}} - 354,2 \text{ g l}^{-1}$; $\text{DW}_{\text{max}} - 25,03 \text{ g l}^{-1}$ – dzień 48) od kultur embrionalnych ($\text{FW}_{\text{max}} - 654,2 \text{ g l}^{-1}$; $\text{DW}_{\text{max}} - 27,9 \text{ g l}^{-1}$ – dzień 22). W rezultacie maksymalna ilość suchej masy w obydwu eksperymentach była porównywalna. Bardzo długi okres wzrostu (76 dni) pędów w hodowli płynnej powoduje jednak, że omawiana kultura wydaje się mniej interesująca, z technologicznego punktu widzenia, w porównaniu z hodowlą zawiesinową i embrionalną.



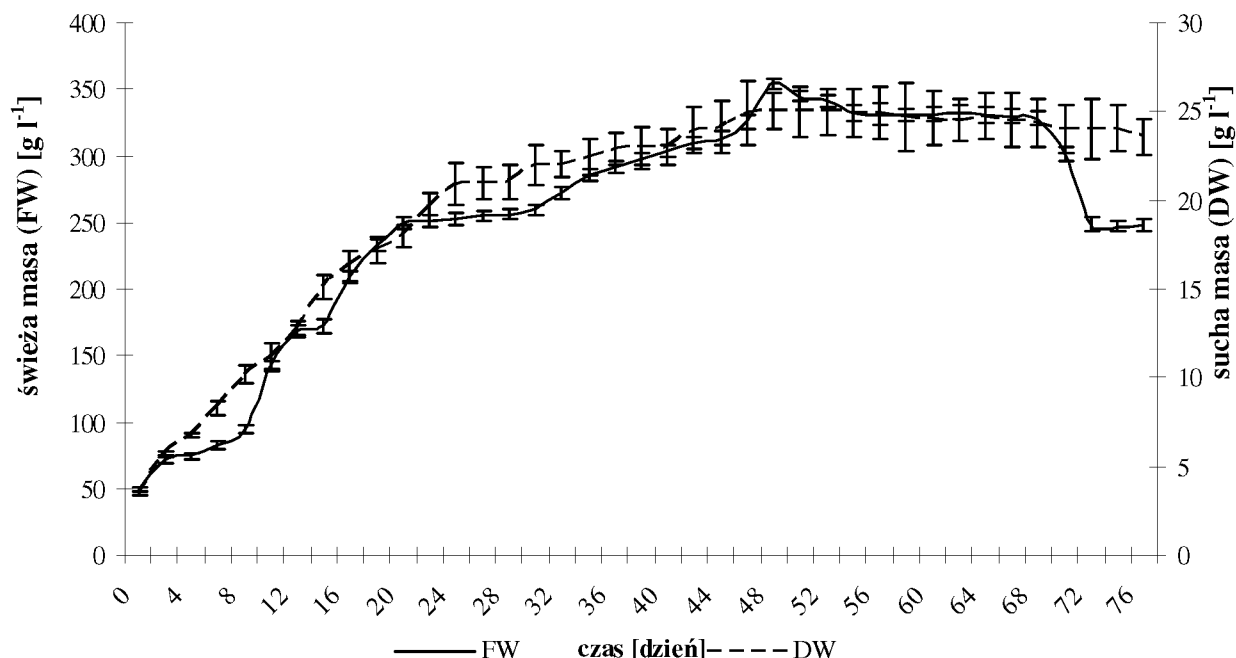
Ryc. 9. Wytrząsana kultura pędowa *Genista tinctoria*.

Fig. 9. *Genista tinctoria* shoot culture in liquid media.

Podobnie jak w pozostałych hodowlach wytrząsanych *G. tinctoria*, również w kulturach pędowych omawianego gatunku występowały wszystkie fazy wzrostu, ze znacznie łagodniej przebiegającą fazą zamierania (ryc. 10). Wydaje się, że wzrost pędów, w końcowym stadium hodowli, był bardziej determinowany rozmiarami naczynia hodowlanego niż brakiem składników odżywczych w podłożu eksperymentalnym. Fakt ten potwierdzał wygląd pędów, które do końca eksperymentu zachowały żywozieloną barwę, wypełniając całą kolbę Erlenmeyer'a. Pożywka doświadczalna żółkła natomiast jedynie w niewielkim stopniu.

Kultury pędowe, tak jak pozostałe typy hodowli wytrząsanych *G. tinctoria*, produkowały 14-składnikowy zespół izoflawonów, magazynowany całkowicie wewnątrzkomórkowo. Brak obecności w hodowli pędowej pochodnych apigeniny i luteoliny, charakterystycznych dla ziela rośliny macierzystej (rozdz. 6), potwierdza spostrzeżenie, że zahamowanie produkcji prostych flawonów, obserwowane również w zawiesinie i embrionach *G. tinctoria* (tab. 1-3), jest bezpośrednio związane z wprowadzeniem rośliny do kultur *in vitro*, a nie ze stadium morfogenezy. Wraz ze stopniem organogenezy maleje natomiast ilość syntetyzowanych w kulturach *in vitro* fitoestrogenów (tab. 1-3). Pomimo zachowanej kinetyki produkcji pochodnych daidzeiny i genisteiny, kultury pędowe produkowały znacznie mniej wtórnych metabolitów niż pozostałe typy hodowli (6640,7 mg/100 g DW genistyny – 40 dzień hodowli; tab. 3). Ciągłe jednak oznaczane stężenia fitoestrogenów były o wiele wyższe niż w ziele rośliny macierzystej (rozdz. 6). Opisywany fenomen, skorelowanego z morfogenezą spadku produkcji izoflawonów, nie dotyczy jedynie estrowych pochodnych genisteiny. Pędy w hodowlach płynnych syntetyzowały najwięcej z wszystkich typów kultur *in vitro* *G. tinctoria* malonylo- i acetylogenistyny (tab. 3). Szczególnie w przypadku malonylogenistyny opisywana kultura wydaje się być źródłem tego związku (1008,2 mg/100 g DW – 66 dzień hodowli), potwierdzając, że magazynowanie genisteiny w formie malonianu jest, w hodowlach *in vitro* *G. tinctoria*, zależne od morfogenezy i wprost proporcjonalne do jej stopnia (tab. 1-3). Uzyskane stężenie malonylogenistyny, w kulturach pędowych *G. tinctoria* nie jest jednak stałe. W ostatnich dniach hodowli (dzień 68 do 76) poziom tego związku drastycznie spada do stężenia

obecnego w *inoculum* (tab. 3). Jako, że w tym samym czasie stężenie genisteiny rośnie, można uważać, że opisywany mechanizm ma podłoże stresowe, generowane prawdopodobnie niewystarczającą objętością naczynia hodowlanego.



Ryc. 10. Profil wzrostowy wytrząsanej kultury pędowej *Genista tinctoria* rosnącej w cyklu 76-dniowym (pożywka SH z dodatkiem $24.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA i 3% (m/v) sacharozy; oświetlenie ciągłe $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Fig. 10. Changes in fresh (FW) and dry (DW) weight of *Genista tinctoria* shoot cultures grown in liquid SH medium, supplemented with $24.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA and 3% (w/v) sucrose, for 32 days, under continuous light.

Wzrost oraz produkcja izoflawonów w wytrząsanej kulturze korzeniowej *G. tinctoria*

Płynne kultury korzeni odciętych otrzymano z fragmentów korzeni pochodzących z rzygennego kalusa *G. tinctoria*, rosnącego na stacjonarnym podłożu SH, z dodatkiem $80.55 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA, $0.46 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny, $260.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ kwasu cytrynowego i 3% (w/v) sacharozy [12]. Powyższa pożywka warunkowała różnicowanie biomasy kalusowej w korzenie, które po odcięciu były zdolne do ciągłego wzrostu, w podłożu płynnym o składzie podanym powyżej. Dodatek kwasu cytrynowego hamował w biomacie produkcję prostych fenoli, prowadzących do szybkiego zamierania hodowli [12]. Otrzymana kultura płynna złożona była z jasnobrunatnej macierzy i wyrastających z niej długich, słabo rozgałęzionych korzeni przybyszowych o jasnokremowej barwie (ryc. 11).

Pomimo hodowli w warunkach pełnego oświetlenia nie stwierdzono powstawania korzeni syntetyzujących chlorofil ani odtwarzania drobnych kulistych struktur o charakterze kalusa. Obydwa zjawiska, jako charakterystyczne dla kultur korzeni odciętych i transgeniczných, prowadzonych w pożywkach z regulatorami wzrostu, przy dostępie do światła dziennego, opisywał uprzednio m. in. Pitta-Alvars i wsp. [19].



Ryc. 11. Wytrząsana kultura korzeni odciętych *Genista tinctoria*.

Fig. 11. *Genista tinctoria* de novo root culture.

Na podstawie uzyskanych wartości FW i DW, w 32 dniowym cyklu hodowlanym, stwierdzono, że korzenie *G. tinctoria* charakteryzują się szybkim przyrostem i znaczną produkcją biomasy ($FW_{\max}$ -543,3 g l⁻¹ – 24 dzień; $DW_{\max}$ -30,2 g l⁻¹ – 22 dzień). W toku przeprowadzonego eksperymentu uzyskano 11-krotny przyrost masy tkankowej w stosunku do 50 g *inoculum* (ryc. 12). Zgodnie z danymi literaturowymi, kultury korzeni odciętych (nie transformowanych) rzadko odznaczają się szybkim przyrostem i często wykazują tendencję do stopniowego przekształcania się w kalus. Przeciętny cykl wzrostowy takich kultur wynosi 60-70 dni [28]. Ze względu na powyższe, szybko rosnące korzenie *de novo* *G. tinctoria* wydają się przydatne do hodowli *in vitro* na większą skalę, w bioreaktorach.

Analiza fitochemiczna biomas otrzymanych w wyniku eksperymentu wykazała, że płynne kultury korzeniowe *G. tinctoria*, podobnie jak korzenie hodowane na podłożu agarowym [12] są, w przeciwieństwie do innych typów kultur *in vitro* janowca, wybiórczym źródłem pojedynczego metabolitu z grupy bioflawonoidów tj. izolikwirytygeniny (978,4 mg/100 g DW – 30 dzień hodowli; tab. 4, ryc. 13). Związek ten nie występuje zarówno w ziele jak i korzeniach rośliny macierzystej, bogatych w szereg flawonoidów z grupy flawonów oraz izoflawonów (rozdz. 6 i 13). Wprowadzenie korzeni *G. tinctoria* do kultur *in vitro* zupełnie zahamowało, w namnażanej biomacie, biosyntezę charakterystycznych dla rośliny gruntowej, pochodnych genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A (rozdz. 6 i 13). Wewnątrzkomórkowa akumulacja jedynie pojedynczego metabolitu bioflawonoidowego, w biomacie korzeniowej janowca, wydaje się wskazywać, że w badanej kulturze mamy do czynienia z blokadą enzymatyczną biosyntezy izoflawonów na poziomie izolikwirytygeniny, która jest bezpośrednim prekursorem daidzeiny [2]. W stanie naturalnym izoflawony spełniają istotną rolę w tworzeniu układów symbiotycznych między roślinami z rodziny *Fabaceae* a bakteriami brodawkowymi z rodzaju *Rhizobium* [3,9,20]. Być może sztuczne warunki, występujące w kulturze *in vitro* odciętych korzeni janowca, zaburzyły fizjologiczne układy regulatorowe i stąd wynika zahamowanie biosyntezy izoflawonów na poziomie izolikwirytygeniny. Jako, że w toku prezentowanych doświadczeń nie przeprowadzono badań dotyczących

aktywności kluczowych enzymów szlaku izoflawonoidowego, trudno wyciągnąć ostateczne wnioski co do natury obserwowanego zjawiska.

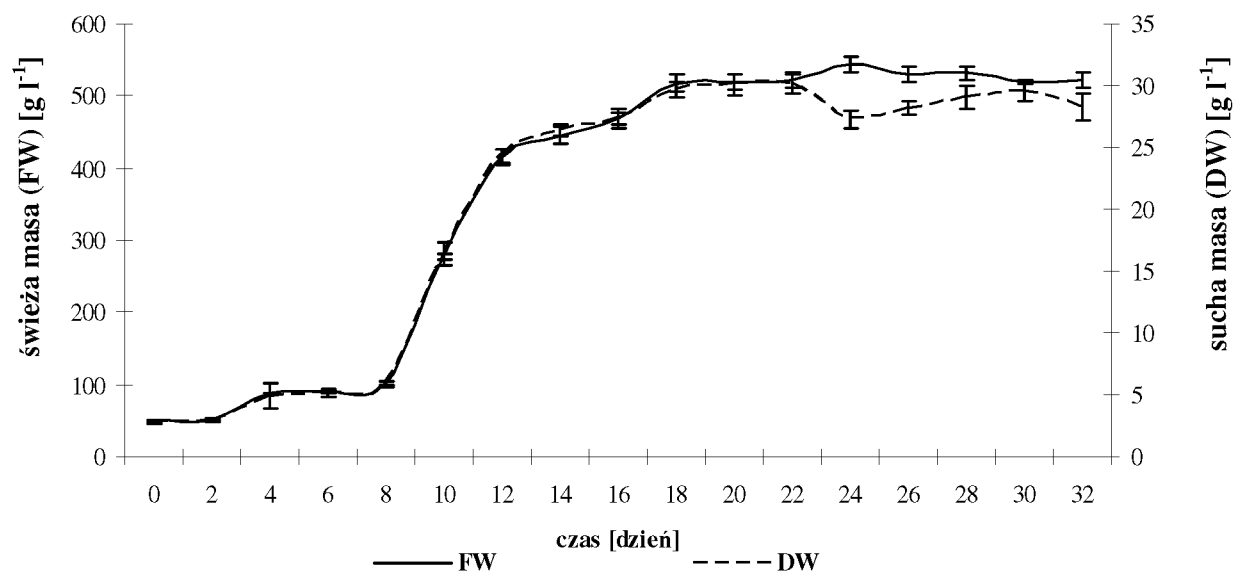
Biosynteza izolikwirytygeniny, w kulturach korzeniowych *G. tinctoria*, jest ściśle skorelowana ze wzrostem biomasy (ryc. 12 i 13). W fazie wzrostu logarytmicznego oraz liniowego, namnażanej tkanki, produkcja izolikwirytygeniny zachodzi stopniowo i raczej wolno. Szczególnie intensywnie przebiega natomiast podczas długiej fazy stacjonarnej. Poziom oznaczanego związku utrzymuje się następnie w biomasie na mniej więcej stałym poziomie, aż do końca eksperymentu (ryc. 13). Obserwowana kinetyka produkcji izolikwirytygeniny w kulturze korzeniowej *G. tinctoria* potwierdza doniesienia literaturowe odnośnie intensywnej biosyntezy szeregu wtórnych metabolitów w kulturach *in vitro* dopiero po ustaniu wzrostu tkanek, czyli właśnie w fazie stacjonarnej [26]. Zjawisko to jest związane z silnym współzawodnictwem szlaków metabolizmu pierwotnego i wtórnego o związki o charakterze prekursorów [13].

Uzyskane, w wyniku przeprowadzonego eksperymentu, wytrząsane kultury korzeniowe *G. tinctoria*, ze względu na produkcję pojedynczego metabolitu z grupy roślinnych polifenoli mogą być uznane jako wybiórcze źródło wartościowego prekursora izoflawonoidowego – izolikwirytygeniny.

W wyniku przeprowadzonego cyklu doświadczeń otrzymano płynne kultury wytrząsane *G. tinctoria* różniące się stopniem cytodyferencjacji i jednocześnie zdolne do akumulacji znacznych ilości fitoestrogenów o określonej aktywności farmakologicznej [15,20]. Biosynteza prostych flawonów pochodnych luteoliny i apigeniny, charakterystycznych dla rośliny macierzystej, została zahamowana we wszystkich typach kultur janowca, czyniąc z nich wybiórcze źródło fitoestrogenów. Uzyskane rezultaty dowodzą, że akumulacja poszczególnych połączeń izoflawonoidowych w biomasach *G. tinctoria* jest bezpośrednio zależna od rodzaju kultury. Szczególnie istotny wydaje się fakt zahamowanie biosyntezy aglikonów i glikozydów izoflawonoidowych, skorelowany ze wzrostem stopnia cytodyferencjacji poszczególnych biomas. Zgodnie z powyższym nieuorganizowana zawieszina *G. tinctoria* akumulowała najwięcej glikozydów i aglikonów izoflawonoidowych (maks. produktywność i specyficzna produktywność – tab. 4). Uzyskana, w zawieszynie 9445 mg zawartość genistyny na 100 g suchej masy jest jednocześnie jedną z największych ilości pojedynczego wtórnego metabolitu otrzymanego dotychczas z kultur *in vitro* roślin wyższych [6]. Biomasa zawieszinowa *G. tinctoria* będąca tak bogatym źródłem genistyny oraz innych 13 izoflawonów może być w przyszłości wykorzystana do produkcji tych związków na skalę przemysłową.

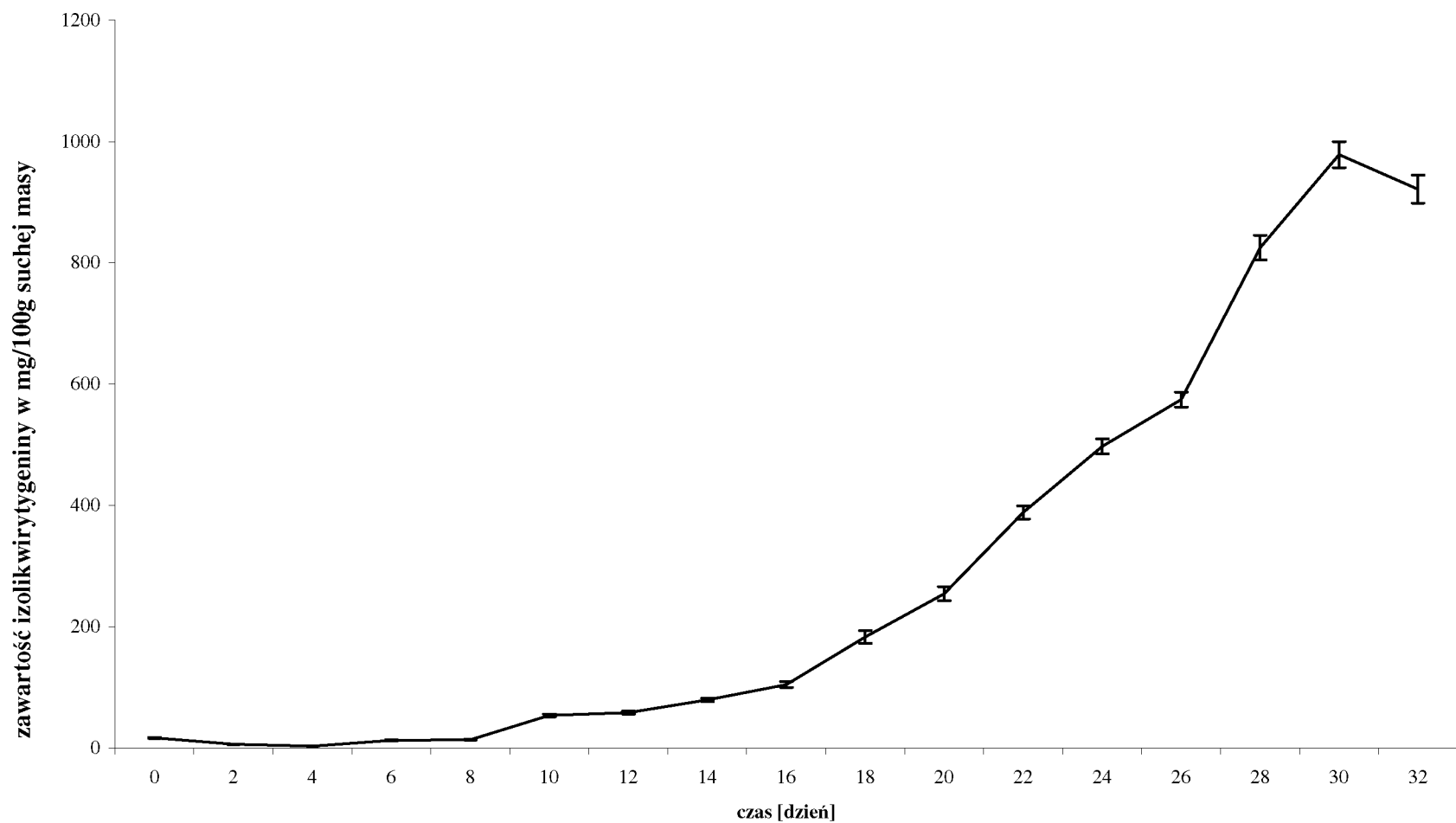
Kultury pędowe janowca, jako najwyżej uorganizowane, cechowała natomiast największa, w porównaniu do innych typów hodowli, zawartość estrowych pochodnych genistyny (maks. produktywność i specyficzna produktywność – tab. 4). Dowodzi to, że również biosynteza tych związków jest związana ze stopniem zróżnicowania tkanek. Przedstawiona powyżej prawidłowość nie dotyczy jedynie kultur korzeni odciętych *G. tinctoria*, w przypadku których organogeneza spowodowała całkowite zahamowanie produkcji izoflawonów pochodnych daidzeiny i genisteiny. Jedynym produkowanym związkiem bioflawonoidowym pozostał pierwotny metabolit szlaku biosyntezy izoflawonów – izolikwirytygenina. Wydaje się zatem, że w omawianej kulturze doszło do blokady enzymów na poziomie izomeryzacji chalkonów do flawanonów. W rezultacie kultury korzeniowe *G. tinctoria*, po skutecznej permeabilizacji, wydają się odpowiednie do otrzymywania powyższego związku z przeznaczeniem do szeregu typów doświadczeń biotechnologicznych, w tym eksperymentów zmierzających do uzyskania, na drodze biokonwersji izolikwirytygeniny, bardziej złożonych struktur izoflawonoidowych.

Wszystkie otrzymane typy kultur *G. tinctoria* stanowią ponadto, w przeciwieństwie do szeregu innych kultur *in vitro* roślin z rodziny *Fabaceae* [5,8,10,11] układy dynamiczne, w których widoczne są, w cyklu hodowlanym, powiązania pomiędzy poszczególnymi metabolitami szlaku genisteiny i daidzeiny. W związku z powyższym uzyskane biomasy roślinne mogą służyć do prowadzenia badań, o charakterze podstawowym, dotyczących biosyntezy izoflawonów oraz pełniejszego poznania zmian metabolizmu roślin na skutek elicytacji.



Ryc. 12. Profil wzrostowy wytrząsanej kultury korzeniowej *Genista tinctoria* rosnącej w cyklu 32-dniowym (pożywka SH z dodatkiem $80,65 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA, $0,46 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny, $260,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ kwasu cytrynowego i 3% (m/v) sacharozy; oświetlenie ciągłe $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Fig. 12. Changes in fresh (FW) and dry (DW) weight of *Genista tinctoria* root cultures grown in liquid SH medium, supplemented with $80.55 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA, $0.46 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetin, $260.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ citric acid and 3% (w/v) sucrose, for 32 days, under continuous light.



Ryc. 13. Zawartość izolikwirytygeniny w wytrząsanych kulturach korzeniowych *Genista tinctoria* (stężenie metabolitów w mg/100g suchej masy roślinnej).
Fig. 13. Isoliquiritigenin concentration in *Genista tinctoria* root cultures (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Tab. 1. Zawartość izoflawonów w kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* (stężenie związków w mg/100g suchej masy).

Tab. 1. Isoflavone concentration in Genista tinctoria suspension cultures (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Dzień	Związek							
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	malonylo-genistyna	acetylo-genistyna
0	4,3 ± 0,1	2117,6 ± 14,5	2,52 ± 0,07	16,53 ± 0,98	603,3 ± 15,3	18,42 ± 0,9	9,2 ± 0,4	4,43 ± 0,1
2	2,9 ± 0,09	1053,3 ± 9,8	1,74 ± 0,09	6,99 ± 0,3	327,3 ± 11,2	11,96 ± 0,8	5,8 ± 0,2	4,42 ± 0,09
4	5,3 ± 0,2	933,9 ± 4,4	1,53 ± 0,09	5,43 ± 0,18	298,1 ± 9,4	11,00 ± 1,1	10,7 ± 0,6	3,21 ± 1,1
6	64,9 ± 0,4	3145,5 ± 19,8	3,32 ± 0,11	8,02 ± 0,39	762,7 ± 16,2	12,18 ± 0,8	17,6 ± 0,8	7,50 ± 0,3
8	83,5 ± 1,3	3582,5 ± 20,5	6,87 ± 0,18	11,90 ± 0,9	815,7 ± 13,4	16,64 ± 0,9	18,3 ± 0,7	10,20 ± 0,5
10	142,7 ± 5,7	3302,7 ± 20,1	9,08 ± 0,59	16,85 ± 1,1	893,3 ± 14,2	22,56 ± 1,4	20,6 ± 0,6	17,77 ± 0,9
12	41,2 ± 2,2	3635,8 ± 21,2	4,74 ± 0,22	39,95 ± 2,0	930,7 ± 16,8	31,91 ± 1,8	27,3 ± 0,8	21,17 ± 1,3
14	20,0 ± 2,0	5818,7 ± 28,3	3,61 ± 0,19	61,1 ± 2,4	946,2 ± 16,1	33,05 ± 1,9	36,4 ± 1,2	22,54 ± 1,4
16	18,4 ± 1,5	7234,65 ± 31,4	2,68 ± 0,10	75,59 ± 3,4	1272,2 ± 15,2	35,23 ± 1,9	40,5 ± 1,8	31,76 ± 1,7
18	15,2 ± 0,9	8472,2 ± 33,2	4,67 ± 0,17	111,86 ± 11,9	1499,1 ± 13,1	70,24 ± 3,9	50,9 ± 2,1	39,40 ± 1,9
20	20,7 ± 1,3	8647,4 ± 36,4	7,65 ± 0,34	114,08 ± 15,3	2003,1 ± 14,4	92,17 ± 4,5	66,8 ± 2,2	39,41 ± 2,1
22	58,1 ± 3,4	9142,7 ± 40,5	6,67 ± 0,2	125,42 ± 17,4	1643,7 ± 13,8	116,42 ± 7,4	67,5 ± 2,4	41,1 ± 1,9
24	73,3 ± 4,9	9343,0 ± 39,2	5,16 ± 0,21	133,11 ± 16,2	1284,6 ± 14,9	193,09 ± 8,6	66,4 ± 1,9	49,5 ± 1,8
26	91,2 ± 6,2	9414,7 ± 37,2	4,29 ± 0,19	152,84 ± 20,1	1091,6 ± 11,2	268,22 ± 11,4	69,4 ± 2,4	46,7 ± 2,0
28	73,3 ± 5,1	7983,41 ± 29,4	3,05 ± 0,18	112,7 ± 14,2	583,8 ± 12,4	340,09 ± 10,8	72,2 ± 2,8	45,4 ± 1,7
30	61,2 ± 4,9	7114,47 ± 25,3	3,14 ± 0,18	102,5 ± 10,8	384,5 ± 9,2	447,65 ± 14,5	74,4 ± 2,4	42,1 ± 2,0
32	82,5 ± 2,9	6286,4 ± 19,3	2,48 ± 0,09	94,3 ± 9,3	308,94 ± 10,0	440,72 ± 13,2	41,3 ± 2,5	48,5 ± 1,6

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów ± S.D./ Each value represents the mean ± S.D. of three samples.

Tab. 2. Zawartość izoflawonów w wytrząsanych kulturach embrionalnych *Genista tinctoria* (stężenie związków w mg/100g suchej masy).
 Tab. 2. Isoflavone concentration in *Genista tinctoria* embryo cultures in liquid media (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Dzień	Związek							
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksy genisteiny	malonyloge- nistyna	acetyloge- nistyna
0	2,2 ± 0,1	2047,6 ± 11,4	1,2 ± 0,09	15,2 ± 0,2	593,04 ± 14,3	15,21 ± 0,9	10,74 ± 0,7	5,4 ± 0,1
2	2,2 ± 0,2	1748,6 ± 9,7	1,37 ± 0,05	15,47 ± 0,3	295,4 ± 8,2	15,22 ± 0,9	9,21 ± 0,3	5,43 ± 0,1
4	2,17 ± 0,09	981,4 ± 3,2	1,28 ± 0,07	5,28 ± 0,1	178,2 ± 5,4	11,92 ± 0,7	6,81 ± 0,3	2,74 ± 0,09
6	4,42 ± 0,2	731,5 ± 5,4	2,47 ± 0,08	6,74 ± 0,4	642,8 ± 8,3	10,44 ± 0,8	6,24 ± 0,31	3,44 ± 0,09
8	52,74 ± 0,3	2894,5 ± 12,3	6,74 ± 0,2	10,12 ± 0,8	874,2 ± 13,2	11,58 ± 0,8	7,22 ± 0,4	5,78 ± 0,1
10	74,43 ± 1,3	2921,4 ± 15,8	7,02 ± 0,3	14,85 ± 0,9	912,5 ± 12,8	15,12 ± 0,9	9,21 ± 0,4	9,12 ± 0,4
12	47,21 ± 2,1	3842,1 ± 19,2	3,21 ± 0,09	29,78 ± 0,9	974,4 ± 14,3	29,86 ± 1,4	10,34 ± 0,8	15,43 ± 0,9
14	32,71 ± 2,8	4971,4 ± 21,3	2,73 ± 0,1	41,21 ± 1,3	998,5 ± 13,8	30,44 ± 1,9	12,43 ± 0,7	17,28 ± 0,8
16	17,44 ± 0,9	5852,7 ± 31,2	2,24 ± 0,1	48,23 ± 2,3	1024,21 ± 11,8	31,47 ± 2,1	18,16 ± 0,5	21,44 ± 1,1
18	31,28 ± 1,5	5944,2 ± 28,7	3,81 ± 0,2	61,7 ± 1,8	1244,66 ± 13,0	48,16 ± 2,3	25,48 ± 0,8	25,27 ± 0,9
20	51,47 ± 3,4	6224,6 ± 27,3	7,35 ± 0,31	67,29 ± 5,1	1000,84 ± 12,7	79,25 ± 4,8	30,74 ± 1,8	44,83 ± 2,1
22	75,74 ± 4,8	6472,2 ± 24,2	4,28 ± 0,4	72,14 ± 3,4	642,53 ± 9,9	104,26 ± 11,4	59,13 ± 2,3	48,27 ± 2,4
24	72,21 ± 5,1	6835,7 ± 23,3	4,13 ± 0,3	84,21 ± 7,9	471,78 ± 10,8	158,73 ± 14,7	67,22 ± 2,8	56,48 ± 3,8
26	48,32 ± 4,7	7742,81 ± 28,2	3,18 ± 0,1	103,21 ± 11,2	500,21 ± 10,7	243,08 ± 17,4	98,11 ± 5,4	58,46 ± 3,9
28	44,75 ± 3,9	7021,57 ± 29,3	2,74 ± 0,09	82,78 ± 4,5	108,31 ± 7,3	253,42 ± 18,2	120,14 ± 6,2	54,94 ± 3,5
30	32,21 ± 2,1	5438,42 ± 34,3	1,26 ± 0,08	79,81 ± 5,2	54,32 ± 2,1	250,73 ± 19,7	128,71 ± 6,4	51,35 ± 3,4
32	25,72 ± 1,7	4271,88 ± 33,8	1,30 ± 0,1	72,21 ± 4,3	42,71 ± 2,3	249,94 ± 17,9	134,27 ± 6,5	48,11 ± 3,7

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów ± S.D./ Each value represents the mean ± S.D. of three samples.

Tab. 3. Zawartość izoflawonów w wytrząsanych kulturach pędowych *Genista tinctoria* (stężenie związków w mg/100g suchej masy).

Tab. 3. Isoflavone concentration in *Genista tinctoria* shoot cultures in liquid media (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Dzień	Związek									
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	malonylogenisztyna	acetylogenisztyna		
0	38,87 ± 1,3	1104,18 ± 10,11	1,0 ± 0,09	24,69 ± 1,4	428,58 ± 9,7	46,81 ± 1,8	42,47 ± 1,5	10,11 ± 0,3		
2	2,23 ± 0,9	977,89 ± 3,4	0,94 ± 0,07	16,08 ± 0,9	417,36 ± 11,4	37,31 ± 1,5	34,91 ± 1,0	10,80 ± 0,4		
4	7,81 ± 0,6	1523,62 ± 9,8	0,72 ± 0,09	14,63 ± 1,0	412,19 ± 11,6	34,56 ± 1,4	22,57 ± 0,9	9,16 ± 0,1		
6	8,24 ± 0,4	1540,63 ± 8,7	0,85 ± 0,08	13,52 ± 0,8	405,17 ± 10,8	38,73 ± 1,7	19,78 ± 1,1	7,14 ± 0,2		
8	10,04 ± 0,8	1630,26 ± 9,2	1,46 ± 0,1	17,94 ± 1,1	374,21 ± 9,4	40,76 ± 1,8	20,89 ± 1,1	5,47 ± 0,09		
10	13,88 ± 0,7	2212,33 ± 14,2	1,54 ± 0,2	21,71 ± 1,8	449,95 ± 10,3	45,21 ± 1,5	33,95 ± 1,4	10,12 ± 0,4		
12	14,44 ± 1,2	2257,04 ± 15,8	1,59 ± 0,08	25,02 ± 1,7	561,80 ± 11,6	56,27 ± 2,0	41,63 ± 2,5	18,57 ± 0,9		
14	14,02 ± 1,5	2291,46 ± 14,7	1,84 ± 0,09	26,62 ± 1,7	564,44 ± 10,8	69,67 ± 2,2	83,31 ± 4,7	20,16 ± 0,9		
16	20,75 ± 0,9	2940,07 ± 16,6	2,07 ± 0,2	29,85 ± 1,8	644,66 ± 14,3	71,10 ± 3,0	79,99 ± 3,8	19,84 ± 0,8		
18	29,58 ± 1,3	3188,54 ± 19,2	2,14 ± 0,13	29,94 ± 1,5	760,54 ± 13,5	91,88 ± 4,7	88,56 ± 4,7	25,64 ± 1,0		
20	44,11 ± 1,4	3363,31 ± 18,4	2,89 ± 0,18	30,72 ± 2,1	798,61 ± 18,8	129,59 ± 5,8	89,65 ± 5,4	30,48 ± 1,2		
22	48,22 ± 1,5	3410,09 ± 15,8	3,21 ± 0,20	32,43 ± 1,7	970,28 ± 17,4	132,77 ± 6,1	90,20 ± 7,9	31,88 ± 1,3		
24	62,34 ± 1,1	4111,92 ± 22,7	4,16 ± 0,09	38,55 ± 1,9	942,91 ± 19,2	133,58 ± 6,5	93,85 ± 6,5	31,74 ± 1,0		
26	77,31 ± 2,3	4103,21 ± 23,4	2,35 ± 0,09	40,47 ± 2,3	1008,64 ± 18,7	153,98 ± 7,1	109,62 ± 11,3	38,66 ± 1,1		
28	51,86 ± 2,0	4746,77 ± 28,1	2,38 ± 0,1	45,69 ± 1,9	965,14 ± 12,2	145,20 ± 7,7	117,77 ± 8,4	42,85 ± 1,4		
30	46,99 ± 1,9	4809,61 ± 31,1	1,57 ± 0,14	54,31 ± 2,5	860,65 ± 12,8	192,50 ± 8,2	119,01 ± 8,8	47,13 ± 1,8		
32	45,03 ± 2,1	5231,07 ± 30,8	1,43 ± 0,18	62,87 ± 2,9	735,34 ± 10,4	210,80 ± 8,0	128,80 ± 9,9	48,15 ± 1,6		
34	22,48 ± 1,2	5418,95 ± 29,7	1,12 ± 0,09	68,65 ± 3,4	655,88 ± 11,7	239,39 ± 7,9	127,40 ± 10,3	49,28 ± 1,7		
36	15,93 ± 0,8	6340,21 ± 27,4	1,07 ± 0,08	72,54 ± 2,8	467,33 ± 12,7	296,14 ± 7,7	129,50 ± 10,6	49,11 ± 2,0		
38	13,35 ± 1,1	6421,76 ± 29,4	0,94 ± 0,07	79,45 ± 4,8	328,16 ± 8,8	298,78 ± 9,4	130,47 ± 10,1	50,09 ± 2,1		
40	14,48 ± 1,2	6640,76 ± 30,6	0,54 ± 0,07	86,17 ± 3,5	278,14 ± 8,9	302,14 ± 11,0	135,28 ± 11,2	55,48 ± 1,6		
42	12,80 ± 0,7	6582,48 ± 27,5	0,32 ± 0,09	82,34 ± 4,4	264,33 ± 7,9	317,88 ± 9,5	270,51 ± 9,4	60,32 ± 2,2		
44	11,76 ± 0,7	5072,07 ± 28,7	0,84 ± 0,04	80,28 ± 5,1	222,67 ± 9,9	314,74 ± 9,7	294,25 ± 8,9	66,37 ± 2,4		
46	10,21 ± 0,6	5124,12 ± 30,1	0,92 ± 0,06	78,99 ± 4,2	175,86 ± 7,6	318,78 ± 8,4	312,94 ± 9,4	68,18 ± 2,3		
48	11,44 ± 0,8	5411,33 ± 31,2	1,12 ± 0,09	79,20 ± 3,9	174,32 ± 7,2	320,42 ± 11,4	458,21 ± 11,5	70,41 ± 2,8		
50	14,47 ± 0,9	5384,43 ± 28,9	1,40 ± 0,1	80,48 ± 4,8	141,64 ± 6,7	339,58 ± 8,6	567,14 ± 11,3	74,82 ± 3,2		
52	15,11 ± 0,8	5324,37 ± 28,8	1,49 ± 0,09	82,64 ± 4,4	128,83 ± 6,6	344,60 ± 9,5	602,47 ± 10,8	76,30 ± 3,3		
54	19,11 ± 0,8	5399,79 ± 27,4	1,97 ± 0,14	81,79 ± 3,7	108,84 ± 6,9	337,77 ± 11,8	608,37 ± 9,4	88,21 ± 4,2		
56	19,95 ± 1,2	5302,50 ± 30,1	1,91 ± 0,12	78,84 ± 4,5	104,27 ± 5,9	330,39 ± 13,4	790,21 ± 13,6	97,79 ± 4,5		
58	23,56 ± 1,0	5294,48 ± 29,9	2,04 ± 0,08	79,46 ± 4,3	100,88 ± 4,7	332,21 ± 12,7	847,09 ± 16,2	99,83 ± 3,2		
60	25,39 ± 1,0	5299,12 ± 32,4	2,08 ± 0,09	76,71 ± 3,9	102,02 ± 6,2	330,82 ± 11,5	852,47 ± 13,2	111,10 ± 4,6		
62	21,48 ± 1,1	5108,62 ± 26,5	1,97 ± 0,07	79,47 ± 4,1	101,54 ± 7,0	329,82 ± 9,6	942,78 ± 11,8	110,28 ± 4,8		
64	19,54 ± 0,6	5117,75 ± 25,7	2,05 ± 0,1	78,83 ± 4,7	89,45 ± 4,2	331,73 ± 8,8	1005,21 ± 13,4	112,59 ± 5,0		
66	32,47 ± 0,7	5127,89 ± 29,4	2,34 ± 0,08	81,43 ± 4,2	87,28 ± 3,7	328,94 ± 9,8	1008,22 ± 16,5	114,64 ± 4,5		
68	29,17 ± 1,4	5086,77 ± 21,2	1,84 ± 0,1	77,51 ± 4,0	76,44 ± 2,2	329,47 ± 10,8	1004,74 ± 12,7	118,19 ± 4,0		
70	24,98 ± 1,0	4979,15 ± 22,9	2,93 ± 0,09	76,43 ± 3,8	87,21 ± 4,8	325,84 ± 11,1	528,66 ± 11,4	116,70 ± 4,2		
72	52,26 ± 1,5	4211,14 ± 28,4	3,44 ± 0,18	52,17 ± 3,1	52,71 ± 3,4	318,34 ± 10,7	157,12 ± 9,2	118,95 ± 3,9		
74	53,77 ± 1,9	3883,44 ± 30,3	4,17 ± 0,16	52,19 ± 3,9	55,16 ± 1,9	320,49 ± 9,4	47,53 ± 2,3	115,43 ± 3,9		
76	58,76 ± 2,1	2967,35 ± 20,9	4,82 ± 0,24	48,99 ± 2,9	50,42 ± 2,0	319,06 ± 9,5	44,58 ± 1,8	109,86 ± 4,5		

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów ± S.D./ Each value represents the mean ± S.D. of three samples.

Tab. 4. Porównanie produktywności kultur *in vitro* *Genista tinctoria* pod względem izoflawonów*.

Tab. 4. Comparison of maximum productivity of each isoflavone in various *in vitro* cultures of *Genista tinctoria**.

Związek	kultury zawiesinowe					kultury embrionalne					kultury pędowe					kultury korzeniowe				
	maks. stężenie (mg/100 g DW)	dzień kultury	ilość biomasy (g l ⁻¹)	produktywność	specyficzna produktywność	maks. stężenie (mg/100 g DW)	dzień kultury	ilość biomasy (g l ⁻¹)	produktywność	specyficzna produktywność	maks. stężenie (mg/100 g DW)	dzień kultury	ilość biomasy (g l ⁻¹)	produktywność	specyficzna produktywność	maks. stężenie (mg/100 g DW)	dzień kultury	ilość biomasy (g l ⁻¹)	produktywność	specyficzna produktywność
genisteina	142,7	10	22,7	32,4	324	74,43	10	21,9	16,3	1,63	77,31	26	21	16,23	0,62	-	-	-	-	-
genistyna	9414,7	26	40,7	3831,8	147,37	7742,81	26	15,8	1223,38	47,05	6640,76	40	23,03	1528,70	38,21	-	-	-	-	-
daidzeina	9,08	10	22,7	2,06	0,21	7,35	20	28,2	2,07	0,10	4,82	76	23,54	1,13	0,02	-	-	-	-	-
daidzina	152,84	26	40,7	62,2	2,39	103,2	26	15,8	16,3	0,63	86,17	40	23,02	19,84	0,49	-	-	-	-	-
7-O-diglukozyd genisteiny	2003,1	20	40,4	809,2	40,46	1844,66	18	27,1	499,90	27,77	1008,64	26	21	221,81	8,15	-	-	-	-	-
7-O-glukozyd 2'-hydroksy-genisteiny	447,65	30	26,9	120,41	4,01	253,42	28	14,7	37,25	1,33	344,60	52	25,02	86,22	1,66	-	-	-	-	-
malonylo-genistyna	74,4	30	26,9	20,01	0,66	134,3	32	13,5	18,13	0,57	1008,22	66	24,53	247,32	3,75	-	-	-	-	-
acetylo-genistyna	49,5	24	40,2	19,9	0,83	58,46	26	15,8	9,24	0,35	118,95	72	24,05	28,6	0,40	-	-	-	-	-
izolikwirytygenina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	978,4	30	29,6	289,6	9,65

* wartości umieszczone w tabeli dotyczą dni, w których uzyskano maksymalną zawartość poszczególnych metabolitów

* all measurements throughout the table are quoted for the day on which maximum concentration of each molecule was recorded

$$\text{produktywność} = \frac{\text{maksymalne stężenie związku w mg/100g DW} \times \text{ilość biomasy w g l}^{-1}}{100\text{g suchej masy}}$$

$$\text{specyficzna produktywność} = \frac{\text{produktywność}}{\text{ilość dni po których stwierdzono maksymalne stężenie określonego związku w kulturze}}$$

Piśmiennictwo

1. Ames T.T., Worden R.M., Continuous production of daidzein and genistein from soybean in a magnetofluidized bed bioreactor, *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 336-339.
2. Aoki T., Akashi T., Ayabe S., Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity and biosynthesis, *J. Plant Res.* 113 (2000) 475-488.
3. Barz W., Mackenbrock U., Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpanes in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 199-211.
4. Berlin J., Fecker L., Ruegenhagen C., Sator C., Strack D., Witte L., Isoflavone glycoside formation in transformed and nontransformed suspension and hairy-root cultures of *Lupinus polyphyllus* and *Lupinus hartwegii*, *Z. Naturforsch. C46* (1991) 725-734.
5. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A., Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53 (1998) 35-41.
6. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant. Sci.* 161 (2001) 839-851.
7. De Castro O., Cozzolino S., Jury S.L., Caputo P., Molecular relationships in *Genista* L. Sect. *Spartocarpus* Spach (Fabaceae), *Plant Syst. Evol.* 231 (2002) 91-108.
8. Dixon R.A., Ferreira D., Molecules of Interest, Genistein, *Phytochemistry* 60 (2002) 205-211.
9. Dixon R.A., Harrison M.J., Paiva N.L., The isoflavonoid phytoalexin pathway: From enzymes to gens to transcription factors, *Physiol. Plant.* 93 (1995) 385-392.
10. Federici E., Touché A., Choquart S., Avanti O., Fay L., Offord E., Courtois D., High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures, *Phytochemistry* 64 (2003) 717-724.
11. Fedoreyew S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Glebko L., Kulesh N.I., Muzarok T.I., Seletskaya L.D., Bulgakov V.P., Zhuravlev Y.N., Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*, *Fitoterapia* 71 (2000) 365-372.
12. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Gryniewicz G., Bączek T., Kaliszan R., Isoflavonoids of estrogenic activity in tissue cultures of *Glycine max* L. and *Genista tinctoria* L., European Scientific Conference on bioactive compounds in plant foods. Health Effect and Perspectives for the Food Industry 26- 28th April, Tenerife, Congress Book of Abstracts, vol. 177, 2001.
13. Łuczkiwicz M., Zárate R., Dembińska-Migas, Migas P., Verpoorte R., Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L., *Plant Sci.* 163 (2002) 91-100.
14. Martin Y., Vermette P., Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization and recent advances, *Biomaterials* 26 (2005) 7481-7503.
15. Messina M.J., Loprinzi C.L., Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature, *J. Nutr.* 131(2001) 3095S-3108S.
16. Niemirowicz-Szczyt K., Kultury pylników i mikrospor, w: S. Malepszy (Ed.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 42-53.
17. Oksman-Caldentey K.M., Inzé D., Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites, *Trends Plant Sci.* 9 (9) (2004) 433-440.

18. Paiva N.L., Oommen A., Harrison M.J., Dixon R.A., Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 213-220.
19. Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M., Advances and limitation in the use of hairy root cultures for the production of tropane alkaloids: use of anti-auxins in the maintenance of normal root morphology, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31 (1995) 215-220.
20. Qiang Ren M., Kuhn G., Wegner J., Chen J., Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties, *Eur. J. Nutr.* 40 (2001) 135-146.
21. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 101-153.
22. Roberts S.C., Shuler M.L., Large-scale plant cell culture, *Curr. Op. Biotechnol.* 8 (1997) 154-159.
23. Schenk R.U., Hildebrandt A.C., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.* 50 (1972) 199-204.
24. Scragg A.H., The problems associated with high biomass levels in plant cell suspensions, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43 (1995) 163-170.
25. Skucińska B., *Kultura komórek i tkanek*, w: S. Malepszy (Ed.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 19-33.
26. van der Plas L.H.W., Eijkelboom C., Hagendoorn M.J.M., Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions, *Competition between secondary Metabolite production and growth in a model system* (*Morinda citrifolia*) *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 43 (1995) 111-116.
27. van Rensen I., Veit M., Greinwald R., Cantó P., Czygan F.C., Simultaneous determination of alkaloids and flavonoids as a useful tool in chemotaxonomy of the genus *Genista*, *Planta Med.* 59 (1993) A592.
28. Wysokińska H., Chmiel A., Transformed Root Cultures for Biotechnology, *Acta Biotechnol.* 17 (1997) 131-159.
29. Zacharius R.M., Kalan E.B., Isoflavonoid changes in soybean cell suspensions when challenged with intact bacteria or fungal elicitors, *J. Plant Physiol.* 135 (1990) 732-736.
30. Zobayed S.M.A., Murch S.J., Rupasinghe H.P.V., de Boer J.G., Glickman B.W., Saxena P.K., Optimized system for biomass production, chemical characterization and evaluation of chemo-preventive properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi., *Plant Sci.* 167 (2004) 439-446.

10. WPŁYW ELICYTACJI ORAZ PERMEABILIZACJI NA AKUMULACJĘ I PROFIL MAGAZYNOWANIA IZOFLAWONÓW W KULTURACH ZAWIESINOWYCH *GENISTA TINCTORIA*

Spośród licznych strategii hodowlanych stosowanych w kulturach *in vitro* roślin wyższych, ukierunkowanych na biosyntezę wtórnych metabolitów należy wymienić suplementację systemów doświadczalnych egzogennymi prekursorami biosyntezy analizowanych związków, bądź substancjami niskocząsteczkowymi, mogącymi wywierać bezpośredni lub pośredni wpływ na akumulację oraz metabolizm badanych połączeń [4,7-9,11,13,19,24,33,37].

W wyniku doświadczeń z zakresu kultur *in vitro* *G. tinctoria* ustalono, że hodowle zawiesinowe niniejszego gatunku, z uwagi na intensywny przyrost ($FW_{max} = 748,6 \text{ g l}^{-1}$) oraz wysoką produktywność w zakresie połączeń izoflawonoidowych ($3831,8 \text{ mg l}^{-1}$ dla genistyny) mogą być postrzegane jako potencjalny roślinny system *in vitro* z przeznaczeniem do przemysłowej produkcji znacznych ilości aktywnych leczniczo fitoestrogenów (rozdz. 9).

W ramach przygotowań zawiesiny janowca do hodowli w skali półtechnicznej postanowiono sprawdzić czy „dokarmianie” powyższej kultury wybranymi związkami egzogennymi może wpłynąć bezpośrednio na akumulację oraz metabolizm podstawowych składników frakcji izoflawonoidowej biomasy (pochodne genisteiny i daidzeiny) oraz na profil magazynowania poszczególnych substancji aktywnych w hodowli.

Większość połączeń zidentyfikowanych w 14 – składnikowym zespole izoflawonoidowym janowca barwierskiego (rozdz. 6) to związki o charakterze fitoaleksyn bądź fitoanacy-pin, w których biosyntezie i metabolizmie znaczną rolę odgrywają czynniki stresowe [2,13,14,30,31]. W oparciu o szereg doniesień literaturowych można stwierdzić, że zarówno elicytory biotyczne jak i również abiotyczne wywierają określony wpływ na akumulację oraz profil magazynowania izoflawonów w kulturach *in vitro* roślin z rodziny *Fabaceae* [2,4,7-9,11,13,14,19,24,30,31,33,37]. Jak opisano szczegółowo w części teoretycznej niniejszej dysertacji (rozdz. 4), wpływ ten jest niejednoznaczny i zależy bezpośrednio zarówno od rodzaju oraz stężenia elicytorów jak i również od elicytowanej biomasy roślinnej. Z uwagi na powyższe, w ramach serii eksperymentów opisanych w danym rozdziale postanowiono sprawdzić czy w wyniku procesu elicytacji zawiesiny *G. tinctoria* możliwe jest uzyskanie zmiany w profilu metabolicznym badanej biomasy w zakresie połączeń izoflawonoidowych. W związku z rozległym charakterem projektu habilitacyjnego zaplanowane eksperymenty miały charakter pilotażowy, a bezpośrednim ich celem było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy w efekcie zastosowania dodatku określonych elicytorów możliwe jest uzyskanie w biomase janowca wyższych stężeń poszczególnych metabolitów izoflawonoidowych w porównaniu z podstawową zawiesiną i czy w wyniku stosowanej procedury dochodzi, w systemie hodowlanym, do zmiany sposobu magazynowania analizowanych związków. Tym samym starano się wytyczyć dalszy kierunek badań nad sterowaną biosyntezą fitoestrogenów w kulturach *in vitro* janowców. W niniejszym doświadczeniu elicytorami z wyboru był jasmonian metylu (elicytor abiotyczny) oraz chitosan (elicytor biotyczny) [12,15,38], które z uwagi na częste stosowanie w eksperymentach dotyczących wpływu warunków stresowych na metabolizm izoflawonów w kulturach *in vitro* roślin motylkowych można uznać za związki modelowe [2,3,13,14,16,22,30,31, rozdz. 4].

W podstawowych kulturach płynnych janowca, w tym w hodowli zawiesinowej, wszystkie syntetyzowane metabolity frakcji izoflawonoidowej magazynowane były wewnątrzkomórkowo (rozdz. 9). W ramach przygotowania zawiesiny *G. tinctoria* do hodowli w skali półtechnicznej, postanowiono doprowadzić do wycieku badanych połączeń z matrycy roślinnej do medium hodowlanego, jednocześnie upraszczając procedury ekstrakcji powyższych związków z opisywanego systemu hodowlanego. Tym samym możliwe byłoby obniżenie kosztów związanych z przemysłową produkcją fitoestrogenów w oparciu o zawiesinę janowca barwierskiego [7,8,11,24,33]. Wyciek związków izoflawonoidowych do pożywki doświadczalnej zamierzano uzyskać na drodze chemicznego rozszczelnienia błon komórkowych w kulturze [5-8,11,21,23-25,33,42]. Bezpośrednim czynnikiem permeabilizującym w opisywanej serii doświadczeń był dimetylosulfotlenek (DMSO) stosowany z powodzeniem w celu uzyskania wycieku wtórnych metabolitów z matryc roślinnych hodowanych w warunkach *in vitro* [21,22].

Powodzenie w zakresie zaplanowanych eksperymentów, tj. dalsze zwiększenie produktywności kultury jako bezpośredni rezultat elicytacji oraz doprowadzenie do wycieku izoflawonów do podłoża hodowlanego stanowiłoby istotny etap mający na celu przygotowanie zawiesiny do procesu technologicznego.

Materiały i metody

Materiał roślinny

Doświadczenia opisane w niniejszym rozdziale prowadzono w oparciu o wysokoprodukcyjną zawiesinę *G. tinctoria* kultywowaną w płynnym podłożu Schenk – Hildebrandt'a [36] zawierającym 3% (w/v) sacharozy, $1,0 \mu\text{mol l}^{-1}$ TIBA (kwas 2,3,5-trijodobenzoesowy) i $23,23 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny (SH_2). Biomasy janowca hodowano w szklanych kolbach Erlenmeyer'a, zamykanych korkami z pianki silikonowej (*Shine-Etsu-Polymer Co.* – Japonia), na wytrząsarce rotacyjnej (INNOVA 2300-New Brunswick Scientific – 150 rpm), w warunkach oświetlenia ciągłego (natężenie światła – $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - lampy jarzeniowe Philips TLD 35W x 3), w temp. $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (rozdz. 9).

Roztwory elicytujące

Chitosan

1,5 g chitosanu z muszli krabów (*Sigma Chemical Company*, USA) rozpuszczono w 4 ml gorącego ($60 \text{ }^\circ\text{C}$) lodowatego kwasu octowego (J.T. Baker, USA), dodając odczynnik po kropli aż do całkowitego rozpuszczenia elicytora [24]. Następnie roztwór, rozcieńczony wodą redestylowaną (40 ml), doprowadzono do pH 5,7 za pomocą 1N NaOH (J.T. Baker, USA) i uzupełniono wodą do całkowitej objętości 50 ml. Przygotowany według powyższej procedury roztwór chitosanu, przed dodaniem do zawiesiny *G. tinctoria* autoklawowano w warunkach standardowych (rozdz. 6 - 9).

Jasmonian metylu

Podstawowy roztwór elicytora sporządzano rozpuszczając 100 mg jasmonianu metylu (*Sigma Chemical Company*, USA) w 100 ml mieszaniny: etanol (J.T. Baker, USA) – woda redestylowana (12:3, v/v) [9]. Elicytor, przed dodaniem do pożywek eksperymentalnych zawierających zainokulowane (0 dzień doświadczenia) lub rosnące aktywnie (26 dzień hodowli) biomasy janowca, sterylizowano metodą jałowego sączenia, przy pomocy wyjąławiających sączków o wielkości porów $0,22 \mu\text{m}$ (Millex Vent Filter, PTFE membrane; Millipore Corporation, Bedford, USA).

Procedury doświadczalne

Elicytacja

Każdorazowo w 250 ml kolbkach Erlenmeyer'a, zamykanych korkami z pianki silikonowej i zawierających po 100 ml zmodyfikowanej pożywki SH (SH_z), umieszczano około 5 g podstawowej zawiesiny *G. tinctoria*. W celu określenia wpływu chitosanu oraz jasmonianu metylu na akumulację oraz profil magazynowania izoflawonów w biomase janowca, obydwie elicytory dodawano do pożywek w 0 bądź 26 dniu trwania hodowli. Elicytowane kultury zawiesinowe janowca barwierskiego prowadzono w cyklu 34 dniowym (3 serie – 22 kolb w każdej), w warunkach standardowych, opisanych powyżej dla zawiesiny podstawowej. Biomasy *G. tinctoria* zbierano w odstępach dwudniowych do 26 dnia eksperymentu, a następnie jednodniowych aż do zakończenia cyklu hodowlanego (ogółem 34 dni).

Próby kontrolne w niniejszych doświadczeniach stanowiły podstawowe zawiesiny janowca hodowane w pożywce SH_z bez dodatku elicytorów i zbierane zgodnie z procedurą podaną dla kultur elicytowanych.

Permeabilizacja

Bezpośrednim czynnikiem permeabilizującym w opisywanym doświadczeniu był dimetylosulfotlenek (DMSO – *Sigma Chemical Company*, USA) dodawany w ilości 20 ml l⁻¹ do aktywnie rosnącej zawiesiny *G. tinctoria*.

Każdorazowo w 250 ml kolbach Erlenmeyer'a, zawierających po 100 ml zmodyfikowanej pożywki SH (SH_z), umieszczano około 5 g podstawowej zawiesiny *G. tinctoria*, którą kultywowano w warunkach standardowych przez 26 dni. W celu uzyskania wycieku izoflawonów z matryc roślinnych do medium hodowlanego w 26 dniu eksperymentu do pożywek dodano jednorazowo 20 ml l⁻¹ DMSO [6,21]. Permeabilizowane zawiesiny janowca kultywowano w warunkach opisanych powyżej dla zawiesiny podstawowej, zbierając biomasy w odstępach 30 min., przez okres 8 godzin (3 serie – 17 kolb w każdej).

Próby kontrolne stanowiły w tym wypadku zawiesiny *G. tinctoria* hodowane w pożywce SH_z bez dodatku DMSO, hodowane w warunkach standardowych i zbierane w 30 min. odstępach, podobnie jak biomasy permeabilizowane.

Otrzymany, w wyniku badań biotechnologicznych, materiał roślinny wraz z płynnymi pożywkami (kultury podstawowe, elicytowane oraz permeabilizowane), pochodzącymi z poszczególnych etapów eksperymentu, suszono przez 48 h, do stałej masy, na drodze liofilizacji (próżnia 1 x 10⁻³ mbar wytworzona przez liofilizator LYOVAC GT2 firmy FIN-AQUA SANTASALO-SOHLBERG Co – Finlandia). Zliofilizowane biomasy janowca oraz podłoża hodowlane przeznaczono do badań fitochemicznych na obecność bioflawonoidów. Uzyskane wyniki (świeża masa – FW, sucha masa – DW oraz zawartość izoflawonów w materiale roślinnym i pożywkach) stanowią średnie arytmetyczne z trzech próbek hodowlanych ± S. D.

Jakościową oraz ilościową analizę frakcji izoflawonoidowych, występujących w badanych biomasach i podłożach hodowlanych, zebranych na wszystkich etapach opisywanych doświadczeń, przeprowadzono techniką HPLC, według procedury opisanej szczegółowo w rozdziale 6.

Omówienie wyników

Jak już wspomniano, we wprowadzeniu do niniejszego rozdziału, opisywane doświadczenia miały charakter pilotażowy, a ich nadrzędnym celem było stwierdzenie, czy stosowanie

procedur hodowlanych związanych z elicytacją oraz permeabilizacją wysoko produkcyjnej zawiesiny *G. tinctoria* (11138,95 mg izoflawonów w 100 g suchej masy) może wpłynąć na akumulację oraz profil magazynowania izoflawonów w badanej biomacie.

W związku z powyższym i w oparciu o dane literaturowe do prezentowanych eksperymentów wybrano dwa elicytory przynoszące najlepsze rezultaty w kulturach *in vitro* roślin wyższych ukierunkowanych na biosyntezę związków aktywnych biologicznie, tj. jasmonian metylu oraz chitosan [3,7,11,19,38].

Całkowicie negatywne rezultaty wstępnych doświadczeń związanych z permeabilizacją zawiesiny *G. tinctoria* wybranymi czynnikami fizycznymi (drastyczna zmiana temperatury, stosowanie impulsów elektrycznych) wpłynęły na decyzję o przedstawieniu w niniejszym rozdziale jedynie wpływu chemicznej permeabilizacji biomasy janowca na ogólnie rozumianą akumulację izoflawonów w badanej zawieszynie. W oparciu o doświadczenie własne oraz doniesienia literaturowe [5,6,21,23,25,42] na opisywanym etapie doświadczeń, jako bezpośredni czynnik permeabilizujący, zastosowano dimetylosulfotlenek (DMSO).

Wpływ dodatku jasmonianu metylu na wzrost zawiesiny G. tinctoria oraz akumulację połączeń izoflawonoidowych

Stosowana w eksperymencie metylowa pochodna kwasu jasmonowego, podobnie jak sam kwas, w warunkach *in vivo*, bierze czynny udział w szlaku metabolicznym kwasu oktadekanowego, wpływając m. in. na przekazywanie impulsów aktywujących procesy obronne w komórkach roślinnych narażonych na niekorzystne warunki środowiskowe, w tym atak patogenów [12,29,35,38,41]. W związku z powyższym omawiane związki jako przekaźniki II-rzędu w relacjach komórka – patogen stosowane są często jako egzogenne elicytory abiotyczne w celu uzyskania, w kulturach *in vitro*, wzmożonej biosyntezy wtórnych metabolitów związanych bezpośrednio z procesami obronnymi [2,3,15,16,19,37,38].

W prezentowanych doświadczeniach jasmonian metylu dodawano do zawiesiny *G. tinctoria* w 0 lub 26 dniu eksperymentu. Tym samym możliwe było prześledzenie wpływu niniejszego elicytora na wzrost biomasy janowca oraz kinetykę produkcji izoflawonów w całym 34 – dniowym cyklu hodowlanym (dodatek jasmonianu do zawiesiny inokularnej), bądź jedynie od momentu, gdy zawiesina *G. tinctoria* osiągnąwszy fazę stacjonarną wzrostu, akumulowała maksymalne stężenia podstawowych składników frakcji izoflawonoidowej (26 dzień - 11138,95 mg izoflawonów w 100 g suchej masy) i tym samym stanowiła roślinną kulturę *in vitro* najbardziej interesującą z technologicznego punktu widzenia (rozdz. 9). Stosowanie opisywanej procedury dokarmiania hodowli zawiesinowej janowca jasmonianem metylu pozwoliło na opracowanie optymalnego systemu elicytacji badanej kultury, umożliwiającego stymulację biosyntezy fitoestrogenów izoflawonoidowych, z wykluczeniem negatywnego wpływu elicytora na wzrost namnażanych biomas (tab. 1-3, ryc. 1-5).

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że jasmonian metylu dodany do zawiesiny *G. tinctoria* w ilości $100 \mu\text{mol l}^{-1}$, wpłynął zasadniczo na wzrost badanej biomasy jak i również na akumulację poszczególnych związków izoflawonoidowych syntetyzowanych w omawianych kulturach *in vitro* (tab. 1-3, ryc. 1 i 2).

Na podstawie ilości świeżej (FW) oraz suchej (DW) masy tkankowej oznaczanej w poszczególnych dniach doświadczenia można stwierdzić, że jasmonian metylu wyraźnie hamował wzrost i juwenilność zawiesiny *G. tinctoria* (ryc. 1 i 2). Opisywane zjawisko jest szczególnie widoczne w przypadku dokarmiania elicytorem zawiesiny inokularnej (ryc. 1 i 2).

W przeciwieństwie do biomasy kontrolnej, kultury z dodatkiem jasmonianu metylu praktycznie zupełnie nie przyrastały do 16 dnia eksperymentu (FW – $49,5 \text{ g l}^{-1}$ – ryc. 1), a następnie

stopniowo zamierały (FW – 28,1 g l⁻¹ – 34 dzień hodowli; ryc. 1). W rezultacie w 22 dniu doświadczenia, w którym stwierdzono dla zawiesiny podstawowej maksymalną ilość świeżej masy (FW – 748,6 g l⁻¹), kultura elicytowana produkowała jedynie 47,6 g l⁻¹ biomasy, czyli prawie 16 krotnie mniej niż hodowla kontrolna (ryc. 1).

Hamowanie przyrostu kultury zawiesinowej *G. tinctoria*, jako bezpośredni rezultat zastosowania jasmonianu metylu, jest znacznie mniej widoczne w przypadku biomasy dokarmianej elicytorem w 26 dniu hodowli (ryc. 1 i 2). Być może wiąże się to ze stosunkowo krótkim okresem kultuwacji zawiesiny janowca z elicytorem (9 dni) oraz z faktem, że analizowana kultura, w omawianym przypadku, znajdowała się w fazie stacjonarnej wzrostu (ryc. 1 i 2).

W efekcie przeprowadzonego doświadczenia potwierdzono szereg doniesień literaturowych, w których eksperymentatorzy stwierdzili wyraźnie zmniejszenie świeżej i suchej masy tkankowej w kulturach roślinnych elicytowanych jasmonianem metylu bądź kwasem jasmonowym [2,4,9,22,24,30,38]. Powszechnie uważa się, że kwas jasmonowy, zaliczany często do endogennych regulatorów wzrostu [12,29,35,41], hamuje przyrost tkanek i przyspiesza procesy starzenia namnażanych biomas [2,4,9,19,22,24,30,38].

W opisywanym doświadczeniu makroskopowym objawem błyskawicznego starzenia się kultur janowca, elicytowanych w dniu inokulacji, było szybkie brunatnienie zawiesiny, która po odsączeniu od pożywki miała charakter ciemnobrunatnej, śluzowatej pozostałości, co wskazywało bezpośrednio na przewagę procesów katabolicznych w badanej biomasie [12,32,41].

Opisywane powyżej rezultaty eksperymentów wskazują jednoznacznie, że elicytacja zawiesiny *G. tinctoria* w 0 dniu doświadczenia jest bezzasadna. Nawet gdyby, w zaistniałych warunkach, doszło do znacznego wzrostu stężenia izoflawonów w namnażanych kulturach, uzyskany rezultat nie rekompensowałyby całkowitego spadku masy roślinnej, otrzymanej z pojedynczego eksperymentu.

Elicytowana jasmonianem metylu zawiesina *G. tinctoria* syntetyzowała 14 – składnikowy zespół izoflawonów, tożsamy ze związkami zidentyfikowanymi w kulturze kontrolnej (tab. 1-3, ryc. 3-5, rozdz. 9). Podstawowymi składnikami frakcji izoflawonoidowej, w badanej biomasie, były pochodne genisteiny, przy znacznie niższych zawartościach połączeń znajdujących się w szlaku metabolicznym daidzeiny (tab. 1-3). Dokarmianie zawiesiny janowca jasmonianem metylu nie wpłynęło na sposób magazynowania badanych związków. Podobnie jak w kulturze podstawowej wszystkie analizowane połączenia gromadzone były wewnątrzkomórkowo (tab. 1-3, ryc. 3-5).

Na obecnym etapie doświadczeń trudno wyjaśnić brak wyrzucania syntetyzowanych metabolitów z elicytowanej zawiesiny do medium hodowlanego, procesu obserwowanego często w przypadku kultur *in vitro* poddanych warunkom stresowym [1,10,28,31,32,34]. Uzyskany rezultat wydaje się być wypadkową stosowania konkretnego elicytora oraz specyficznym metabolizmem dokarmianej biomasy. W tym miejscu należy zaznaczyć, że ciągle nie dysponujemy ostatecznym modelem wyjaśniającym relacje między organizmami roślinnymi a środowiskiem, obejmujące również reakcje obronne [12,41,42]. Poszczególne dane literaturowe wskazują, że w zależności od badanego gatunku roślinnego oraz typu dokarmianych tkanek (korzenie, pędy, rozproszone komórki parenchymatyczne) elicytacja jasmonianem metylu może wiązać się wybiórczo z wyrzuceniem wtórnych metabolitów do pożywki eksperymentalnej bądź też z zachowaniem wewnątrzkomórkowego profilu magazynowania [1,10,14,20,28,32,34]. Uzyskane w niniejszym eksperymencie wyniki potwierdzają powyższe dane literaturowe i wskazują na złożony charakter procesów obronnych w biomasach roślinnych.

W wyniku dokarmiania zawiesiny *G. tinctoria* jasmonianem metylu, w dniu inokulacji, nie stwierdzono wpływu elicytora na zawartość połączeń izoflawonoidowych w badanej biomasie. Przypuszczalnie wiąże się to bezpośrednio z całkowitym zamieraniem kultury poddanej działaniu jasmonianu metylu. W rezultacie stężenia wszystkich analizowanych związków izoflawonoidowych znajdowały się w zawieszynie janowca na poziomie oznaczonym w biomasie inokularnej (tab. 2).

Elicytacja kultury *G. tinctoria* w 26 dniu hodowli wpłynęła natomiast wybiórczo na akumulację aglikonów izoflawonoidowych (genisteiny i daidzeiny) oraz malonylogenistyny (tab. 3, ryc. 3-5). Począwszy od dnia, w którym dodano jasmonian metylu stężenia obydwu aglikonów stopniowo rosły, osiągając wartości maksymalne w 30 dniu hodowli (198,3 mg/100 g suchej masy – genisteina; 15,21 mg/100 g suchej masy – daidzeina – tab. 3). Tym samym maksymalna zawartość genisteiny w elicytowanej kulturze była 3 krotnie wyższa niż w biomasie kontrolnej (tab. 1 i 3, ryc. 5), a w przypadku daidzeiny przekraczała 5 krotnie poziom związku oznaczonego w zawieszynie podstawowej (tab. 1 i 3, ryc. 3). Jednocześnie stwierdzono, że stężenie malonylogenistyny, w opisywanym przedziale czasowym, zmalało w kulturze 30 krotnie (69,4 mg/100 g suchej masy – dzień 26 – zawiesina podstawowa; 2,5 mg/100 g suchej masy – dzień 30 – zawiesina elicytowana – tab. 1 i 3). Pozostałe związki izoflawonoidowe pozostały w elicytowanej zawieszynie w ilościach oznaczanych w kulturze kontrolnej (tab. 1 i 3).

Rezultaty przeprowadzonych badań pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi wskazującymi, że w warunkach stresowych dochodzi w roślinie do wybiórczej syntezy aglikonów izoflawonoidowych mających charakter fitoaleksyn [1,2,14,16,20,30,31,34]. Proces ten jest związany z biosyntezą powyższych związków *de novo* lub też jest wynikiem hydrolitycznego rozpadu połączeń estrowych pełniących rolę fitoantycypin [1,2,18,27,28]. Wysokie stężenie genisteiny, uzyskane w wyniku elicytacji zawiesiny janowca barwierskiego, w powiązaniu z wyraźnym rozpadem, w biomasie, magazynowej formy fitoantycypiny, wskazują, że reakcja na warunki stresowe w kulturze janowca może mieć charakter złożony [18,27]. Prawdopodobnie jest ona związana nie tylko z biosyntezą fitoaleksyny *de novo*, ale również z pośrednim powstawaniem genisteiny na skutek hydrolitycznego rozpadu malonylogenistyny.

We wtórnym powstawaniu aglikonów izoflawonoidowych nie brały natomiast udziału połączenia o charakterze glikozydów (stężenia niniejszych związków w elicytowanej kulturze odpowiadały zawartościom odpowiednich metabolitów w biomasie kontrolnej – tab. 1 i 3).

W toku dalszego procesu hodowlanego (34 dniowy cykl wzrostowy) nie stwierdzono ponadto gwałtownego spadku zawartości genisteiny oraz daidzeiny, połączonego z wtórnym wzrostem stężenia estrowej formy magazynującej fitoaleksyn (tab. 3, ryc. 3-5), tj. zjawiska obserwowanego często w elicytowanych kulturach *in vitro* roślin motylkowych [2,26,27]. Być może w zawieszynie janowca barwierskiego, ze względu na ciągły kontakt pojedynczych komórek z substancją elicytującą, w opisywanym przedziale czasowym, nie doszło do wygaszenia reakcji obronnej, mającej w tym wypadku, podobnie jak w zawieszynie *Pueraria lobata* [31], charakter odpowiedzi systemowej [12,20,31].

W efekcie zastosowania opisaney procedury hodowlanej otrzymano wysokoprodukcyjną zawiesinę janowca barwierskiego, która syntetyzowała glikozydy izoflawonoidowe na poziomie kultury podstawowej, a jednocześnie akumulowała, w wyniku elicytacji, kilkukrotnie wyższe stężenia aglikonów (tab. 1 i 3, ryc. 3-5).

Wpływ dodatku chitosanu na wzrost zawiesiny *G. tinctoria* oraz akumulację połączeń izoflawonoidowych

Chitosan, będący chemicznie diacetylową pochodną chityny [12], należy do najczęściej stosowanych elicytorów biotycznych, w kulturach *in vitro* roślin wyższych [3,7,11,33,42]. W licznych doświadczeniach, związanych z hodowlą biomas roślinnych ukierunkowanych na produkcję wtórnych metabolitów, stwierdzono, że dodatek niniejszego elicytora do kultury wiąże się nie tylko ze zwiększoną biosyntezą określonych związków aktywnych biologicznie, ale również wpływa na rozszczelnienie błon komórkowych, w efekcie którego dochodzi do wycieku, do pożywki eksperymentalnej, akumulowanych wewnątrzkomórkowo połączeń [3,7,11,33,42].

W hodowlach zawiesinowych *G. tinctoria* syntetyzowane związki izoflawonoidowe magazynowane były całkowicie wewnątrzkomórkowo (rozdz. 9). Jak już wspomniano, uzyskanie wycieku niniejszych połączeń do medium hodowlanego w istotny sposób usprawniłoby procedury związane z ekstrakcją izoflawonów z matrycy roślinnej. W oparciu o dane literaturowe [3,33,42] oczekiwano, że dodawany do zawiesiny janowca chitosan może spełnić podwójną rolę, zarówno jako czynnik elicytujący, jak i również permeabilizujący badaną biomasę.

W celu opracowania optymalnego systemu elicytacji kultury *G. tinctoria* chitosanem, podobnie jak to miało miejsce w przypadku doświadczeń z jasmonianem metylu, niniejszy elicytor dodawano do zawiesiny w 0 bądź 26 dniu hodowli, w standardowej ilości 150 mg l^{-1} [3,7,8,11,24,33,42].

W toku przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że chitosan wywierał zasadniczy wpływ na przyrost badanej zawiesiny (ryc. 1 i 2) oraz akumulację połączeń izoflawonoidowych (tab. 4 i 5, ryc. 3-5). Podobnie jak jasmonian metylu niniejszy elicytor dodany do pożywki w dniu inokulacji, hamował wzrost oraz żywotność namnażanej biomasy (ryc. 1 i 2). Począwszy od pierwszego dnia eksperymentu, w kulturze prowadzonej w obecności chitosanu, w całym 34 – dniowym cyklu hodowlanym, odnotowano stopniowy spadek ilości suchej (DW) oraz świeżej (FW) masy tkankowej (ryc. 1 i 2). W efekcie, w ostatnim dniu doświadczenia otrzymano $30,4 \text{ g l}^{-1}$ świeżej biomasy janowca, co stanowi jedynie około 60% wartości wyjściowej ($50,3 \text{ g l}^{-1}$ FW – ryc. 1).

Profil wzrostowy zawiesiny *G. tinctoria* elicytowanej chitosanem, w fazie stacjonarnej wzrostu (26 dzień) niemal całkowicie pokrywał się z krzywą wzrostową wyznaczoną dla kultury kontrolnej (ryc. 1 i 2). Omawiane powyżej wyniki eksperymentu zbieżne z rezultatami uzyskanymi podczas dokarmiania hodowli jasmonianem metylu wskazują, że niezależnie od stosowanego czynnika stresowego, niezwykle istotne jest przestrzeganie dodatku elicytora na określonym etapie wzrostu hodowli *in vitro*, w tym wypadku w fazie stacjonarnej. Wydaje się, że stosowanie powyższej procedury eksperymentalnej pozwala na uniknięcie negatywnego wpływu elicytora na pierwotny metabolizm tkankowy [8,12,24] i uzyskanie jedynie pozytywnych efektów elicytacji, wiążących się z wybiórczym wpływem czynnika stresowego na metabolizm wtórny (ryc. 3-5).

Dokarmianie zawiesiny janowca chitosanem nie wiązało się ze zmianą składu jakościowego frakcji izoflawonoidowej syntetyzowanej w badanej kulturze. Istotny okazał się natomiast termin elicytacji, wpływający bezpośrednio na ilość akumulowanych połączeń. Podobnie jak to miało miejsce w przypadku jasmonianu metylu chitosan dodawany do pożywki w dniu inokulacji ogólnie hamował produkcję izoflawonoidów w biomasie (tab. 1 i 4, ryc. 3-5). Efekt ten był w obydwu wypadkach skorelowany z zamieraniem zawiesiny (ryc. 1 i 2). Prawdopodobnie zaistniałe zmiany nekrotyczne w zawieszynie *G. tinctoria* spowodowały, że

stężenia poszczególnych izoflawonów w kulturze utrzymywały się na mniej więcej stałym poziomie, charakterystycznym dla biomasy inokularnej, nie uwidaczniając jednocześnie wpływu elicytorów na zawartość poszczególnych składników frakcji izoflawonoidowej, czyli zjawiska obserwowanego podczas dokarmiania zawiesiny w fazie stacjonarnej (tab. 1,4,5, ryc. 3-5).

Elicytacja chitosanem biomasy *G. tinctoria*, w 26 dniu eksperymentu, spowodowała wybiórczy wzrost stężenia aglikonów izoflawonoidowych (daidzeiny i genisteiny) w badanej zawiesinie (tab. 5, ryc. 3-5). Podobnie jak w przypadku dokarmiania kultury jasmonianem metylu poziom obydwu związków rósł stopniowo, od momentu dodatku elicytora, osiągając *maximum* w 30 dniu hodowli (258,4 mg/100 g suchej masy – genisteina; 17,51 mg/100 g suchej masy – daidzeina), a następnie utrzymując się w kulturze na mniej więcej stałym poziomie (tab. 5, ryc. 3-5).

W opisywanym doświadczeniu wysoka zawartość izoflawonoidowych fitoaleksyn, akumulowanych w hodowli janowca, wiązała się prawdopodobnie całkowicie z biosyntezą niniejszych połączeń *de novo*. Wskazuje na to niezmienna, w stosunku do biomasy kontrolnej, zawartość glikozydowych pochodnych genisteiny i daidzeiny w zawiesinie (tab. 5). Ponadto, w przeciwieństwie do doświadczenia z jasmonianem metylu, poziom formy magazynującej fitoaleksynę (malonylogenistyna), w całym cyklu hodowlanym, stopniowo wzrastał, przypominając kinetykę produkcji niniejszego związku w hodowli podstawowej (tab. 3 i 5, ryc. 5). Opisywane zjawisko zdaje się więc wykluczać możliwość powstawania genisteiny w wyniku hydrolitycznego rozpadu formy magazynującej i sugeruje, że przebieg reakcji obronnej w zawiesinie *G. tinctoria* może być różny i bezpośrednio zależny od rodzaju stosowanego elicytora.

Maksymalna zawartość genisteiny i daidzeiny w przypadku elicytacji zawiesiny chitosanem była odpowiednio o 24 i 13% wyższa od stężeń omawianych związków uzyskanych podczas dokarmiania kultury jasmonianem metylu (tab. 3 i 5, ryc. 3-5). Ponadto, ze względu na zachowany profil produkcji malonylogenistyny (max. zawartość – 73,6 mg/100 g suchej masy – tab. 5), biomasa *G. tinctoria* elicytowana chitosanem stanowi materiał biologiczny zawierający ogólnie więcej izoflawonów niż zawiesina kultywowana w obecności jasmonianu (tab. 3 i 5, ryc. 3-5). Pod względem technologicznym, omawiana kultura jest więc bardziej atrakcyjna.

Niezależnie od momentu dodawania do pożywki, chitosan nie spełnił, w zawiesinie *G. tinctoria*, roli czynnika permeabilizującego. Wszystkie analizowane wtórne metabolity, w badanej kulturze, magazynowane były wewnątrzkomórkowo, podobnie jak w biomasie podstawowej oraz elicytowanej jasmonianem metylu.

Reasumując, w wyniku przeprowadzonego doświadczenia stwierdzono, że dokarmianie kultury *G. tinctoria* chitosanem, podobnie jak to miało miejsce w przypadku eksperymentów z jasmonianem metylu może istotnie zwiększyć zawartość aglikonów izoflawonoidowych, syntetyzowanych w biomasie jako bezpośredni efekt wystąpienia warunków stresowych. Sam proces elicytacji nie wpłynął natomiast na profil magazynowania analizowanych połączeń.

Wpływ dodatku DMSO na wzrost zawiesiny G. tinctoria oraz profil magazynowania połączeń izoflawonoidowych

Permeabilizacja chemiczna, w przeciwieństwie do fizycznej, stanowi stosunkowo mało kosztowną oraz prostą metodę pozwalającą na wyciek wtórnych metabolitów z matrycy roślinnej do medium hodowlanego [5,6,17,21,23,25,39,40,42]. Testowanie efektów permeabilizacji z zastosowaniem szeregu związków takich jak: DMSO, chloroform, alkohol fenyłowy, Triton X-100 oraz bardzo zróżnicowanego materiału roślinnego (kultury *in vitro* *Catharanthus*

roseus, *Thalictrum rugosum* i *Chenopodium rubrum*) wykazało, że końcowy efekt eksperymentu, związany z wyciekiem wtórnych metabolitów do pożywki oraz z zachowaniem żywotności biomas, zależy zarówno od rodzaju i stężenia czynnika permeabilizującego, jak i również od badanego gatunku roślinnego oraz typu hodowli *in vitro* [5,6].

Wybór DMSO do permeabilizacji zawiesiny *G. tinctoria* podyktowany był danymi literaturowymi wskazującymi, że niniejszy związek należy do najbardziej efektywnych czynników rozszczelniających błony komórkowe, powodujący nie tylko znaczny wyciek analizowanych substancji do medium hodowlanego, ale pozwalający również w zakresie niskich stężeń (2 – 10%) na zachowanie aktywności namnażanych tkanek [5,6,17,23,25,42].

W celu uniknięcia zamierania biomasy janowca kultywowanej w obecności DMSO [5,6,23], niniejszy związek dodawano do pożywki w stosunkowo niskim stężeniu (20 ml l⁻¹), dopiero w 26 dniu hodowli, czyli po ukończeniu intensywnego przyrostu komórek i uzyskaniu maksymalnej zawartości izoflawonów w kulturze (tab. 6, ryc. 6). Żywotność biomasy janowca oraz stężenia wtórnych metabolitów w matrycach roślinnych i pożywkach doświadczalnych badano w 8 godzinnym cyklu hodowlanym, zbierając zawiesinę w odstępach 30 minutowych.

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że DMSO w kulturze janowca doprowadził do wycieku izoflawonów do medium hodowlanego wywołując jednocześnie stopniową nekrozę namnażanych komórek (tab. 6-8, ryc. 6-10). W przeciwieństwie do kultury podstawowej, zawiesina *G. tinctoria* kultywowana w obecności DMSO stosunkowo szybko zamierała. Ilości suchej (28,6 g l⁻¹) oraz świeżej (532,3 g l⁻¹) masy tkankowej uzyskane w ostatniej godzinie eksperymentu były odpowiednio o 23 i 28% niższe niż w przypadku zawiesiny kontrolnej (ryc. 6). Ponieważ DMSO dodawano dopiero w fazie stacjonarnej wzrostu biomasy, trudno ocenić jednoznacznie, jaki bezpośredni wpływ na wzrost oraz żywotność kultury wywiera niniejszy czynnik permeabilizujący. Ostateczne wnioski można byłoby wysunąć dopiero dodając DMSO do biomasy inokularnej, a następnie monitorując wzrost zawiesiny w całym 34 dniowym cyklu hodowlanym [5,6,17,23,25,42].

W tym miejscu należy zaznaczyć, że system hodowlany z zastosowaniem zawiesiny janowca barwieskiego miał charakter kultury okresowej. W przeciwieństwie do permeabilizowanych kultur ciągłych [5,23,42], w niniejszym doświadczeniu komórki parenchymatyczne *G. tinctoria* wykorzystywano jednorazowo, by po zakończonym cyklu hodowlanym przeznaczyć je w całości wraz z pożywkami eksperymentalnymi do izolacji związków izoflawonoidowych. W związku z powyższym opisywane zjawisko zamierania namnażanej biomasy, jako bezpośredni efekt dodatku DMSO, nie wydaje się wpływać znacząco na końcowy wynik doświadczenia.

2% zawartość DMSO w zawiesinie *G. tinctoria* okazała się wystarczająca do rozszczelnienia badanych komórek. W opisywanych warunkach uzyskano stopniowy wyciek, do medium hodowlanego, wszystkich syntetyzowanych w biomasie połączeń izoflawonoidowych. Proces ten był jednak rozciągnięty w czasie (tab. 6-8, ryc. 7-10). W przeciwieństwie do danych literaturowych gdzie maksymalne stężenia analizowanych metabolitów obserwowano w pożywkach już pół godziny po permeabilizacji [5,6], w opisywanym przypadku powyższy efekt osiągnięto dopiero w 7 godzinie eksperymentu (tab. 8, ryc. 7-10). Stosunkowo powolny wyciek związków izoflawonoidowych z komórek janowca spowodowany był prawdopodobnie niskim stężeniem DMSO w kulturze (2%) oraz suplementacją niniejszego związku dopiero w fazie stacjonarnej przyrostu biomasy, czyli przyjęciem procedury hodowlanej różniącej się od opisywanych dotychczas modeli doświadczalnych [5,6,17,23,25,42].

Analizując zawartość izoflawonów w poszczególnych pożywkach i matrycach roślinnych w grupie aglikonów (genisteina i daidzeina), glikozydów (genistyna, 7-O-diglukozyd genisteiny, 7-O-glukozyd-2'-hydroksygenisteiny, daidzina) oraz estrów (6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny /malonylogenisstyna oraz 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny /acetylogenisstyna) ustalono, że zarówno stopień jak i tempo wycieku z komórek poszczególnych związków związane są bezpośrednio z budową chemiczną badanych połączeń (ryc. 7-10).

W związku z powyższym jako pierwsze, w medium hodowlanym, stwierdzono związki estrowe i diglikozydowe (30 min. po permeabilizacji), a następnie monoglikozydy i aglikony (odpowiednio 60, 90 i 120 min. po dodaniu DMSO – tab. 7 i 8). Uzyskane wyniki wskazują, że tempo uwalniania izoflawonów z matrycy roślinnej w biomasie janowca jest wprost proporcjonalne do polarności badanych związków. Od polarności zależy również stopień wycieku izoflawonów z biomasy, czyli całkowita zawartość badanych połączeń w pożywce eksperymentalnej. Ogólnie ujmując dla estrów izoflawonoidowych wynosiła ona ok. 95% ogólnego stężenia niniejszych związków akumulowanych w zawieszynie *G. tinctoria*, w 26 dniu hodowli (tab. 6 i 8, ryc. 10), a glikozydów i aglikonów, do medium hodowlanego, wyciekło ostatecznie odpowiednio 80 i 67 % (tab. 8, ryc. 7-9).

Wysoka zawartość izoflawonów w pożywce eksperymentalnej odpowiada rezultatom uzyskanym uprzednio podczas permeabilizacji roślinnych kultur *in vitro* DMSO, w stężeniu 25% [5,6]. Otrzymany wynik wskazuje, że biomasa janowca jest wyjątkowo podatna na permeabilizację niniejszym związkiem i jednocześnie nie wymaga stosowania wysokich stężeń DMSO, które mogłyby spowodować znaczący spadek aktywności namnażanych komórek [5,6,40,42].

W tym miejscu należy zaznaczyć, że niezależnie od struktury badanych izoflawonów, maksymalną zawartość wszystkich analizowanych związków uzyskano w pożywce w 7 godzinie eksperymentu, a kontynuowanie doświadczenia nie wiązało się dalszym wyciekaniem akumulowanych metabolitów do pożywki (tab. 8, ryc. 7-10).

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że w wyniku dodatku DMSO do zawiesziny *G. tinctoria* możliwe jest uzyskanie zmiany profilu magazynowania związków izoflawonoidowych w badanej kulturze. Stosowana procedura hodowlana spowodowała wyciek analizowanych połączeń na zadawalającym poziomie [5,6,17,23,25,39,40,42] i wydaje się odpowiednia dla kultury okresowej, prowadząc do usprawnienia procedur technologicznych związanych z ekstrakcją izoflawonów.

Reasumując, w wyniku sterowanego procesu hodowlanego związanego z elicytacją i permeabilizacją zawiesziny *G. tinctoria* udało się zrealizować zasadniczy cel eksperymentu, którym było uzyskanie systemu hodowlanego, produkującego fitoestrogeny na poziomie wyższym niż kultura podstawowa, jednocześnie charakteryzującego się zewnątrzkomórkowym profilem magazynowania analizowanych wtórnych metabolitów.

Seria eksperymentów z zastosowaniem chitosanu oraz jasmonianu metylu potwierdziła dane literaturowe odnośnie kluczowej roli czynników stresowych w biosyntezie izoflawonów o charakterze fitoaleksyn. Wykazano jednocześnie, że rodzaj elicytora wpływa na mechanizm tworzenia się poszczególnych fitoaleksyn w zawieszynie *G. tinctoria*. Właściwy moment dodatku czynnika stresowego do systemu hodowlanego wiąże się natomiast z ostateczną zawartością frakcji izoflawonoidowej w biomasie, co ma istotne znaczenie w przypadku traktowania kultury *in vitro* jako źródła określonych wtórnych metabolitów. Uzyskane wyniki wskazują, że ogólnie rozumiana elicytacja zawiesziny janowca barwierskiego powinna stanowić dalszy kierunek badań nad sterowaną biosyntezą izoflawonów w kulturach *in vitro* niniejszego

gatunku, których bezpośrednim celem jest opracowanie wysokowydajnego procesu biotechnologicznego do otrzymania aktywnych leczniczo izoflawonów. Ponadto biomasa *G. tinctoria* ze względu na bogaty skład frakcji izoflawonoidowej (14 związków) oraz znaczną podatność na proces elicytacji może być stosowana w przyszłości jako modelowy system w doświadczeniach podstawowych, mających na celu badania relacji między roślinami a środowiskiem.

Permeabilizacja zawiesiny janowca 2% DMSO dowiodła, że w badanym systemie hodowlanym możliwe jest uzyskanie pożądanego wycieku izoflawonów do medium eksperymentalnego, w stężeniach uzasadniających stosowanie niniejszej procedury w procesie technologicznym. Należy jednak zaznaczyć, że jest ona odpowiednia dla kultury okresowej. Adaptacja opracowanych warunków hodowlanych dla kultury ciągłej wymagać będzie dalszej serii doświadczeń uwzględniających zachowanie żywotności biomasy janowca podczas kultywowania zawiesiny z czynnikiem permeabilizującym, w całym cyklu hodowlanym.

Tab. 1. Zawartość izoflawonów w podstawowej kulturze zawiesinowej *Genista tinctoria* (stężenie związków w mg/100 g suchej masy).

Tab. 1. Isoflavone concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Dzień	Związek								
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'- hydroksygenisteiny	malonylo- genistyna	acetylogenisztyna	
0	4,3 ± 0,1	2117,6 ± 14,5	2,52 ± 0,07	16,53 ± 0,98	603,3 ± 15,3	18,42 ± 0,9	9,2 ± 0,4	4,43 ± 0,1	
2	2,9 ± 0,09	1053,3 ± 9,8	1,74 ± 0,09	6,99 ± 0,3	327,3 ± 11,2	11,96 ± 0,8	5,8 ± 0,2	4,42 ± 0,09	
4	5,3 ± 0,2	933,9 ± 4,4	1,53 ± 0,09	5,43 ± 0,18	298,1 ± 9,4	11,00 ± 1,1	10,7 ± 0,6	3,21 ± 1,1	
6	64,9 ± 0,4	3145,5 ± 19,8	3,32 ± 0,11	8,02 ± 0,39	762,7 ± 16,2	12,18 ± 0,8	17,6 ± 0,8	7,50 ± 0,3	
8	83,5 ± 1,3	3582,5 ± 20,5	6,87 ± 0,18	11,90 ± 0,9	815,7 ± 13,4	16,64 ± 0,9	18,3 ± 0,7	10,20 ± 0,5	
10	142,7 ± 5,7	3302,7 ± 20,1	9,08 ± 0,59	16,85 ± 1,1	893,3 ± 14,2	22,56 ± 1,4	20,6 ± 0,6	17,77 ± 0,9	
12	41,2 ± 2,2	3635,8 ± 21,2	4,74 ± 0,22	39,95 ± 2,0	930,7 ± 16,8	31,91 ± 1,8	27,3 ± 0,8	21,17 ± 1,3	
14	20,0 ± 2,0	5818,7 ± 28,3	3,61 ± 0,19	61,1 ± 2,4	946,2 ± 16,1	33,05 ± 1,9	36,4 ± 1,2	22,54 ± 1,4	
16	18,4 ± 1,5	7234,6 ± 31,4	2,68 ± 0,10	75,59 ± 3,4	1272,2 ± 15,2	35,23 ± 1,9	40,5 ± 1,8	31,76 ± 1,7	
18	15,2 ± 0,9	8472,2 ± 33,2	4,67 ± 0,17	111,86 ± 10,9	1499,1 ± 13,1	70,24 ± 3,9	50,9 ± 2,1	39,40 ± 1,9	
20	20,7 ± 1,3	8647,4 ± 36,4	7,65 ± 0,34	114,08 ± 8,3	2003,1 ± 14,4	92,17 ± 4,5	66,8 ± 2,2	39,41 ± 2,1	
22	58,1 ± 3,4	9142,7 ± 40,5	6,67 ± 0,2	125,42 ± 9,4	1643,7 ± 13,8	116,42 ± 7,4	67,5 ± 2,4	41,1 ± 1,9	
24	73,3 ± 4,9	9343,0 ± 39,2	5,16 ± 0,21	133,11 ± 10,2	1284,6 ± 14,9	193,09 ± 8,6	66,4 ± 1,9	49,5 ± 1,8	
26	91,2 ± 6,2	9414,7 ± 37,2	4,29 ± 0,19	152,84 ± 11,1	1091,6 ± 11,2	268,22 ± 11,4	69,4 ± 2,4	46,7 ± 2,0	
27	83,11 ± 5,4	8571,4 ± 40,2	3,75 ± 0,22	138,55 ± 10,7	892,13 ± 15,6	316,52 ± 17,6	70,2 ± 3,9	46,2 ± 3,4	
28	73,3 ± 5,1	7983,41 ± 29,4	3,05 ± 0,18	112,7 ± 14,2	583,8 ± 12,4	340,09 ± 10,8	72,2 ± 2,8	45,4 ± 1,7	
29	68,12 ± 5,6	7569,1 ± 35,7	3,15 ± 0,16	108,51 ± 9,7	516,4 ± 19,1	402,99 ± 15,7	74,1 ± 3,6	43,8 ± 2,9	
30	61,2 ± 4,9	7114,47 ± 25,3	3,14 ± 0,18	102,5 ± 10,8	384,5 ± 19,2	447,65 ± 14,5	74,4 ± 2,4	42,1 ± 2,0	
31	75,3 ± 4,4	6675,3 ± 28,6	3,09 ± 0,26	95,02 ± 8,7	334,1 ± 16,5	439,28 ± 16,6	60,8 ± 4,5	43,5 ± 1,8	
32	82,5 ± 2,9	6286,4 ± 19,3	2,48 ± 0,09	94,3 ± 9,3	308,94 ± 10,0	440,72 ± 13,2	41,3 ± 2,5	48,5 ± 1,6	
33	80,6 ± 5,3	6406,2 ± 25,4	2,49 ± 0,17	95,11 ± 8,2	286,23 ± 12,9	438,44 ± 15,6	40,2 ± 3,6	47,6 ± 3,5	
34	81,7 ± 5,5	6327,1 ± 21,3	2,38 ± 0,14	95,54 ± 7,9	288,01 ± 13,7	435,61 ± 18,0	41,0 ± 2,9	46,2 ± 3,4	

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów ± S.D./ Each value represents the mean ± S. D. of 3 samples.

Tab. 2. Zawartość izoflawonów w wytrząsanych kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* elicytowanych, w dniu inokulacji, 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ jasmonianu metylu (stężenie związków w mg/100 g suchej masy).

Tab. 2. Isoflavone concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures after elicitation with methyl jasmonate (100 $\mu\text{mol l}^{-1}$) on the inoculation day (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Dzień	Związek							
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	malonylo-genistyna	acetylogenistyna
0	4,3 $\pm$ 0,1	2117,6 $\pm$ 14,5	2,52 $\pm$ 0,07	16,53 $\pm$ 0,98	603,3 $\pm$ 15,3	18,42 $\pm$ 0,9	9,21 $\pm$ 0,4	4,43 $\pm$ 0,1
2	2,7 $\pm$ 0,08	1043,3 $\pm$ 11,4	1,54 $\pm$ 0,08	6,98 $\pm$ 0,34	317,4 $\pm$ 10,23	9,68 $\pm$ 0,52	5,12 $\pm$ 0,3	2,85 $\pm$ 0,15
4	2,4 $\pm$ 0,1	884,2 $\pm$ 9,17	1,51 $\pm$ 0,09	6,52 $\pm$ 0,19	187,31 $\pm$ 8,9	9,01 $\pm$ 0,49	4,83 $\pm$ 0,33	2,33 $\pm$ 0,19
6	2,5 $\pm$ 0,09	843,1 $\pm$ 8,15	1,55 $\pm$ 0,1	6,42 $\pm$ 0,54	185,63 $\pm$ 10,38	8,37 $\pm$ 0,34	4,45 $\pm$ 0,31	2,18 $\pm$ 0,2
8	3,1 $\pm$ 0,15	806,68 $\pm$ 13,4	1,62 $\pm$ 0,08	5,98 $\pm$ 0,32	188,47 $\pm$ 10,21	9,52 $\pm$ 0,63	3,94 $\pm$ 0,22	2,29 $\pm$ 0,18
10	3,0 $\pm$ 0,2	821,7 $\pm$ 15,4	1,61 $\pm$ 0,09	6,03 $\pm$ 0,34	179,6 $\pm$ 9,67	9,34 $\pm$ 0,79	3,63 $\pm$ 0,21	2,96 $\pm$ 0,19
12	3,2 $\pm$ 0,09	809,4 $\pm$ 9,2	1,69 $\pm$ 0,12	6,54 $\pm$ 0,48	177,54 $\pm$ 8,51	8,95 $\pm$ 0,42	3,84 $\pm$ 0,29	2,74 $\pm$ 0,17
14	2,9 $\pm$ 0,08	811,4 $\pm$ 8,47	1,74 $\pm$ 0,11	6,87 $\pm$ 0,33	165,91 $\pm$ 12,7	9,25 $\pm$ 0,48	4,22 $\pm$ 0,38	2,91 $\pm$ 0,15
16	3,5 $\pm$ 0,09	793,2 $\pm$ 9,1	2,0 $\pm$ 0,08	8,21 $\pm$ 0,52	197,25 $\pm$ 11,5	9,38 $\pm$ 0,43	4,47 $\pm$ 0,39	2,99 $\pm$ 0,21
18	3,8 $\pm$ 0,12	784,1 $\pm$ 6,7	2,31 $\pm$ 0,12	9,85 $\pm$ 0,59	199,57 $\pm$ 9,85	9,65 $\pm$ 0,41	4,56 $\pm$ 0,41	3,04 $\pm$ 0,25
20	3,9 $\pm$ 0,11	754,8 $\pm$ 8,9	2,44 $\pm$ 0,07	9,96 $\pm$ 0,46	240,95 $\pm$ 19,5	10,02 $\pm$ 0,59	4,93 $\pm$ 0,37	3,67 $\pm$ 0,22
22	3,7 $\pm$ 0,13	739,2 $\pm$ 5,9	2,5 $\pm$ 0,15	9,72 $\pm$ 0,62	272,2 $\pm$ 15,4	10,06 $\pm$ 0,75	5,44 $\pm$ 0,32	3,97 $\pm$ 0,28
24	4,1 $\pm$ 0,18	769,4 $\pm$ 9,4	2,71 $\pm$ 0,19	9,98 $\pm$ 0,63	308,1 $\pm$ 14,5	10,39 $\pm$ 0,82	5,96 $\pm$ 0,39	3,85 $\pm$ 0,29
26	3,9 $\pm$ 0,14	797,5 $\pm$ 11,1	2,62 $\pm$ 0,08	10,05 $\pm$ 0,82	358,7 $\pm$ 13,8	10,86 $\pm$ 0,96	6,11 $\pm$ 0,48	3,94 $\pm$ 0,31
27	4,2 $\pm$ 0,09	806,37 $\pm$ 11,9	2,75 $\pm$ 0,19	10,14 $\pm$ 0,98	482,65 $\pm$ 16,8	10,95 $\pm$ 0,99	4,73 $\pm$ 0,51	4,03 $\pm$ 0,35
28	4,4 $\pm$ 0,17	825,7 $\pm$ 9,8	2,9 $\pm$ 0,09	15,57 $\pm$ 1,1	498,62 $\pm$ 19,64	11,23 $\pm$ 1,1	3,98 $\pm$ 0,52	4,28 $\pm$ 0,33
29	4,5 $\pm$ 0,39	834,12 $\pm$ 11,5	3,11 $\pm$ 0,20	15,49 $\pm$ 1,5	523,96 $\pm$ 21,95	13,42 $\pm$ 0,98	3,22 $\pm$ 0,55	4,45 $\pm$ 0,24
30	4,9 $\pm$ 0,34	811,9 $\pm$ 8,6	3,35 $\pm$ 0,21	16,88 $\pm$ 1,2	559,16 $\pm$ 22,41	13,99 $\pm$ 0,99	3,98 $\pm$ 0,62	4,82 $\pm$ 0,26
31	4,5 $\pm$ 0,31	792,1 $\pm$ 9,2	3,01 $\pm$ 0,20	16,56 $\pm$ 0,9	607,21 $\pm$ 18,8	14,73 $\pm$ 1,12	2,42 $\pm$ 0,59	4,98 $\pm$ 0,28
32	4,1 $\pm$ 0,23	683,4 $\pm$ 8,7	2,86 $\pm$ 0,08	16,28 $\pm$ 0,98	615,72 $\pm$ 17,2	15,48 $\pm$ 0,95	2,35 $\pm$ 0,52	5,13 $\pm$ 0,36
33	4,3 $\pm$ 0,15	715,8 $\pm$ 9,1	2,63 $\pm$ 0,15	15,99 $\pm$ 1,1	619,4 $\pm$ 19,9	16,02 $\pm$ 0,86	2,96 $\pm$ 0,56	5,24 $\pm$ 0,42
34	4,1 $\pm$ 0,16	763,2 $\pm$ 11,4	2,57 $\pm$ 0,09	15,68 $\pm$ 0,88	611,21 $\pm$ 20,7	17,63 $\pm$ 1,2	2,12 $\pm$ 0,78	6,18 $\pm$ 0,52

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów $\pm$ S.D./ Each value represents the mean $\pm$ S. D. of 3 samples.

Tab. 3. Zawartość izoflawonów w wytrząsanych kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* elicytowanych, w 26 dniu, 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ jasmonianu metylu (stężenie związków w mg/100 g suchej masy).

Tab. 3. Isoflavone concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures after elicitation with methyl jasmonate (100 $\mu\text{mol l}^{-1}$) on the day 26 (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Dzień	Związek							
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	malonylo-genistyna	acetylo-genistyna
0	4,3 $\pm$ 0,1	2117,6 $\pm$ 14,5	2,52 $\pm$ 0,07	16,53 $\pm$ 0,98	603,3 $\pm$ 15,3	18,42 $\pm$ 0,9	9,2 $\pm$ 0,4	4,43 $\pm$ 0,1
2	2,9 $\pm$ 0,09	1053,3 $\pm$ 9,8	1,74 $\pm$ 0,09	6,99 $\pm$ 0,3	327,3 $\pm$ 11,2	11,96 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 0,2	4,42 $\pm$ 0,09
4	5,3 $\pm$ 0,22	933,9 $\pm$ 4,4	1,53 $\pm$ 0,09	5,43 $\pm$ 0,18	298,1 $\pm$ 9,4	11,00 $\pm$ 1,1	10,7 $\pm$ 0,6	3,21 $\pm$ 1,1
6	64,9 $\pm$ 0,40	3145,5 $\pm$ 19,8	3,32 $\pm$ 0,11	8,02 $\pm$ 0,39	762,7 $\pm$ 16,2	12,18 $\pm$ 0,8	17,6 $\pm$ 0,8	7,50 $\pm$ 0,3
8	83,5 $\pm$ 1,33	3582,5 $\pm$ 20,5	6,87 $\pm$ 0,18	11,90 $\pm$ 0,9	815,7 $\pm$ 13,4	16,64 $\pm$ 0,9	18,3 $\pm$ 0,7	10,20 $\pm$ 0,5
10	142,7 $\pm$ 5,11	3302,7 $\pm$ 20,1	9,08 $\pm$ 0,59	16,85 $\pm$ 1,1	893,3 $\pm$ 14,2	22,56 $\pm$ 1,4	20,6 $\pm$ 0,6	17,77 $\pm$ 0,9
12	41,2 $\pm$ 2,21	3635,8 $\pm$ 21,2	4,74 $\pm$ 0,22	39,95 $\pm$ 2,0	930,7 $\pm$ 16,8	31,91 $\pm$ 1,8	27,3 $\pm$ 0,8	21,17 $\pm$ 1,3
14	20,0 $\pm$ 2,0	5818,7 $\pm$ 28,3	3,61 $\pm$ 0,19	61,1 $\pm$ 2,4	946,2 $\pm$ 16,1	33,05 $\pm$ 1,9	36,4 $\pm$ 1,2	22,54 $\pm$ 1,4
16	18,4 $\pm$ 1,52	7234,65 $\pm$ 31,4	2,68 $\pm$ 0,10	75,59 $\pm$ 3,4	1272,2 $\pm$ 15,2	35,23 $\pm$ 1,9	40,5 $\pm$ 1,8	31,76 $\pm$ 1,7
18	15,2 $\pm$ 0,93	8472,2 $\pm$ 33,2	4,67 $\pm$ 0,17	111,86 $\pm$ 11,9	1499,1 $\pm$ 13,1	70,24 $\pm$ 3,9	50,9 $\pm$ 2,1	39,40 $\pm$ 1,9
20	20,7 $\pm$ 1,34	8647,4 $\pm$ 36,4	7,65 $\pm$ 0,34	114,08 $\pm$ 15,3	2003,1 $\pm$ 14,4	92,17 $\pm$ 4,5	66,8 $\pm$ 2,2	39,41 $\pm$ 2,1
22	58,1 $\pm$ 3,41	9142,7 $\pm$ 40,5	6,67 $\pm$ 0,2	125,42 $\pm$ 17,4	1643,7 $\pm$ 13,8	116,42 $\pm$ 7,4	67,5 $\pm$ 2,4	41,1 $\pm$ 1,9
24	73,3 $\pm$ 4,9	9343,0 $\pm$ 39,2	5,16 $\pm$ 0,21	133,11 $\pm$ 16,2	1284,6 $\pm$ 14,9	193,09 $\pm$ 8,6	66,4 $\pm$ 1,9	49,5 $\pm$ 1,8
26	91,2 $\pm$ 6,26	9414,7 $\pm$ 37,2	4,29 $\pm$ 0,19	152,84 $\pm$ 20,1	1091,6 $\pm$ 11,2	268,22 $\pm$ 11,4	69,4 $\pm$ 2,4	46,7 $\pm$ 2,0
27	102,8 $\pm$ 8,51	8537,65 $\pm$ 38,7	6,26 $\pm$ 0,25	136,21 $\pm$ 10,8	697,41 $\pm$ 15,4	295,61 $\pm$ 9,5	51,3 $\pm$ 3,4	42,2 $\pm$ 2,9
28	148,63 $\pm$ 11,58	7964,21 $\pm$ 38,6	9,11 $\pm$ 0,61	118,6 $\pm$ 11,9	588,4 $\pm$ 15,7	337,51 $\pm$ 12,8	21,4 $\pm$ 1,9	44,7 $\pm$ 2,8
29	165,24 $\pm$ 13,51	7493,58 $\pm$ 31,8	13,94 $\pm$ 0,74	110,24 $\pm$ 9,4	426,51 $\pm$ 16,1	398,62 $\pm$ 11,2	8,7 $\pm$ 0,11	40,3 $\pm$ 3,0
30	198,3 $\pm$ 6,83	7098,52 $\pm$ 26,3	15,21 $\pm$ 0,85	105,1 $\pm$ 10,2	379,2 $\pm$ 11,8	444,56 $\pm$ 15,2	2,5 $\pm$ 0,09	41,4 $\pm$ 3,4
31	197,64 $\pm$ 7,05	6558,56 $\pm$ 23,5	15,14 $\pm$ 0,91	99,99 $\pm$ 8,41	359,4 $\pm$ 10,44	440,22 $\pm$ 16,4	2,1 $\pm$ 0,12	42,7 $\pm$ 2,8
32	195,85 $\pm$ 8,67	6239,5 $\pm$ 19,8	14,98 $\pm$ 0,77	92,3 $\pm$ 8,7	310,15 $\pm$ 10,8	446,68 $\pm$ 18,6	1,5 $\pm$ 0,07	47,17 $\pm$ 3,0
33	196,77 $\pm$ 6,84	6122,96 $\pm$ 20,9	14,62 $\pm$ 0,83	89,52 $\pm$ 8,1	295,47 $\pm$ 7,4	439,84 $\pm$ 19,7	1,3 $\pm$ 0,09	39,8 $\pm$ 2,4
34	195,52 $\pm$ 7,02	5989,17 $\pm$ 25,9	14,66 $\pm$ 0,69	84,76 $\pm$ 7,1	236,21 $\pm$ 10,45	423,4 $\pm$ 14,3	0,7 $\pm$ 0,05	33,5 $\pm$ 2,7

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów $\pm$ S.D.

Each value represents the mean $\pm$ S. D. of 3 samples.

Tab. 4. Zawartość izoflawonów w wytrząsanych kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* elicytowanych, w dniu inokulacji, 150 mg l⁻¹ chitosanu (stężenie związków w mg/100 g suchej masy).

Tab. 4. Isoflavone concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures after elicitation with chitosane (150 mg l⁻¹) on the inoculation day (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Dzień	Związek							
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	malonylo-genistyna	acetylogenistyna
0	4,3 ± 0,1	2117,6 ± 14,5	2,52 ± 0,07	16,53 ± 0,98	603,3 ± 15,3	18,42 ± 0,9	9,2 ± 0,4	4,43 ± 0,1
2	2,5 ± 0,07	1032,2 ± 13,2	1,51 ± 0,08	6,54 ± 0,35	452,34 ± 17,62	8,42 ± 0,71	4,98 ± 0,25	2,12 ± 0,21
4	2,2 ± 0,1	902,43 ± 10,5	1,50 ± 0,07	6,47 ± 0,28	446,46 ± 18,79	8,25 ± 0,64	4,75 ± 0,31	2,03 ± 0,19
6	2,0 ± 0,08	835,24 ± 16,8	1,42 ± 0,06	5,97 ± 0,34	409,58 ± 22,6	8,08 ± 0,54	4,55 ± 0,32	1,95 ± 0,07
8	2,9 ± 0,09	805,31 ± 19,4	1,39 ± 0,09	5,98 ± 0,44	328,74 ± 19,61	7,73 ± 0,59	4,23 ± 0,27	1,91 ± 0,06
10	2,8 ± 0,07	794,2 ± 15,3	1,35 ± 0,08	5,48 ± 0,49	297,27 ± 18,81	7,95 ± 0,61	3,86 ± 0,29	1,87 ± 0,11
12	3,0 ± 0,09	784,3 ± 14,2	1,24 ± 0,07	5,86 ± 0,47	271,62 ± 21,45	8,11 ± 0,48	3,19 ± 0,31	1,52 ± 0,08
14	2,7 ± 0,1	782,4 ± 12,6	1,15 ± 0,09	6,05 ± 0,48	195,12 ± 17,38	8,23 ± 0,68	3,02 ± 0,2	1,39 ± 0,09
16	2,6 ± 0,05	754,36 ± 10,2	2,34 ± 1,12	6,34 ± 0,32	186,39 ± 13,46	8,71 ± 0,75	3,26 ± 0,27	1,27 ± 0,11
18	2,2 ± 0,04	732,21 ± 9,9	2,47 ± 1,25	7,29 ± 0,67	189,67 ± 12,57	9,25 ± 0,49	3,43 ± 0,22	1,41 ± 0,08
20	1,5 ± 0,08	706,41 ± 11,4	2,44 ± 1,17	7,63 ± 0,61	218,62 ± 17,95	9,61 ± 0,47	3,79 ± 0,29	1,46 ± 0,09
22	1,1 ± 0,04	695,24 ± 13,8	2,41 ± 0,09	7,98 ± 0,59	246,86 ± 17,09	10,05 ± 0,63	4,11 ± 0,35	1,63 ± 0,12
24	1,9 ± 0,07	666,1 ± 15,2	2,54 ± 0,13	8,03 ± 0,62	308,57 ± 11,2	10,34 ± 0,82	4,62 ± 0,37	1,72 ± 0,09
26	2,3 ± 0,09	669,46 ± 14,7	2,64 ± 0,24	8,89 ± 0,75	250,84 ± 14,32	10,72 ± 0,86	5,99 ± 0,42	1,96 ± 0,15
27	2,7 ± 0,11	697,14 ± 11,9	2,66 ± 0,19	9,34 ± 0,74	311,67 ± 13,62	10,95 ± 0,95	5,01 ± 0,39	2,16 ± 0,13
28	3,1 ± 0,15	715,21 ± 15,8	2,61 ± 0,17	9,85 ± 0,84	397,08 ± 19,05	11,24 ± 0,91	4,86 ± 0,35	2,22 ± 0,09
29	3,4 ± 0,24	723,59 ± 16,7	2,55 ± 0,09	10,54 ± 0,95	429,65 ± 22,59	12,01 ± 0,87	4,21 ± 0,33	2,56 ± 0,16
30	4,2 ± 0,32	758,64 ± 19,2	2,51 ± 0,12	13,29 ± 1,12	499,89 ± 18,67	12,98 ± 0,96	3,54 ± 0,28	3,97 ± 0,18
31	4,0 ± 0,25	774,23 ± 18,4	2,45 ± 0,13	13,68 ± 0,94	516,19 ± 19,28	13,37 ± 1,16	3,02 ± 0,25	4,15 ± 0,28
32	3,8 ± 0,29	741,2 ± 11,4	2,32 ± 0,08	14,27 ± 1,21	529,64 ± 25,61	14,28 ± 0,86	2,87 ± 0,18	4,53 ± 0,26
33	3,1 ± 0,19	734,5 ± 15,7	2,15 ± 0,11	14,96 ± 0,08	519,49 ± 19,76	14,57 ± 0,95	2,51 ± 0,19	5,24 ± 0,36
34	3,2 ± 0,26	706,4 ± 14,3	2,07 ± 0,09	15,29 ± 1,34	507,68 ± 17,92	15,21 ± 0,93	2,07 ± 0,18	5,67 ± 0,41

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów ± S.D.

Each value represents the mean ± S. D. of 3 samples.

Tab. 5. Zawartość izoflawonów w wytrząsanych kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* elicytowanych, w 26 dniu, 150 mg l⁻¹ chitosanu (stężenie związków w mg/100 g suchej masy).

Tab. 5. Isoflavone concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures after elicitation with chitosane (150 mg l⁻¹) on the day 26 (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Dzień	Związek								
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	malonylo- genistyna	acetylo-genistyna	
0	4,3 ± 0,1	2117,6 ± 14,5	2,52 ± 0,07	16,53 ± 0,98	603,3 ± 15,3	18,42 ± 0,9	9,2 ± 0,4	4,43 ± 0,1	
2	2,9 ± 0,09	1053,3 ± 9,8	1,74 ± 0,09	6,99 ± 0,3	327,3 ± 11,2	11,96 ± 0,8	5,8 ± 0,2	4,42 ± 0,09	
4	5,3 ± 0,2	933,9 ± 4,4	1,53 ± 0,09	5,43 ± 0,18	298,1 ± 9,4	11,00 ± 1,1	10,7 ± 0,6	3,21 ± 1,1	
6	64,9 ± 0,4	3145,5 ± 19,8	3,32 ± 0,11	8,02 ± 0,39	762,7 ± 16,2	12,18 ± 0,8	17,6 ± 0,8	7,50 ± 0,3	
8	83,5 ± 1,3	3582,5 ± 20,5	6,87 ± 0,18	11,90 ± 0,9	815,7 ± 13,4	16,64 ± 0,9	18,3 ± 0,7	10,20 ± 0,5	
10	142,7 ± 5,7	3302,7 ± 20,1	9,08 ± 0,59	16,85 ± 1,1	893,3 ± 14,2	22,56 ± 1,4	20,6 ± 0,6	17,77 ± 0,9	
12	41,2 ± 2,2	3635,8 ± 21,2	4,74 ± 0,22	39,95 ± 2,0	930,7 ± 16,8	31,91 ± 1,8	27,3 ± 0,8	21,17 ± 1,3	
14	20,0 ± 2,0	5818,7 ± 28,3	3,61 ± 0,19	61,1 ± 2,4	946,2 ± 16,1	33,05 ± 1,9	36,4 ± 1,2	22,54 ± 1,4	
16	18,4 ± 1,5	7234,65 ± 31,4	2,68 ± 0,10	75,59 ± 3,4	1272,2 ± 15,2	35,23 ± 1,9	40,5 ± 1,8	31,76 ± 1,7	
18	15,2 ± 0,9	8472,2 ± 33,2	4,67 ± 0,17	111,86 ± 10,9	1499,1 ± 13,1	70,24 ± 3,9	50,9 ± 2,1	39,40 ± 1,9	
20	20,7 ± 1,3	8647,4 ± 36,4	7,65 ± 0,34	114,08 ± 8,3	2003,1 ± 14,4	92,17 ± 4,5	66,8 ± 2,2	39,41 ± 2,1	
22	58,1 ± 3,4	9142,7 ± 40,5	6,67 ± 0,2	125,42 ± 9,4	1643,7 ± 13,8	116,42 ± 7,4	67,5 ± 2,4	41,1 ± 1,9	
24	73,3 ± 4,9	9343,0 ± 39,2	5,16 ± 0,21	133,11 ± 10,2	1284,6 ± 14,9	193,09 ± 8,6	66,4 ± 1,9	49,5 ± 1,8	
26	91,2 ± 6,2	9414,7 ± 37,2	4,29 ± 0,19	152,84 ± 11,1	1091,6 ± 11,2	268,22 ± 11,4	69,4 ± 2,4	46,7 ± 2,0	
27	138,6 ± 9,8	8254,21 ± 42,1	6,14 ± 0,22	138,65 ± 8,8	762,4 ± 13,8	305,55 ± 11,9	71,1 ± 2,7	45,3 ± 2,1	
28	162,3 ± 9,5	7985,24 ± 28,4	11,74 ± 0,59	113,08 ± 10,3	578,8 ± 10,4	339,01 ± 10,7	70,1 ± 3,8	44,2 ± 2,3	
29	203,1 ± 10,1	7529,61 ± 31,9	15,32 ± 0,62	108,21 ± 10,9	409,5 ± 12,9	396,24 ± 11,3	72,3 ± 2,4	42,6 ± 2,6	
30	258,4 ± 11,4	7058,44 ± 26,8	17,51 ± 0,64	105,13 ± 9,5	379,5 ± 10,2	447,64 ± 13,8	73,6 ± 3,1	40,7 ± 3,4	
31	255,3 ± 9,9	6628,36 ± 27,6	17,32 ± 0,53	98,17 ± 8,6	343,2 ± 9,6	446,22 ± 14,7	66,7 ± 2,9	43,9 ± 3,1	
32	239,4 ± 13,3	6318,31 ± 22,7	17,04 ± 0,85	92,11 ± 7,6	307,23 ± 10,0	437,27 ± 12,2	58,6 ± 3,2	41,8 ± 2,9	
33	229,7 ± 11,1	6233,49 ± 25,8	16,43 ± 0,69	88,64 ± 6,3	284,6 ± 15,3	441,29 ± 10,9	53,11 ± 3,5	42,6 ± 3,3	
34	230,6 ± 9,8	6019,46 ± 21,7	15,97 ± 0,59	90,32 ± 7,1	281,9 ± 14,7	422,5 ± 16,5	49,2 ± 2,9	43,0 ± 2,8	

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów ± S.D./ Each value represents the mean ± S. D. of 3 samples.

Tab. 6. Zawartość izoflawonów w niepermeabilizowanej kulturze zawiesinowej *Genista tinctoria* (stężenie związków w mg/100 g suchej masy).
 Tab. 6. Isoflavone concentration in non permeabilized *Genista tinctoria* suspension cultures (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Czas ho- dowli w min.	Związek							
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksy genisteiny	malonyloge- nistyna	acetylo- genistyna
0	91,2 ± 6,2	9414,7 ± 37,2	4,29 ± 0,19	152,84 ± 11,1	1091,6 ± 11,2	268,22 ± 11,4	69,4 ± 2,4	46,7 ± 2,0
30	90,9 ± 7,3	9416,1 ± 40,2	4,35 ± 0,25	152,94 ± 13,8	1092,5 ± 12,7	269,12 ± 17,8	67,1 ± 3,3	47,1 ± 2,9
60	91,0 ± 5,9	9416,8 ± 38,6	4,25 ± 0,26	152,31 ± 11,2	1091,7 ± 18,6	267,4 ± 13,3	69,4 ± 4,2	47,3 ± 3,1
90	90,3 ± 5,5	9408,4 ± 37,8	4,22 ± 0,28	151,97 ± 13,9	1015,4 ± 17,5	271,44 ± 17,6	75,8 ± 3,7	46,2 ± 4,1
120	90,7 ± 5,8	9371,5 ± 37,7	4,19 ± 0,18	151,64 ± 12,4	1006,3 ± 13,5	278,21 ± 16,4	77,2 ± 2,4	47,3 ± 3,5
150	90,2 ± 5,6	9147,3 ± 39,5	4,16 ± 0,24	150,19 ± 13,0	1011,4 ± 14,2	281,02 ± 10,0	76,2 ± 3,8	47,1 ± 3,4
180	90,8 ± 5,7	9125,6 ± 40,9	4,11 ± 0,23	149,22 ± 10,4	1003,9 ± 18,4	283,51 ± 18,6	74,5 ± 4,6	46,8 ± 3,1
210	91,1 ± 6,4	9000,3 ± 38,2	4,07 ± 0,29	149,84 ± 11,5	997,6 ± 13,4	280,74 ± 15,3	72,1 ± 3,9	46,9 ± 4,3
240	91,2 ± 5,3	9011,4 ± 37,9	4,01 ± 0,31	148,41 ± 12,4	994,5 ± 11,4	287,15 ± 16,9	72,0 ± 4,3	46,4 ± 3,8
270	90,4 ± 6,1	8946,2 ± 35,4	4,03 ± 0,22	147,92 ± 11,7	995,3 ± 15,8	288,14 ± 21,3	71,5 ± 5,2	46,8 ± 3,4
300	89,6 ± 5,4	8916,5 ± 38,5	3,99 ± 0,25	146,53 ± 12,2	991,6 ± 16,2	287,64 ± 24,8	71,4 ± 2,9	46,4 ± 3,6
330	89,9 ± 5,9	8894,1 ± 36,1	3,94 ± 0,27	145,82 ± 11,9	990,4 ± 14,3	293,61 ± 18,7	70,4 ± 3,6	46,2 ± 3,5
360	88,1 ± 6,2	8852,7 ± 39,2	3,97 ± 0,25	145,03 ± 13,4	943,3 ± 18,4	295,76 ± 23,5	70,8 ± 3,9	46,0 ± 3,9
390	87,6 ± 6,1	8861,1 ± 40,5	3,92 ± 0,29	144,67 ± 10,8	921,5 ± 17,6	300,04 ± 20,8	69,5 ± 3,6	45,9 ± 2,8
420	87,4 ± 5,8	8806,5 ± 39,4	3,90 ± 0,21	144,16 ± 11,5	906,4 ± 16,9	302,94 ± 14,7	69,1 ± 2,9	46,1 ± 3,3
450	87,1 ± 6,4	8791,9 ± 39,2	3,91 ± 0,20	142,23 ± 13,7	901,7 ± 14,3	307,20 ± 19,3	68,0 ± 4,1	46,2 ± 3,4
480	86,1 ± 5,3	8771,4 ± 41,3	3,84 ± 0,19	141,11 ± 10,8	890,13 ± 19,7	312,58 ± 16,5	68,1 ± 3,4	45,9 ± 2,3

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów ± S.D./ Each value represents the mean ± S. D. of 3 samples.

Tab. 7. Zawartość izoflawonów w biomase hodowli zawiesinowych *Genista tinctoria*, po permeabilizacji 2% DMSO (stężenie związków w mg/100 g suchej masy).

Tab. 7. Isoflavone concentration in *Genista tinctoria* biomass after permeabilisation with 2% DMSO (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Czas hodowli w min.	Związek							
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksy-genisteiny	malonyloge-nistyna	acetylo-genistyna
0	91,2 ± 6,2	9414,7 ± 37,2	4,29 ± 0,19	152,84 ± 11,1	1091,6 ± 11,2	268,22 ± 11,4	69,4 ± 2,41	46,7 ± 2,0
30	90,3 ± 7,2	9415,2 ± 40,2	4,32 ± 0,18	153,12 ± 10,2	1090,5 ± 19,8	272,15 ± 23,0	69,19 ± 3,52	46,5 ± 3,4
60	90,9 ± 6,8	9417,3 ± 39,4	4,30 ± 0,21	155,47 ± 12,7	1092,4 ± 25,1	268,63 ± 15,2	65,74 ± 4,17	43,1 ± 2,9
90	87,2 ± 6,5	9415,3 ± 36,0	4,31 ± 0,22	154,33 ± 11,8	1091,3 ± 21,6	270,85 ± 19,5	61,25 ± 5,16	43,5 ± 3,6
120	85,8 ± 5,7	9413,6 ± 38,3	4,32 ± 0,23	154,09 ± 10,6	999,3 ± 20,4	268,24 ± 21,9	49,61 ± 3,64	39,2 ± 2,9
150	83,4 ± 6,0	9388,6 ± 47,3	4,34 ± 0,22	150,24 ± 13,7	984,2 ± 16,7	265,08 ± 17,5	35,64 ± 2,29	36,5 ± 2,7
180	79,5 ± 6,4	9238,1 ± 41,6	4,21 ± 0,18	151,38 ± 11,6	905,5 ± 23,6	263,36 ± 16,3	28,33 ± 1,93	34,6 ± 2,8
210	67,1 ± 5,9	8474,5 ± 36,7	3,99 ± 0,25	112,21 ± 9,5	795,1 ± 26,3	247,28 ± 20,8	23,08 ± 1,85	27,8 ± 1,5
240	68,3 ± 6,1	6833,4 ± 33,9	4,05 ± 0,27	95,75 ± 8,3	716,4 ± 29,7	203,61 ± 19,1	19,15 ± 0,82	21,4 ± 1,7
270	64,4 ± 5,8	3932,8 ± 39,1	3,95 ± 0,21	69,86 ± 5,9	622,7 ± 27,1	179,52 ± 14,2	17,65 ± 1,12	19,7 ± 1,4
300	64,2 ± 5,9	3573,9 ± 33,0	3,53 ± 0,26	60,61 ± 4,6	503,8 ± 24,5	142,58 ± 11,6	8,24 ± 0,54	17,3 ± 1,1
330	58,3 ± 4,3	3154,8 ± 28,5	3,24 ± 0,31	52,30 ± 4,3	396,6 ± 19,5	115,37 ± 9,4	6,13 ± 0,20	11,5 ± 0,9
360	33,7 ± 2,7	2423,5 ± 19,6	3,07 ± 0,24	45,03 ± 3,2	269,9 ± 18,4	73,11 ± 5,7	3,67 ± 0,19	9,1 ± 0,4
390	33,4 ± 2,9	1924,3 ± 17,5	2,81 ± 0,19	34,67 ± 2,9	207,6 ± 15,2	61,46 ± 4,3	2,13 ± 0,11	3,1 ± 0,1
420	28,4 ± 1,9	1802,7 ± 24,1	2,01 ± 0,13	30,94 ± 2,2	198,4 ± 14,1	59,27 ± 3,9	3,14 ± 0,21	0,5 ± 0,03
450	29,1 ± 2,2	1754,9 ± 19,3	2,22 ± 0,16	28,69 ± 1,7	179,6 ± 15,3	52,61 ± 4,1	2,95 ± 0,19	0,8 ± 0,04
480	32,3 ± 2,9	1698,3 ± 22,5	2,07 ± 0,15	26,66 ± 1,8	167,5 ± 13,7	65,87 ± 4,8	2,74 ± 0,09	0,9 ± 0,05

Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów ± S.D.

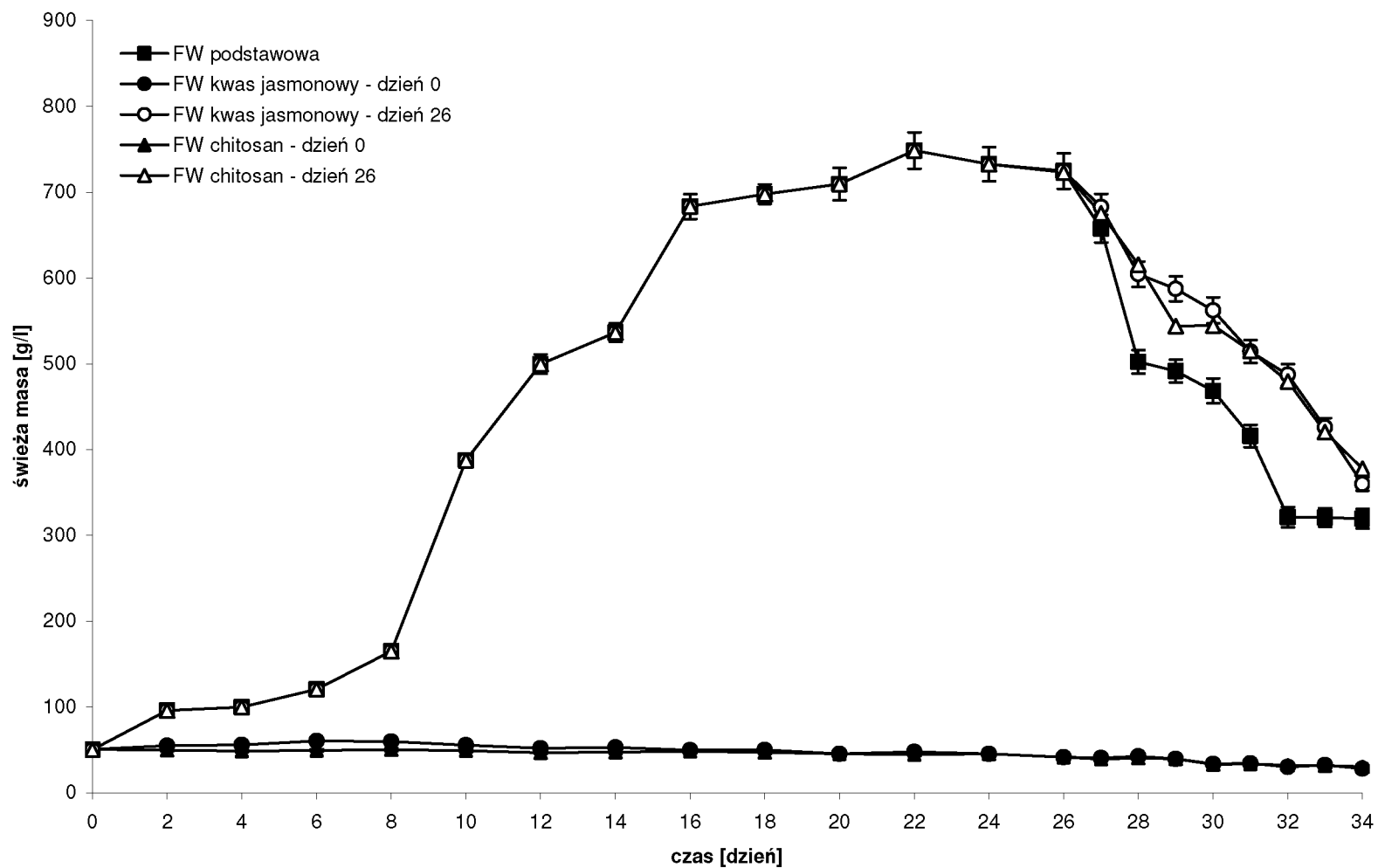
Each value represents the mean ± S. D. of 3 samples.

Tab. 8. Zawartość izoflawonów w pożywce hodowli zawiesinowych *Genista tinctoria*, po permeabilizacji DMSO (stężenie związków w mg/100 g suchej masy).
 Tab. 8. Isoflavone concentration in the growth medium of *Genista tinctoria* suspension culture, after permeabilisation with 2% DMSO (isoflavone content in mg per 100 g DW plant material).

Czas ho- dowli w min.	Związek									
	genisteina	genistyna	daidzeina	daidzina	7-O-diglukozyd genisteiny	7-O-glukozyd 2'-hydroksy- genisteiny	malonylo- genistyna	acetylo- genistyna		
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
30	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,9 ± 0,08	0,00 ± 0,00	1,52 ± 0,09	0,71 ± 0,04		
60	0,00 ± 0,00	1,3 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,7 ± 0,09	0,07 ± 0,01	4,68 ± 0,39	2,86 ± 0,19		
90	4,2 ± 0,31	2,6 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,01	10,1 ± 0,7	0,15 ± 0,01	9,02 ± 0,84	4,53 ± 0,24		
120	7,2 ± 0,49	5,9 ± 0,29	0,16 ± 0,009	0,56 ± 0,01	105,5 ± 8,6	0,34 ± 0,02	22,5 ± 0,92	9,27 ± 0,87		
150	9,5 ± 0,52	35,4 ± 2,36	0,15 ± 0,008	3,12 ± 0,09	157,3 ± 11,5	1,99 ± 0,09	35,97 ± 1,60	15,54 ± 0,90		
180	15,7 ± 0,96	185,6 ± 10,7	0,19 ± 0,01	7,85 ± 0,36	206,5 ± 13,4	5,74 ± 0,34	44,34 ± 2,32	23,06 ± 1,32		
210	19,8 ± 0,81	958,3 ± 17,6	0,38 ± 0,02	64,28 ± 5,22	327,3 ± 19,5	21,86 ± 0,94	48,06 ± 2,91	27,19 ± 1,68		
240	22,9 ± 1,23	2641,5 ± 18,4	0,42 ± 0,02	71,66 ± 5,39	396,4 ± 22,0	70,09 ± 5,17	51,57 ± 4,36	29,34 ± 1,76		
270	28,5 ± 1,94	5691,7 ± 29,7	0,78 ± 0,05	92,41 ± 7,04	494,6 ± 29,7	106,87 ± 8,23	58,32 ± 4,53	31,67 ± 2,28		
300	29,3 ± 2,22	6005,6 ± 28,1	0,94 ± 0,06	97,37 ± 7,91	639,1 ± 28,4	138,26 ± 10,7	62,10 ± 4,28	36,08 ± 3,02		
330	33,4 ± 2,41	6412,1 ± 30,9	1,31 ± 0,09	106,08 ± 9,46	755,6 ± 36,1	172,08 ± 12,6	64,53 ± 3,95	39,97 ± 2,89		
360	41,9 ± 3,05	7191,6 ± 36,1	1,34 ± 0,1	115,47 ± 10,5	882,5 ± 34,2	209,99 ± 16,9	67,62 ± 4,58	46,34 ± 3,81		
390	58,7 ± 4,60	7594,2 ± 38,2	1,93 ± 0,09	120,81 ± 11,0	898,02 ± 33,1	213,21 ± 16,8	68,51 ± 3,97	47,05 ± 3,54		
420	63,0 ± 5,11	7625,9 ± 33,4	2,94 ± 0,14	125,31 ± 10,4	899,11 ± 36,5	212,89 ± 19,7	66,23 ± 3,41	45,45 ± 3,16		
450	62,7 ± 5,57	7624,3 ± 35,8	2,77 ± 0,13	123,86 ± 9,8	898,03 ± 31,1	208,63 ± 18,6	59,11 ± 4,29	42,11 ± 3,00		
480	60,3 ± 4,93	7598,4 ± 39,3	2,81 ± 0,17	126,011 ± 10,9	889,76 ± 35,7	205,40 ± 17,5	61,49 ± 3,25	43,02 ± 3,76		

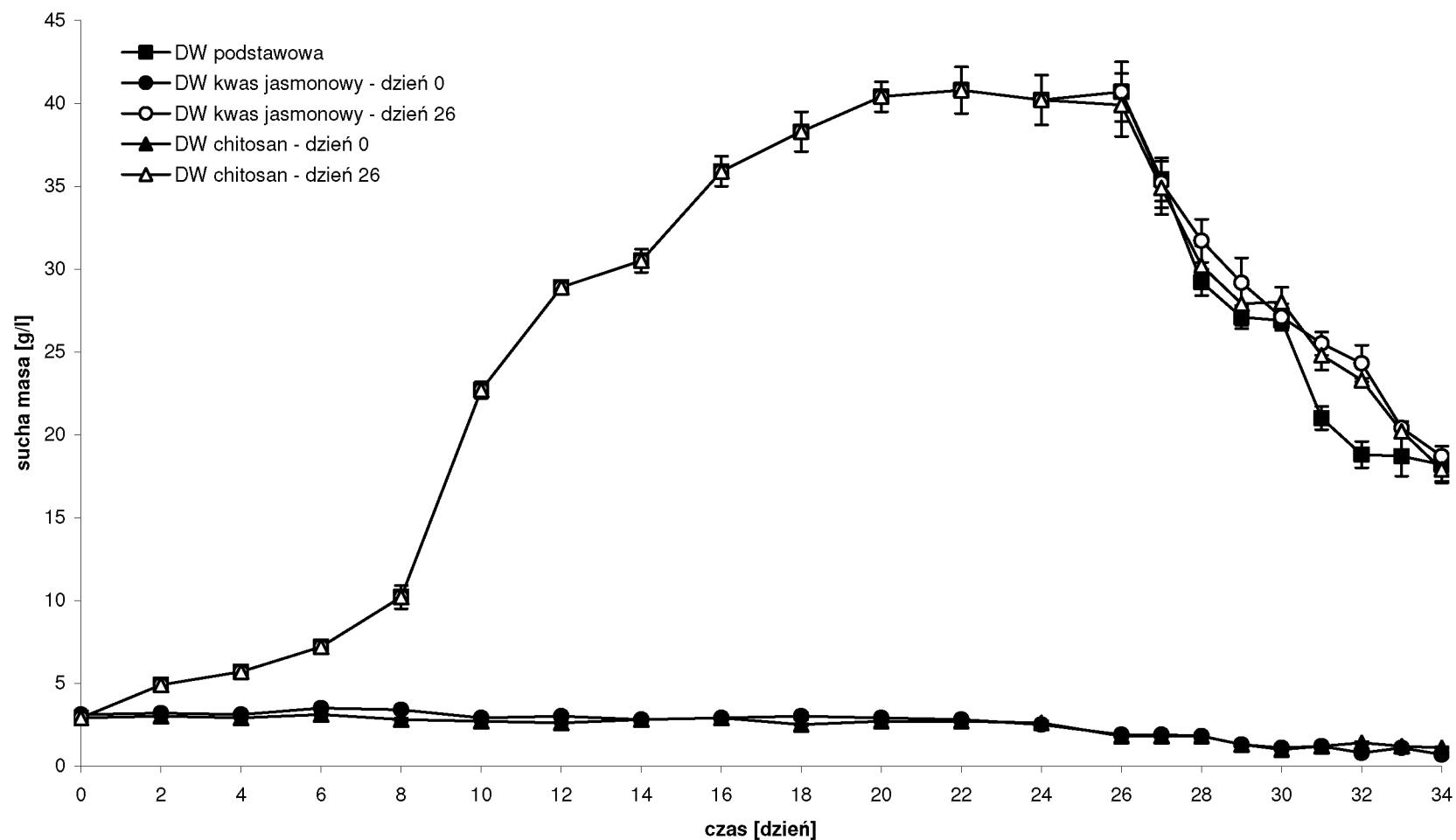
Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z 3 pomiarów ± S.D.

Each value represents the mean ± S. D. of 3 samples.



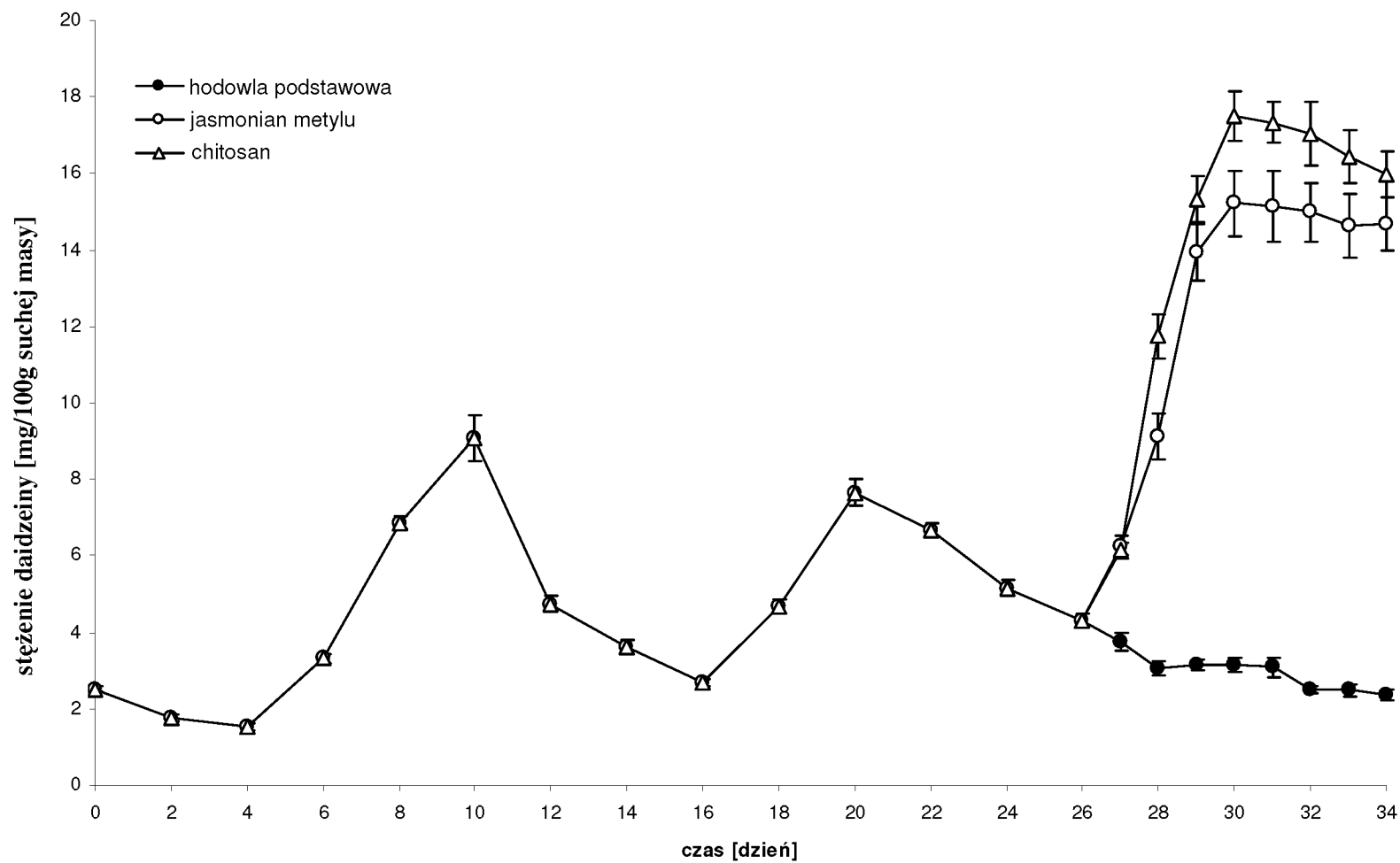
Ryc. 1. Zmiany w ilości świeżej masy, w podstawowej oraz elicytowanej ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$ jasmonianu metylu lub 150 mg l^{-1} chitosanu – dodawane w 0 lub 26 dniu hodowli) zawiesinie *Genista tinctoria* (ilość świeżej masy w g l^{-1}).

Fig. 1. Changes in fresh weight of elicited and unelicited ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$ methyl jasmonate or 150 mg l^{-1} chitosane, supplemented on day 0 or 26) *Genista tinctoria* suspension cultures (FW content in g l^{-1}).



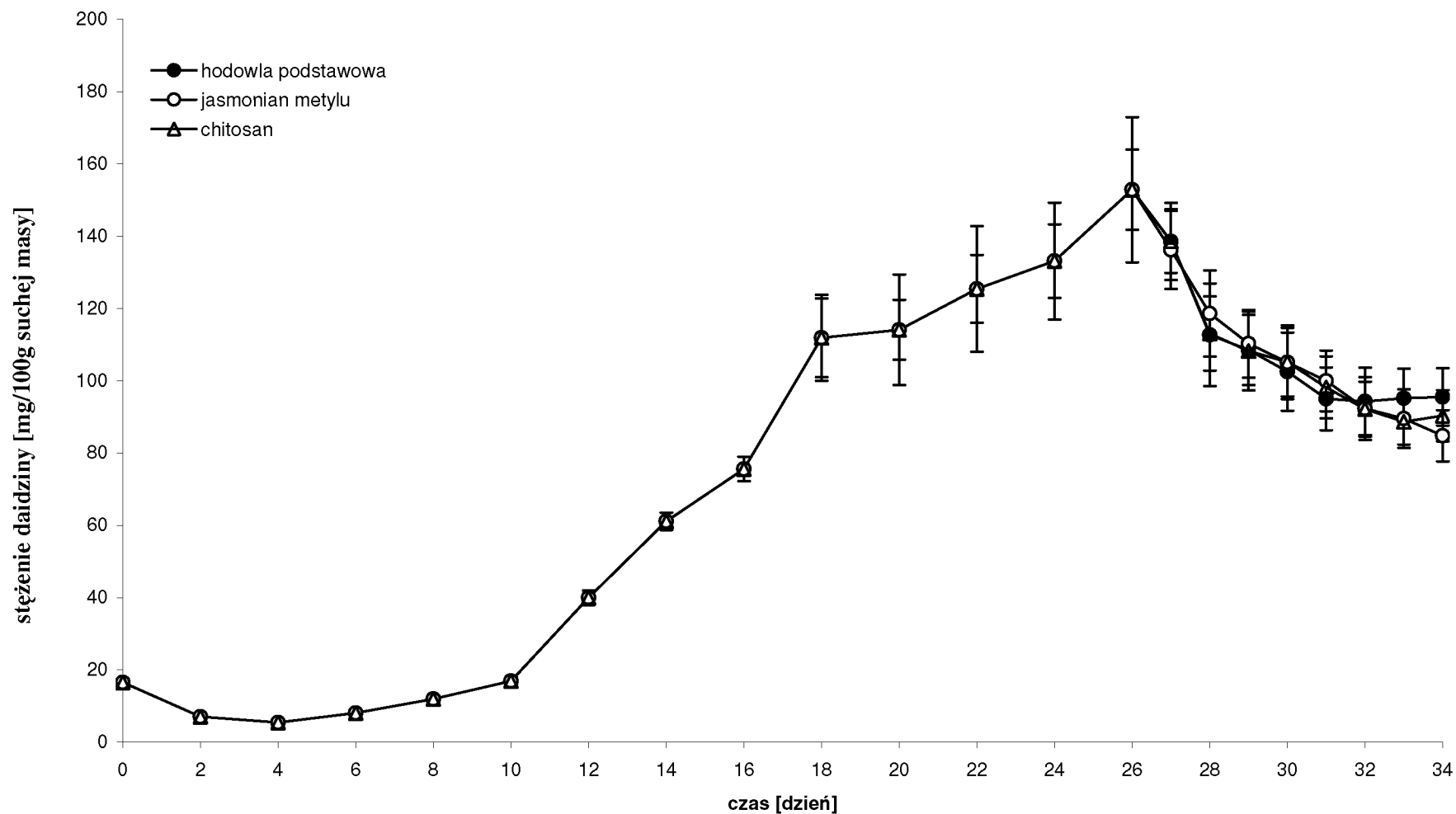
Ryc. 2. Zmiany w ilości suchej masy, w podstawowej oraz elicytowanej ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$ jasmonianu metylu lub 150 mg l^{-1} chitosanu – dodawane w 0 lub 26 dniu hodowli) zawiesinie *Genista tinctoria* (ilość suchej masy w g l^{-1}).

Fig. 2. Changes in dry weight of elicited and unelicited ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$ methyl jasmonate or 150 mg l^{-1} chitosane, supplemented on day 0 or 26) *Genista tinctoria* suspension cultures (DW content in g l^{-1}).



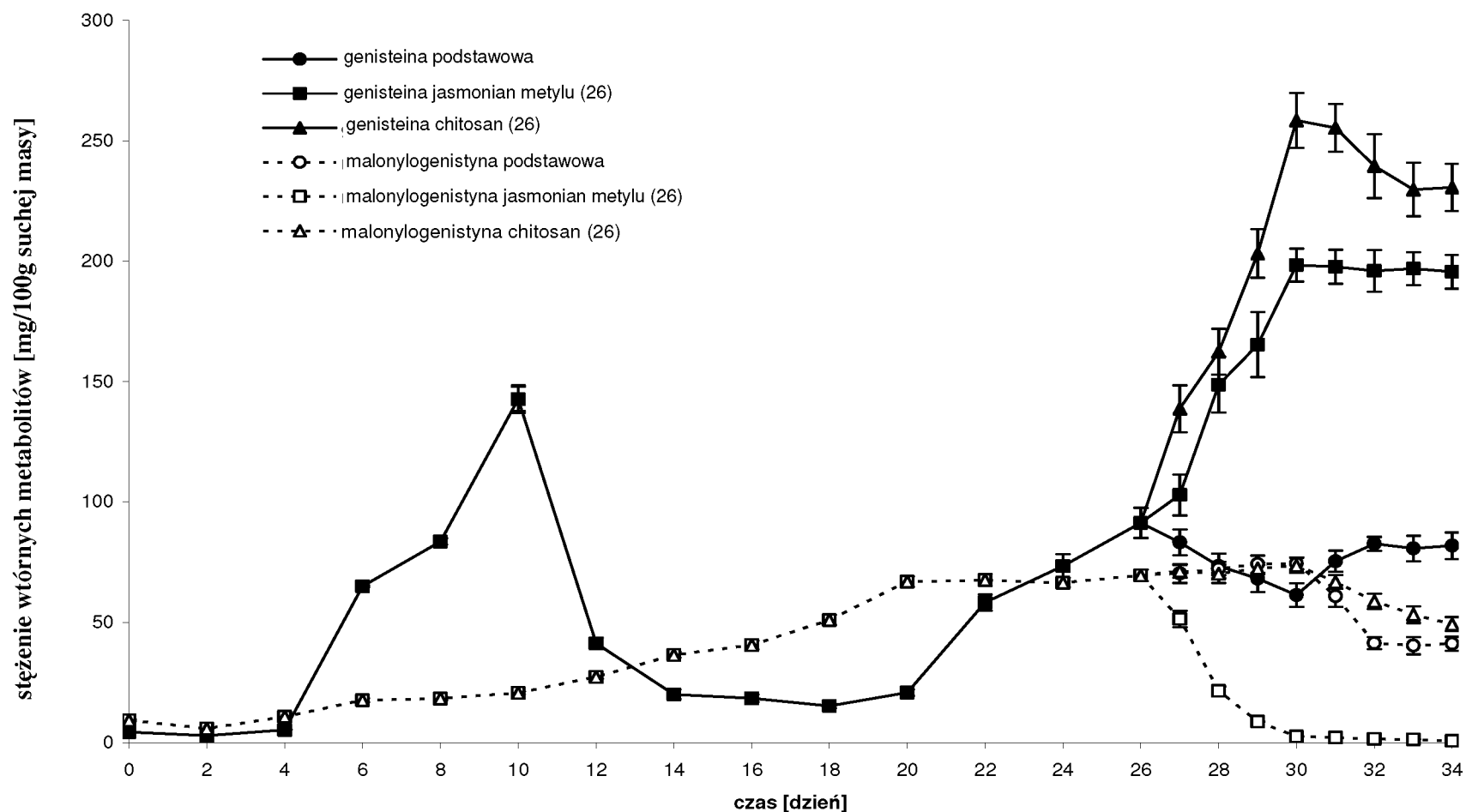
Ryc. 3. Zawartość daidzeiny w podstawowych oraz elicytowanych, w dniu 26 ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$ jasmonianu metylu lub 150 mg l^{-1} chitosanu) kulturach zawieszonych *Genista tinctoria* (stężenie daidzeiny w $\text{mg}/100 \text{ g}$ suchej masy).

Fig. 3. Daidzein concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures, before and after elicitation with methyl jasmonate ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$) or chitosane (150 mg l^{-1}), supplemented on day 26 (daidzein concentration in $\text{mg}/100\text{g DW}$).



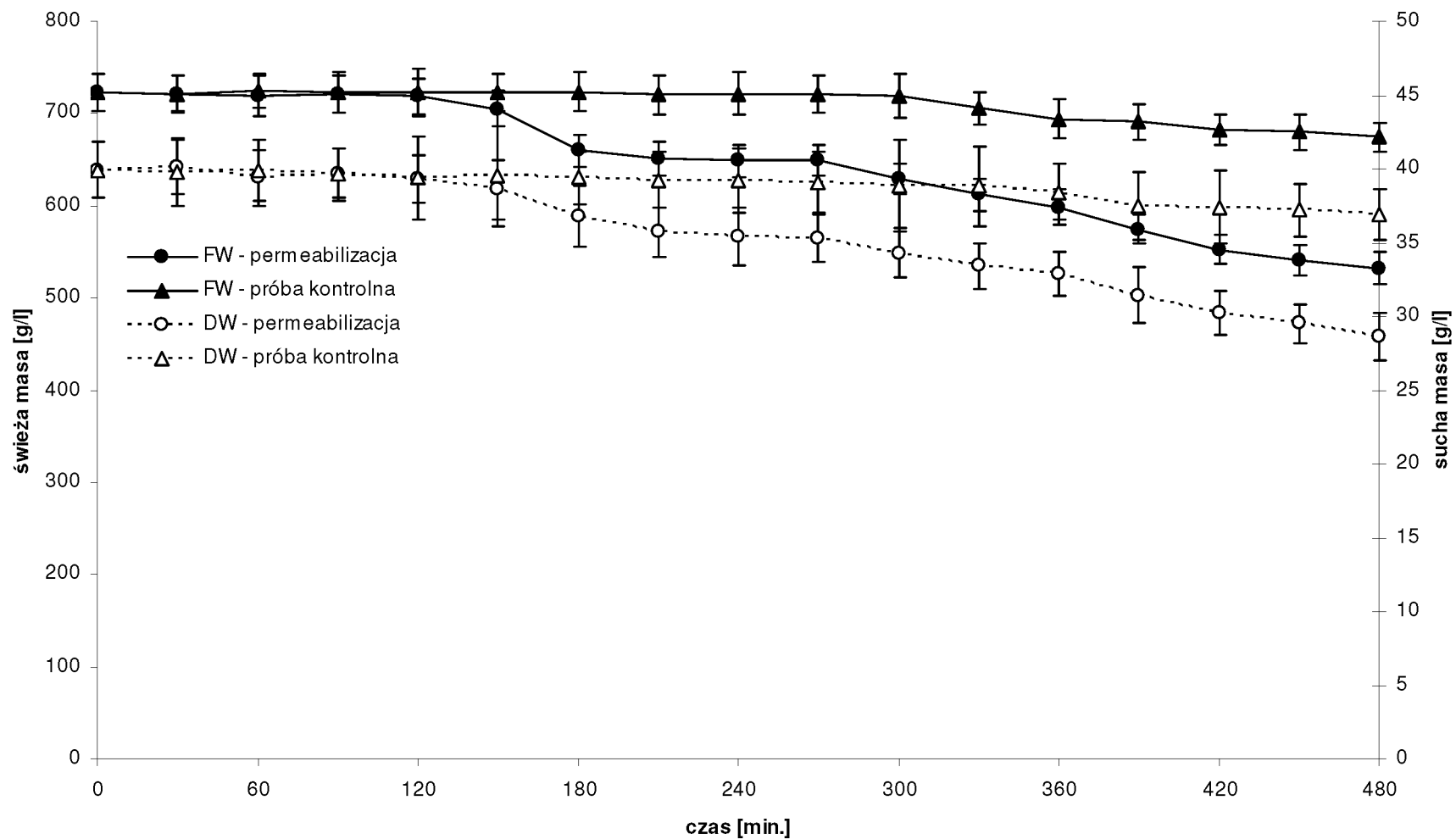
Ryc. 4. Zawartość daidziny w podstawowych oraz elicytowanych, w dniu 26 ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$ jasmonianu metylu lub 150 mg l^{-1} chitosanu) kulturach zawieszonych *Genista tinctoria* (stężenie daidziny w mg/100 g suchej masy).

Fig. 4. Daidzin concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures, before and after elicitation with methyl jasmonate ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$) or chitosane (150 mg l^{-1}), supplemented on day 26 (daidzin concentration in mg/100g DW).



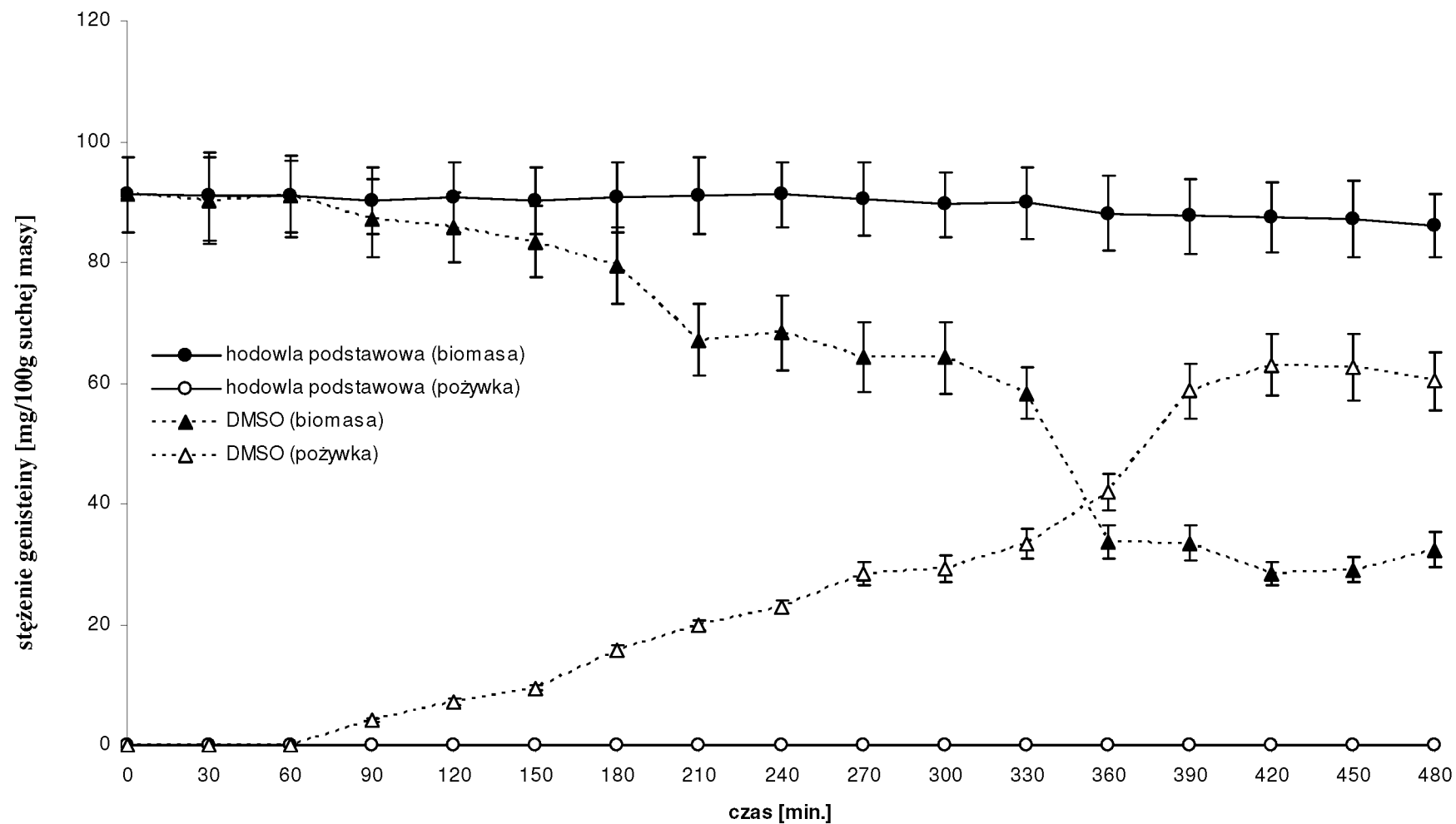
Ryc. 5. Zawartość genisteiny i malonylogenistyny w podstawowych oraz elicytowanych, w dniu 26 ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$ jasmonianu metylu lub 150 mg l^{-1} chitosanu) kulturach zawieszinowych *Genista tinctoria* (stężenie związków w $\text{mg}/100 \text{ g}$ suchej masy).

Fig. 5. Genistein and genistin malonate concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures, before and after elicitation with methyl jasmonate ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$) or chitosane (150 mg l^{-1}), supplemented on day 26 (secondary metabolite concentration in $\text{mg}/100 \text{ g}$ DW).



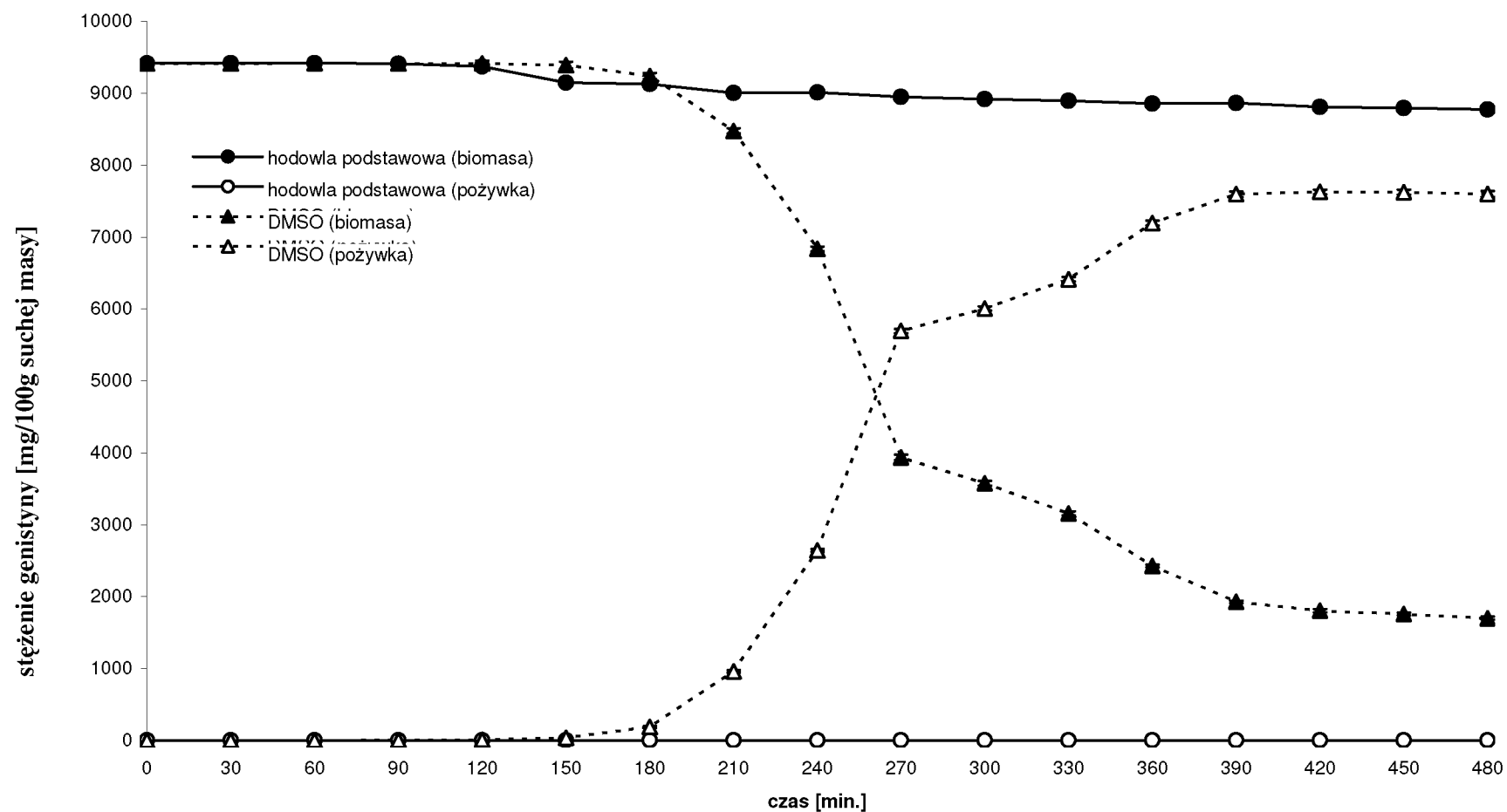
Ryc. 6. Zmiany w ilości świeżej i suchej masy w podstawowej hodowli zawiesinowej *Genista tinctoria* oraz hodowli permeabilizowanej DMSO.

Fig. 6. Changes in fresh (FW) and dry (DW) weight of *Genista tinctoria* suspension cultures, permeabilized with DMSO and without DMSO supplementation.



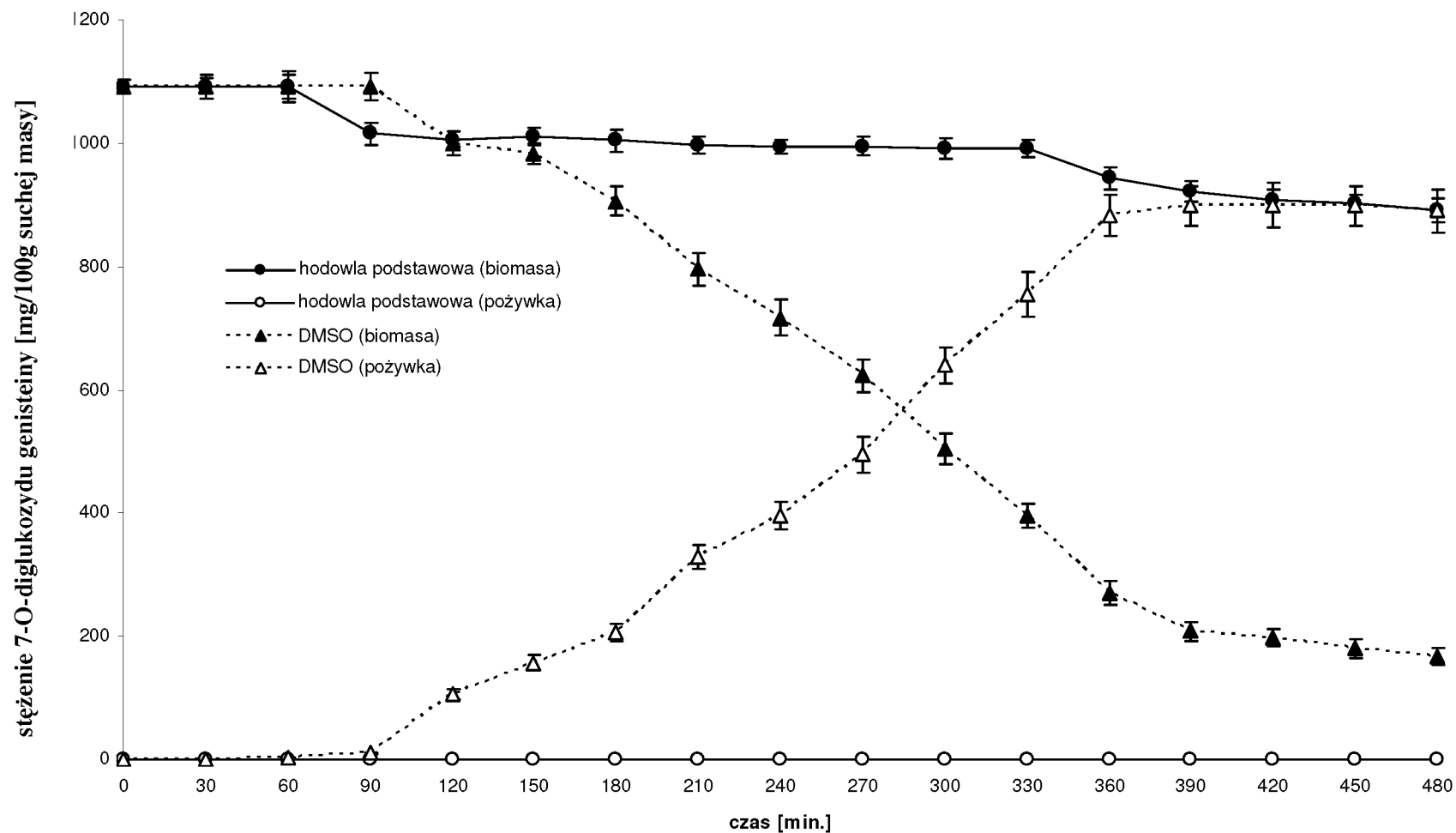
Ryc. 7. Zawartość genisteiny w podstawowych oraz permeabilizowanych (2% DMSO), w dniu 26, kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* (stężenie genisteiny w mg/100g suchej masy).

Fig. 7. Genistein concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures, before and after permeabilization with 2% DMSO, supplemented on day 26 (genistein concentration in mg/100g DW).



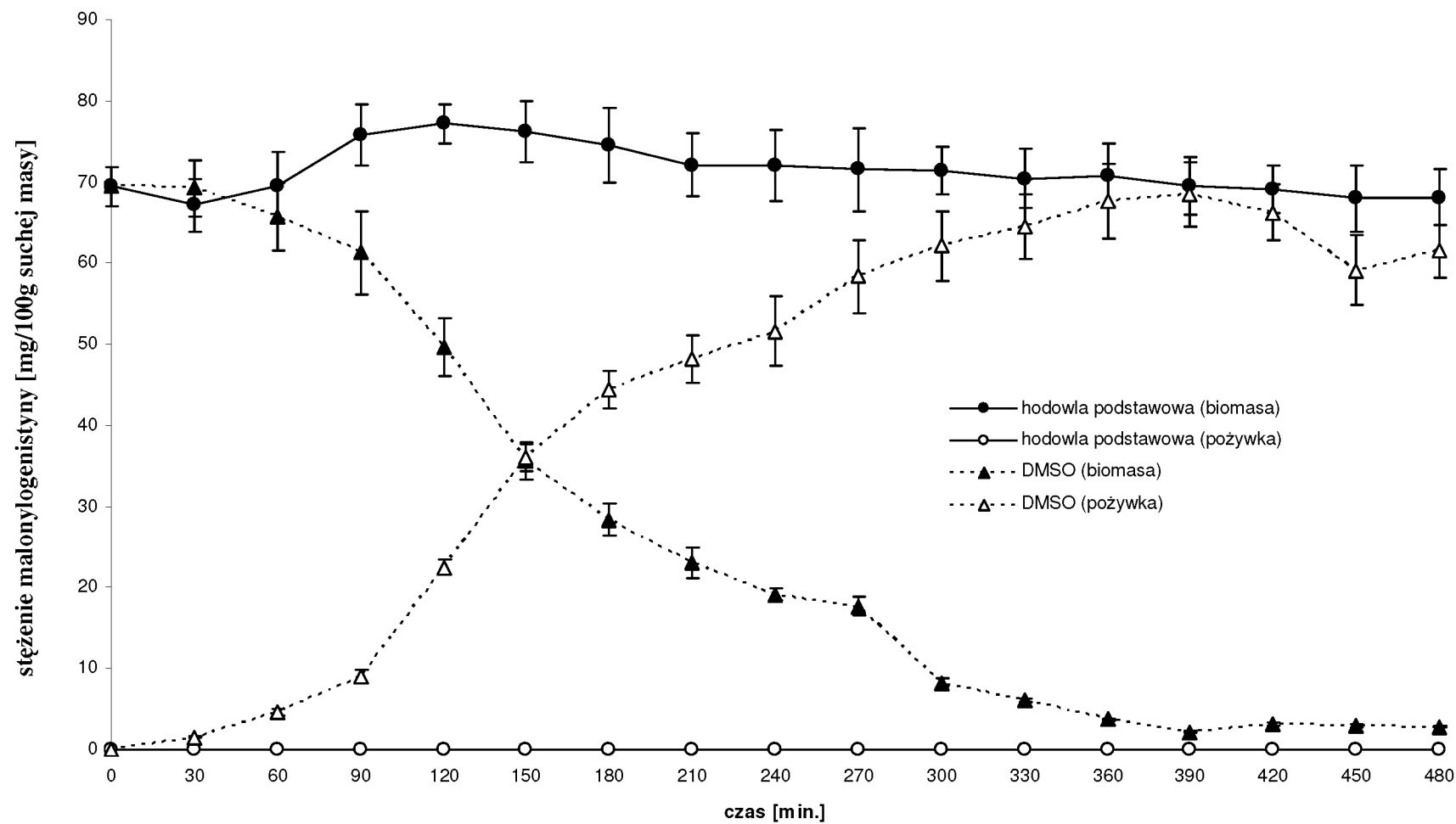
Ryc. 8. Zawartość genistyny w podstawowych oraz permeabilizowanych (2% DMSO), w dniu 26, kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* (stężenie genisteiny w mg/100g suchej masy).

Fig. 8. Genistin concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures, before and after permeabilization with 2% DMSO, supplemented on day 26 (genistein concentration in mg/100g DW).



Ryc. 9. Zawartość 7-O-diglukozydu genisteiny w podstawowych oraz permeabilizowanych (2% DMSO), w dniu 26, kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* (stężenie 7-O-diglukozydu genisteiny w mg /100g suchej masy).

Fig. 9. Genistein 7-O-diglucoside concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures, before and after permeabilization with 2% DMSO, supplemented on day 26 (genistein-7-O- diglucoside concentration in mg/100g DW).



Ryc. 10. Zawartość malonylogenistyny w podstawowych oraz permeabilizowanych (2% DMSO), w dniu 26, kulturach zawiesinowych *Genista tinctoria* (stężenie malonylogenistyny w mg /100g suchej masy).

Fig. 10. Genistin malonate concentration in *Genista tinctoria* suspension cultures, before and after permeabilization with 2% DMSO, supplemented on day 26 (genistin malonate concentration in mg/100g DW).

Piśmiennictwo

1. Armero J., Requejo R., Jorrián J., López-Valbuena R., Tena M., Release of phytoalexins and related isoflavonoids from intact chickpea seedlings elicited with reduced glutathione at root level, *Plant Physiol. Biochem.* 39 (2001) 785-795.
2. Barz W., Mackenbrock U., Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpanes in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 199-211.
3. Bednarek P., Frański R., Kerhoas L., Einhorn J., Wojtaszek P., Stobiecki M., Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor, *Phytochemistry* 56 (2001) 77-85.
4. Bhuiyan Md.N.H., Adach T., Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-culture cells of *Portulaca*, *J. Plant. Physiol.* 160 (2003) 1117-1124.
5. Bordelius P., Nilsson K., Permeabilization of immobilized plant cells, resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 (1983) 275-280.
6. Bordelius P., Permeabilization of plant cells for release of intracellularly stored products: viability studies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1998) 561-566.
7. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant. Sci.* 161 (2001) 839-851.
8. Chang-He Z., Hui-Bi X., Improved paclitaxel production by *in situ* extraction and elicitation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*, *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 189-193.
9. Curtin Ch., Zhang W., Franco Ch., Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 1131-1135.
10. Daniell T., O'Hagan D., Edwards R., Alfalfa cell cultures treated with a fungal elicitor accumulate flavone metabolites rather than isoflavones in the presence of the methylation inhibitor tubericidin, *Phytochemistry* 44 (2) (1997) 285-291.
11. Dörnenburg H., Knorr D., Strategies for improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures, *Enz. Microbiol. Technol.* 17 (1995) 674-684.
12. Ebdel J., Mithöfer A., Early events in the elicitation of plant defense, *Planta* 206 (1998) 335-348.
13. Edwards R., Mavandad M., Dixon R.A., Metabolic fate of cinnamic acid in elicitor treated cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*, *Phytochemistry* 29 (1990) 1867-1873.
14. Edwards R., Daniell T.J., Gregory A.C.E., Methylation reactions and the phytoalexin response in alfalfa suspension cultures, *Planta* 201 (1997) 359-367.
15. Furmanowa M., Olędzka H., Sykawska-Baranek K., Józefowicz J., Gieracka S., Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidate* and *Taxus × media* by some elicitors and precursors, *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 1449-1452.
16. Gagnon H., Ibrahim R.K., Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin, *Phytochemistry* 44 (8) (1997) 1463-1467.

17. Gontier E., Clement A., Tran T.L.M., Gravot A., Lievre K., Guckert A., Bourgaud F., Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: A promising technique for plant secondary metabolite production, *Plant Sci.* 163 (2002) 723-732.
18. Graham T.L., Kim J.E., Graham M.Y., Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of gluceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*, *Molec. Plant-Microbe Interact.* 3 (1990) 157-166.
19. Grajek W., Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*, w: S. Malepszy (Ed.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 306-341.
20. Haberder H., Schröder G., Ebel J., Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (*Glycine max* L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis, *Planta* 177 (1989) 59-65.
21. Kanaraiah P., Kavi Kishor P.B., Carlsson M., Magnusson K.E., Mandenins C.F., Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures, *Plant Sci.* 168 (2005) 1337-1344.
22. Kessmann H., Barz W., Accumulation of isoflavones and pterocarpin phytoalexins in cell suspension cultures of different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Plant Cell Rep.* 6 (1987) 55-59.
23. Knorr D., Berlin J., Effects of immobilization and permeabilization procedures on growth of *Chenopodium rubrum* and amaranthin concentration, *J. Food Sci.* 52 (5) (1987) 1397-1400.
24. Komaraiah P., Naga Amrutha R., Kavi Kishor P.B., Ramakrishna S.V., Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L., *Enz. Microbiol. Technol.* 31 (2002) 634-639.
25. Komolpis K., Kaufman P.B., Wang H.Y., Chemical permeabilization and *in situ* removal of daidzein from biologically viable soybean (*Glycine max*) seeds, *Biotechnol. Techn.* 12 (9) (1998) 697-700.
26. Landini S., Graham M.Y., Graham T.L., Lactofen induces isoflavone accumulation and gluceollin elicitation competency in soybean, *Phytochemistry* 62 (2003) 865-874.
27. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M., Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*, *Plant Physiol. Biochem.* 42 (2004) 671-679.
28. Nakamura K., Akashi T., Aoki T., Kawaguchi K., Induction of Isoflavonoid and Retrochalcone Branches of the Flavonoid Pathway in Cultured *Glycyrrhiza echinata* Cells Treated with Yeast Extract, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (9) (1999) 1618-1620.
29. Ozawa R., Arimura G., Takabayashi J., Shimoda T., Nishioka T., Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants, *Plant Cell Physiol.* 41 (2000) 391-398.
30. Paiva N.L., Oommen A., Harrison M.J., Dixon R.A., Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 213-220.
31. Park H-H., Hakamatsuka T., Sankawa U., Ebizuka Y., Rapid metabolism of isoflavonoids in elicitor-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*, *Phytochemistry* 38 (2) (1995) 373-380.
32. Pitta-Alvarez S.I., Spollansky T.C., Giulietti A.M., The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*, *Enz. Microb. Technol.* 26 (2000) 252-258.

33. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 101-153.
34. Robbins M.P., Hartnoll J., Morris P., Phenylpropanoid defence responses in transgenic *Lotus corniculatus* L. Glutathione elicitation of isoflavan phytoalexins in transformed root cultures, *Plant Cell Rep.* 10 (1991) 59-62.
35. Schenk P., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M., Coordinate plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 11655-11660.
36. Schenk R.U., Hildebrandt A.C., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.* 50 (1972) 199-204.
37. Staniszevska I., Królicka A., Malińska E., Wojkowska E., Szafrank J., Elicitation of secondary metabolites in in vitro cultures of *Ammi majus* L., *Enz. Microbiol. Technol.* 33(5) (2003) 565-568.
38. Stojakowska A., Malarz J., Kisiel W., Salicylate and methyl jasmonate differently influence diacetylene accumulation pattern in transformed roots of feverfew, 163 (2002) 1147-1152.
39. Teissie J., Eynard N., Gabriel B., Rols M.P., Electroporation of cell membranes, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35 (1999) 3-19.
40. Teissie J., Golzio M., Rols M.P., Mechanism of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of?) knowledge, *Biochim. Biophys. Acta* 1724 (2005) 270-280.
41. Thomma B.P.H.J., Eggermont K., Penninckx I.A.M.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P.A., Broekaert W.F., Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 11654-11659.
42. Zhang W., Curtin Ch., Franco Ch., Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures, *Enz. Microbiol. Technol.* 30 (2002) 688-696.

11. KORZENIE WŁOŚNIKOWATE *GENISTA TINCTORIA* JAKO SYSTEM *IN VITRO* DO SELEKTYWNEJ PRODUKCJI WYSOKICH STĘŻEŃ IZOLIKWIRYTYGENINY

Wstęp

Kultury *in vitro* roślin wyższych, od szeregu lat, postrzegane są jako alternatywne źródło wtórnych metabolitów o potencjalnej aktywności farmakologicznej. Pomimo szeregu badań prowadzonych w tym zakresie, tylko w nielicznych przypadkach udało się opracować roślinne systemy *in vitro*, zdolne do produkcji przemysłowych ilości substancji biologicznie aktywnych (np. szikoniny, berberyny, kwasu rozmarynowego, biomasy żeń-szenia) [3,21,38,39,40]. Przyczyny zaistniałych niepowodzeń upatruje się w powszechnie występującej genetycznej niestabilności hodowanych, w warunkach *in vitro*, biomas i związanej z tym niskiej i zmiennej produktywności tkanek roślinnych w zakresie pożądanych wtórnych metabolitów [3,21,27,39]. Duże nadzieje, na uzyskanie opłacalnej i stabilnej biosyntezy związków biologicznie aktywnych, w warunkach hodowli *in vitro*, budzą natomiast kultury organów transformowanych, tj. korzeni włośnikowatych [9,12,22,31,41,42] oraz ostatnio również teratomów pędowych [1,5,8,28,36]. Potencjalnie, stwarzają one warunki histologiczne (typowa budowa tkankowa oraz strukturalna integracja organów) korzystne dla biosyntezy określonych wtórnych metabolitów [1,3,5,8,9,12,22,27,28,36,41,42]. Ponadto, w wyniku infekcji dzikimi lub „przekonstruowanymi” szczepami *Agrobacterium rhizogenes* (dla korzeni włośnikowatych) lub *Agrobacterium tumefaciens* (dla teratomów pędowych) powstają kultury organów transgeniczných, wykazujące niezwykłą stabilność genetyczną, przekładającą się m. in. na stałą produktywność biomas w zakresie wtórnych metabolitów [1,5,8,9,12,22,28,36,41,42]. Znaczną akumulację substancji farmakologicznie aktywnych uzyskano, do tej pory, przede wszystkim, w oparciu o kultury korzeni włośnikowatych [9,12,22,31,41,42].

Opisywane, w uprzednich rozdziałach, badania biotechnologiczne wykazały, że kultury *in vitro* janowca barwierskiego zdolne są do wybiórczej akumulacji znacznych ilości fitoestrogenów, wywodzących się z klasy izoflawonów (rozd. 6 i 9). Stwierdzono ponadto, że zarówno ilość jak i rodzaj syntetyzowanych bioflawonoidów zależne są, w otrzymanych hodowlach, bezpośrednio od stopnia morfogenezy biomas (rozd. 9). Spośród wszystkich otrzymanych, do tej pory, kultur *G. tinctoria* szczególne zainteresowanie budzą hodowle korzeni odciętych badanego gatunku. W przeciwieństwie do kultur zawieszinowych, embrionalnych i pędowych syntetyzowały one jedynie pojedynczy metabolit z grupy bioflawonoidów, tj. izolikwirytygeninę. Opisane zjawisko może wskazywać na zaistnienie w biomasie korzeniowej *G. tinctoria* blokady metabolicznej szlaku izoflawonoidowego na poziomie chalkonów (rozd. 9).

Zasadniczym celem prezentowanych, w niniejszym rozdziale, badań biotechnologicznych było otrzymanie hodowli korzeni włośnikowych *G. tinctoria* oraz ustalenie czy proces infekcji, dzikim szczepem *A. rhizogenes*, wpływa na metabolizm otrzymanej kultury transgenicznej w zakresie produkcji połączeń bioflawonoidowych. Uzyskane korzenie transformowane postanowiono następnie porównać, pod kątem produkcji fitoestrogenów, zarówno z korzeniami rośliny macierzystej jak i z otrzymanymi uprzednio kulturami korzeni odciętych *G. tinctoria*. Tym samym starano się odpowiedzieć na pytanie czy możliwe jest wyprowadzenie kultur korzeni włośnikowatych janowca i czy otrzymane biomasy mogą stanowić obiecujący system hodowlany z przeznaczeniem do produkcji znacznych ilości substancji o działaniu fitoestrogennym.

W niniejszym rozdziale opisano, po raz pierwszy, indukcję korzeni transgenicznych *G. tinctoria*, zdolnych do wybiórczej, podobnie jak w przypadku kultur korzeni odciętych, akumulacji znacznych stężeń „bliskiego” prekursora izoflawonoidowego – izolikwirytygeniny. Dla otrzymanej hodowli scharakteryzowano następnie profil wzrostowy, w warunkach kultur wytrząsanych, oraz opisano kinetykę produkcji izolikwirytygeniny w cyklu doświadczalnym. Ponadto, określono wpływ dodatku, do podłoża eksperymentalnego, kwasu abscyzynowego, na produkcję i sposób magazynowania, w korzeniach, izolikwirytygeniny. Ze względu na znaczną produktywność korzeni włosnikowatych janowca w zakresie izolikwirytygeniny, dla otrzymanej kultury opracowano wstępne warunki hodowli w skonstruowanym, do tego celu, bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym. Obliczona dla danej kultury produktywność oraz specyficzna produktywność umożliwiły ocenę hodowli korzeni transformowanych *G. tinctoria*, w bioreaktorze, w zakresie przydatności do ewentualnej produkcji izolikwirytygeniny na skalę przemysłową.

Materiały i metody

Materiał roślinny

Sterylnie siewki, kultury pędowe oraz zregenerowane, w warunkach *in vitro*, rośliny wprowadzono z nasion *Genista tinctoria* L., otrzymanych w 2000 roku z Ogródu Botanicznego w Glasgow (Wielka Brytania). Tożsamość gatunku potwierdzono po izolacji DNA roślinnego i porównaniu otrzymanych sekwencji z biblioteką danych GeneBank [17]. Próbkę materiału nasiennego zdeponowano, pod numerem 00-01 (*G. tinctoria*), w kolekcji nasiennej Ogródu Roślin Leczniczych Katedry i Zakładu Farmakognozji, Akademii Medycznej w Gdańsku.

Juwenilne siewki janowca barwierskiego, stosowane następnie w doświadczeniach nad transformacją badanego gatunku, otrzymano metodą opisaną szczegółowo w rozdziale 6.

Zregenerowane, bezpośrednio z siewek, żywotne roślinki *G. tinctoria* kultywowano, w warunkach *in vitro*, na podłożu Schenk-Hildebrandt'a [30] bez regulatorów wzrostu (SH₀), suplementowanym 3% (w/v) dodatkiem sacharozy i zestalonym agarem (0,7 % w/v).

Kultury pędowe janowca barwierskiego prowadzono natomiast na, zestalonej agarem (0,7% w/v), pożywce Schenk-Hildebrandt'a [30], zawierającej 9,84 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP (6-{ γ - γ -dimetyloallilo}-aminopuryna), 0,99 $\mu\text{mol l}^{-1}$ TDZ (tidiazuron) oraz 3% (w/v) sacharozy (rozdz. 7).

Zarówno zregenerowane rośliny jak i kultury pędowe janowca hodowano w pojemnikach doświadczalnych typu „baby food jars” (Sigma), zawierających każdorazowo po 25 ml poszczególnych pożywek wzrostowych. Opisywane eksperymenty biotechnologiczne prowadzono w fitotronie, w warunkach ciągłego oświetlenia (lampy jarzeniowe Philips TLD 35W x 3), o natężeniu $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, w temp. $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Otrzymane w wyżej opisanych warunkach kultury *in vitro* *G. tinctoria* oraz sterylne siewki badanego gatunku wykorzystano następnie, jako podstawowe eksplantaty, w cyklu doświadczeń związanym z otrzymaniem korzeni transformowanych janowca.

Szczepy bakteryjne stosowane w procesie transformacji

Dziki, agropinowy szczep *Agrobacterium rhizogenes* – LBA 9402 otrzymano od Pani prof. dr hab. Mirosławy Furmanowej, z kolekcji Katedry i Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Akademii Medycznej w Warszawie. Szczep ATCC 15834 *Agrobacterium rhizogenes* pochodził natomiast z kolekcji Pana dr Rafaela Zárate (*Department of Pharmacognosy, Gorleaus Laboratories, University of Leiden, Holandia*). Wyżej wymienione bakterie

hodowano w ciemności (25 ± 2 °C), na zestalonych agarem (0,9% w/v), pożywkach: YMB (dla *A. rhizogenes* – LBA 9402) [13] oraz TY (dla *A. rhizogenes* – ATCC 15834) [43]. Dwudziestoczerogodzinne kultury bakteryjne, przeznaczone bezpośrednio do infekcji poszczególnych eksplantatów janowca barwierskiego hodowano na wyżej wymienionych podłożach zawierających dodatkowo $200 \mu\text{mol l}^{-1}$ acetosyringonu.

Metoda zakażenia oraz indukcja korzeni włośnikowatych *G. tinctoria*

Tkanki roślinne infekowano, metodą „smarowania”, zawiesinami bakteryjnymi [18,43], pochodzącymi bezpośrednio ze stacjonarnych kolonii wyjściowych obydwu szczepów. Roślinny materiał inokulacyjny stanowiły: hypokotylowe fragmenty 7 - dniowych siewek janowca, ogonki liściowe wraz z górną stroną blaszek liściowych wzdłuż nerwów głównych (w przypadku zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin) oraz pędowe struktury primordialne (kultury pędowe *G. tinctoria*). Bezpośredni proces zakażenia tkanek janowca polegał na kilkakrotnym nakłuciu, wyżej wymienionego, materiału roślinnego za pomocą sterylnej igły ($\varnothing 0,75$ mm) zanurzonej, przed infekcją, w pierwotnej kulturze bakteryjnej. Zakażone eksplantaty roślinne przenoszono następnie na, zestaloną agarem (0,7% w/v), pożywkę Schenk-Hildebrandt'a, bez regulatorów wzrostu (SH_0), zawierającą 3% (w/v) sacharozy i kultywowano w ciemności (25 ± 2 °C), aż do momentu pojawienia się pierwszych korzeni włośnikowatych. Roślinny materiał inokulacyjny umieszczano w pojemnikach hodowlanych („baby food jars” – Sigma) tak, by nie dotykał ścianek naczynia oraz tak, by fragmenty zakażone były pozbawione bezpośredniego kontaktu z pożywką. Próbę kontrolną, na opisywanym etapie doświadczeń, stanowiły jałowe (nie zainfekowane) tkanki *G. tinctoria*, kultywowane na podłożu SH_0 , w warunkach identycznych jak materiał zakażony szczepami *A. rhizogenes*. Po upływie 14 dni, od momentu zakażenia, wyrastające, bezpośrednio z miejsca infekcji, korzenie wraz z fragmentami tkanki macierzystej przenoszono, podobnie jak jałowy materiał roślinny, na świeże podłoża SH_0 zawierające 50 mg l^{-1} tetracykliny, dodanej do pożywki na drodze jałowego sączenia. Powstałe korzenie pasażowano, w odstępach 20 dniowych, na świeże pożywki SH_0 , z dodatkiem antybiotyku, aż do momentu całkowitego usunięcia bakterii i powstania kultury korzeni dobrze rozgałęzionych, które odcięto ostatecznie od tkanki macierzystej (trzy pasaży). Otrzymane korzenie przenoszono następnie do 100 ml szklanych kolbek Erlenmeyer'a z płynną, zawierającą antybiotyk, pożywką SH_0 i kultywowano na wstrząsarce rotacyjnej, w ciemności bądź w warunkach oświetlenia ciągłego (lampy jarzeniowe Philips TLD 35W x 3; natężenie $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), w temp. 25 ± 2 °C. Po osiągnięciu właściwej ilości biomasy, fragmenty jałowych korzeni przenoszono do 250 ml kolbek Erlenmeyer'a zawierających 100 ml płynnego podłoża SH_0 i hodowano w warunkach opisanych powyżej. Otrzymane, w ten sposób, podstawowe, wstrząsane kultury korzeni transformowanych janowca barwierskiego (po 6 linii prowadzonych na świetle oraz w ciemności) oceniono pod kątem wzrostu (morfologia korzeni oraz wartości współczynników przyrostu W_p [35]) oraz akumulacji bioflawonoidów. Linie korzeni 3M, prowadzonych w warunkach ciągłego oświetlenia, przeznaczono do dalszych eksperymentów biotechnologicznych.

Doświadczenie mające na celu określenie profilu wzrostowego oraz kinetyki produkcji izolikwirytygeniny, w wstrząsanej kulturze korzeni transformowanych *G. tinctoria*, prowadzono wykorzystując płynne podłoże SH_0 , suplementowane 3% (w/v) dodatkiem sacharozy. Każdorazowo, w 250 ml kolbach Erlenmeyer'a, zamykanych korkami z pianki silikonowej (Shine-Etsu-Polymer Co. – Japonia) i zawierających po 100 ml pożywki SH_0 , umieszczano około 5 g biomasy korzeniowej *G. tinctoria* (fragmenty macierzy z korzeniami włośnikowatymi – linia 3M). W celu spowodowania wycieku izolikwirytygeniny, z korzeni do pożywki doświadczalnej, w 0 oraz 42 dniu eksperymentu, dodano do podłoża wzrostowego kwas

abscyzynowy (ABA), w ilości $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$. Wytrząsane kultury korzeni włośnikowatych *G. tinctoria* prowadzono w cyklu 60-dniowym (3 serie – 17 kolb w każdej), w warunkach oświetlenia ciągłego (lampy jarzeniowe Philips TLD 35W x 3; natężenie $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), w temp. $25 \pm 2 ^\circ\text{C}$, na wytrząsarce rotacyjnej (INNOVA 2300-New Brunswick Scientific – 150 rpm).

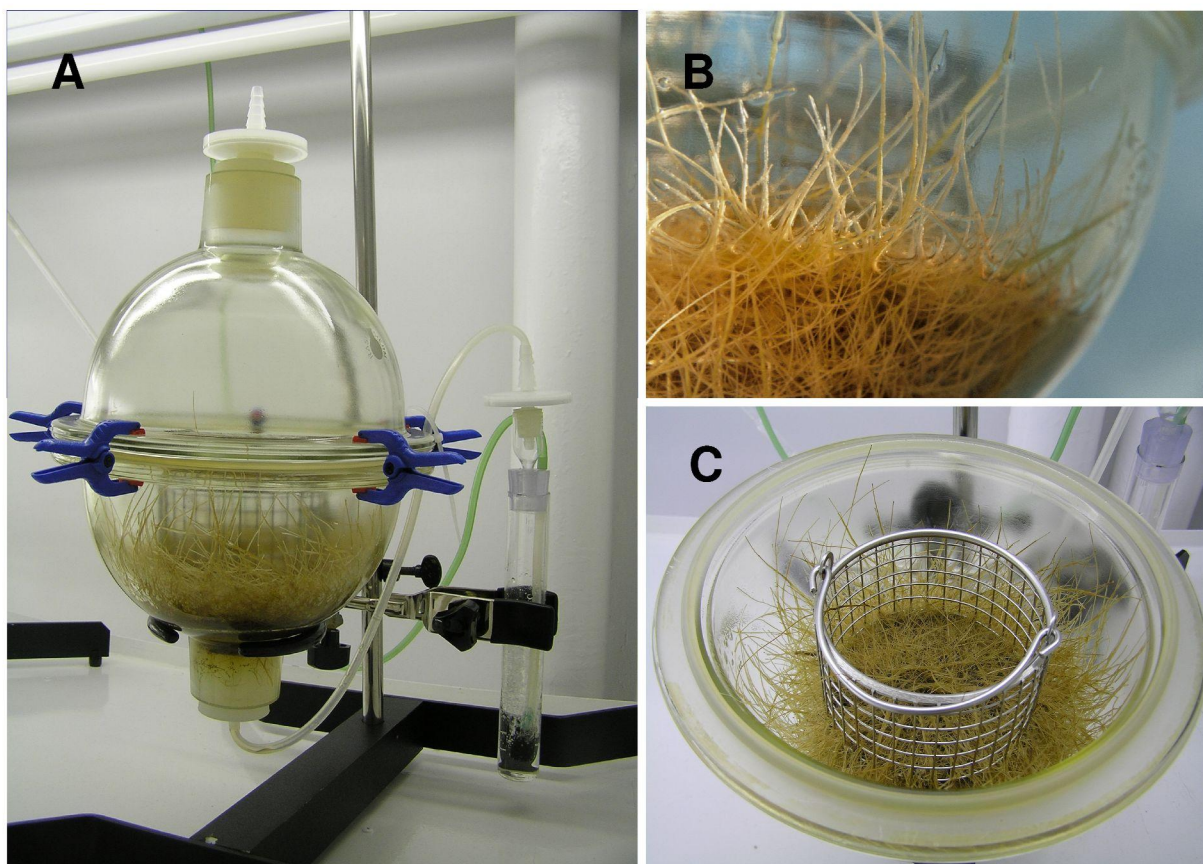
Rosnące aktywnie korzenie transformowane janowca barwierskiego zbierano, w odstępach dwudniowych (każdorazowo po trzy kolby), aż do zakończenia cyklu hodowlanego. Otrzymany, w wyniku badań biotechnologicznych, materiał roślinny wraz z płynnymi pożywkami, pochodzącymi z poszczególnych dni eksperymentu, suszono przez 48 h, do stałej masy, na drodze liofilizacji (próżnia 1×10^{-3} mbar wytworzona przez liofilizator LYOVAC GT2 firmy FIN-AQUA SANTASALO-SOHLBERG Co – Finlandia). Zliofilizowane biomasy janowca oraz podłoża hodowlane przeznaczono do badań fitochemicznych na obecność bioflawonoidów. Uzyskane wyniki (świeża masa – FW, sucha masa – DW oraz zawartość izolokwirytygeniny w materiale roślinnym i pożywkach) stanowią średnie arytmetyczne z trzech próbek hodowlanych $\pm$ S. D.

Kultury korzeni włośnikowatych G. tinctoria prowadzone w bioreaktorze

Bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy – konstrukcja oraz procedury hodowlane

Bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy składał się z dwóch identycznych szklanych kopuł (Rasotherm, Niemcy) o wysokości wewnętrznej 100 mm i średnicy wewnętrznej, w najszerszym miejscu, 180 mm, połączonych 8 zaciskami (ryc. 1).

Miejsce złączenia kopuł szklanych uszczelniono dodatkowo uszczelką silikonową (wymiar DN 150, Schott-Duran, Niemcy). W celu immobilizacji kultur korzeniowych, wewnątrz naczynia hodowlanego umieszczono koszyk ze stali nierdzewnej (18/8) o średnicy oczek 8 mm (Deutsch-Neuman, Niemcy). Powyższy koszyk o średnicy 100 mm i wysokości 80 mm umieszczono koncentrycznie, wewnątrz zbiornika bioreaktora tak, że odległość między dołem koszyka a dnem dolnej kopuły urządzenia wynosiła 20 mm (ryc. 1). Korzenie włośnikowate *G. tinctoria* (sumarycznie ok. 25,0 g kępek korzeniowych z macierzą) umieszczono równomiernie wewnątrz koszyka. Po napełnieniu naczynia hodowlanego 500 ml pożywki SH₀, zawierającej 3% (w/v) sacharozy, *inoculum* korzeniowe zostało całkowicie zanurzone w medium hodowlanym (ryc. 1). Kulturę napowietrzano wtłaczając powietrze od spodu zbiornika hodowlanego poprzez silikonowy wąż o średnicy wewnętrznej 4 mm i grubości ściany 1 mm (Deutsch-Neumann, Niemcy) przy użyciu pompy membranowej z regulacją przepływu (Maxima R Air Pump, 6 W, 6 PSI, Rolf C. Hagen Inc. Montreal, Quebec, Kanada). Przepływ powietrza w kulturze wynosił 800 ml/min. W celu zapewnienia sterylnych warunków hodowli zastosowano filtry wyjąławiające (Millex Vent Filter, średnica 50 mm, PTFE membrane, wielkość porów 0,2 mm; Millipore Corporation, Bedford, USA), zarówno na przewodach doprowadzających, jak i wyjściu powietrza z naczynia hodowlanego (ryc.1). Aby zapobiec ubytкови pożywki w procesie napowietrzania, powietrze przed jałową filtracją, przepuszczano przez płuczkę wodną (ryc. 1).



A – bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy – widok ogólny/ the basket-bubble bioreactor – general view
 B – bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy – widok z boku/ the basket-bubble bioreactor – side view
 C – bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy – widok z góry/ the basket-bubble bioreactor – upper view

Ryc. 1. Korzenie włosnikowate *Genista tinctoria* rosnące w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym w płynnym podłożu SH suplementowanym $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA, dodanym w dniu 42 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, intensywność naświetlenia - $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Fig. 1. *Genista tinctoria* hairy root cultures grown in the basket-bubble bioreactor in liquid SH medium with $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA supplemented on day 42 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, light intensity - $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Korzenie transformowane *G. tinctoria* hodowano w bioreaktorze w warunkach opisywanych dla analogicznych kultur prowadzonych w kolbach Erlenmeyer'a. W celu spowodowania wycieku izolikwirytygeniny, z biomasy korzeniowej do medium hodowlanego, w 42 dniu doświadczenia, dodano $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA. Zarówno biomasy tkankowe jak i pożywki hodowlane zbierano w: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 i 60 dniu eksperymentu, przez całkowite rozładowanie bioreaktora, celem oznaczenia świeżej (FW) i suchej (DW) masy tkankowej oraz wykonania analizy fitochemicznej biomasy i pożywek. Eksperyment powtórzono trzykrotnie a wyniki stanowią średnie arytmetyczne pochodzące z trzech pomiarów $\pm$ S. D.

Jakościową oraz ilościową analizę frakcji izoflawonoidowych, występujących w badanych biomasach i podłożach hodowlanych, zebranych na wszystkich etapach opisywanych doświadczeń, przeprowadzono techniką HPLC, według procedury opisaną szczegółowo w rozdziale 6.

Analiza opin w korzeniach transformowanych G. tinctoria

W celu potwierdzenia transgenicznej natury otrzymanych kultur korzeniowych świeżej biomasy *G. tinctoria* ekstrahowano wodą redestylowaną (1 ml g⁻¹ świeżej masy tkankowej) a otrzymane wyciągi odwirowano, przez 5 min., przy szybkości obrotów 12 000 r.p.m (mikrowirówka z rotorem kątowym – *Heraeus*-typ BIOFUGE FRESCO). Zlany z nad osadu roztwór oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem (temp. ± 40 °C) a syropową pozostałość rozpuszczono ponownie w wodzie redestylowanej (0,2 ml g⁻¹ świeżej masy tkankowej) i odwirowano (12 000 r.p.m. – 5 min.) [24,32,37,44]. 10 µl otrzymanego roztworu наносono techniką pasemkową na bibułę chromatograficzną (*Whatman 3MM - W&R, Balston*, Wielka Brytania) wobec wzorcowej agropiny (związek otrzymany na drodze syntezy enzymatycznej [44] pochodził z kolekcji dr Rafaela Zárate – *Instituto Universitario de Bio-Organica, Universidad de La Laguna, Tenerife*, Hiszpania). Pochodne aminokwasowe rozdzielano elektroforetycznie (400V-1h) z zastosowaniem mieszaniny rozpuszczalników złożonej z: kwasu mrówkowego, lodowatego kwasu octowego i wody w stosunku 1:3:16 (v/v/v) (faza ruchoma). Opiny analizowano następnie, na wysuszonych chromatogramach, w świetle dziennym, po wywołaniu alkalicznym roztworem azotanu srebra [18,24,37].

Omówienie wyników

W wyniku przeprowadzonych badań biotechnologicznych otrzymano, po raz pierwszy, korzenie włośnikowate *G. tinctoria*, akumulujące wybiórczo znaczne ilości pojedynczego metabolitu z klasy bioflawonoidów – izolikwirytygeniny.

Inicjacja kultur korzeni transformowanych G. tinctoria

Z licznych doniesień literaturowych wynika, że poszczególne gatunki roślinne a nawet tkanki wykazują zmienną wrażliwość na infekcję bakteriami z rodzaju *Agrobacterium rhizogenes* [9,12,37,41]. Ponadto, mimo szeregu udanych prób otrzymania korzeni włośnikowatych w rodzinie *Fabaceae* ciągle uważa się, że indukowana, za pośrednictwem wektorów bakteryjnych, transformacja roślin motylkowych jest bardzo trudna [2,45]. Powodem tego są prawdopodobnie specyficzne mechanizmy regulatorowe związane z procesem symbiozy między roślinami z rodziny *Fabaceae* a poszczególnymi szczepami bakteryjnymi z rodzaju *Rhizobium* [2]. Z tego względu, w doświadczeniach nad otrzymaniem korzeni włośnikowatych *G. tinctoria*, zastosowano dwa dzikie, agropinowe szczepy *A. rhizogenes*: LBA 9402 oraz ATCC 15834. Ponadto, jako roślinny materiał inicjalny posłużyły różne tkanki *G. tinctoria* (części hypokotylowe siewek, 2-letnie kultury pędowe oraz liście i łodygi pochodzące z dwumiesięcznych, zregenerowanych roślin, hodowanych w warunkach *in vitro*). Transformację janowca barwierskiego przeprowadzono metodą „smarowania”, zranionych tkanek roślinnych [15,18], zawieszoną bakteryjną pobraną bezpośrednio z kultury pierwotnej. Już na wstępnym etapie doświadczeń zrezygnowano z techniki infiltracji [43], która powodowała prawie natychmiastowe zamieranie biomas roślinnych, będące skutkiem zbyt intensywnego wzrostu bakterii w inicjalnej kokulturze.

Kultury korzeni włośnikowatych *G. tinctoria* udało się otrzymać jedynie przy zastosowaniu szczepu ATCC 15834 *A. rhizogenes* i tylko wtedy gdy bakterie, bezpośrednio przed infekcją, kultywowano na podłożu TY [43] z 200 µmol l⁻¹ dodatkiem acetosyringonu. Zgodnie z obserwacjami poczynionymi uprzednio przez Stachel i wsp. [34] oraz Królicką i wsp. [15], również w omawianym przypadku, doszło prawdopodobnie do, indukowanej obecnością acetosyringonu, korzystnej aktywacji bakteryjnych genów wirulencji [34]. Jednocześnie w tym miejscu należy zaznaczyć, że korzenie włośnikowate *G. tinctoria* wyrastały, bezpośrednio

w miejscach infekcji, jedynie gdy zakażeniu poddawano zgrubiałe fragmenty pędów, pobrane z kultur mikroroślinek janowca (ryc. 2).



* kulturę prowadzono w ciemności, w temperaturze 25 ± 2 °C

* The culture was maintained in darkness, at 25 ± 2 °C

Ryc. 2. Wczesne stadium powstawania korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria* na podłożu SH bez dodatku regulatorów wzrostu.*

Fig. 2. Early stage of *Genista tinctoria* hairy root formation on SH medium without growth regulators.*

Skuteczność transformacji, w opisywanym przypadku, była jednak bardzo niska (32%). Fragmenty hypokotylowe siewek *G. tinctoria* podobnie jak ogonki oraz blaszki liściowe badanego gatunku, w wyniku stosowanej procedury zakażania, nie różnicowały się w kultury korzeniowe. Przedstawione wyniki potwierdzają więc informacje literaturowe wskazujące na istotne trudności w otrzymaniu korzeni transformowanych z roślin motylkowych [2,45]. Wydaje się, że w przypadku *G. tinctoria* uzyskany rezultat, w postaci juwenilnej kultury korzeni włosnikowatych, był wypadkową zastosowania odpowiedniego szczepu bakteryjnego oraz tkanki roślinnej. Jedynie pozbawione systemu korzeniowego, 2-letnie kultury pędowe janowca, różniące się statusem hormonalnym zarówno od siewek jak i zregenerowanych, w warunkach *in vitro*, roślin okazały się podatne na infekcję bakteryjną. W przeciwieństwie do korzeni i pędów rośliny gruntowej (tab. 1, rozdz. 6), tylko w pędach *G. tinctoria* namnożonych w warunkach *in vitro*, nie stwierdzono obecności prostych flawonów, pochodnych luteoliny i apigeniny (rozdz. 7 i 9). Być może fakt ten wpłynął na wyjątkową podatność pędowych kultur *in vitro* na proces zakażenia przez *A. rhizogenes*. Udział flawonoidów, a w tym w szczególności izoflawonów, w relacjach między roślinami z rodziny *Fabaceae* a bakteriami symbiotycznymi i patogennymi ma charakter bardzo złożony i jest szeroko dyskutowany w licznych doniesieniach

literaturowych [2,23,45]. W ramach niniejszego projektu nie koncentrowano się na wyjaśnieniu tego procesu, stąd przypuszczenie o korzystnym wpływie braku flawonów w tkankach pędowych na inicjację korzeni włóśnikowatych janowca może pozostać jedynie w sferze przypuszczeń.

Jałowe kultury korzeni transformowanych *G. tinctoria* otrzymano po trzech pasażach badanych biomas na pożywkach SH₀ z dodatkiem antybiotyku. Uzyskane korzenie charakteryzował plagiotropizm, znaczna ilość bocznych odgałęzień oraz możliwość ciągłego wzrostu na pożywce pozbawionej regulatorów wzrostu, czyli cechy właściwe korzeniom transformowanym [9,12,22,31,41,42]. Ponadto naturę transgeniczną otrzymanych kultur potwierdzono chromatograficznie [18,24,37,44]. W trzytygodniowych korzeniach janowca, w przeciwieństwie do nietransformowanych tkanek roślinnych, stwierdzono obecność agropiny (krochmalografia wobec substancji wzorcowej – ryc. 3). Kultywowane w identycznych warunkach, jak transformowane biomasy *G. tinctoria*, jałowe tkanki badanego gatunku nie różnicowały się w kultury korzeniowe. Ponadto korzenie *de novo* janowca (rozdz. 9) hodowane na pożywce SH₀, bez regulatorów wzrostu, nie ulegały wydłużaniu i zamierały w trakcie kolejnych trzech pasażów.

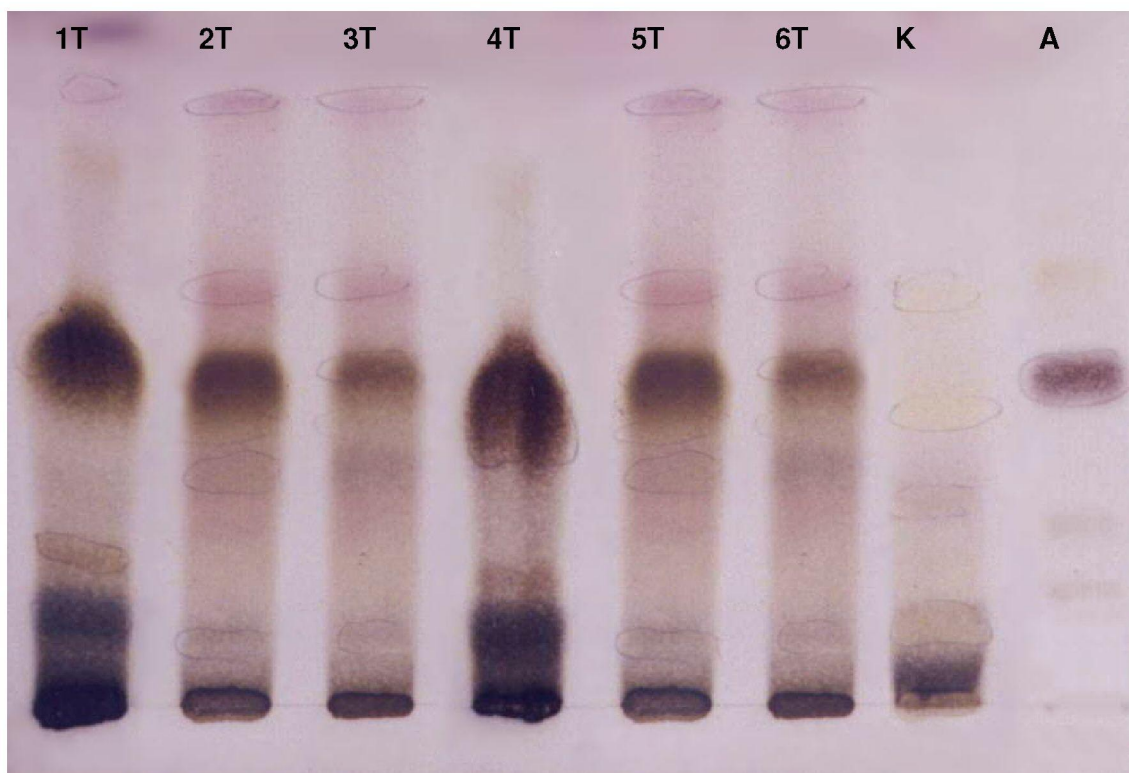
Ostatecznie, w wyniku zakażenia tkanek janowca barwierskiego agropinowym szczepem ATCC 15834 *A. rhizogenes* otrzymano jedynie 6 linii korzeni włóśnikowatych (tab. 2), powstałych z pojedynczych korzeni, które wyrosły bezpośrednio z miejsca infekcji (ryc. 2). Reszta korzeni, w trakcie wzrostu, ulegała szybkiej nekrozie w wyniku masywnego zakażenia bakteriami transformującymi, którego nie udało się wyeliminować poprzez hodowlę kokultur roślinno - bakteryjnych na pożywkach wzrostowych suplementowanych antybiotykiem. Przeniesienie korzeni włóśnikowatych z podłoży stacjonarnych do pożywek płynnych wiązało się z otrzymaniem kultur wytrząsanych, których wzrost oraz metabolizm wtórny były bezpośrednio zależne od warunków oświetleniowych hodowli (tab. 2).

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że różnice, w zakresie przyrostu oraz akumulacji bioflawonoidów, między liniami korzeniowymi kultywowanymi w identycznym reżimie oświetleniowym (1M-6M oraz 1L-6L – tab. 2) są nieznaczne. Wszystkie otrzymane biomasy korzeni transformowanych, podobnie jak kultury korzeni odciętych janowca (rozdz. 9, tab. 1) akumulowały jedynie pojedynczy metabolit z grupy izoflawonów, tj. izolikwirytygeninę. O ile jednak ilość syntetyzowanego metabolitu była porównywalna w grupie linii korzeniowych hodowanych w identycznych warunkach o tyle ulegała ona istotnej zmianie w kulturach prowadzonych przy pełnym dostępie światła bądź w ciemności (1M-6M – ok. 1700 mg/100g suchej masy; 1L-6L – ok. 860 mg/100g suchej masy – tab. 2). Dostęp światła spowodował nie tylko wzmoczoną akumulację izolikwirytygeniny w korzeniach włóśnikowatych janowca, ale również wiązał się z większym przyrostem badanych biomas (1M- 6M – W_p- śr. 1058; 1L-6L – W_p - śr. 748 – tab. 2).

W liniach korzeniowych hodowanych w warunkach ciągłego oświetlenia nie zaobserwowano powstawania korzeni syntetyzujących chlorofil ani odtwarzania kulistych struktur o charakterze kalusa, co często ma miejsce w kulturach korzeni transgenicznych oraz nietransformowanych, prowadzonych przy dostępie światła [26]. Korzenie włóśnikowate janowca kultywowane na świetle charakteryzowały się jedynie nieznacznie bardziej żółtą barwą niż biomasy hodowane w ciemności (tab. 2).

Wpływ szeroko rozumianych warunków oświetleniowych na produkcję wtórnych metabolitów, w kulturach *in vitro*, został opisany w wielu doniesieniach naukowych [3,11,27,39] i dotyczy w szczególności barwników roślinnych, których biosynteza rozpoczyna się od aktywacji prekursorów, inicjowanej za pośrednictwem fotonu światła [4,10,14,19,25]. W przypadku korzeni

transformowanych *G. tinctoria* światło dzienne zdaje się wpływać nie tyle na sam fakt akumulacji izolikwirytygeniny w biomasach, ale raczej na ilość syntetyzowanego połączenia (tab. 2).



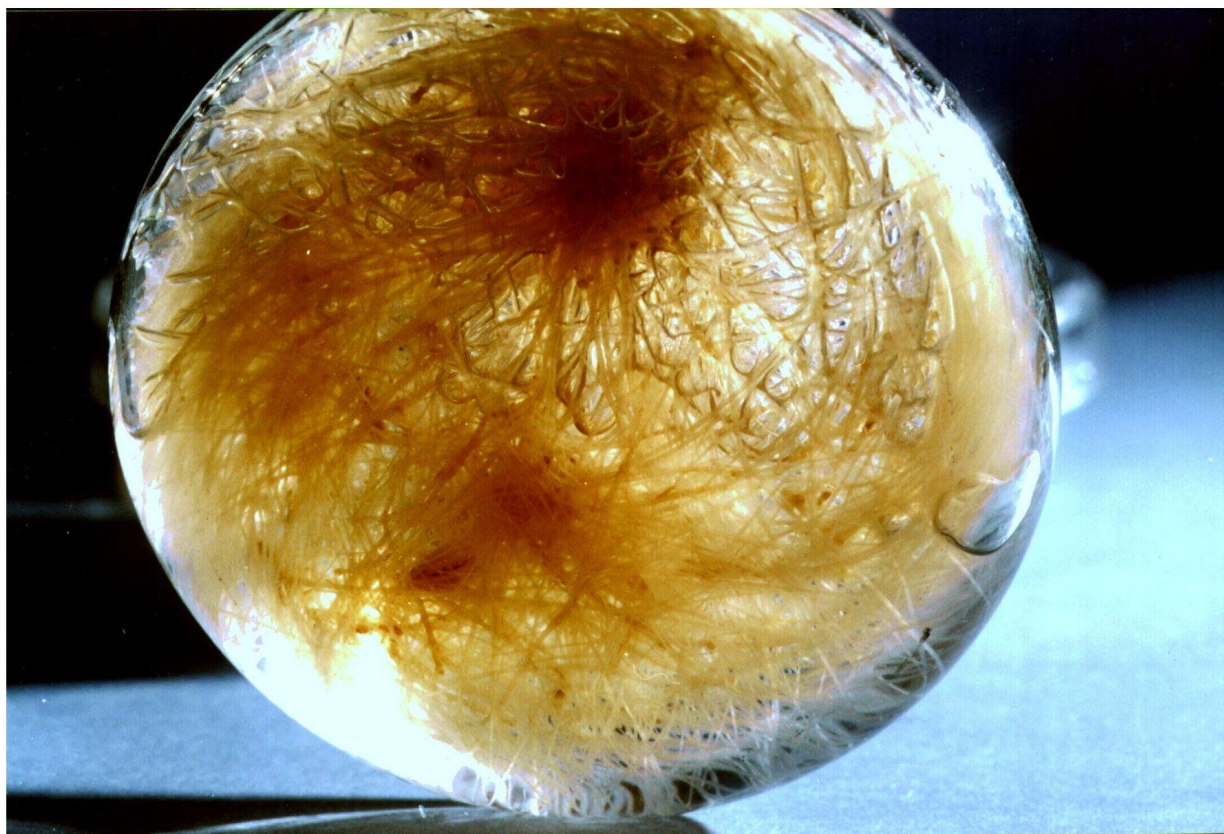
Ryc. 3. Chromatogram TLC ekstraktów z linii korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria* (1T-6T), wyciągu z nietransformowanej tkanki pędowej (K) oraz wzorca agropiny (A); bibuła chromatograficzna Whatman 3MM; faza ruchoma: kwas mrówkowy : lodowaty kwas octowy : woda – 1:3:16 (v/v/v); wizualizacja: amoniakalny roztwór azotanu srebra.

Fig. 3. TLC chromatogram of extracts from *Genista tinctoria* hairy roots (1T-6T), extract from *Genista tinctoria* untransformed shoots (K), and agropine standard (A); Whatman 3MM chromatographic paper, mobile phase: formic acid: glacial acetic acid: water – 1:3:6 (v/v/v), visualisation: silver nitrate ammoniacal solution.

Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują, że otrzymane korzenie transformowane dostarczają znacznie więcej biomasy roślinnej oraz izolikwirytygeniny (tab. 1, rozdz. 9) niż kultury korzeni odciętych *G. tinctoria*. Powyższe stwierdzenie jest prawdziwe zarówno dla korzeni włosnikowatych hodowanych w warunkach ciągłego oświetlenia jak i również w ciemności (tab. 2). Przy czym należy zaznaczyć, że w grupie linii korzeni transformowanych janowca, zawsze więcej biomasy oraz izolikwirytygeniny otrzymywano z kultur hodowanych na świetle. Z tego względu do dalszych eksperymentów biotechnologicznych, mających na celu opracowanie roślinnego systemu *in vitro* z przeznaczeniem do produkcji izolikwirytygeniny, zdecydowano się wybrać linię 3M (max. produkcja biomasy oraz izolikwirytygeniny – tab. 2), a doświadczenia prowadzić przy dostępie światła.

Wzrost oraz produkcja izolikwirytygeniny w wytrząsanej kulturze korzeniowej *G. tinctoria*, prowadzonej w pożywce SH₀

W wyniku hodowli linii korzeniowej 3M, w pożywce Schenk-Hildebrandta [30], pozbawionej regulatorów wzrostu (SH₀), uzyskano szybko rosnące kultury wytrząsane korzeni włosnikowatych *G. tinctoria* (ryc. 4).



* kultury prowadzono w kolbach Erlenmeyer'a, przy oświetleniu ciągłym, w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

* The culture was maintained in Erlenmeyer flask under continuous light, at $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ryc. 4. 42 dzień hodowli korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria*, rosnących w płynnym podłożu SH bez regulatorów wzrostu.*

Fig. 4. 42 day old *Genista tinctoria* hairy root culture grown in SH liquid medium without growth regulators.*

Maksymalną ilość namnożonej biomasy ($801,3 \text{ g l}^{-1}$ świeżej masy – FW oraz $40,6 \text{ g l}^{-1}$ suchej masy – DW) otrzymano w 34 dniu hodowli (tab. 3, ryc. 5 i 6). Jako, że kultury korzeni transformowanych *G. tinctoria* wykazywały nadal dużą juwenilność eksperyment kontynuowano aż do dnia 60, celem opracowania kompletnego profilu wzrostowego dla danej hodowli. W cyklu wzrostowym badanych biomas można wyróżnić wszystkie charakterystyczne fazy, z gwałtownie przebiegającą fazą wykładniczą i słabo zaznaczonym etapem zamierania (ryc. 5 i 6).

Analiza fitochemiczna namnożonych korzeni oraz pożywek pochodzących z różnych etapów hodowli wykazała, jak wspomniano wcześniej, że w omawianych kulturach doszło do całkowitego zahamowania biosyntezy izoflawonów, pochodnych genisteiny i daidzeiny oraz prostych flawonów, pochodnych luteoliny i apigeniny, charakterystycznych dla rośliny gruntowej (tab. 1 i 2; ryc. 7). Jedynym oznaczonym metabolitem z grupy bioflawonoidów była izolikwirytygenina, nie występująca zupełnie w roślinie gruntowej (ryc. 7). Związek ten magazynowany był całkowicie wewnątrzkomórkowo. Nie stwierdzono bowiem obecności izolikwirytygeniny w medium hodowlanym. W związku z powyższym można sądzić, że w korzeniach włosnikowatych *G. tinctoria* doszło do enzymatycznej blokady szlaku biosyntezy izoflawonoidów na poziomie izolikwirytygeniny, będącej bezpośrednim prekursorem daidzeiny [6]. Dane literaturowe oraz poprzednie badania nad kulturami *in vitro* janowca barwierskiego (rozdz. 9)

wskazują, że połączenia znajdujące się w szlaku metabolicznym genisteiny oraz daidzeiny są syntetyzowane równolegle i niezależnie od siebie, nie konkurując o prekursory biosyntezy [6,33].

W badanej biomase korzeniowej poza izolikwirytygeniną nie stwierdzono również obecności pochodnych genisteiny ani jej bezpośredniego prekursora naryngeniny. Wskazuje to na całkowitą blokadę łańcucha przemian biogennych, prowadzących do powstania genisteiny, czyli szlaku metabolicznego, który dominował zarówno w roślinie gruntowej, jak i w biomasach kalusowych, zawieszin oraz kulturach embrionalnych i pędowych *G. tinctoria* (rozdz. 6-9). W rezultacie korzenie włośnikowate janowca barwierskiego stały się wybiórczym i jednocześnie bogatym źródłem izolikwirytygeniny (2271,2 mg/100 g DW – dzień 42; ryc. 7). Obliczona dla danej kultury produktywność (719,97 mg l⁻¹) oraz specyficzna produktywność (17,14 mg l⁻¹) wskazują, że korzenie włośnikowate *G. tinctoria* mogą być rozpatrywane jako system hodowlany *in vitro* z przeznaczeniem do pozyskiwania powyższego wtórnego metabolitu (tab. 4). Ponieważ największa akumulacja izolikwirytygeniny przypada na fazę stacjonarną, konieczny jest niestety stosunkowo długi okres prowadzenia hodowli omawianej kultury korzeniowej (ryc. 5-7).

Wzrost oraz produkcja izolikwirytygeniny w wytrząsanej kulturze korzeniowej *G. tinctoria*, prowadzonej w pożywce SH₀, suplementowanej kwasem abscyzynowym

Zahamowanie biosyntezy izoflawonów, pochodnych genisteiny i daidzeiny może wskazywać na fakt zaistnienia w korzeniach włośnikowatych *G. tinctoria* innego niż w roślinie gruntowej statusu hormonalnego [3,21,27,39]. Jako, że obserwowana zmiana w metabolizmie związków bioflawonoidowych dotyczyła zarówno kultur korzeni odciętych jak i korzeni transgenicznych można więc przypuszczać, że wybiórcza akumulacja izolikwirytygeniny w obydwu typach tkanek była raczej wynikiem samego procesu hodowli w warunkach *in vitro*, a nie skutkiem infekcji *A. rhizogenes*.

Przeprowadzone badania na hypokotylach *Phaseolus vulgaris* dowiodły, że w badanym materiale tkankowym możliwe było znaczne zwiększenie produkcji izoflawonoidowych fitoaleksyn (fazeoliny i kiewetonu) poprzez prostą inkubację materiału roślinnego z kwasem abscyzynowym (ABA). W omawianym doniesieniu literaturowym sugerowano, że ABA w tkankach fasoli wpływał na regulację biosyntezy fitoaleksyn, bezpośrednio a nie poprzez mechanizmy obronne [10]. W rezultacie powyższy regulator wzrostu wybiórczo przyczynił się do około 10-krotnego wzrostu stężenia badanych izoflawonów w fragmentach hypokotylowych *Phaseolus vulgaris* [10].

W oparciu o powyższe doniesienie literaturowe postanowiono sprawdzić czy kultywowanie korzeni włośnikowatych *G. tinctoria* w pożywce SH₀, suplementowanej ABA, przyczyni się do zmiany profilu akumulacji izoflawonów w badanej biomacie.

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że kwas abscyzynowy dodawany, na początku eksperymentu (dzień 0) do pożywki SH₀, w ilości 37,8 μmol l⁻¹, wpłynął w sposób istotny zarówno na wzrost korzeni włośnikowatych *G. tinctoria* (ryc. 5 i 6), jak i również na akumulację izolikwirytygeniny (ryc. 7). Na podstawie ilości świeżej oraz suchej masy tkankowej, oznaczonej w poszczególnych dniach hodowli, można stwierdzić, że ABA wyraźnie hamował wzrost badanej kultury korzeniowej. Wprawdzie do 18 dnia doświadczenia korzenie włośnikowate *G. tinctoria* stopniowo przyrastały, jednak uzyskana maksymalna ilość świeżej masy tkankowej (FW- 92,3 g l⁻¹; DW-2,9 g l⁻¹) była około 9-krotnie niższa niż w przypadku eksperymentu bez dodatku do pożywki ABA (tab. 3). W wyniku postępujących

zmian nekrotycznych (bardzo długa faza zamierania) w 60 dniu hodowli ilość świeżej masy korzeniowej ($58,3 \text{ g l}^{-1}$) była w przybliżeniu równa masie inokulanej ($50,5 \text{ g l}^{-1}$; ryc. 5 i 6; tab. 3).

Korzenie włośniczkowe *G. tinctoria* w obecności ABA nie syntetyzowały żadnych pochodnych daidzeiny oraz genisteiny. Wskazuje to jednoznacznie, że w badanej tkance ABA nie odegrał oczekiwanej funkcji regulatorowej w mechanizmach biosyntezy izoflawonów. Jedynym oznaczanym w korzeniach związkiem, z klasy bioflawonoidów, była nadal izolikwirytygenina. Ilość powyższego metabolitu, w porównaniu z kulturą prowadzoną w podłożu SH₀ ($2271,2 \text{ mg/100 g DW}$ – dzień 42), zmalała jednak około 27-krotnie ($84,7 \text{ mg/100g DW}$ – 20 dzień; ryc. 7). Fakt ten związany jest niewątpliwie z ogólnie negatywnym wpływem ABA na wzrost korzeni włośnikowatych *G. tinctoria*. Analiza fitochemiczna pożywek pochodzących z poszczególnych dni hodowli wykazała natomiast, że w przeciwieństwie do kultury prowadzonej w pożywce SH₀ izolikwirytygenina była w tym przypadku stopniowo wyrzucana z tkanki do medium hodowlanego. W efekcie poziom oznaczanego metabolitu w pożywce był nawet 9 razy wyższy niż w biomase korzeniowej ($723,5 \text{ g/100 g DW}$ – 60 dzień; ryc. 7). Można więc sądzić, że o ile kwas abscyzynowy, w korzeniach transformowanych *G. tinctoria*, nie wpłynął bezpośrednio na szlaki metaboliczne izoflawonów, o tyle przyczynił się istotnie do zmiany statusu magazynowania syntetyzowanej izolikwirytygeniny. Pożywka eksperymentalna, w danym systemie hodowlanym, funkcjonowała jako „aktywny zbiornik”, pełniący rolę zewnętrznej wakuoli. Dotychczas, w danych literaturowych, brak informacji odnośnie roli egzogenego kwasu abscyzynowego w metabolizmie wtórnym roślin, na poziomie magazynowania syntetyzowanych połączeń. W związku z powyższym, na obecnym etapie doświadczeń trudno ustalić, czy obserwowana zmiana statusu magazynowania izolikwirytygeniny związana jest z permeabilizacją ściany komórkowej, czy też ma charakter bardziej złożony. Z technologicznego punktu widzenia wyrzucanie wtórnego metabolitu z tkanki do podłoża hodowlanego jest bardzo korzystne, gdyż eliminuje konieczność ekstrakcji danego związku z często wieloskładnikowej matrycy roślinnej [3,7,11,16,27].

Maksymalna ilość izolikwirytygeniny uzyskana w eksperymencie, gdy pożywkę SH₀ suplementowano ABA ($723,5 \text{ g/100g DW}$ – medium hodowlane – 60 dzień; ryc. 7), była około 3-krotnie niższa niż w tkance korzeniowej *G. tinctoria* hodowanej bez dodatku powyższego regulatora wzrostu ($2271,2 \text{ g/100 g DW}$ – 42 dzień – ryc. 7). Stopniowe zamieranie kultury, a co za tym idzie niewielka ilość uzyskanej masy tkankowej oraz długi okres hodowli wpłynęły ponadto na otrzymanie bardzo niskiej produktywności ($8,06 \text{ mg l}^{-1}$) oraz specyficznej produktywności ($0,13 \text{ mg l}^{-1}$) w danym systemie hodowlanym (tab. 4).

Aby uzyskać, w kulturze korzeni włośnikowatych janowca, syntezę izolikwirytygeniny na poziomie doświadczenia bez dodatku do pożywki ABA (ryc. 7), a następnie spowodować korzystne wyrzucanie metabolitu do medium hodowlanego, zdecydowano dodać kwas abscyzynowy, do pożywki, w 42 dniu eksperymentu. W tym czasie kultura korzeniowa *G. tinctoria* znajdowała się w fazie stacjonarnej cyklu wzrostowego a stężenie izolikwirytygeniny w tkankach osiągnęło wartość maksymalną (ryc. 5-7). Tym samym uniknięto negatywnego wpływu kwasu abscyzynowego na wzrost korzeni *G. tinctoria* ($\text{FW}_{\text{max}} - 803,4 \text{ g l}^{-1}$; $\text{DW}_{\text{max}} - 32,1 \text{ g l}^{-1}$ – 36 dzień), a począwszy od dnia 44 uzyskano stopniowe wyrzucanie izolikwirytygeniny do pożywki (tab. 3). W wyniku przeprowadzonego eksperymentu, w 58 dniu hodowli uzyskano ok. $2109,2 \text{ mg/100 g DW}$ izolikwirytygeniny, w pożywce wzrostowej, co stanowi około 80% maksymalnej ilości związku syntetyzowanego w tkankach korzeniowych janowca (ryc. 7). Uzyskany rezultat wskazuje, że korzenie transgeniczne *G. tinctoria* mogą zostać uznane jako wartościowy system hodowlany *in vitro*, z przeznaczeniem do produkcji znacznych ilości izolikwirytygeniny, łatwej do ostatecznego pozyskiwania, z uwagi na „zewnętrzkomórkowy” system magazynowania.

Wzrost oraz akumulacja izolikwirytygeniny w korzeniach transformowanych *G. tinctoria*, hodowanych w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym

Korzenie włośnikowate *G. tinctoria*, kultywowane w pożywce SH₀ z dodatkiem kwasu abscyzynowego, charakteryzowała niezmiernie wysoka wydajność w zakresie produkcji izolikwirytygeniny. Postanowiono więc przenieść badane biomasy do odpowiedniego bioreaktora, który umożliwiłby przetestowanie opracowanego systemu hodowlanego w skali półtechnicznej.

Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że konstrukcja pojemnika hodowlanego oraz sposób napowietrzania kultury wpływają zasadniczo zarówno na parametry wzrostowe biomas korzeniowych jak i również na poziom syntetyzowanych przez nie wtórnych metabolitów [9,12,20,29,41,46]. Hodowle korzeni włośnikowatych *G. tinctoria* prowadzono, w specjalnie skonstruowanym do tego celu, bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym. Inoculum korzeniowe umieszczono w koszu ze stali nierdzewnej, zawieszonym w szklanym zbiorniku hodowlanym (ryc. 1). Napowietrzanie kultury odbywało się poprzez wymuszony, pompą membranową, przepływ jałowego powietrza, a nie poprzez mechaniczne mieszanie jak to miało miejsce w kolbie Erlenmeyer'a. Tym samym cała biomasa korzeniowa uzyskiwała dobry dostęp do składników pożywki oraz równomierne napowietrzenie. Konstrukcja zbiornika doświadczalnego spowodowała, że tkanki korzeniowe rosły swobodnie, oplatały oczka koszyka hodowlanego i na skutek mechanicznej immobilizacji rosły zarówno w kierunku górnej kopuły bioreaktora jak również całkowicie wypełniały dolną część urządzenia (ryc. 1). W efekcie, dla kultury korzeniowej, prowadzonej w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym, uzyskano znacznie lepsze parametry wzrostowe (FW_{max} - 914,5 g l⁻¹ – 36 dzień) niż w przypadku tkanek namnażanych tradycyjnie, w kolbach Erlenmeyer'a (FW_{max} - 803,4 g l⁻¹ – 36 dzień; tab. 3, ryc. 8). Zachowana została również, w tkance korzeniowej, kinetyka produkcji izolikwirytygeniny, oraz indukowany dodatkiem ABA, zewnątrzkomórkowy sposób magazynowania powyższego wtórnego metabolitu w pożywce (ryc. 7 i 9). Uogólniając, przeniesienie kultur korzeni transformowanych *G. tinctoria*, z kolby Erlenmeyer'a do bioreaktora koszyczkowo-bąbelkowego, spowodowało zwiększenie ilości izolikwirytygeniny, uzyskanej z danego systemu hodowlanego (2363,7 mg/100 g DW – 54 dzień; ryc. 9). W rezultacie korzenie włośnikowate *G. tinctoria*, hodowane w bioreaktorze, stanowią wartościowy system hodowlanych, zdolny do produkcji znacznych ilości bezpośredniego prekursora daidzeiny – izolikwirytygeniny. Produktywność (733,52 mg l⁻¹) oraz specyficzna produktywność (13,58 mg l⁻¹) biomas rosnących w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym, w zakresie izolikwirytygeniny, były najwyższe w całym cyklu badań nad korzeniami transgenicznymi *G. tinctoria* (tab. 4).

Reasumując, w wyniku przeprowadzonego eksperymentu otrzymano, po raz pierwszy, korzenie włośnikowate *G. tinctoria*. Trudności w uzyskaniu korzeni transgenicznych janowca potwierdziły dane literaturowe odnośnie licznych ograniczeń w zakresie transformacji roślin motylkowych. Kluczową rolę w procesie zakażenia *G. tinctoria*, poza doбором szczepu bakteryjnego, odegrał przede wszystkim inokularny materiał tkankowy. Jedynie kultury pędowe janowca, różniące się pod względem statusu hormonalnego od rośliny macierzystej, były podatne na transformację dzikim szczepem *A. rhizogenes* ATCC 15834. Być może opisana procedura otrzymania korzeni włośnikowatych *G. tinctoria* okaże się właściwa dla innych roślin z rodziny *Fabaceae*.

Hodowla korzeni transformowanych *G. tinctoria* w pożywce SH₀ doprowadziła do otrzymania materiału roślinnego produkującego wybiórczo pojedynczy metabolit – izolikwirytygeninę, która w wyniku dodatku do pożywki ABA była w 80% wyrzucana do medium

doświadczalnego. Tym samym późniejsza ekstrakcja syntetyzowanego połączenia była znacznie uproszczona.

Skonstruowany w toku prac laboratoryjnych bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy okazał się odpowiedni do prowadzenia kultur korzeni włoszczykowych *G. tinctoria*. Poprzez immobilizację korzeni w koszyku hodowlanym i zmianę sposobu napowietrzania poprawiono parametry kultury dotyczące zarówno wzrostu biomasy roślinnej jak i również produkcji izolikwirytygeniny. W rezultacie opracowany system hodowlany może posłużyć do otrzymania badanego związku na skalę półtechniczną. Jako bezpośredni prekursor daidzeiny, izolikwirytygenina może być następnie wykorzystana w eksperymentach biotechnologicznych mających na celu biokonwersję tego związku do bardziej złożonych i cennych struktur izoflawonoidowych o charakterze aktywnych farmakologicznie fitoestrogenów. Dostępna w ofercie komercyjnej izolikwirytygenina jest zbyt droga by wykorzystać ją w systemie hodowlanym, z zamiarem otrzymania przemysłowych ilości fitoestrogenów.

Tab. 1. Analiza ilościowa związków flawonoidowych w roślinie gruntowej oraz korzeniowych kulturach *in vitro* *Genista tinctoria* (zawartość flawonoidów w mg/100g suchej masy).*

Tab. 1. Quantitative analysis of flavonoids in the intact plant (herb and roots) and *in vitro* cultures (hairy roots) of *Genista tinctoria* (isoflavone content in mg/100g DW).*

Związek	Materiał roślinny				
	Roślina gruntowa			Kultury <i>in vitro</i>	
	Ziele		Korzenie	Korzenie odcięte	Korzenie włosnikowate
7-O-diglukozyd genisteiny	437,94	± 0,1	531,5 ± 0,4	-	-
pueraryna	5,4	± 0,09	-	-	-
7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	420,6	± 0,11	631,3 ± 0,1	-	-
daidzina	42,8	± 0,21	28,6 ± 0,2	-	-
7-O-glukozyd apigeniny	169,6	± 0,15	-	-	-
7-O-glukozyd luteoliny	1097,0	± 0,1	347,3 ± 0,2	-	-
genistyna	1454,2	± 0,1	1477,9 ± 0,3	-	-
malonylogenistyna	303,7	± 0,09	374,2 ± 0,1	-	-
7,3',4'-trihydroksy-izoflawon	11,5	± 0,18	-	-	-
acetylogenistyna	68,3	± 0,19	-	-	-
ononina	6,2	± 0,28	-	-	-
ekwol	6,42	± 0,21	-	-	-
daidzeina	0,3	± 0,01	11,52 ± 0,29	-	-
sisotryna	1,4	± 0,08	3,81 ± 0,09	-	-
genisteina	32,7	± 0,13	514,88 ± 0,1	-	-
luteolina	5,4	± 0,07	-	-	-
izolikwirytygenina	-	-	-	978,4 ± 21,5	2271,2 ± 13,4

* Wartości przedstawione w tabeli są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z trzech pomiarów ± S. D.

* Each value represents the mean ± S. D. of three samples.

Tab. 2. Wzrost oraz produkcja izolikwirytygeniny w pierwotnych kulturach korzeni transformowanych *Genista tinctoria* (linie tkankowe 1M- 6M oraz 1L - 6L).

 Tab. 2. Growth and isoliquiritigenin production in *Genista tinctoria* hairy root cultures (tissue lines 1M-6M and 1L-6L).

Numer linii korzeniowej	Współczynnik przyrostu Wp (%)	Barwa korzeni	Zawartość izolikwirytygeniny (w mg/100 g suchej masy)
1M	989	Jasnożółta	1742,2
2M	994	Jasnożółta	1689,4
3M	1119	Jasnożółta	1798,7
4M	1048	Żółta	1643,5
5M	1113	Jasnożółta	1704,3
6M	1085	Jasnożółta	1699,2
1L	762	Kremowa	845,0
2L	683	Kremowa	903,1
3L	794	Kremowa	874,8
4L	842	Jasnobrunatna	915,4
5L	698	Kremowa	799,9
6L	714	Kremowa	844,1

Kultury korzeni transformowanych prowadzono w pożywce SH₀, z 3% (w/v) dodatkiem sacharozy, przez 60 dni, w ciemności (linie 1L-6L) lub w warunkach ciągłego oświetlenia (linie 1M-6M – natężenie $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), w temp. $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Wartości umieszczone w tabeli dotyczą pomiarów pochodzących z pojedynczych pojemników hodowlanych, zawierających odpowiednie linie tkankowe.

Hairy root cultures were grown in liquid SH₀ medium, supplemented with 3% (w/v) sucrose. All cultures were maintained in the dark (lines 1L-6L) or under continuous light (light intensity $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cell lines 1M-6M) for 60 days, temperature $25 \pm 2^\circ \text{C}$. The values presented in the table represent single samples.

 Tab. 3. Zmiany w ilości świeżej i suchej masy korzeni włośnikowatych *Genista tinctoria* rosnących w pożywce SH bez regulatorów wzrostu lub suplementowanej 37,8 μM dodatkiem ABA^a.

 Tab. 3. Changes in fresh (FW) and dry weight (DW) of *Genista tinctoria* hairy roots grown in liquid SH medium without growth regulators or supplemented with 37.8 μM ABA^a.

Dzień hodo- wli	Rodzaj podłoża					
	SH ₀ ^b		SH _{ABA (0)} ^c		SH _{ABA (42)} ^d	
	FW (g l ⁻¹)	DW (g l ⁻¹)	FW (g l ⁻¹)	DW (g l ⁻¹)	FW (g l ⁻¹)	DW (g l ⁻¹)
0	50,3 ± 2,1	2,7 ± 0,09	50,5 ± 1,7	2,3 ± 0,09	50,7 ± 1,9	2,02 ± 0,08
4	61,7 ± 2,4	3,7 ± 0,18	59,3 ± 2,5	2,0 ± 0,1	59,7 ± 1,9	2,3 ± 0,09
16	604,3 ± 24,3	28,2 ± 1,5	87,4 ± 4,1	2,6 ± 0,22	611,5 ± 19,4	25,6 ± 1,2
34	801,3 ± 25,3	40,6 ± 2,9	76,4 ± 4,8	2,2 ± 0,19	803,4 ± 21,8	32,1 ± 2,3
60	632,4 ± 22,2	26,5 ± 1,0	58,3 ± 2,7	1,1 ± 0,16	477,6 ± 16,4	19,1 ± 0,8

Kultury prowadzono w cyklach 60-dniowych przy oświetleniu ciągłym (natężenie oświetlenia – $88,8 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), w temp. $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

^a wartości przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z trzech pomiarów ± S. D.

^b SH₀, płynna pożywka SH bez dodatku regulatorów wzrostu.

^c SH_{ABA (0)}, płynna pożywka SH suplementowana 37,8 μM ABA (dodany w dniu 0).

^d SH_{ABA (42)}, płynne podłoże SH suplementowane 37,8 μM ABA (dodany w dniu 42).

All cultures were maintained for 60 days under continuous light (light intensity $88,8 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temp. $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

^a each value represents the mean ± S. D. of three samples.

^b SH₀, liquid SH medium without growth regulators.

^c SH_{ABA (0)}, liquid SH medium supplemented with 37.8 μM ABA (on day 0).

^d SH_{ABA (42)}, liquid SH medium supplemented with 37.8 μM ABA (on day 42).

Tab. 4. Porównanie produktywności pod względem izolikwirytygeniny, w kulturach korzeni włosni-
kowatych *Genista tinctoria* prowadzonych w kolbach Erlenmeyer'a oraz bioreaktorze ko-
szyczkowo-bąbelkowym.*

Tab. 4. Comparison of maximum productivity of isoliquiritigenin (biomass and media) in *Genista tinctoria* hairy root cultures grown in Erlenmeyer flasks and in the basket- bubble bioreactor.*

Rodzaj kultury	Maksymalne stężenie izolikwirytygeniny [mg/100 g DW]	Dzień hodowli	Ilość biomasy [g l ⁻¹]	Produktywność	Specyficzna produktywność
Kultury w kolbach Erlenmeyer'a (pożywka SH bez dodatku ABA)	2271,2	42	31,7	719,97	17,14
Kultury w kolbach Erlenmeyer'a (pożywka SH z dodatkiem ABA w dniu 0)	732,7	60	1,1	8,06	0,13
Kultury w kolbach Erlenmeyer'a (pożywka SH z dodatkiem ABA w dniu 42)	2652,9	58	18,9	501,39	8,64
Kultura w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym (pożywka SH z dodatkiem ABA w dniu 42)	2887,9	54	25,4	733,52	13,58

* Wartości umieszczone w tabeli dotyczą dni, w których uzyskano maksymalną zawartość izolikwirytygeniny

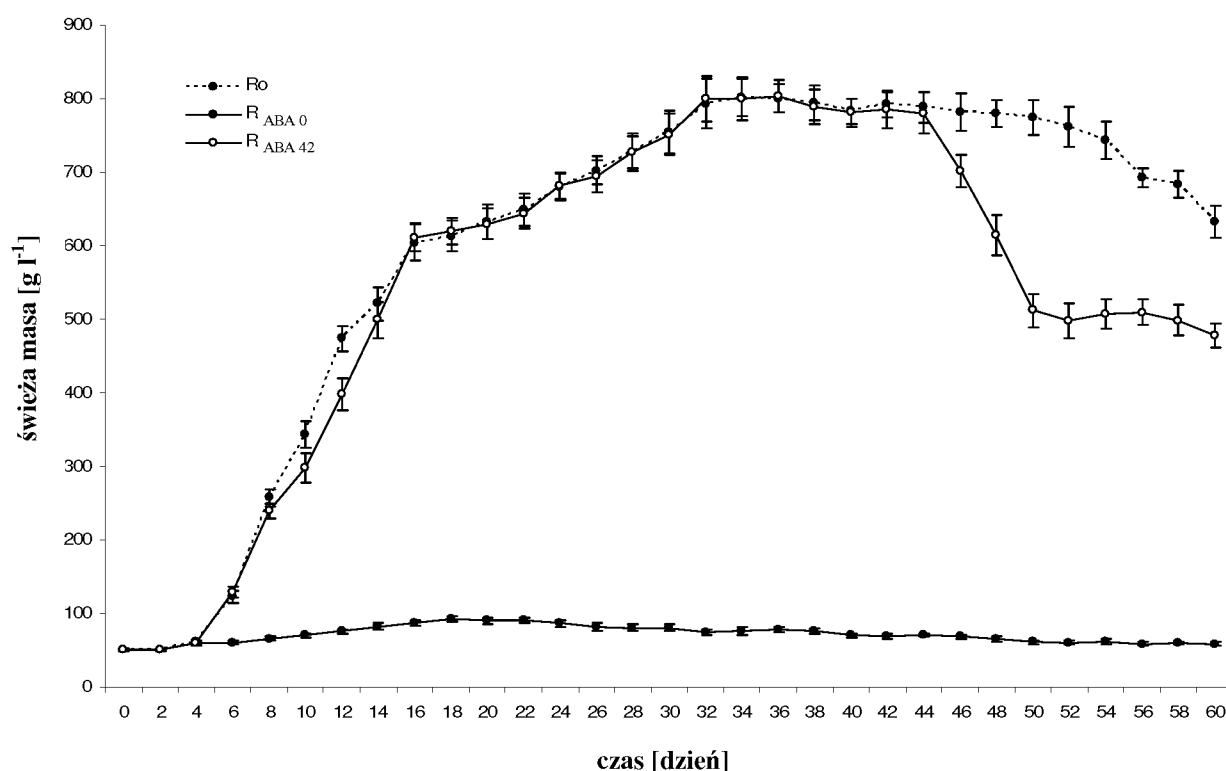
$$\text{produktywność} = \frac{\text{maksymalne stężenie izolikwirytygeniny w mg/100g DW} \times \text{ilość biomasy w g l}^{-1}}{100\text{g suchej masy}}$$

$$\text{specyficzna produktywność} = \frac{\text{produktywność}}{\text{ilość dni po których stwierdzono maksymalne stężenie izolikwirytygeniny w kulturze}}$$

* All measurements throughout the table are quoted for the day on which maximum concentration of isoliquiritigenin was recorded

$$\text{productivity} = \frac{\text{max. concentration for isoliquiritigenin in mg/100g DW} \times \text{culture biomass in g l}^{-1}}{100 \text{ g DW}}$$

$$\text{specific productivity} = \frac{\text{productivity}}{\text{the number of days after which the max. concentration of isoliquiritigenin was reached}}$$



* Kultury prowadzono w cyklach 60-dniowych, przy oświetleniu ciągłym (natężenie światła – $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), w temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ro – korzenie włosnikowate rosnące w płynnym podłożu SH bez regulatorów wzrostu (SH₀).

R_{ABA 0} – korzenie włosnikowate rosnące w płynnym podłożu SH, suplementowanym $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodanym w dniu 0).

R_{ABA 42} – korzenie włosnikowate rosnące w płynnym podłożu SH, suplementowanym $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodanym w dniu 42).

* All cultures were maintained for 60 days under continuous light ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, light intensity – $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

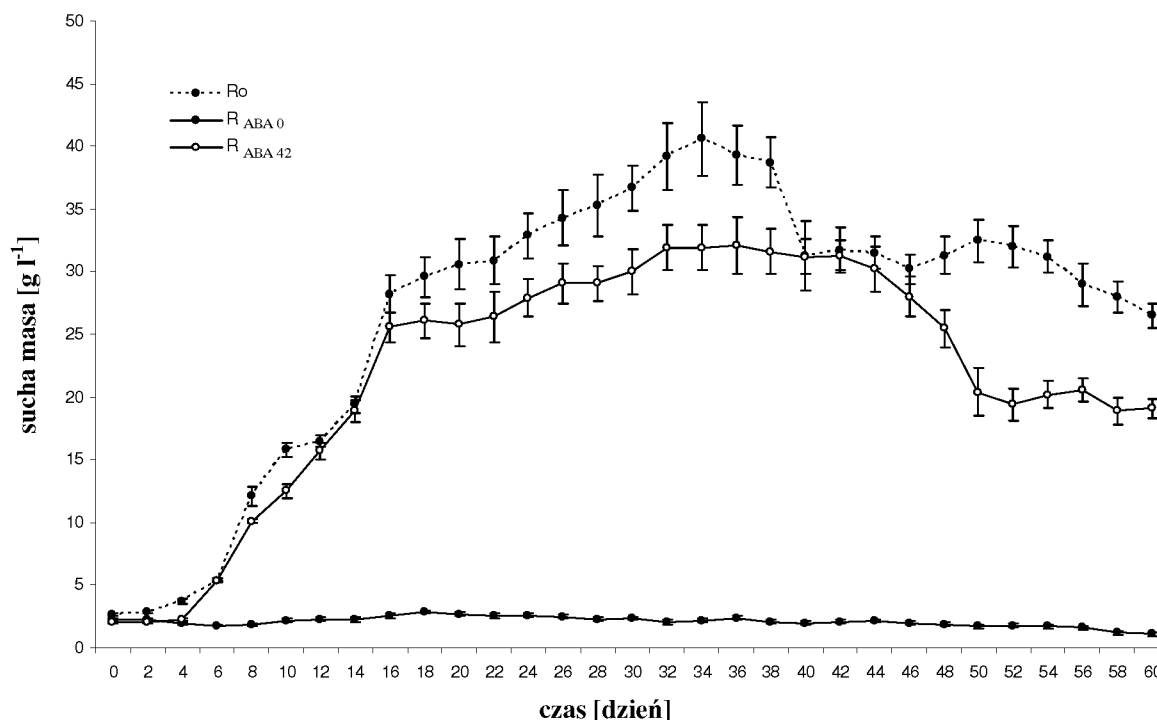
Ro - hairy roots grown in SH liquid medium without growth regulators (SH₀).

R_{ABA 0} – hairy roots grown in SH liquid medium with $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA, supplemented on day 0.

R_{ABA 42} – hairy roots grown in SH liquid medium with $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA, supplemented on day 42.

Ryc. 5. Zmiany w ilości świeżej masy korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria* rosnących w podłożu SH bez regulatorów wzrostu lub suplementowanym $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ dodatkiem ABA.*

Fig. 5. Changes in fresh weight (FW) of *Genista tinctoria* hairy roots grown in SH medium without growth regulators or supplemented with $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA.*



* Kultury prowadzono w cyklach 60-dniowych, przy oświetleniu ciągłym (natężenie światła – $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), w temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ro – korzenie włosnikowate rosnące w płynnym podłożu SH bez regulatorów wzrostu (SH_0).

$R_{\text{ABA } 0}$ – korzenie włosnikowate rosnące w płynnym podłożu SH, suplementowanym $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodanym w dniu 0).

$R_{\text{ABA } 42}$ – korzenie włosnikowate rosnące w płynnym podłożu SH, suplementowanym $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodanym w dniu 42).

* All cultures were maintained for 60 days under continuous light ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, light intensity – $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

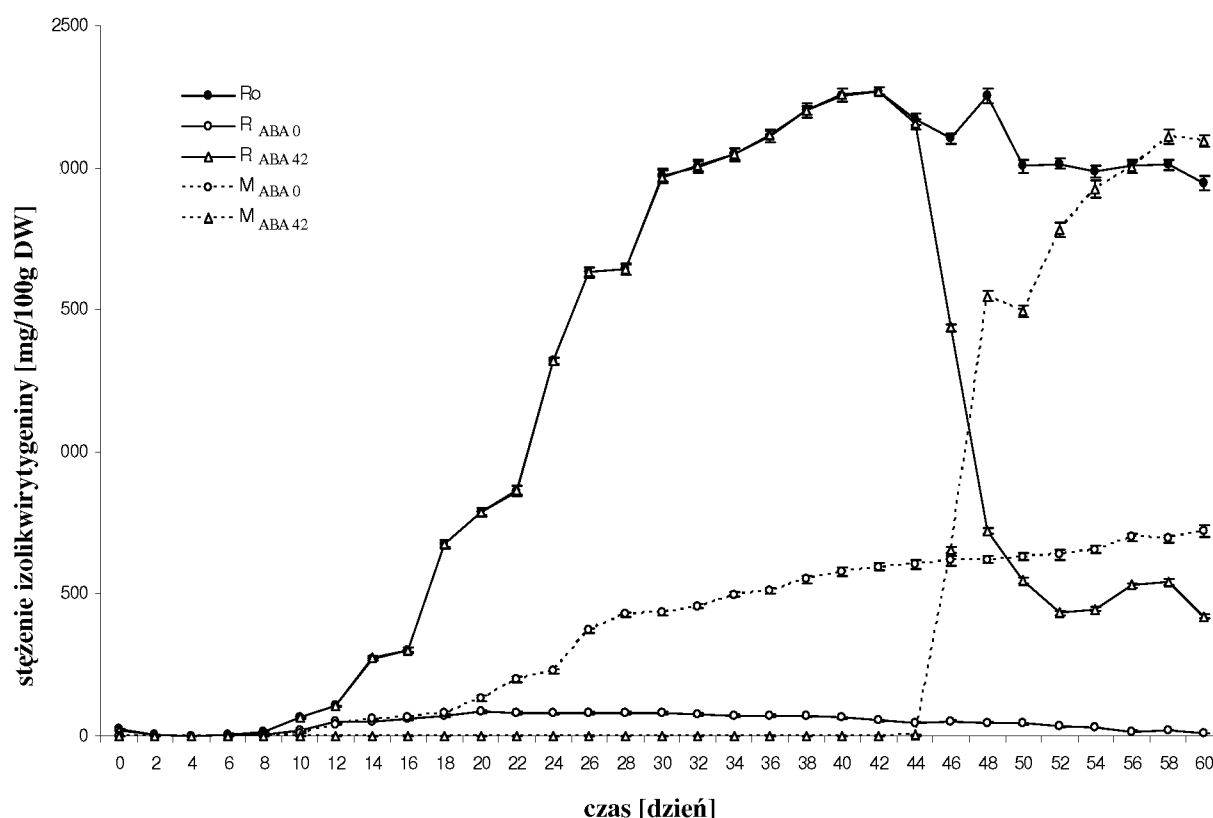
Ro – hairy roots grown in SH liquid medium without growth regulators (SH_0).

$R_{\text{ABA } 0}$ – hairy roots grown in SH liquid medium with $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA, supplemented on day 0.

$R_{\text{ABA } 42}$ – hairy roots grown in SH liquid medium with $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA, supplemented on day 42.

Ryc. 6. Zmiany w ilości suchej masy korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria* rosnących w podłożu SH bez regulatorów wzrostu lub suplementowanym $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ dodatkiem ABA.*

Fig. 6. Changes in dry weight (DW) of *Genista tinctoria* hairy roots grown in SH medium without growth regulators or supplemented with $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA.*



Ro – stężenie izolikwirytygeniny w korzeniach włosnikowatych, rosnących w podłożu SH bez regulatorów wzrostu (SH₀).

R_{ABA 0} – stężenie izolikwirytygeniny w korzeniach włosnikowatych, rosnących w podłożu SH suplementowanym 37,8 μmol l⁻¹ ABA (w dniu 0).

M_{ABA 0} – stężenie izolikwirytygeniny w podłożu hodowlanym SH suplementowanym 37,8 μmol l⁻¹ ABA (w dniu 0).

R_{ABA 42} – stężenie izolikwirytygeniny w korzeniach włosnikowatych rosnących w podłożu SH suplementowanym 37,8 μmol l⁻¹ ABA (w dniu 42).

M_{ABA 42} – stężenie izolikwirytygeniny w podłożu hodowlanym SH suplementowanym 37,8 μmol l⁻¹ ABA (w dniu 42).

Ro – isoliquiritigenin content in hairy roots grown in SH liquid medium without growth regulators (SH₀).

R_{ABA 0} – isoliquiritigenin content in hairy roots grown in SH liquid medium with 37.8 μmol l⁻¹ ABA, supplemented on day 0.

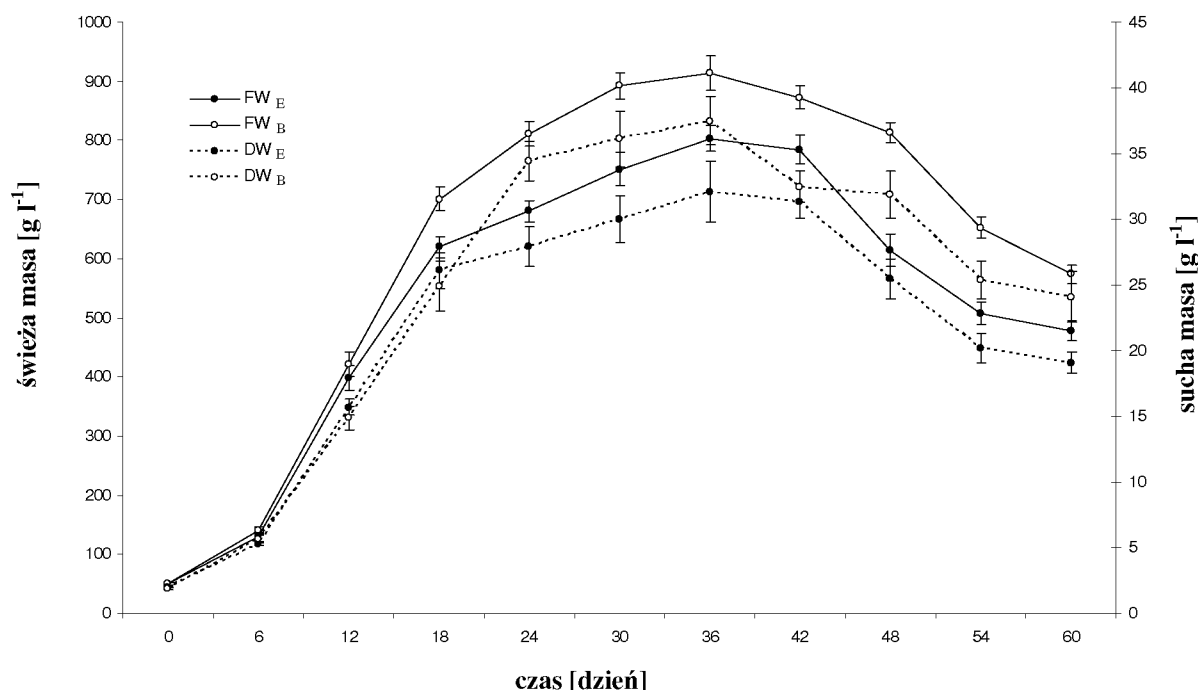
M_{ABA 0} – isoliquiritigenin content in SH media with 37.8 μmol l⁻¹ ABA, supplemented on day 0.

R_{ABA 42} – isoliquiritigenin content in hairy roots grown in SH liquid medium with 37.8 μmol l⁻¹ ABA, supplemented on day 42.

M_{ABA 42} – isoliquiritigenin content in SH media with 37.8 μmol l⁻¹ ABA, supplemented on day 42.

Ryc. 7. Zawartość izolikwirytygeniny w kulturach korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria* (oznaczona w biomase i pożywce hodowlanej), prowadzonych w podłożu SH bez regulatorów wzrostu (SH₀) lub suplementowanych 37,8 μmol l⁻¹ dodatkiem ABA (stężenie izolikwirytygeniny w mg/100g suchego materiału roślinnego).

Fig. 7. Isoliquiritigenin concentration in *Genista tinctoria* hairy root cultures (measured in the biomass and in the media) grown in SH medium without growth regulators (SH₀) or supplemented with 37.8 μmol l⁻¹ ABA (isoliquiritigenin content in mg/100g DW plant material).



* kultury prowadzono w cyklach 60-dniowych, w pożywce SH suplementowanej $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodano w dniu 42), przy oświetleniu ciągłym (natężenie światła – $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), w temp. $25 \pm 2 ^\circ\text{C}$.

FW_E – świeża masa korzeni włosnikowatych rosnących w kolbach Erlenmeyer’a.

FW_B – świeża masa korzeni włosnikowatych rosnących w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym.

DW_E – sucha masa korzeni włosnikowatych rosnących w kolbach Erlenmeyer’a.

DW_B – sucha masa korzeni włosnikowatych rosnących w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym.

* Both cultures were grown in SH medium supplemented with $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA on day 42 and maintained for 60 days under continuous light ($25 \pm 2 ^\circ\text{C}$, light intensity - $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

FEW – fresh weight of hairy roots grown in Erlenmeyer flask.

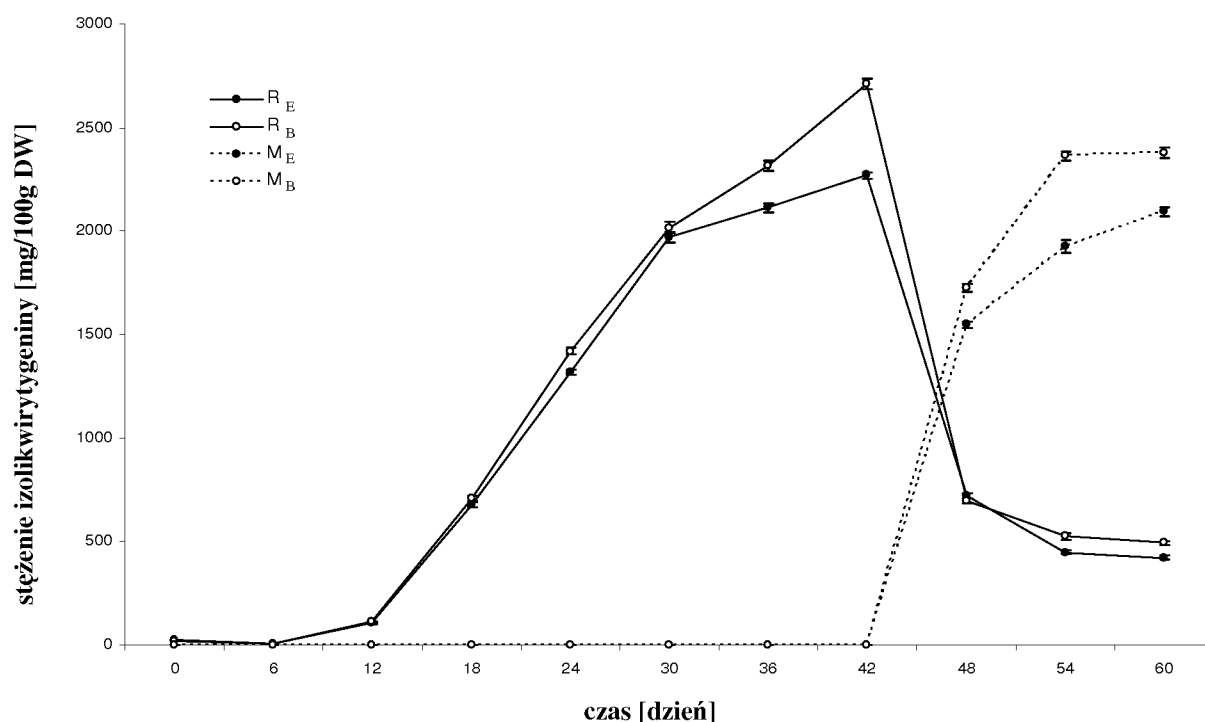
FW_B – fresh weight of hairy roots grown in the basket-bubble bioreactor.

DW_E – dry weight of hairy roots grown in Erlenmeyer flask.

DW_B – dry weight of hairy roots grown in the basket-bubble bioreactor.

Ryc. 8. Zmiany w ilości świeżej i suchej masy korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria* hodowanych w kolbach Erlenmeyer’a lub w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym.*

Fig. 8. Changes in fresh weight (FW) and dry weight (DW) of *Genista tinctoria* hairy roots grown in Erlenmeyer flask or in the basket-bubble bioreactor.*



* kultury prowadzono w podłożu SH suplementowanym 37,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodano w dniu 42).

R_E – stężenie izolikwirytygeniny w korzeniach włosnikowatych rosnących w kolbach Erlenmeyer’a.

R_B – stężenie izolikwirytygeniny w korzeniach włosnikowatych rosnących w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym.

M_E – stężenie izolikwirytygeniny w podłożu hodowlanym kultury prowadzonej w kolbach Erlenmeyer’a.

M_B – stężenie izolikwirytygeniny w podłożu hodowlanym kultury prowadzonej w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym.

* Both cultures were grown in SH medium supplemented with 37.8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA on day 42.

R_E – isoliquiritigenin content in hairy roots grown in Erlenmeyer flask.

R_B – isoliquiritigenin content in hairy roots grown in the basket-bubble bioreactor.

M_E – isoliquiritigenin content in SH medium of the culture grown in Erlenmeyer flask.

M_B – isoliquiritigenin content in SH medium of the culture grown in the basket-bubble bioreactor.

Ryc. 9. Zawartość izolikwirytygeniny w kulturach korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria* (oznaczona w biomase i pożywce hodowlanej), prowadzonych w kolbach Erlenmeyer’a lub w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym (stężenie izolikwirytygeniny w mg/100g suchego materiału roślinnego).*

Fig. 9. Isoliquiritigenin concentration in *Genista tinctoria* hairy root cultures (measured in the biomass and the media) grown in Erlenmeyer flask or in the basket-bubble bioreactor (isoliquiritigenin content in mg/100g DW plant material).*

Piśmiennictwo

1. Azmi A., Dewitte W., Drevet C., van Onckelen H., Landre P., Boudet A.M., Jouanin L., Chriqui D., Bud regeneration from *Eucalyptus globulus* clones and seedlings through hormonal imbalances induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139, *Plant Sci.* 127 (1997) 81-90.
2. Bednarek P., Frański R., Kerhoas L., Einhorn J., Wojtaszek P., Stobiecki M., Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor, *Phytochemistry* 56 (2001) 77-85.
3. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant. Sci.* 161 (2001) 839-851.
4. Chappell J., Hahlbrock K., Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor, *Nature* 311 (1984) 76-78.
5. Chen H., Yuan J.P., Chen F., Zhang Y.L., Song J.Y., Tanshinone production in Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures, *J. Biotechnol.* 58 (1997) 147-156.
6. Dixon R.A., Harrison M.J., Paiva N.L., The flavonoid phytoalexin pathway: from enzymes to genes to transcription factors, *Physiol. Plant.* 93 (1995) 385-392.
7. Dörnenburg H., Knorr D., Strategies for improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures, *Enz. Microb. Technol.* 17 (1995) 674-684.
8. Floryanowicz-Czekalska K., Wysokińska H., Transgenic shoots and plants as a source of natural phytochemical products, *Acta Soc. Bot. Pol.* 15 (1994) 57-64.
9. Giri A., Narasu M.L., Transgenic hairy roots: recent trends and applications, *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 1-22.
10. Goossens J.F.V., Vendrig J.C., Effects of abscisic acid, cytokinins, and light on isoflavonoid phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* L., *Planta* 154 (1982) 441-446.
11. Grajek W., Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*, w: S. Malepszy (Ed.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2004, str. 328-329.
12. Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Kumar Pati P., Rideau M., Gantet P., Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. Commentary, *Cur. Opinion Plant Biotechnol.* 9(2006) 341-346.
13. Hooykaas P.J.J., Klapwijk P., Noti M.P., Schilperoort R., Rorsch A., Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to a virulent *Agrobacteria* and *Rhizobium* ex planta, *J. Gen. Microbiol.* 98 (1977) 503-517.
14. Kishima Y., Shimaya A., Adachi T., Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulaca* callus, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43 (1995) 67-70.
15. Królicka A., Staniszewska J., Bielawski K., Maliński E., Szafranek J., Łojkowska E., Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*, *Plant Sci.* 160 (2001) 259-264.
16. Kwon I.C., Yoo Y.J., Lee J.H., Hyun J.O., Enhancement of taxol production by *in situ* recovery of product, *Proc. Biochem.* 33(7) (1998) 701-707.
17. Łuczkiwicz M., Piotrowski A., Two-Stage System for Micropropagation of Several *Genista* Plants Producing Large Amounts of Phytoestrogens, *Z. Naturforsch.* 60c (2005) 557-566.
18. Łuczkiwicz M., Zárate R., Dembińska-Migas W., Migas P., Verpoorte R., Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L., *Plant Sci.* 163 (2002) 91-100.

19. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Optimization of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 65 (2001) 57-68.
20. Martin Y., Vermette P., Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization and recent advances, Biomaterials 26 (2005) 7481-7503.
21. Oksman-Caldentey K.M., Inzé D., Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites, Trends Plant Sci. 9 (9) (2004) 433-440.
22. Olszowska O., Transformowane korzenie jako źródło wtórnych metabolitów, Biotechnologia 2 (49) (2000) 54-63.
23. Paiva N.L., Oommen A., Harrison M.J., Dixon R.A., Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38 (1994) 213-220.
24. Petit A., David C., Dahl G.A., Ellis J.G., Guyon P., Casse- Delbart F., Tempe J., Further extension of the opine concepts: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation, Mol. Gen. Genet. 190 (1983) 204-214.
25. Pinto M.E., Casati P., Hsu T-P., Ku M.S.B., Edwards G.E., Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B-absorbing compounds and NADP- malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different nitrogen conditions, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 48 (1999) 200-209.
26. Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M., Advances and limitation in the use of hairy root cultures for the production of tropane alkaloids: use of anti-auxins in the maintenance of normal root morphology, In Vitro Cell Dev. Biol. 31 (1995) 215-220.
27. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, Biotechnol. Adv. 20 (2002) 101-153.
28. Ray S., Jha S., Withanolide synthesis in cultures of *Withanina somnifera* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Sci. 146 (1999) 1-7.
29. Roberts S.C., Shuler M.L., Large-scale plant cell culture, Curr. Op. Biotechnol. 8 (1997) 154-159.
30. Schenk R.U., Hildebrandt A.C., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, Can. J. Bot. 50 (1972) 199-204.
31. Shen W.H., Petit A., Guern J., Tempe J., (1988), Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 35 (1988) 3417-3421.
32. Shi H.P., Kintzios S., Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots, Plant Cell Rep. 21 (2003) 1103-11107.
33. Shimada N., Akashi T., Aoki T., Ayabe S., Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis, Plant Sci. 160 (2000) 37-47.
34. Stachel S.E., Messens E., van Montagu M., Zambryski P., Identification of signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*, Nature 318 (1985) 624-629.
35. Street H.E., Henshaw G.G., Introduction and Methods Employed in Plant Tissue Cultures, in E.N. Wilmer (Eds.), Cell and Tissue Culture, Vol. 3, Academic Press, London, New York, 1966.
36. Subroto M.A., Hamill J.D., Doran P.M., Development of shooty teratomas from several solanaceous plants: growth kinetics, stoichiometry and alkaloid production, 45 (1996) 45-57.
37. Thron U., Maresch L., Beiderbeck R., Reichling J., Accumulation of unusual phenylpropanoid in transformed and non-transformed root cultures of *Coreopsis incana*, Z. Naturforsch. 44c (1989) 573-577.

38. Verpoorte R., Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production, *Transgenic Res.* 9 (2000) 323-343.
39. Verpoorte R., Plant secondary metabolism, w: Verpoorte R., Alfermann A.W. (Eds.), *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 2000, str. 1-29.
40. Verpoorte R., van der Heijden R., ten Hoopen H.J.G., Memmelink G., Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production, *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 4 (1998) 3-19.
41. Wysokińska H., Chmiel A., Transformed root cultures for biotechnology, *Acta Biotechnol.* 17 (1997) 131-159.
42. Wysokińska H., Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach korzeni transformowanych, *Biotechnologia* 4 (51) (2000) 32-39.
43. Zárte R., Tropane alkaloid production by *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root cultures of *Atropa baetica* Willk. (Solanaceae), *Plant Cell. Rep.* 18 (1999) 418-423.
44. Zhang D., Shelby R., Savka M.A., Dessaux Y., Wilson M., Separation, detection, and quantitation of imine-liked opines by high-performance liquid chromatography, *J.Chromatogr. A* 813 (1998) 247-253.
45. Zhang Z., Xing A., Staswick P., Clemente T.E., The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 56 (1999) 37-46.
46. Zobayed S.M.A., Murch S.J., Rupasinghe H.P.V., de Boer J.G., Glickman B.W., Saxena P.K., Optimized system for biomass production, chemical characterization and evaluation of chemo-preventive properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi., *Plant Sci.* 167 (2004) 439-446.

12. KOKULTURY KORZENI WŁOŚNIKOWATYCH I PĘDÓW *GENISTA TINCTORIA* JAKO SYSTEM HODOWLANY Z PRZEZNACZENIEM DO AKUMULACJI ORAZ BIO-KONWERSJI ZNACZNYCH ILOŚCI FITOESTROGENÓW

Wstęp

Opisywane, w uprzednich rozdziałach, badania nad kulturami *in vitro* *G. tinctoria*, doprowadziły do otrzymania wytrząsanych kultur zawiesinowych, embrionalnych oraz pędowych janowca, będących bogatym źródłem fitoestrogenów, wywodzących się z klasy izoflawonów (rozdz. 9). Zarówno kultury zawiesinowe, embrionalne jak i pędowe *G. tinctoria* syntetyzowały jedną z największych ilości fitoestrogenów, otrzymanych dotychczas w biomasach roślinnych pochodzących z kultur *in vitro* [1,4,5,8,9]. Wieloskładnikowy zespół izoflawonów, otrzymany w hodowlach *in vitro* janowca barwierskiego (14 związków, pochodnych genisteiny, daidzeiny oraz formononetyny) oraz fakt, że omawiane metabolity syntetyzowane były w znacznych ilościach wskazuje, iż zarówno kultury zawiesinowe, jak i pędowe *G. tinctoria*, po odpowiedniej adaptacji, mogą być wykorzystane do produkcji fitoestrogenów na skalę przemysłową.

W toku przeprowadzonych badań stwierdzono, że zarówno pędy jak i zawiesina *G. tinctoria* szczególnie aktywnie akumulowały związki znajdujące się w szlaku metabolicznym genisteiny, przy jednoczesnej, niewielkiej produkcji daidzeiny i daidziny. Równolegle otrzymane kultury korzeni odciętych oraz włośnikowatych syntetyzowały wybiórczo tylko jeden metabolit szlaku izoflawonoidowego, a mianowicie izolikwirytygeninę (rozdz. 9 i 11). W przypadku korzeni transformowanych ulegała ona wyrzuceniu do podłoża, w wyniku dodatku do pożywki kwasu abscyzynowego (rozdz. 11). Jako, że izolikwirytygenina jest bezpośrednim prekursorem daidzeiny [7] postanowiono sprawdzić czy w wyniku hodowli biomas bogatych w pochodne genisteiny i ubogich w daidzeinę (pędy i zawiesina) z korzeniami włośnikowatymi *G. tinctoria*, w jednym zbiorniku hodowlanym, możliwe jest doprowadzenie do międzykankowej translokacji izolikwirytygeniny, a następnie jej biotransformacji do pochodnych daidzeiny w pędach lub zawieszinie janowca.

Zasadniczym celem tej części projektu było więc otrzymanie kokultur *G. tinctoria*, które mogłyby, w wyniku zaistniałej biokonwersji, stanowić system *in vitro*, produkujący nie tylko znaczne ilości genisteiny i jej pochodnych, jak to miało miejsce w przypadku odpowiednich monokultur, ale również zdolne byłyby do akumulacji wysokich stężeń daidzeiny i daidziny. Tym samym uzyskano by cenny materiał roślinny, z przeznaczeniem do wykorzystania w produkcji przemysłowych ilości szeregu izoflawonów o charakterze fitoestrogenów.

Hodowle biomas roślinnych w systemie kokultur prowadzone były do tej pory sporadycznie [13,14]. Jedyne doniesienia literaturowe dotyczące kultur korzeni transformowanych *Atropa belladonna* i teratomów pędowych *Duboisia* [14] oraz korzeni włośnikowatych *Ammi majus* i pędów *Ruta graveolens* [13] dowiodły, że ten nowatorski system hodowli może przyczynić się do istotnego podniesienia wydajności kultur *in vitro* w zakresie produkcji wybranych wtórnych metabolitów.

Pierwsze próby uzyskania kokultur janowca barwierskiego, opartych na zawieszinie i korzeniach transformowanych badanego gatunku, skończyły się całkowitym niepowodzeniem, spowodowanym niemożnością dobrania pożywki doświadczalnej, zdolnej do podtrzymania

wzrostu zawiesiny kultywowanej w obecności korzeni (brunatnienie biomasy i przerastanie korzeni kalusem). Z tego względu system kokultur *G. tinctoria* zdecydowano się opracować na bazie pędów i korzeni transformowanych badanego gatunku, które we wstępnym etapie badań nie stwarzały opisywanych powyżej trudności. W tym miejscu należy zaznaczyć, że do doświadczeń wykorzystano korzenie transformowane *G. tinctoria*, a nie kultury korzeni odciętych powyższej rośliny, nie tylko ze względu na większą stabilność genetyczną i szybszy wzrost tych pierwszych [10,16] ale przede wszystkim z uwagi na konstytucyjną niemożność hodowli w jednym podłożu pędów i korzeni *de novo* wymagających do ciągłego wzrostu innej równowagi hormonalnej [10,14,16].

Cykl badań, opisywany w niniejszym rozdziale, pozwolił na opracowanie warunków hodowli umożliwiających jednoczesny wzrost pędów i korzeni transformowanych *G. tinctoria* w jednym zbiorniku hodowlanym. Ponadto na danym etapie doświadczeń przebadano metabolizm pędów i korzeni transformowanych janowca w kokulturach, w zakresie izoflawonów, porównując uzyskane wyniki z odpowiednimi monokulturami. Opracowano następnie warunki przeniesienia kokultur janowca, z kolby laboratoryjnej, do bioreaktora celem prowadzenia doświadczenia w skali półtechnicznej. Jak już wspomniano problem prowadzenia kokultur w systemie wewnątrz i międzygatunkowym jest zupełnie nowy w badaniach biotechnologicznych roślin wyższych [10,16]. Z tego względu na rynku brak urządzeń komercyjnych nadających się do prowadzenia tego typu doświadczeń na skalę półtechniczną. Dla aktywnie rosnących kokultur *G. tinctoria* skonstruowano więc urządzenie prototypowe (bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy) i w niniejszym rozdziale opisano szczegóły dotyczące jego budowy.

Prezentowane badania stanowią pierwsze doniesienie naukowe dotyczące systemu hodowlanego o charakterze kokultur, prowadzonego na skalę półtechniczną, z przeznaczeniem do otrzymania znacznych ilości wtórnych metabolitów o cennej aktywności farmakologicznej. W rozdziale uzasadniono celowość prowadzenia tego typu doświadczeń obliczając produktywność i specyficzną produktywność pochodnych genisteiny i daidzeiny, w materiale roślinnym, rosnącym w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym.

Materiały i metody

Monokultury pędów oraz korzeni transformowanych G. tinctoria – materiał roślinny i warunki hodowli

Wytrąsane kultury pędowe *G. tinctoria*, syntetyzujące znaczne ilości połączeń izoflawonoidowych prowadzono w cyklu 60 dniowym, w płynnym podłożu Schenk - Hildebrandt'a (SH) [12], suplementowanym 24,6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA (kwas indolilo-3-masłowy) oraz 3% (w/v) sacharozy (rozd. 9). Każdorazowo, w 250 ml kolbach Erlenmeyer'a, zawierających po 100 ml zmodyfikowanej pożywki SH, umieszczano około 5 g 2 cm fragmentów pędowych *G. tinctoria* pochodzących z płynnych kultur *in vitro* (3 serie po 31 kolb w każdej).

Wytrąsane kultury korzeni włósnikowatych janowca, akumulujących znaczne ilości izolikwirytygeniny, prowadzono w cyklu 60 dniowym, w płynnym podłożu SH, bez regulatorów wzrostu (SH₀), zawierającym 3% (w/v) sacharozy (rozd. 9).

W celu określenia profilu wzrostowego oraz produkcji izolikwirytygeniny, w wytrąsanej kulturze korzeniowej, ok. 5 g biomasy (fragmenty macierzy z korzeniami włósnikowatymi) inokulowano do 250 ml kolb Erlenmeyer'a zawierających po 100 ml płynnego, podłoża SH₀, (3 serie – 31 kolb w każdej). Aby doprowadzić do wycieku izolikwirytygeniny, z tkanki korzeniowej do medium hodowlanego, w 42 dniu doświadczenia, do pożywki dodano 37,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ kwasu abscyzynowego (ABA).

Zarówno kultury korzeni transformowanych jak i pędy *G. tinctoria* kultywowano w szklanych kolbach Erlenmeyer'a, zamykanych korkami z pianki silikonowej (Shine-Etsu-Polymer Co. – Japonia), na wytrząsarce rotacyjnej (INNOVA 2300-New Brunswick Scientific – 150 rpm), w warunkach oświetlenia ciągłego (natężenie światła – $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – lampy jarzeniowe Philips TLD 35W x 3), w temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Rosnące aktywnie korzenie oraz pędy *G. tinctoria* zbierano w odstępach dwudniowych (každorazowo po trzy kolby), aż do zakończenia cyklu hodowlanego. Po odsączeniu od podłoża hodowlanego i przemyciu wodą redestylowaną biomasy *G. tinctoria* przeznaczono do badań biologicznych (oznaczenie świeżej i suchej masy tkankowej) oraz fitochemicznych (jakościowa i ilościowa analiza frakcji izoflawonoidowej). Otrzymany, w wyniku badań biotechnologicznych, materiał roślinny wraz z płynnymi pożywkami, pochodzącymi z poszczególnych dni eksperymentu, suszono przez 48 h, do stałej masy, na drodze liofilizacji (próżnia 1×10^{-3} mbar wytworzona przez liofilizator LYOVAC GT2 firmy FIN-AQUA SANTASALO-SOHLBERG Co – Finlandia). Zliofilizowane biomasy oraz podłoża hodowlane przeznaczono do badań fitochemicznych na obecność bioflawonoidów. Uzyskane wyniki (świeża masa – FW, sucha masa – DW oraz zawartość izoflawonów w materiale roślinnym i pożywkach) stanowią średnie arytmetyczne z trzech próbek hodowlanych $\pm$ S. D.

Kokultury pędów oraz korzeni transformowanych G. tinctoria – materiał roślinny i warunki hodowli

Hodowle *in vitro* *G. tinctoria* wyprowadzono w oparciu o biomasy inicjalne, które stosowano w trzech zmiennych ilościach, tak by stosunek pędów do korzeni transformowanych w *inoculum* wynosił odpowiednio: 4:1, 2,5:2,5 lub 1:4. Ogółem około 5 g świeżej masy tkankowej (korzenie oraz pędy) umieszczano w 250 ml kolbach Erlenmeyer'a (3 serie – 31 kolb w każdej) zawierających po 100 ml płynnej pożywki SH [12] suplementowanej $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz 3% (w/v) sacharozy. Doświadczenie prowadzono w cyklu 60 dniowym, na wytrząsarce rotacyjnej, w warunkach identycznych jak to miało miejsce w przypadku monokultur pędów i korzeni włośnikowatych *G. tinctoria* (rozd. 9 i 11). Rosnące kultury *G. tinctoria* zbierano w odstępach dwudniowych (každorazowo po trzy kolby) aż do zakończenia cyklu hodowlanego. Po mechanicznym oddzieleniu biomasy korzeniowej od pędowej oznaczono świeżą (FW) oraz, po liofilizacji, suchą (DW) masę obydwu typów tkanek.

Doświadczenie mające na celu określenie profilu wzrostowego oraz kinetyki produkcji poszczególnych związków izoflawonoidowych w kokulturze *G. tinctoria* prowadzono w cyklu 60-dniowym, wykorzystując płynne podłoże SH, o składzie podanym powyżej. Ogółem około 5 g świeżej masy tkankowej (stosunek biomasy pędowej do korzeniowej w *inoculum* - 4:1) umieszczano w 250 ml kolbach Erlenmeyer'a (3 serie – 31 kolb w każdej) zawierających po 100 ml płynnej, zmodyfikowanej pożywki SH i kultywowano na wytrząsarce rotacyjnej, w warunkach opisanych dla odpowiednich monokultur (rozd. 9 i 11). W celu spowodowania wycieku izolikwirytygeniny, z tkanki korzeniowej do medium hodowlanego, w 42 dniu doświadczenia, do pożywki dodano $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA. Rosnące kultury *G. tinctoria* zbierano w odstępach dwudniowych (každorazowo po trzy kolby), aż do zakończenia cyklu hodowlanego. Następnie, dla oddzielonych mechanicznie korzeni i pędów janowca, oznaczono świeżą, i po liofilizacji, suchą masę tkankową.

Zliofilizowane biomasy korzeniowe i pędowe janowca oraz pożywki pochodzące z kolejnych dni hodowli poddano analizie fitochemicznej na obecność izoflawonoidów. Otrzymane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z trzech próbek hodowlanych $\pm$ S. D.

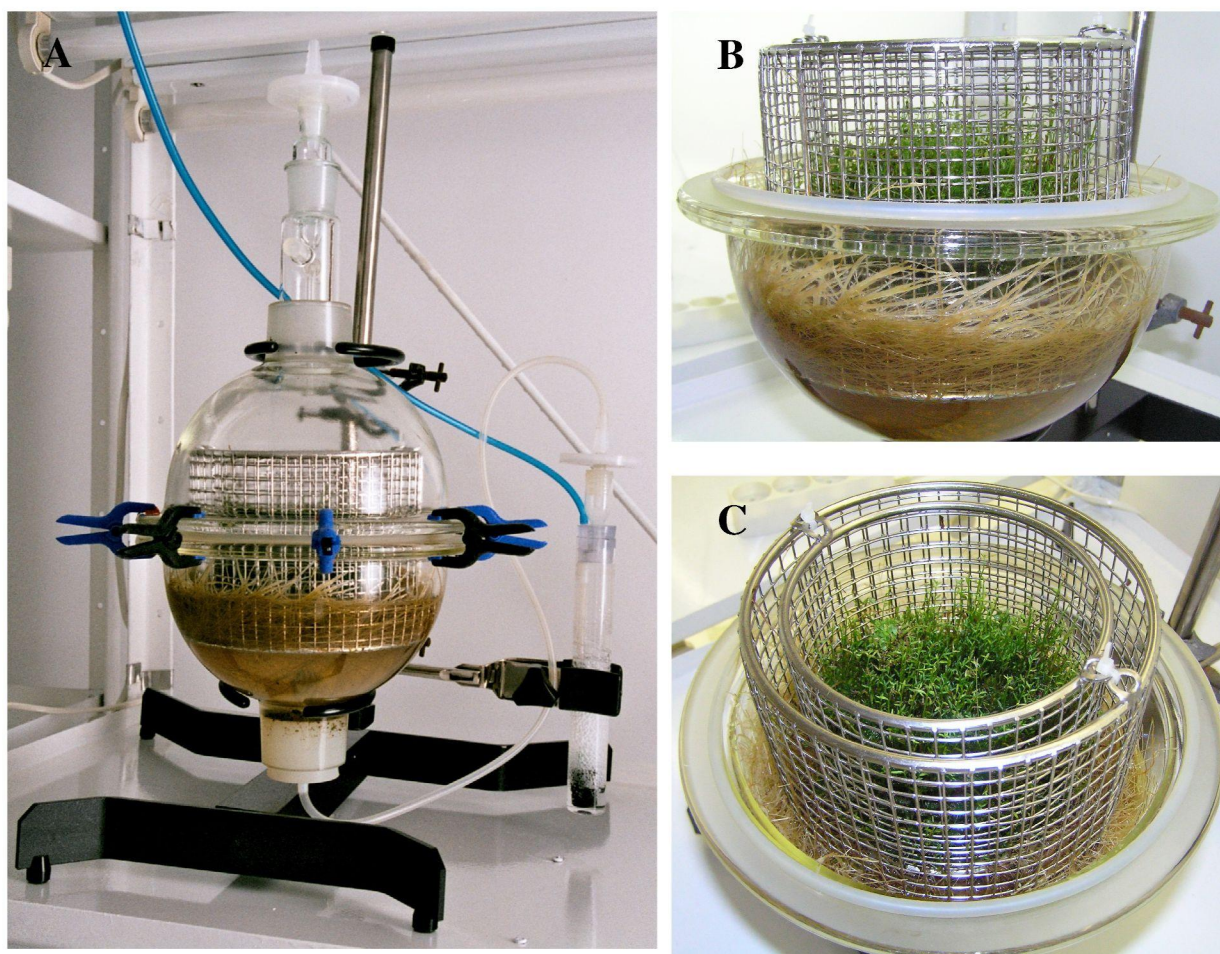
Kokultury pędowo - korzeniowe *G. tinctoria* prowadzone w bioreaktorze

Bioreaktor koszyczko –bąbelkowy – konstrukcja oraz procedury hodowlane

Bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy składał się z dwóch identycznych szklanych kopuł (Rasotherm, Niemcy) o wysokości wewnętrznej 100 mm i średnicy wewnętrznej, w najszerszym miejscu, 180 mm, połączonych 8 zaciskami (ryc. 1). Miejsce złączenia kopuł szklanych uszczelniono dodatkowo uszczelką silikonową (wymiar DN 150, Schott-Duran, Niemcy). W celu immobilizacji kultur korzeniowych i pędowych wewnątrz naczynia hodowlanego umieszczono dwa koszyki ze stali nierdzewnej (18/8) o średnicy oczek 8 mm (Deutsch-Neuman, Niemcy). Mniejszy koszyk o średnicy 120 mm i wysokości 100 mm umieszczono koncentrycznie wewnątrz koszyka większego o średnicy 150 mm i wysokości 120 mm tak, że odległość między koszykami wynosiła 15 mm. Maksymalna odległość od dna zewnętrznego koszyka do dna dolnej kopuły wynosiła 40 mm (ryc. 1). Korzenie włósnikowate *G. tinctoria* (ok. 10,0 g) umieszczono równomiernie w przestrzeni między koszykami, a pędy (ok. 40,0 g) w wewnętrznym koszyku. Po napełnieniu naczynia hodowlanego 1000 ml zmodyfikowanej pożywki SH korzenie zostały całkowicie zanurzone w medium hodowlanym natomiast pędy przykrywała pożywka do wysokości 15 mm (ryc. 1). Kokulturę napowietrzano wtłaczając powietrze od spodu zbiornika hodowlanego poprzez silikonowy wąż o średnicy wewnętrznej 4 mm i grubości ściany 1 mm (Deutsch-Neumann, Niemcy) przy użyciu pompy membranowej z regulacją przepływu (Maxima R Air Pump, 6W, 6 PSI, Rolf C. Hagen Inc. Montreal, Quebec, Kanada). Przepływ powietrza w kulturze wynosił 800 ml/min. W celu zapewnienia sterylnych warunków hodowli zastosowano filtry wyjąławiające (Millex Vent Filter, średnica-50 mm, PTFE membrane, wielkość porów 0,2 mm; Millipore Corporation, Bedford, USA) zarówno na przewodach doprowadzających jak i wyjściu powietrza z naczynia hodowlanego (ryc. 1). Aby zapobiec ubytkowi pożywki w procesie napowietrzania powietrze, przed jałową filtracją, przepuszczano przez płuczkę wodną (ryc. 1).

Kokultury *G. tinctoria* hodowano w bioreaktorze w warunkach opisywanych dla analogicznych kultur prowadzonych w kolbach Erlenmeyer'a (stosunek biomasy pędowej do korzeniowej w *inoculum*- 4:1). Celem doprowadzenia do wycieku izolikwirytygeniny z biomasy korzeniowej do medium hodowlanego, w 42 dniu doświadczenia, dodano do systemu hodowlanego 37,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA. Zarówno biomasy tkankowe, jak i pożywki hodowlane zbierano w: 0, 26, 40, 42, 50 i 54 dniu doświadczenia, przez całkowite rozładowanie bioreaktora, w celu oznaczenia świeżej (FW) i suchej (DW) masy tkankowej oraz by wykonać analizy fitochemiczne biomas i pożywek. Eksperyment powtórzono trzykrotnie a wyniki stanowią średnie arytmetyczne z trzech próbek hodowlanych $\pm$ S. D.

Jakościową oraz ilościową analizę frakcji izoflawonoidowych, występujących w badanych biomasach i podłożach hodowlanych, zebranych na wszystkich etapach opisywanych doświadczeń, przeprowadzono techniką HPLC według procedury opisaną szczegółowo w rozdziale 6.



A – bioreaktor koszyczkowo- bąbelkowy – całość konstrukcji/ the basket-bubble bioreactor – general view
 B – bioreaktor koszyczkowo- bąbelkowy – widok z boku/ the basket-bubble bioreactor – side view
 C – bioreaktor koszyczkowo- bąbelkowy – widok z góry/ the basket-bubble bioreactor – upper view

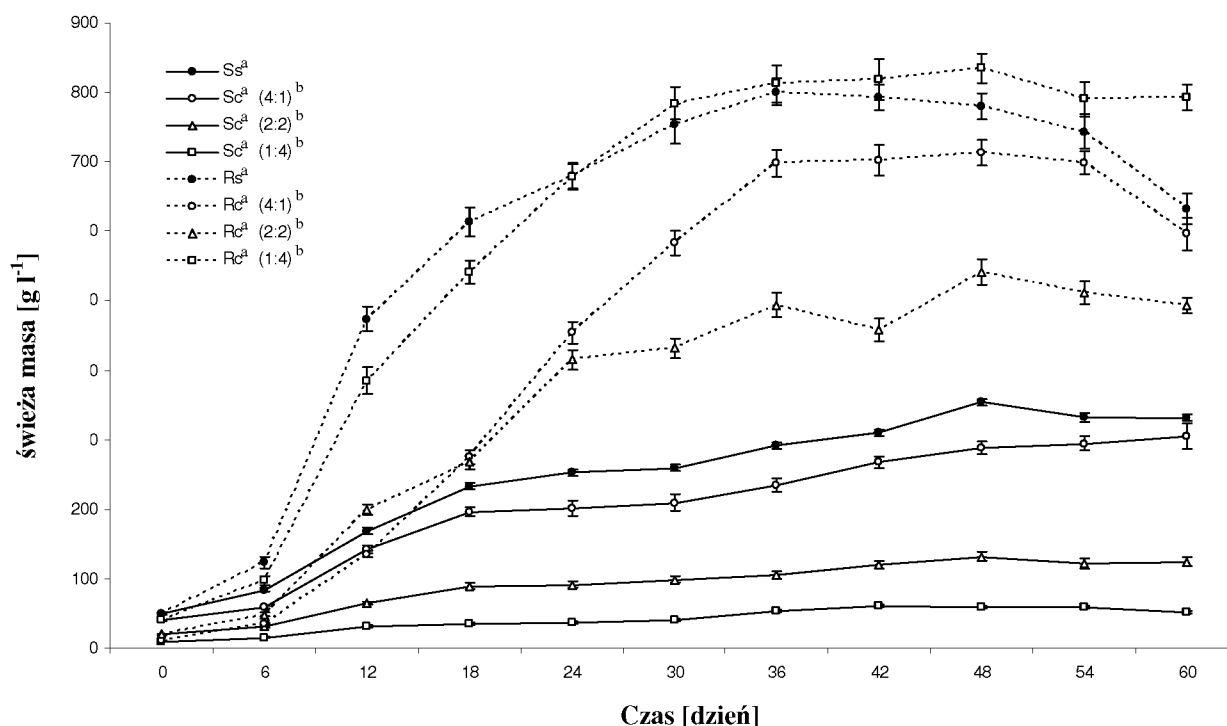
Ryc. 1. Kokultury pędowo-korzeniowe *Genista tinctoria* prowadzone w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym (pożywka SH suplementowana $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA oraz 3% (w/v) sacharozy; temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$; natężenie światła – $88,8 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Fig. 1. *Genista tinctoria* co-culture grown in the basket-bubble bioreactor in liquid SH medium supplemented with $24.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA 3% (w/v) sucrose ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, light intensity – $88.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Omówienie wyników

Monokultury pędowe *G. tinctoria* - wzrost i akumulacja izoflawonów

W wyniku przeprowadzonych uprzednio badań opracowano warunki do ciągłego wzrostu kultur pędowych *G. tinctoria* w hodowli płynnej (rozdz. 9). Dla pędów rosnących w pożywce SH z $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ dodatkiem IBA, maksymalną ilość biomasy uzyskano w 48 dniu doświadczenia ($354,2 \text{ g l}^{-1}$ FW i $25,03 \text{ g l}^{-1}$ DW) (ryc. 2 i 3). Sześćdziesięciodniowy cykl wzrostowy omawianej kultury wyznaczały wszystkie charakterystyczne fazy, ze słabo zaznaczonym etapem zamierania. Otrzymane pędy charakteryzowały się morfologią właściwą dla rośliny grun- towej, bez tendencji do wiotryfikacji i tworzenia struktur anormalnych.



* Kokultury oraz monokultury pędów *Genista tinctoria* prowadzono w płynnym podłożu SH suplementowanym 24,6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz 3% (w/v) sacharozy. Monokultury korzeni włosnikowatych prowadzono w płynnym podłożu SH bez regulatorów wzrostu (SH_0) z 3% dodatkiem sacharozy (w/v). Hodowle prowadzono przy oświetleniu ciągłym w cyklu 60-dniowym.

a: Ss – pędy rosnące jako monokultury; Sc – pędy rosnące w systemie kokultury; Rs – korzenie włosnikowate rosnące jako monokultury; Rc – korzenie włosnikowate rosnące w systemie kokultury.

b: wartości w nawiasach przedstawiają stosunek ilościowy pędów do korzeni w *inoculum*.

* *Genista tinctoria* co-culture and single shoot cultures were grown in liquid SH medium supplemented with 24.6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA and 3% (w/v) sucrose. Single hairy root cultures were grown in liquid SH medium without growth regulators (SH_0) with 3% (w/v) sucrose. All cultures were maintained for 60 days under continuous light.

a: Ss – shoots grown as a single culture; Sc - shoots grown in a co-culture; Rs – hairy roots grown as a single culture; Rc – hairy roots grown in a co-culture.

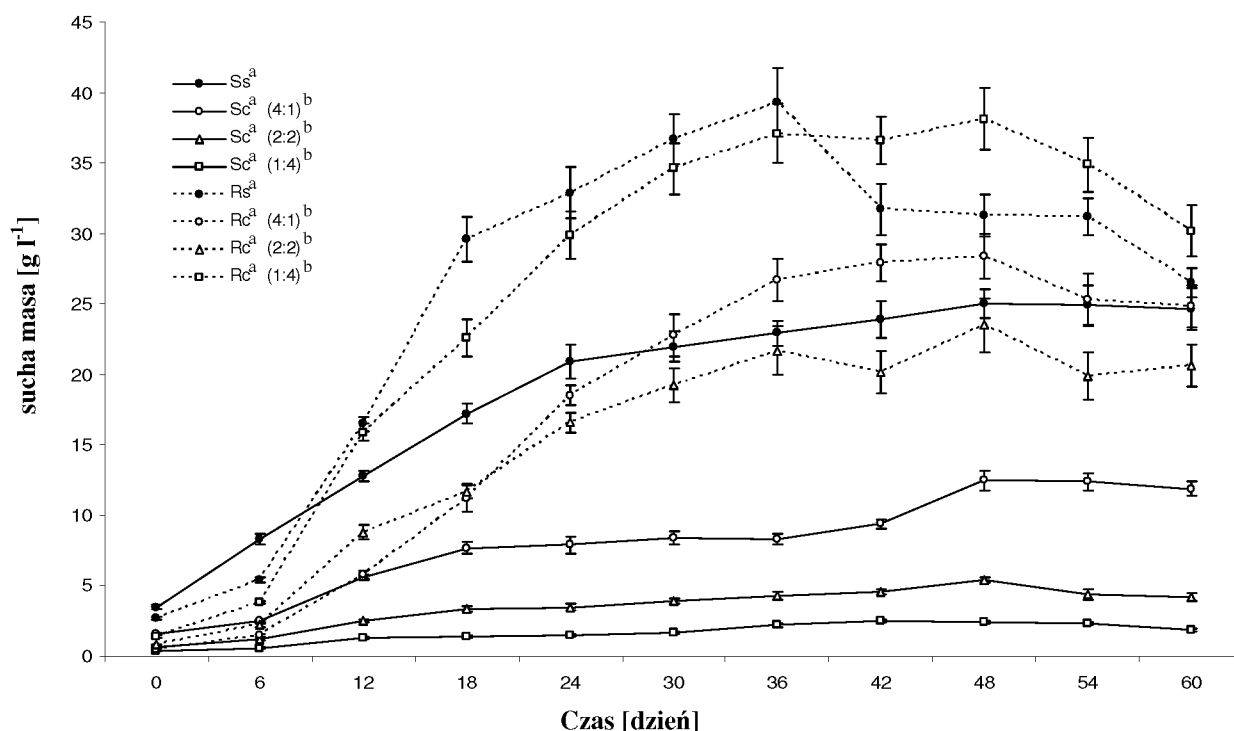
b: the values in brackets represent various ratios of shoot and hairy root fresh matter in the inoculum.

Ryc. 2. Zmiany w ilości świeżej masy pędów i korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria*, rosnących jako monokultury lub kokultury (stosunek ilościowy pędów do korzeni w *inoculum* 4:1, 2:2, 1:4).*

Fig. 2. Changes in fresh weight (FW) of *Genista tinctoria* shoots and hairy roots grown as single cultures or in a co-culture (shoot to root inoculation ratios 4:1, 2:2, 1:4).*

Kultury pędowe *G. tinctoria* produkowały bogaty, 14-składnikowy zespół izoflawonów, pochodnych genisteiny, daidzeiny i formononetyny, magazynowany całkowicie wewnątrzkomórkowo. Nie stwierdzono natomiast obecności izoflawonów w medium doświadczalnym (rozdz. 9). W zoptymalizowanych warunkach hodowlanych, główny metabolit zespołu – genistyna, akumulowany był w ponad 3-krotnie wyższym stężeniu niż w przypadku części nadziemnych rośliny gruntowej (6640 mg/100 g DW – 40 dzień – ryc. 4) (rozdz. 6). W wytrząsanej hodowli pędowej janowca stwierdzono, że synteza metabolitów znajdujących się w szlaku genisteiny i daidzeiny zachodzi równolegle i niezależnie od siebie, nie konkurując o prekursor biosyntezy (ryc. 5). Należy jednak zaznaczyć, że szlak biosyntezy genisteiny realizowany był w pędach *G. tinctoria* w znacznej przewadze do biosyntezy pochodnych

daidzeiny (maks. stężenie daidziny – 86,17 mg/100g DW – ryc. 5). W efekcie wytrząsane hodowle pędowe *G. tinctoria* stanowią bogate źródło genisteiny i jej pochodnych, przy niewielkim udziale daidziny.



* Kokultury oraz monokultury pędów *Genista tinctoria* prowadzono w płynnym podłożu SH suplementowanym 24,6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz 3% (w/v) sacharozy. Monokultury korzeni włosnikowatych prowadzono w płynnym podłożu SH bez regulatorów wzrostu (SH_0) z 3% dodatkiem sacharozy (w/v). Hodowle prowadzono przy oświetleniu ciągłym w cyklu 60-dniowym.

a: Ss – pędy rosnące jako monokultury; Sc – pędy rosnące w systemie kokultur; Rs – korzenie włosnikowate rosnące jako monokultury; Rc – korzenie włosnikowate rosnące w systemie kokultur.

b: wartości w nawiasach przedstawiają stosunek ilościowy pędów do korzeni w *inoculum*.

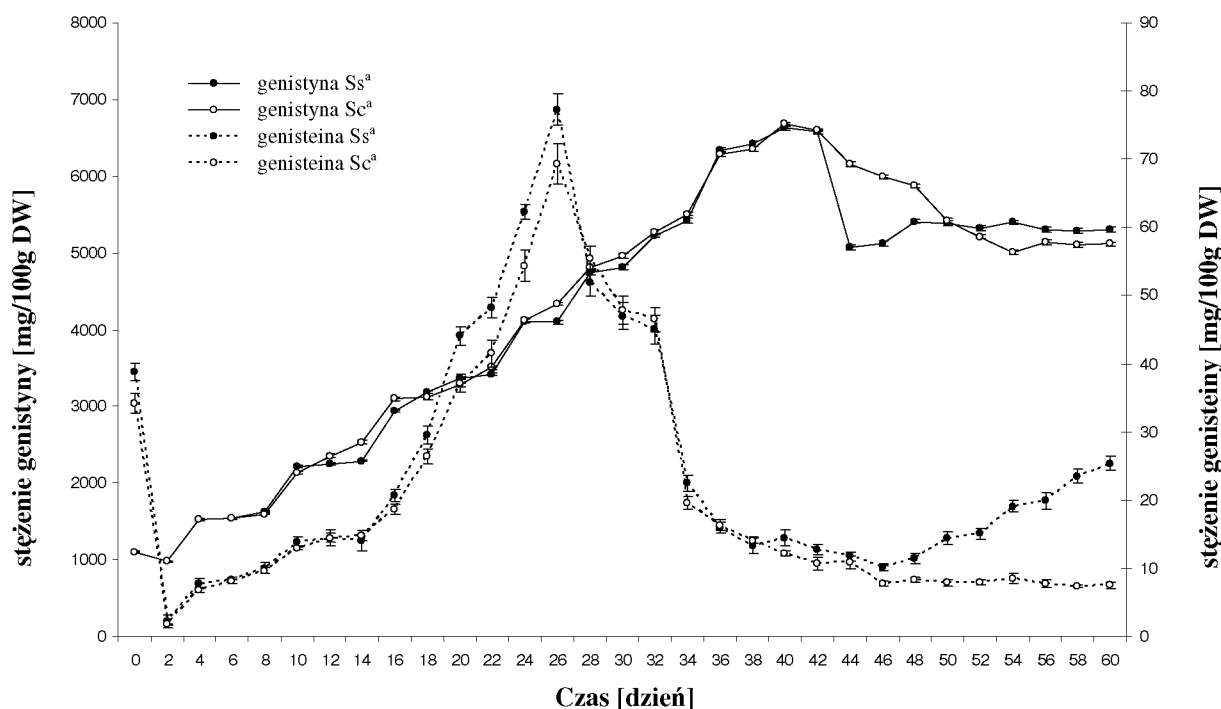
* *Genista tinctoria* co-cultures and single shoot cultures were grown in liquid SH medium supplemented with 24.6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA and 3% (w/v) sucrose. Single hairy root cultures were grown in liquid SH medium without growth regulators (SH_0) with 3% (w/v) sucrose. All cultures were maintained for 60 days under continuous light.

a: Ss – shoots grown as a single culture; Sc – shoots grown in a co-culture; Rs – hairy roots grown as a single culture; Rc – hairy roots grown in a co-culture.

b: the values in brackets represent various ratios of shoot and hairy root fresh matter in the inoculum.

Ryc. 3. Zmiany w ilości suchej masy pędów i korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria*, rosnących jako monokultury lub kokultury (stosunek ilościowy pędów do korzeni w *inoculum* 4:1, 2:2, 1:4).*

Fig. 3. Changes in dry weight (DW) of *Genista tinctoria* shoots and hairy roots grown as single cultures or in a co-culture (shoot to root inoculation ratios 4:1, 2:2, 1:4).*

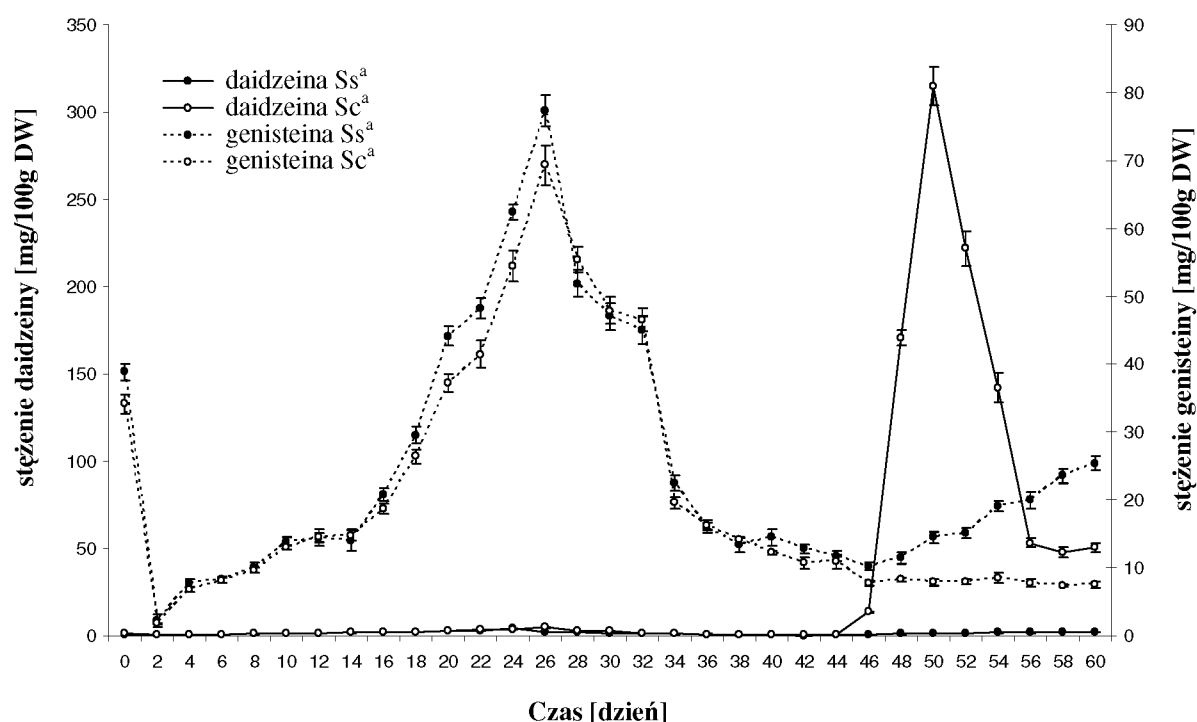


a: Ss – pędy rosnące jako monokultury; Sc – pędy rosnące w systemie kokultury.

a: Ss – shoots grown as a single culture; Sc – shoots grown in a co-culture.

Ryc. 4. Zawartość genisteiny i genistyny w pędach *Genista tinctoria* rosnących w kolbach Erlenmeyer'a jako monokultury oraz w systemie kokultury (4:1), suplementowanych $37,3 \mu\text{mol l}^{-1}$ dodatkiem ABA (zawartość izoflawonów w mg/100g suchego materiału roślinnego).

Fig. 4. Genistein and genistin concentration in *Genista tinctoria* shoots grown in Erlenmeyer flasks as single cultures and in a co-culture (4:1) supplemented with $37.3 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (isoflavone content in mg/100g DW plant material).



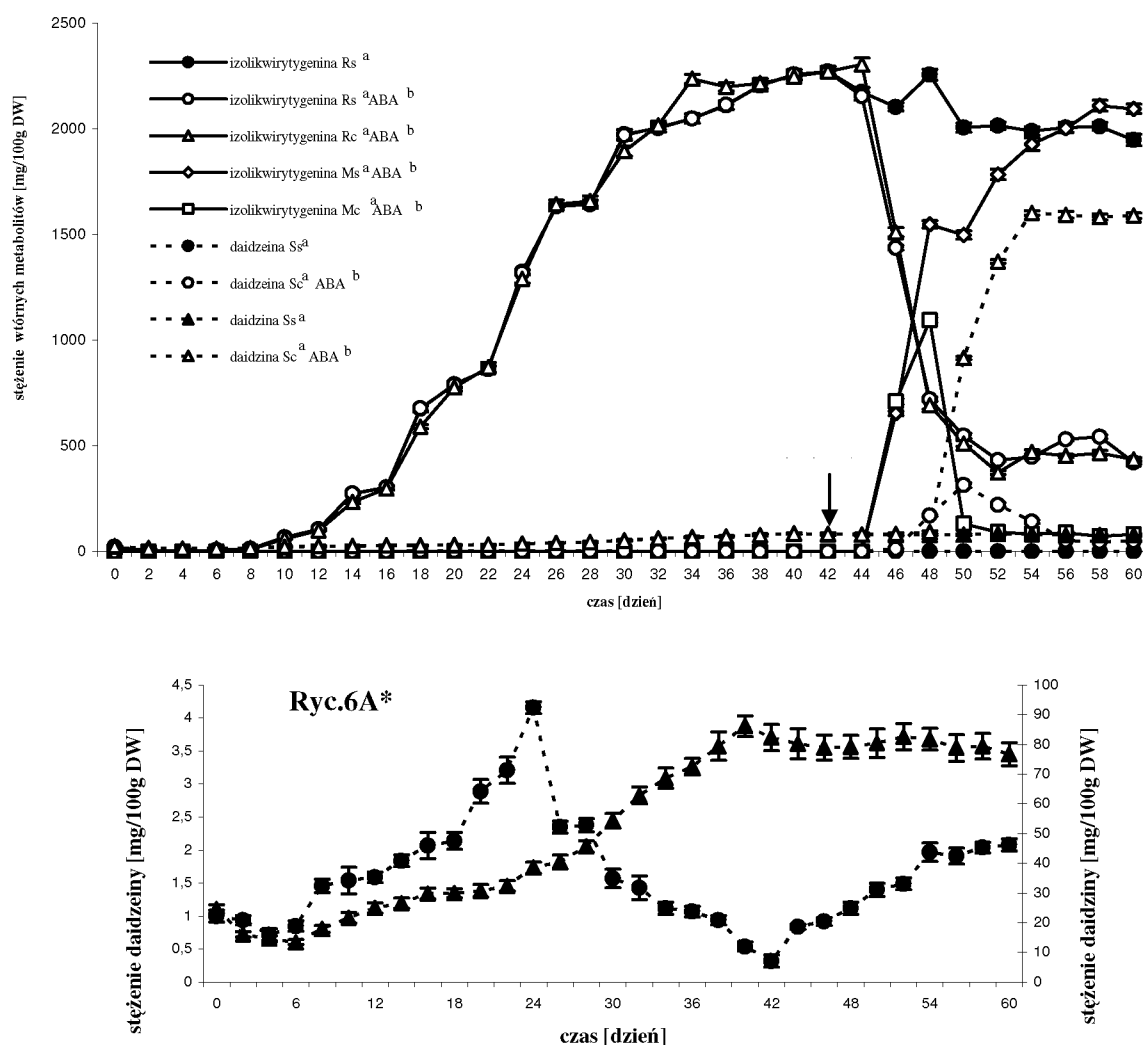
a: Ss – pędy rosnące jako monokultury; Sc – pędy rosnące w systemie kokultur.
 a: Ss – shoots grown as a single culture; Sc – shoots grown in a co-culture.

Ryc. 5. Zawartość daidzeiny i genisteiny w pędach *Genista tinctoria* rosnących w kolbach Erlenmeyer'a jako monokultury oraz w systemie kokultur (4:1), suplementowanych $37,3 \mu\text{mol l}^{-1}$ dodatkiem ABA (zawartość izoflawonów w mg/100g suchego materiału roślinnego).

Fig.5. Daidzein and genistein concentration in *Genista tinctoria* shoots grown in Erlenmeyer flasks as single cultures and in a co-culture (4:1), supplemented with $37.3 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (isoflavone content in mg/100g DW plant material).

Monokultury korzeni włosnikowatych *G. tinctoria* – wzrost i akumulacja izolikwirytygeniny

Wyprowadzenie płynnej kultury korzeni włosnikowatych *G. tinctoria*, zdolnych do produkcji znacznych ilości pojedynczego metabolitu z grupy bioflawonoidów – izolikwirytygeniny opisano szczegółowo w rozdziale 11. W efekcie przeprowadzonych badań uzyskano szybko rosnące kultury korzeni transformowanych, produkujące w pożywce SH, bez dodatku regulatorów wzrostu, znaczne ilości biomasy (ok. $803,4 \text{ g l}^{-1} \text{ FW}$ i $32,1 \text{ g l}^{-1} \text{ DW}$ – dzień 36 – ryc. 2 i 3). Maksymalne stężenie izolikwirytygeniny, w badanych korzeniach, równe $2271,2 \text{ mg/100 g DW}$, uzyskano w 42 dniu doświadczenia, co przypada na fazę stacjonarną cyklu wzrostowego hodowli (ryc. 6).



* stężenie daidzeiny i daidziny w monokulturach pędowych *Genista tinctoria* (mg/100g DW).

a: Ss – pędy rosnące jako monokultury, Sc – pędy rosnące w systemie kokultury, Rs – korzenie włosnikowate rosnące jako monokultury, Rc – korzenie włosnikowate rosnące w systemie kokultury, Ms – podłoże wzrostowe (monokultury korzeni włosnikowatych), Mc – podłoże wzrostowe (kokultury).

b: podłoże suplementowane ABA.

* Daidzein and daidzin concentration in *Genista tinctoria* single shoot cultures (isoflavone content in mg/100g DW).

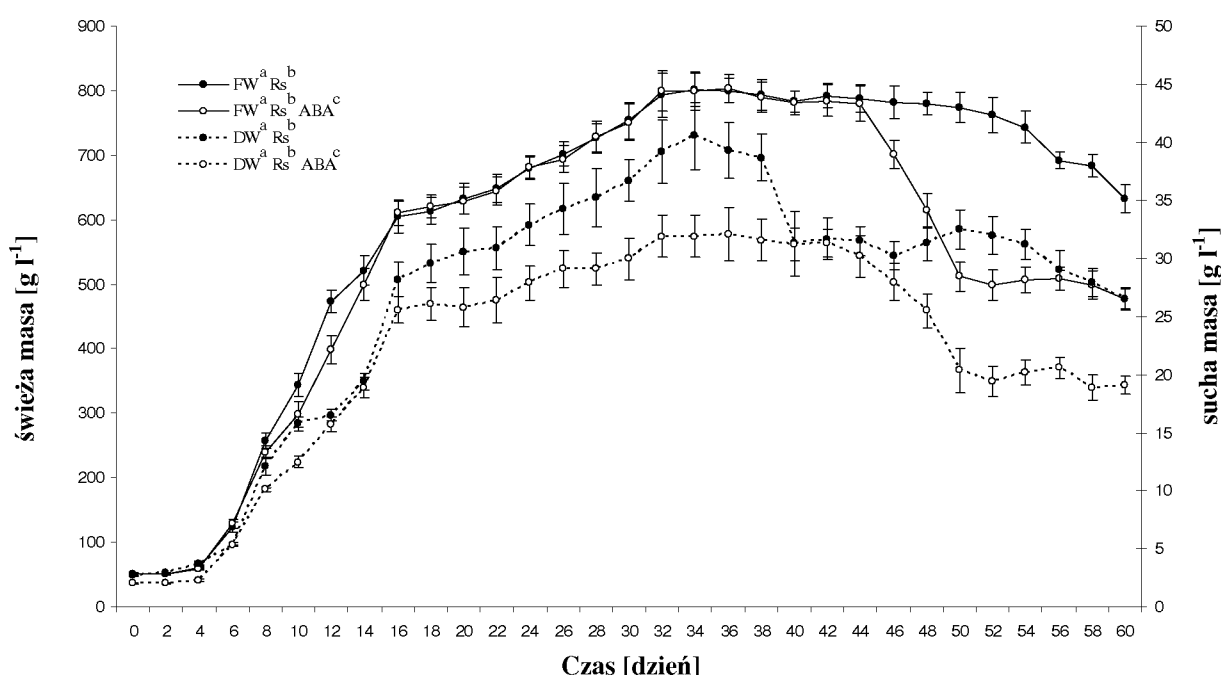
a: Ss – shoots grown as a single culture, Sc – shoots grown in a co-culture, Rs – hairy roots grown as a single culture, Rc – hairy roots grown in a co-culture, Ms – growth medium (single hairy root culture), Mc – growth medium (co-culture).

b: medium supplemented with ABA.

Ryc. 6. Zawartość izolikwirytygeniny, daidzeiny i daidziny w monokulturach oraz kokulturach *Genista tinctoria* (4:1) prowadzonych w kolbach Erlenmeyer'a, mierzona w pędach, korzeniach włosnikowatych i podłożu wzrostowym (zawartość izoflawonów w mg/100g DW).

Fig. 6. Isoliquiritigenin, daidzein and daidzin concentration in *Genista tinctoria* single cultures and a co-culture (4:1) (measured in shoots, hairy roots and media), grown in Erlenmeyer flasks (isoflavone content in mg/100g DW).

W korzeniach włosnikowatych *G. tinctoria* doszło do całkowitego zahamowania biosyntezy izoflawonów, pochodnych genisteiny i daidzeiny, charakterystycznych dla rośliny macierzystej. Ponadto, syntetyzowana izolikwirytygenina magazynowana była w całości wewnątrzkomórkowo. Dopiero w wyniku dodatku do pożywki kwasu abscyzynowego zaobserwowano niezwykle zmianę w statusie magazynowania omawianego związku. Większość metabolitu, po dodaniu ABA, została wyrzucona z tkanki korzeniowej do podłoża hodowlanego, które w tym wypadku można uznać za „zewnętrzną wakuolę” (ryc. 6). Dodatek kwasu abscyzynowego do kultury korzeni włosniczokowych powodował znaczne zmiany nekrotyczne w badanej biomacie (rozdz. 11). Z tego względu powyższy regulator wzrostu dodano ostatecznie do pożywki w 42 dniu hodowli, gdy kultura korzeniowa znajdowała się w stacjonarnej fazie wzrostu, a uzyskane stężenie izolikwirytygeniny osiągnęło wartość maksymalną (ryc. 6 i 7).



a: FW – świeża masa, DW – sucha masa/ FW – fresh weight, DW – dry weight.

b: Rs – korzenie włosnikowate rosnące jako monokultury/ Rs – hairy roots grown as a single culture.

c: ABA – hodowla suplementowana ABA/ ABA – culture supplemented with ABA.

Ryc. 7. Zmiany ilości świeżej i suchej masy korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria* rosnących jako monokultury w podłożu SH₀ bez dodatku bądź z dodatkiem 37,8 μmol l⁻¹ ABA.

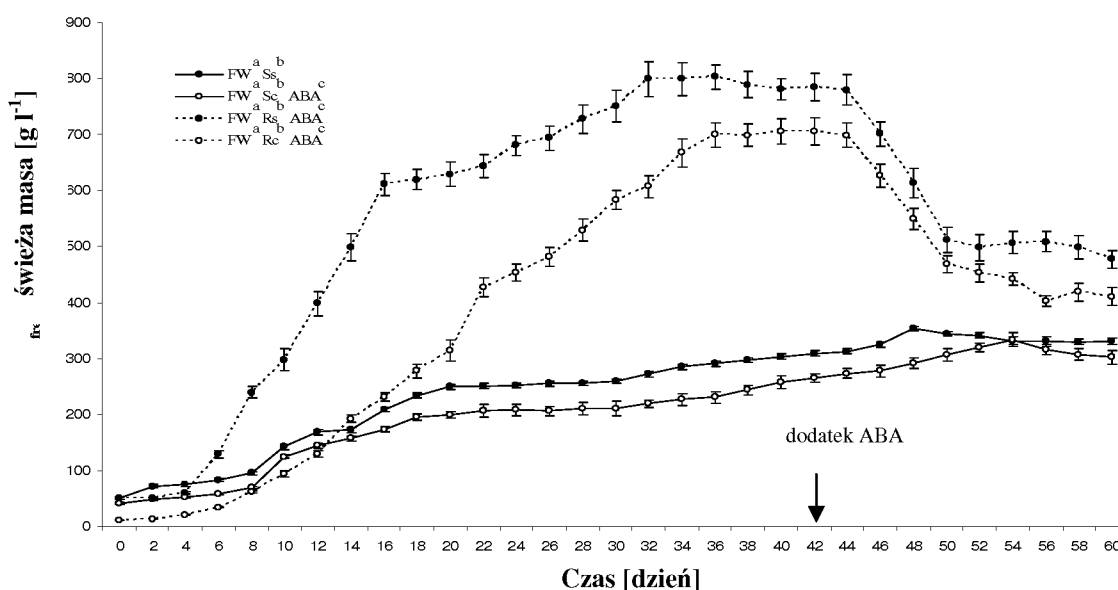
Fig. 7. Changes in fresh (FW) and dry (DW) weight of *Genista tinctoria* hairy roots grown as single cultures in SH₀ medium without or supplemented with 37.8 μmol l⁻¹ ABA.

W rezultacie w 54 dniu doświadczenia otrzymano 2363,7 mg/100 g DW izolikwirytygeniny w pożywce, co stanowi około 80% ogólnej ilości tego związku, syntetyzowanej w danym momencie w kulturze (ryc. 6). W związku z powyższym kultury korzeni włosnikowatych *G. tinctoria* mogą zostać uznane za bardzo wartościowy system *in vitro*, do produkcji izolikwirytygeniny, łatwej do izolacji ze względu na zewnątrzkomórkowy sposób magazynowania.

Inicjacja kokultur pędowo-korzeniowych *G. tinctoria*

Porównanie wtórnego metabolizmu kultur korzeni włosnikowatych i pędowych *G. tinctoria*, w zakresie związków izoflawonoidowych, nasunęło przypuszczenie, że podczas hodowli

obydwu kultur w jednym naczyniu hodowlanym mogłoby dojść do translokacji i biokonwersji produkowanej przez korzenie izolikwirytygeniny do pochodnych daidzeiny w pędach. Niewielkie ilości daidzeiny i daidziny syntetyzowane w monokulturach pędowych *G. tinctoria* wskazują, że w danej biomase roślinnej aktywne są układy enzymatyczne niezbędne do produkcji tych związków (ryc. 5). Hodowle roślin wyższych w systemie kokultury międzygatunkowych, do tej pory, realizowane były w celu translokacji hioscyjminy syntetyzowanej w korzeniach włośnikowatych *Atropa belladonna* do teratomów pędowych *Duboisia*, gdzie powyższa cząsteczka ulegała biotransformacji do skopolaminy [14]. Ponadto Sidwa-Gorycka i wsp. opracowali warunki do prowadzenia kokultury korzeni włośnikowatych *Ammi majus* oraz pędów *Ruta graveolens* w celu uzyskania wzmożonej biosyntezy furanokumaryn [13]. W przeciwieństwie do opisywanych, przez powyższych autorów, doświadczeń w przypadku kokultury pędowo-korzeniowych *G. tinctoria* dobór podstawowego podłoża hodowlanego nie sprawił zasadniczych trudności. Obydwie biomasy w systemie monokultury hodowane były w pożywce SH [12] (rozdz. 9 i 11). Na wstępnym etapie doświadczeń wykazano również, że korzenie włośnikowate *G. tinctoria*, które naturalnie wykazują anergizację w stosunku do regulatorów wzrostu (wzrost na SH₀ – rozdz. 11) mogą być z powodzeniem hodowane na pożywce SH z 24,6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ dodatkiem IBA. Auksyna ta nie hamowała ani wzrostu korzeni ani biosyntezy izolikwirytygeniny (ryc. 6-9).



* kultury prowadzono w płynnym podłożu SH suplementowanym 24,6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz 37,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodano w dniu 42).

a: FW – świeża masa.

b: Ss – pędy rosnące jako monokultury; Sc – pędy rosnące w systemie kokultury; Rs – korzenie włośnikowate rosnące jako monokultury; Rc – korzenie włośnikowate rosnące w systemie kokultury.

c: ABA – hodowla suplementowana ABA (w dniu 42).

* All cultures were grown in liquid SH medium supplemented with 24.6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, 37.8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (on day 42)

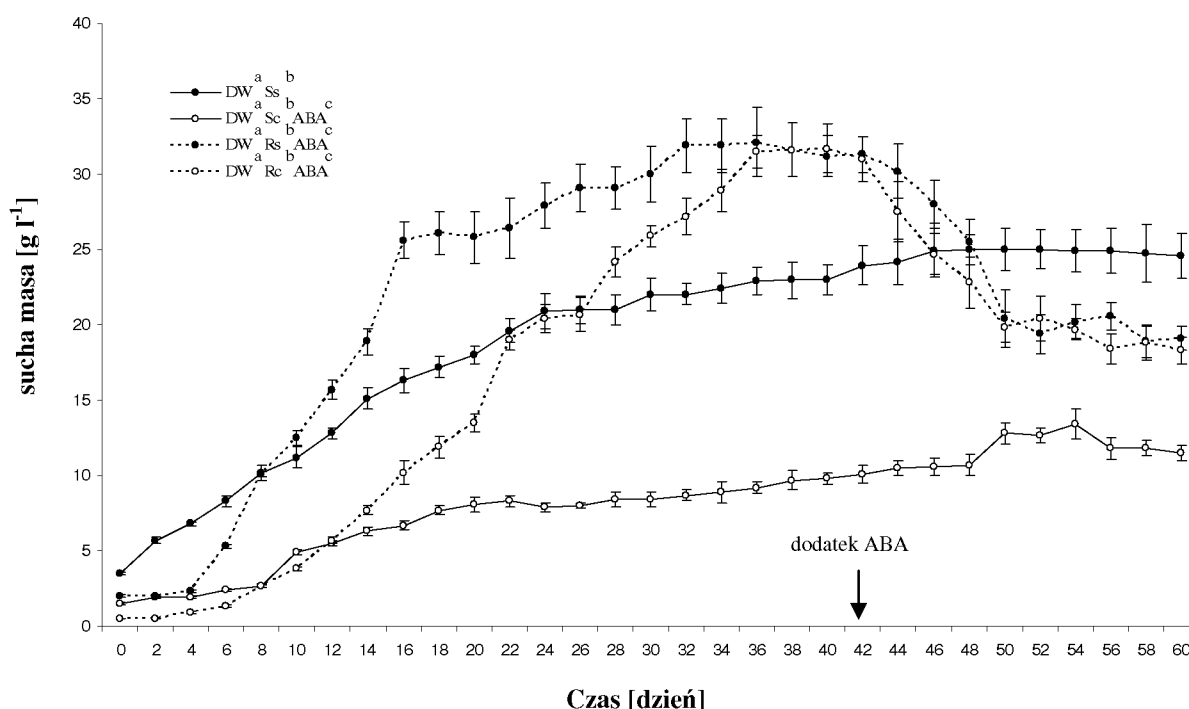
a: FW – fresh weight.

b: Ss – shoots grown as a single culture, Sc – shoots grown in a co-culture, Rs – hairy roots grown as a single culture, Rc – hairy roots grown in a co-culture.

c: ABA – culture supplemented with ABA (on day 42).

Ryc. 8. Zmiany ilości świeżej masy pędów i korzeni włośnikowatych *Genista tinctoria* rosnących jako monokultury oraz w systemie kokultury (stosunek ilościowy pędów do korzeni w *inoculum* 4:1).*

Fig. 8. Changes in fresh weight (FW) of *Genista tinctoria* shoots and hairy roots grown as single cultures or in a co-culture (shoot to root inoculation ratio 4:1).*



* kultury prowadzono w płynnym podłożu SH suplementowanym $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodano w dniu 42).

a: DW – sucha masa.

b: Ss – pędy rosnące jako monokultury; Sc – pędy rosnące w systemie kokultury; Rs – korzenie włoszowate rosnące jako monokultury; Rc – korzenie włoszowate rosnące w systemie kokultury.

c: ABA – hodowla suplementowana ABA (w dniu 42).

* All cultures were grown in liquid SH medium supplemented with $24.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (on day 42).

a: DW – fresh weight.

b: Ss – shoots grown as a single culture, Sc – shoots grown in a co-culture, Rs – hairy roots grown as a single culture, Rc – hairy roots grown in a co-culture.

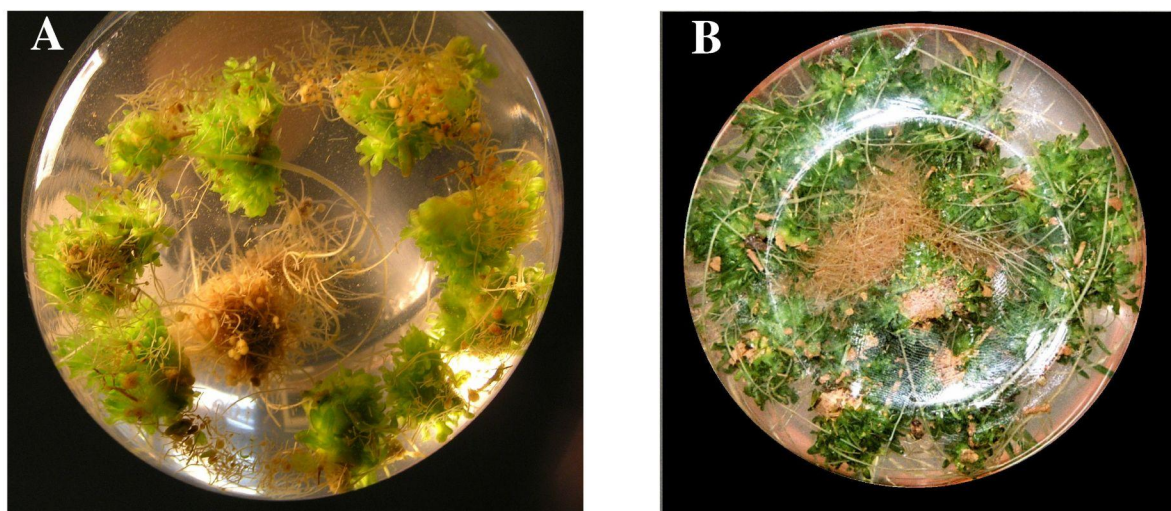
c: ABA – culture supplemented with ABA (on day 42).

Ryc. 9. Zmiany ilości suchej masy pędów i korzeni włoszowatych *Genista tinctoria* rosnących jako monokultury oraz w systemie kokultury (stosunek ilościowy pędów do korzeni w *inoculum* 4:1).*

Fig. 9. Changes in dry weight (DW) of *Genista tinctoria* shoots and hairy roots grown as single cultures or in a co-culture (shoot to root inoculation ratio 4:1).*

Kluczowym okazał się natomiast dobór stosunku ilościowego pędów do korzeni transformowanych w biomasie inokulacyjnej. Kultury korzeni włoszowatych oraz wytrząsane hodowle pędów *G. tinctoria* różniły się szybkością oraz intensywnością przyrostu (ryc. 2 i 3). Uogólniając, korzenie rosły znacznie szybciej od pędów a uzyskana maksymalna ilość świeżej masy w monokulturze była w tym przypadku ponad dwukrotnie większa od biomasy pędowej (ok. 803 g l^{-1} FW – korzenie; ok. 354 g l^{-1} FW – ryc. 2 i 7). W efekcie, w trakcie kokultywacji obydwu tkanek w jednym zbiorniku hodowlanym szybko rosnące korzenie mogłyby znacznie hamować wzrost pędów wykorzystując składniki odżywcze z podłoża doświadczalnego. Celem uzyskania, w kokulturze, profilów wzrostowych obydwu tkanek jak najbardziej zbliżonych do optymalnych parametrów wzrostowych, stwierdzonych w przypadku monokultur posłużono się zmienną ilością badanych biomas w *inoculum* wyjściowym (ryc. 2 i 3). Stwierdzono, że korzenie włoszowate *G. tinctoria* hodowane wspólnie z pędami powyższej rośliny hamują zasadniczo ich wzrost (ryc. 2 i 3). Gdy stosunek ilościowy pędów do korzeni

w *inoculum* wynosił 1:4, w 42 dniu hodowli otrzymano jedynie 61,4 g l⁻¹ świeżej masy pędowej. Uzyskany wynik wskazuje jednoznacznie, że ta niewielka (FW_{max} - ok. 354 g l⁻¹), w porównaniu z monokulturami, ilość biomasy jest nie tylko wynikiem 4-krotnie mniejszego wyjściowego *inoculum* pędowego ale również wiąże się z obecnością korzeni włosnikowatych w zbiorniku hodowlanym (ryc. 2). Szybko rosnące kultury korzeniowe szczelnie oplatały *inoculum* pędowe już w pierwszych dniach doświadczenia, warunkując tym samym gorsze napowietrzanie pędów i słabszy dostęp do składników odżywczych pożywki (ryc. 10).



A – pierwszy dzień hodowli/ the first day of a co-culture

B – sześćdziesiąty dzień hodowli/ the 60th day of a co-culture

Ryc. 10. Kokultury pędowo - korzeniowe *Genista tinctoria* prowadzone w kolbach Erlenmeyer'a (pożywka SH suplementowana 24,6 μmol l⁻¹ IBA, 37,8 μmol l⁻¹ ABA oraz 3% (w/v) sacharozy; temp. 25 ± 2°C; natężenie światła – 88,8 μmol m⁻² s⁻¹).

Fig. 10. *Genista tinctoria* co-culture grown in Erlenmeyer flask in liquid SH medium supplemented with 24.6 μmol l⁻¹ IBA, 37.8 μmol l⁻¹ ABA, 3% (w/v) sucrose (25 ± 2°C, light intensity – 88.8 μmol m⁻² s⁻¹).

Przyrastające pędy były słabsze i wykazywały liczne ciemnobrunatne zmiany nekrotyczne. Wraz ze zmniejszeniem ilości wyjściowej korzeni (stosunek 2,5:2,5) pędy przyrastały znacznie intensywniej (ryc. 2). Najmniejszą inhibicję przyrostu pędów *G. tinctoria* uzyskano przy stosunku ilościowym pędów do korzeni, równym 4:1 (ok. 304,3 g l⁻¹ FW – pędy). Uzyskany w tym wypadku wynik jest najbardziej zbliżony do rezultatu otrzymanego w odpowiedniej monokulturze. Dotyczy on jednak tylko świeżej masy pędowej (ryc. 2). Sucha masa pędowa, niezależnie od stosunku ilościowego pędów do korzeni w *inoculum* była zawsze dużo niższa niż w przypadku monokultury (przykładowo - 11,9 g l⁻¹ DW- 4:1; 23,03 g l⁻¹ DW – 5:0 – monokultura; ryc. 3). Opisywane zjawisko może świadczyć o znacznie większej hydratacji pędów w kokulturze. W wyniku obserwacji makroskopowych stwierdzono, że prawie wszystkie pędy janowca barwierskiego hodowane z korzeniami włosnikowatymi wityfikowały. Powszechnie wiadomo, że efekt szklenia związany jest z obecnością znacznych stężeń cytokinin w pożywce [17]. Jako, że w omawianym doświadczeniu nie stosowano w podłożu SH regulatorów wzrostu z tej klasy, opisywane zjawisko jest niewątpliwie rezultatem kokultury pędów i korzeni włosniczkowych *G. tinctoria*. Być może jest ono spowodowane zawartością endogennych regulatorów wzrostu w badanych korzeniach. Jako, że w doświadczeniu nie oznaczano wewnętrznego poziomu cytokinin w biomasach, powyższe stwierdzenie musi pozostać jedynie w sferze przypuszczeń.

Niezależnie od ilości, w *inoculum* hodowlanym, pędy nie wpływały negatywnie na wzrost korzeni włósnikowatych *G. tinctoria* w kokulturze. Stwierdzono natomiast, że małe *inoculum* wyjściowe korzeni wyraźnie warunkuje ich szybszy i bardziej intensywny wzrost. Gdy stosunek ilościowy pędów do korzeni w *inoculum* kokultury wynosił 4:1, w końcowym dniu eksperymentu, uzyskano ok. 304,3 g l⁻¹ świeżej biomasy korzeniowej (ryc. 2). Wartość ta, zważywszy na 4-krotnie niższe, w porównaniu z monokulturą, *inoculum* przewyższa maksymalną ilość świeżej masy korzeniowej otrzymanej w monokulturze (ok. 800,7 g l⁻¹ FW – dzień 36; ryc. 2,7,8). Uzyskany wynik jest prawdopodobnie spowodowany zarówno obecnością pędów w kokulturze oraz dodatkiem do pożywki 24,6 μmol l⁻¹ IBA, auksyny której nie stosowano w pierwotnej monokulturze korzeni transformowanych *G. tinctoria*.

Z uwagi na uzyskane wyniki, do dalszych eksperymentów z kokulturami *G. tinctoria* wybrano *inoculum* tkankowe, w którym stosunek ilościowy pędów do korzeni wynosił 4:1. Uzyskane, w danych warunkach, profile wzrostowe obydwu tkanek jak i ilości świeżych i suchych biomas były najbardziej zbieżne do wyników uzyskanych w przypadku odpowiednich monokultur (rozdz. 9 i 11; ryc. 8 i 9).

Wzrost oraz akumulacja związków izoflawonoidowych w kokulturach *G. tinctoria* prowadzonych w kolbach Erlenmeyer'a

Kokulturę pędowo-korzeniową *G. tinctoria*, otrzymaną na bazie optymalnego *inoculum* tkankowego (stosunek pędów do korzeni – 4:1), hodowano w cyklu sześćdziesięciodniowym, stosując dodatek 37,8 μmol l⁻¹ ABA w 42 dniu doświadczenia. Tym samym powtórzono warunki dokarmiania monokultur korzeni włósnikowatych janowca w celu doprowadzenia do wycieku izolikwirytygeniny do podłoża. Oznaczając świeże (FW) i suche (DW) masy tkankowe, co drugi dzień trwania eksperymentu, ustalono wpływ ABA na wzrost korzeni i pędów *G. tinctoria* w kokulturze. Korzenie włósnikowate, w obecności ABA wolno, ale systematycznie zamierały, podobnie jak to miało miejsce w odpowiedniej monokulturze (ryc. 7,8,9). Kwas abscyzynowy nie hamował natomiast wzrostu i nie powodował nekrozy pędów, które rosły w kokulturze mimo jego obecności aż do końca eksperymentu (FW_{max}-ok. 334,2 g l⁻¹ - 54 dzień – ryc. 8).

Analiza fitochemiczna biomas i pożywek wzrostowych z poszczególnych etapów doświadczenia wykazała, że hodowane równolegle, w jednej kolbie, pędy i korzenie włósnikowate *G. tinctoria* nie wpływają zasadniczo na rodzaj oraz ilość akumulowanych izoflawonów w poszczególnych tkankach. Aż do 42 dnia eksperymentu, w którym zastosowano dokarmianie ABA, korzenie produkowały ciągle tylko jeden metabolit z grupy bioflawonoidów – izolikwirytygeninę. Maksymalną ilość oznaczanego związku równą 2304,3 mg/100g DW otrzymano w 44 dniu doświadczenia. Ilość ta jest więc porównywalna do stężenia omawianego wtórnego metabolitu w odpowiedniej monokulturze (ryc. 6, tab. 1). Jednocześnie, aż do 44 dnia hodowli nie stwierdzono w pędach janowca obecności izolikwirytygeniny ani też wzrostu, w danej biomasie, zawartości daidzeiny i daidziny, których izolikwirytygenina jest prekursorem (ryc. 6, 6A, tab. 1). Świadczy to niezbicie, że sam proces hodowania pędów i korzeni *G. tinctoria* w jednym zbiorniku doświadczalnym nie jest wystarczający do otrzymania systemu hodowlanego, w którym pędy zdolne są do bezpośredniej biokonwersji izolikwirytygeniny, produkowanej i magazynowanej w korzeniach. Prawdopodobnie odpowiedzialne są za to mechanizmy magazynowania odpowiednich substratów w tkankach i co za tym idzie ich ograniczona biodostępność dla odpowiednich układów enzymatycznych [11]. Sama obecność korzeni w kokulturze nie wpłynęła również na metabolizm pochodnych daidzeiny i genisteiny (aglikonów, glikozydów oraz estrów) w pędach *G. tinctoria* (rozdz. 9).

Celem uzyskania większej przejrzystości, w interpretacji otrzymanych wyników, zdecydowano się zaprezentować, na danym etapie doświadczeń, jedynie zmiany dotyczące zawartości, w pędach, dwóch par zależnych od siebie związków tj. genisteiny i genistyny oraz daidzeiny i daidziny. Ewentualne różnice stężeń powyższych metabolitów, obserwowane w cyklu hodowlanym, wystarczają do określenia wpływu sposobu hodowli, jakim są kokultury na istniejące, w pędach, równoległe szlaki metaboliczne daidzeiny i genisteiny.

Pędy *G. tinctoria*, hodowane w systemie kokultur zachowały, w kolejnych dniach doświadczenia, charakterystyczną dla odpowiednich monokultur zależność między stężeniami genisteiny i daidzeiny, a odpowiednimi monoglikozydami (ryc. 4-6, tab. 1, rozdz. 9). W przypadku obydwu par związków najbardziej intensywny wzrost zawartości glikozydów wystąpił w dniach, kiedy stężenie aglikonów malało (ryc. 4 i 6A). Można więc przypuszczać, że w danym momencie biosynteza aglikonów *de novo* przebiega znacznie wolniej niż ich glikozydacja do odpowiednich monoglikozydów. Najintensywniejsza produkcja daidziny i genistyny (do 42 dnia hodowli – dokarmianie ABA) przypadała na fazę stacjonarną cyklu wzrostowego (ryc. 8 i 9) co potwierdza fakt, że w większości wypadków biosynteza wtórnych metabolitów, w hodowlach *in vitro* roślin wyższych, rozpoczyna się dopiero po ukończeniu intensywnego przyrostu tkankowego [15]. Ponadto wyraźnie widać, że biosynteza obydwu par związków (genisteina - daidzeina i genistyna - daidzina) przebiegała, w kokulturach, równoległe. Potwierdza to dane literaturowe, zgodnie z którymi ilość grup fenylowych w pierścieniach izoflawnonu jest determinowana już na etapie powstawania chalkonu [2,7]. Podstawowym metabolitem frakcji izoflawnonowej, pędów *G. tinctoria* rosnących w kokulturach, podobnie jak w monokulturach, była genistyna (6678,4 mg/100 DW – 40 dzień; ryc. 4), a daidzina, do dnia 42, syntetyzowana była jedynie w niewielkiej ilości (85,4 mg/100 g DW – 40 dzień – ryc. 6 i 6A, tab. 1).

Zasadnicze różnice między pędami hodowanymi jako monokultury oraz kokultury pojawiły się po dodaniu do pożywki kwasu abscyzynowego. Uzyskano wtedy stopniowy wyciek izolikwirytygeniny, z biomasy korzeniowej do pożywki hodowlanej, którego maksimum (1094, 4 mg/100 g DW) przypada na 48 dzień doświadczenia (6 dni po dokarmianiu – ryc. 6, tab. 1). W podłożu eksperymentalnym nie stwierdzono natomiast zupełnie obecności innych izoflawnonów. Pochodne daidzeiny i genisteiny w pędach pozostały, co wykazała analiza HPLC, zmagazynowane wewnątrzkomórkowo, tak jak to miało miejsce w odpowiedniej monokulturze (tab. 1). Z technologicznego punktu widzenia wyciek omawianych izoflawnonów byłby bardzo korzystny, gdyż ułatwiłby znacznie proces ekstrakcji cennych fitoestrogenów. Na obecnym etapie badań trudno wyjaśnić czy brak wycieku pochodnych genisteiny i daidzeiny z pędów, w przeciwieństwie do łatwo uwalnianej z korzeni izolikwirytygeniny, związany jest z samą naturą fizykochemiczną poszczególnych związków (różnica w hydrofilności), czy też zależy od magazynowania ich w innych rodzajach tkanek (pędy i korzenie transformowane).

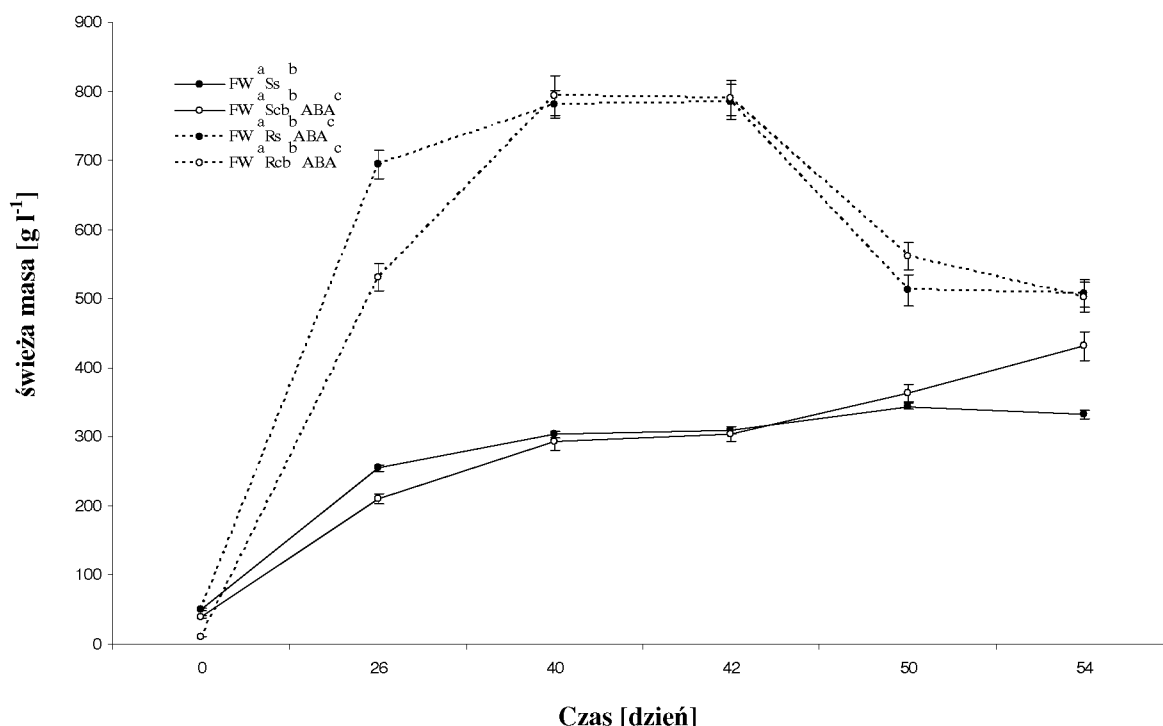
W opracowanym systemie hodowlanym pędy *G. tinctoria* były natomiast zdolne do bio-konwersji izolikwirytygeniny uwalnianej do podłoża z korzeni włóśnikowatych. Związek ten był stopniowo przekształcany w daidzeinę a następnie w daidzinę (glikozydacja), które były następnie magazynowane w pędach wewnątrzkomórkowo (ryc. 6 i 6A, tab. 1). W efekcie przeprowadzonego eksperymentu uzyskano w pędach kokultury, w 54 dniu doświadczenia, maksymalną ilość daidziny (1601,7 mg/100 g DW – ryc. 6). Ilość ta jest około 38 razy wyższa niż zawartość powyższego izoflawnonu w ziele rośliny macierzystej (42,0 mg/100 g DW – rozdz. 6). Również otrzymana końcowa zawartość daidzeiny (50,4 mg/100 g DW – dzień 60; ryc. 6) 166-krotnie przewyższa ilość tego związku w roślinie gruntowej (ryc. 6, rozdz. 6 i 9).

W dniach, w których odnotowano znaczny wzrost stężenia daidzeiny i daidziny, w pędach kokultur, ilość oznaczanej w pożywce izolikwirytygeniny drastycznie malała z 1094,4 mg/100 g DW (dzień 48) do około 80 mg/100 g DW (dni 52-60 – ryc. 6, tab. 1). Świadczy to, że powyższy związek, po translokacji, posłużył jako substrat do biosyntezy daidzeiny, a następnie daidziny. W przeciwieństwie do izolikwirytygeniny magazynowanej w korzeniach, powyższy prekursor, wydalany wstępnie do pożywki, wykazał odpowiednią biodostępność dla pędowych układów enzymatycznych, znajdujących się w łańcuchu metabolicznym daidzeiny.

Zaistniały proces biokonwersji izolikwirytygeniny do daidzeiny nie zaburzał mechanizmów biosyntezy i magazynowania genisteiny i jej glikozydowych pochodnych. Były one syntetyzowane, w przybliżeniu, na poziomie oznaczonym w pędach janowca, hodowanych jako monokultury. W efekcie, po biokonwersji, uzyskany system kokultur pędowo-korzeniowych *G. tinctoria* stał się źródłem znacznych stężeń genistyny (6678,4 mg/100 g DW) oraz daidziny (1601,7 mg/100 g DW – ryc. 4-6, tab. 1).

Wzrost oraz akumulacja związków izoflawonoidowych w kokulturach G. tinctoria prowadzonych w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym

Hodowla korzeni włosnikowatych oraz pędów *G. tinctoria* w tej samej kolbie Erlenmeyer'a wiązała się z szeregiem problemów. Jak już wspomniano, z jednej strony, korzenie oplatając pędy hamowały ich wzrost (ryc. 10), a z drugiej strony, po zakończonym procesie hodowlanym, niezwykle trudno było mechanicznie oddzielić obydwie tkanki celem przeprowadzenia odpowiednich pomiarów dotyczących wzrostu oraz wykonania analizy fitochemicznej. Z uwagi na zaistniałe ograniczenia oraz fakt, że system kokultur *G. tinctoria* charakteryzowała niezmiernie wysoka wydajność w zakresie produkcji izoflawonów, postanowiono przenieść badane biomasy do odpowiedniego bioreaktora, który umożliwiłby przetestowanie opracowanego typu hodowli w skali półtechnicznej. W tym celu skonstruowano urządzenie prototypowe (bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy). Dwa koncentrycznie umieszczone koszyki umożliwiły przestrzenne odseparowanie pędów od korzeni janowca, przy zachowaniu swobodnego dostępu pożywki do obydwu tkanek (ryc. 1). Napowietrzanie kokultury odbywało się poprzez wymuszony, pompą membranową, przepływ jałowego powietrza, a nie poprzez mechaniczne mieszanie jak to miał miejsce w kolbie Erlenmeyer'a. W efekcie pędy mogły rosnąć swobodnie, w kierunku górnej kopuły bioreaktora, natomiast korzenie oplatały siatkę koszyków ulegając immobilizacji i naturalnie wypełniając dolną kopułę urządzenia (ryc. 1). Tym samym uzyskano znacznie lepsze parametry wzrostowe hodowanych tkanek niż w przypadku kokultur janowca prowadzonych w standardowych kolbach szklanych (ryc. 8,9,11,12). Fakt ten był szczególnie zauważalny w przypadku pędów, które charakteryzowały się mniejszym szkleniem i produkowały znacznie więcej suchej masy ($26,4 \text{ g l}^{-1} \text{ DW}$ – 54 dzień) niż pędy kultywowane w kolbie ($13,4 \text{ g l}^{-1} \text{ DW}$ – 54 dzień – ryc. 9 i 12). Kokultury rosnące w bioreaktorze poddano ponadto analizie fitochemicznej, zbierając tkanki w dniach, w których osiągnięto dla kokultur i monokultur janowca, prowadzonych w kolbach, maksymalne stężenia poszczególnych metabolitów, pochodnych genisteiny. W tym przypadku oprócz aglikonów i monoglikozydów oznaczono, w systemie hodowlanym, zawartość: 7-O-diglukozydu genisteiny, 7-O-glukozydu 2'-hydroksygenisteiny, 6''-O-malonylo-7-O-glukozydu genisteiny (malonylogenistyna) oraz 6''-O-acetylo-7-O-glukozydu genisteiny (acetylogenistyna), czyli wszystkich podstawowych metabolitów frakcji izoflawonoidowej obecnej w badanych tkankach (tab. 2). Pozwoliło to na obliczenie produktywności i specyficznej produktywności wszystkich substancji obecnych w kokulturach *G. tinctoria* (tab. 2).



* kultury prowadzono w płynnym podłożu SH suplementowanym $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodano w dniu 42).

a: FW – świeża masa.

b: Ss – pędy rosnące jako monokultury; Scb – pędy rosnące w systemie kokultury w bioreaktorze; Rs – korzenie włosnikowate rosnące jako monokultury; Rcb – korzenie włosnikowate rosnące w systemie kokultury w bioreaktorze.
c: ABA – hodowla suplementowana ABA (w dniu 42).

* All cultures were grown in liquid SH medium supplemented with $24.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (on day 42).

a: FW – fresh weight.

b: Ss – shoots grown as a single culture, Scb – shoots grown in a co-culture in the bioreactor, Rs – hairy roots grown as a single culture, Rcb – hairy roots grown in a co-culture in the bioreactor.

c: ABA – culture supplemented with ABA (on day 42).

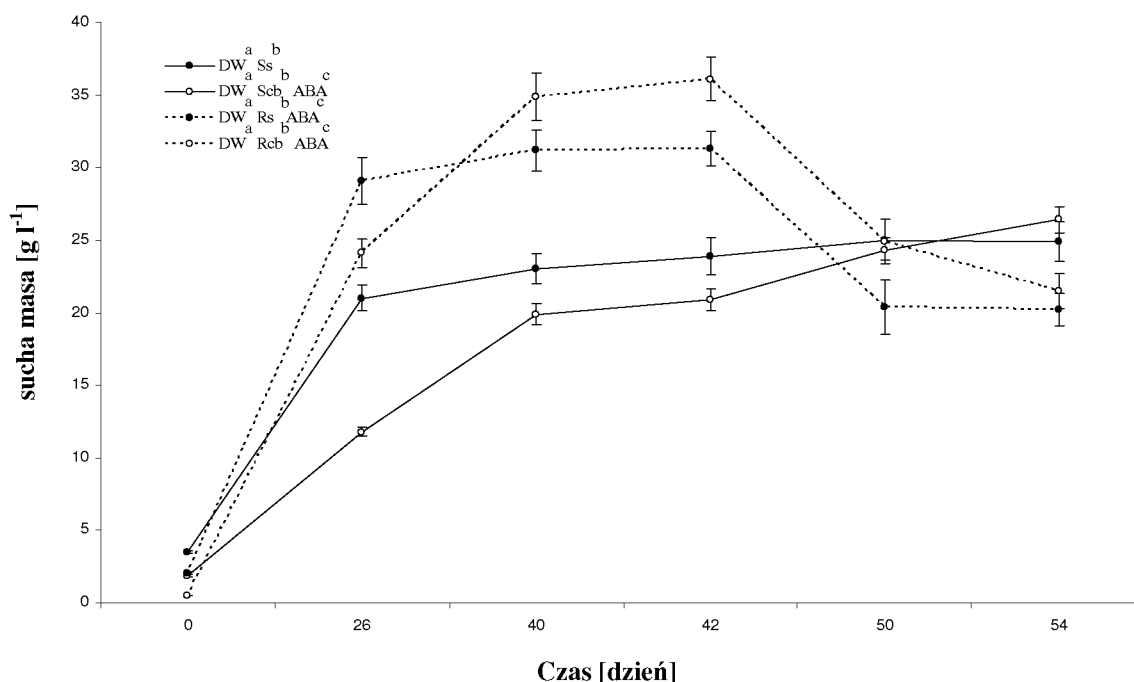
Ryc. 11. Zmiany ilości świeżej masy pędów i korzeni włosnikowatych *Genista tinctoria* rosnących jako monokultury oraz w systemie kokultury w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym (stosunek ilościowy pędów do korzeni w *inoculum* 4:1).*

Fig. 11. Changes in fresh weight of *Genista tinctoria* shoots and hairy roots grown as single cultures or in a co-culture in the basket-bubble bioreactor (shoot to root inoculation ratio 4:1).*

Zasadniczo przeniesienie biomas *G. tinctoria* z kolby Erlenmeyer'a do bioreaktora podniosło ilość wszystkich oznaczanych, w tkankach, wtórnych metabolitów (stwierdzenie to dotyczy jedynie doświadczeń prowadzonych w systemie kokultury – tab. 1 i 2). Wiąże się to zapewne ze zmianą systemu napowietrzania oraz z przestrzennym oddzieleniem pędów od korzeni. Jak wynika z licznych badań nad biosyntezą wtórnych metabolitów w dużych zbiornikach hodowlanych, w znacznej ilości przypadków, poziom syntetyzowanych związków jest bezpośrednio zależny od typu bioreaktora [18]. W przypadku kokultury *G. tinctoria* konstrukcja pojemnika hodowlanego również okazała się istotna.

Porównując wyniki dotyczące produktywności genisteiny i jej mono i diglukozydowych pochodnych, kultury prowadzone w bioreaktorze charakteryzują się trochę gorszymi parametrami od monokultury pędów. Przykładowo, specyficzna produktywność genisteiny wynosi

w monokulturze 38 a w kokulturze 34 (tab. 2). Wiąże się to bezpośrednio z mniejszą ilością suchej masy tkankowej otrzymanej w eksperymencie z zastosowaniem kokultury. Specyficzna produktywność daidziny w kokulturze wzrosła jednak zasadniczo. Podczas gdy w monokulturze wynosiła ona 0,49 to w kokulturze wzrosła do 8,05 (tab. 2). Uzyskany wynik wydaje się rekompensować nieznaczny spadek produktywności podstawowego metabolitu, którym jest genistyna.



* wszystkie kultury prowadzono w płynnym podłożu SH suplementowanym $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz $37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (dodano w dniu 42).

a: DW – sucha masa.

b: Ss – pędy rosnące jako monokultury; Scb – pędy rosnące w systemie kokultur w bioreaktorze; Rs – korzenie włośnikowate rosnące jako monokultury; Rcb – korzenie włośnikowate rosnące w systemie kokultur w bioreaktorze.

c: ABA – hodowla suplementowana ABA (w dniu 42).

* All cultures were grown in liquid SH medium supplemented with $24.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, $37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ABA (on day 42).

a: DW – fresh weight.

b: Ss – shoots grown as a single culture, Scb – shoots grown in a co-culture in the bioreactor, Rs – hairy roots grown as a single culture, Rcb – hairy roots grown in a co-culture in the bioreactor.

c: ABA – culture supplemented with ABA (on day 42).

Ryc. 12. Zmiany ilości suchej masy pędów i korzeni włośnikowatych *Genista tinctoria* rosnących jako monokultury oraz w systemie kokultur w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym (stosunek ilościowy pędów do korzeni w *inoculum* 4:1).*

Fig. 12. Changes in dry weight of *Genista tinctoria* shoots and hairy roots grown as single cultures or in a co-culture in the basket-bubble bioreactor (shoot to root inoculation ratio 4:1).*

Kokultury *G. tinctoria* w przeciwieństwie do monokultur nie produkowały zupełnie acetylogenisyny, a biosynteza malonylogenisyny, w badanym systemie, gwałtownie spadła, po dodaniu kwasu abscyzynowego (tab. 2). Jak powszechnie wiadomo malonylogenisyna jest, w roślinie, formą magazynową genisteiny, która jako fitoaleksyna uwalniana zostaje, na drodze hydrolitycznej, w sytuacjach stresu biotycznego lub abiotycznego [3]. Jeżeli zaistniałe, po dodaniu ABA warunki (uwolnienie izolikwirytygeniny do podłoża i jej późniejsza biokonwersja) uznamy za stresowe to spadek stężenia malonylogenisyny, w pędach kokultury,

można właśnie wyjaśnić wystąpieniem stresu abiotycznego. W rezultacie otrzymane kokultury pędowo-korzeniowe *G. tinctoria* są wybiórczym, bogatym źródłem mono- i diglukozydów genisteiny oraz daidzeiny i daidziny, co zasadniczo odróżnia je od monokultur pędowych.

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych badań opracowano po raz pierwszy, w warunkach *in vitro*, system hodowlany na bazie kokultur pędów i korzeni włósnikowatych *Genista tinctoria*, zdolny do produkcji znacznych ilości fitoestrogenów, pochodnych genisteiny i daidzeiny. Dobór *inoculum* hodowlanego, w zakresie stosunku ilościowego pędów do korzeni, umożliwił ciągły wzrost obydwu tkanek w jednym zbiorniku hodowlanym oraz znaczną produkcję biomasy roślinnej. Przeprowadzona analiza fitochemiczna pędów, korzeni oraz pożywek pochodzących z poszczególnych dni kokultury i porównanie uzyskanych wyników z odpowiednimi monokulturami wykazało, że opracowany sposób hodowli nie zahamował akumulacji znacznych ilości genistyny i jej pochodnych w biomase pędowej. Jednie dokarmienie kokultury kwasem abscyzynowym umożliwiło wyrzucenie z korzeni do podłoża izolikwirytygeniny, a następnie wykorzystanie jej do syntezy daidzeiny i daidziny w pędach. Można więc uznać, że w układach hodowlanych złożonych z kokultur, których celem jest uzyskanie biokonwersji określonych prekursorów do metabolitów wtórnych syntetyzowanych przez różne tkanki, należy zwrócić znaczną uwagę na biodostępność substratów.

Hodowle wytrząsane *G. tinctoria*, w których biokonwersję izolikwirytygeniny do daidzeiny i jej pochodnych próbowano by uzyskać dokarmiając kulturę rozpuszczoną w podłożu izolikwirytygeniną, ze względu na cenę omawianego prekursora, nie byłyby opłacalne. Stąd szczególnie cennym wydaje się wykorzystanie, jako bezpośredniego źródła izolikwirytygeniny, właśnie kultur korzeni włósnikowatych. Umożliwiły one nie tylko uzyskanie znacznych stężeń prekursora, ale również poprzez zastosowanie pożywki z dodatkiem ABA, pominięcie kosztownego etapu ekstrakcji omawianego związku z matrycy roślinnej. W rezultacie, w systemie kokultur, wykorzystano hodowle korzeni transformowanych *G. tinctoria*, które zważywszy na akumulację tylko jednego wtórnego metabolitu z klasy bioflawonoidów, związku o ograniczonej aktywności farmakologicznej [6], wydawały się mało atrakcyjne z technologicznego punktu widzenia.

Skonstruowany bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy umożliwił przeprowadzenie doświadczenia z kokulturami *G. tinctoria* w skali półtechnicznej. Hodowla prowadzona w powyższym bioreaktorze okazała się bardziej efektywna pod względem ilości otrzymanej biomasy i produkcji fitoestrogenów od analogicznego eksperymentu wykonanego w kolbie Erlenmeyer'a.

Uzyskane w toku pracy doświadczenie wskazuje, że zważywszy na prostą konstrukcję, bioreaktor ten może być z powodzeniem wykorzystany do prowadzenia doświadczeń na dużą skalę, w zakresie kokultur różnych gatunków roślinnych, likwidując ograniczenia spowodowane hodowlą różnych tkanek w jednym, niepodzielonym zbiorniku hodowlanym.

Tab. 1. Zawartość izoflawonów w kokulturach *Genista tinctoria*, prowadzonych w kolbach Erlenmeyer'a (4:1), suplementowanych ABA (stężenie izoflawonów w mg/100g DW materiału roślinnego).*

Tab. 1. Isoflavone content in *Genista tinctoria* co-cultures grown in Erlenmeyer flasks (4:1), supplemented with ABA (isoflavone concentration in mg/100g DW).

Dzień	Pędy				Korzenie włóśnikowate	
	Genisteina	Genistyna	Daidzeina	Daidzina	Izolikwirytygenina	
	Biomasa				Biomasa	Pożywka
0	34,2 ± 1,4	1094,2 ± 15,2	1,3 ± 0,07	25,7 ± 1,5	23,4 ± 1,3	-
2	1,8 ± 0,09	985,4 ± 5,4	0,7 ± 0,07	14,3 ± 0,9	4,0 ± 0,2	-
4	6,8 ± 0,3	1534,5 ± 11,3	0,8 ± 0,05	14,4 ± 1,0	3,9 ± 0,1	-
6	8,2 ± 0,4	1537,1 ± 12,8	0,7 ± 0,08	14,8 ± 0,9	6,8 ± 0,3	-
8	9,7 ± 0,4	1599,6 ± 10,4	1,2 ± 0,1	17,5 ± 1,2	10,9 ± 1,0	-
10	13,0 ± 0,3	2128,3 ± 16,7	1,6 ± 0,1	23,4 ± 1,1	60,4 ± 1,9	-
12	14,5 ± 0,7	2354,1 ± 20,9	1,5 ± 0,2	26,0 ± 1,6	100,5 ± 2,7	-
14	14,8 ± 0,8	2536,5 ± 19,4	1,9 ± 0,08	25,9 ± 1,7	234,0 ± 7,3	-
16	18,7 ± 0,7	3101,3 ± 23,1	2,2 ± 0,1	28,6 ± 1,5	298,6 ± 8,3	-
18	26,4 ± 1,1	3119,4 ± 25,6	2,4 ± 0,09	29,1 ± 1,5	591,2 ± 10,1	-
20	37,2 ± 1,3	3278,5 ± 18,7	2,9 ± 0,2	31,4 ± 2,5	777,5 ± 17,9	-
22	41,5 ± 1,9	3507,9 ± 29,5	3,4 ± 0,2	33,4 ± 1,7	872,1 ± 23,4	-
24	54,4 ± 2,3	4125,1 ± 24,7	3,7 ± 0,3	37,9 ± 1,4	1289,7 ± 19,6	-
26	69,3 ± 2,9	4334,6 ± 17,8	4,8 ± 0,2	41,4 ± 2,3	1643,2 ± 19,0	-
28	55,4 ± 1,8	4813,4 ± 23,7	3,2 ± 0,1	44,8 ± 2,9	1658,7 ± 23,1	-
30	47,9 ± 2,0	4958,3 ± 29,1	2,9 ± 0,1	51,3 ± 3,1	1894,3 ± 22,3	-
32	46,5 ± 1,7	5276,3 ± 31,8	1,7 ± 0,06	62,7 ± 2,9	2017,6 ± 19,7	-
34	19,6 ± 0,9	5508,4 ± 27,4	1,2 ± 0,08	67,5 ± 3,0	2236,5 ± 21,6	-
36	16,3 ± 0,9	6291,7 ± 30,9	1,0 ± 0,1	71,3 ± 2,9	2198,4 ± 19,8	-
38	14,1 ± 0,5	6354,5 ± 28,7	0,7 ± 0,07	78,7 ± 3,8	2214,9 ± 23,5	-
40	12,2 ± 0,3	6678,4 ± 25,3	0,5 ± 0,06	85,4 ± 4,3	2247,5 ± 20,8	-
42	10,7 ± 0,9	6604,1 ± 24,2	0,4 ± 0,02	83,9 ± 5,3	2271,4 ± 24,3	-
44	10,9 ± 1,0	6153,7 ± 32,7	0,9 ± 0,1	81,2 ± 6,3	2304,3 ± 30,7	0,5 ± 0,09
46	7,7 ± 0,4	5988,1 ± 29,3	13,7 ± 0,2	83,7 ± 5,9	1511,3 ± 20,9	710,2 ± 13,4
48	8,3 ± 0,3	5876,4 ± 26,3	170,4 ± 4,3	92,7 ± 6,3	692,8 ± 19,7	1094,4 ± 12,1
50	7,9 ± 0,5	5423,8 ± 34,7	314,8 ± 11,2	916,3 ± 7,2	512,2 ± 13,4	132,3 ± 7,3
52	8,0 ± 0,4	5215,6 ± 31,5	221,7 ± 9,6	1372,5 ± 8,4	374,5 ± 9,3	92,4 ± 2,8
54	8,5 ± 0,7	5007,9 ± 30,1	142,1 ± 8,4	1601,7 ± 10,3	471,3 ± 10,8	83,5 ± 3,4
56	7,8 ± 0,6	5143,2 ± 29,8	53,2 ± 2,4	1593,2 ± 15,7	452,4 ± 7,4	89,5 ± 6,4
58	7,4 ± 0,2	5108,3 ± 28,7	47,6 ± 3,0	1582,7 ± 14,4	466,8 ± 11,3	72,3 ± 5,3
60	7,5 ± 0,5	5117,4 ± 24,3	50,4 ± 2,9	1589,2 ± 13,6	436,5 ± 9,1	81,2 ± 4,9

* Poszczególne wartości są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z trzech pomiarów ± S. D.

* Each value represents the mean ± S. D. of three samples.

Tab. 2. Porównanie produktywności pochodnych daidzeiny i genisteiny w pędach *Genista tinctoria* rosnących jako monokultury lub kokultury.*
 Tab. 2. Comparison of maximum production of daidzein and genistein derivatives in shoots of *Genista tinctoria* grown as a single culture and in a co-culture.*

Związek	Pędy (monokultury)					Pędy (kokultury w bioreaktorze)				
	Maksymalne stężenie mg/100g DW	Dzień hodowli	Ilość biomasy g l ⁻¹	Produktywność	Specyficzna produktywność	Maksymalne stężenie mg/100g DW	Dzień hodowli	Ilość biomasy g l ⁻¹	Produktywność	Specyficzna produktywność
Genisteina	77,31	26	21,00	16,23	0,62	67,40	26	11,80	7,95	0,30
Genistyna	6640,76	40	23,03	1528,70	38,21	6941,5	40	19,90	1381,30	34,53
Daidzeina	4,16	24	20,92	0,87	0,04	328,70	50	24,30	79,87	1,59
Daidzina	86,17	40	23,02	19,84	0,49	1647,50	54	26,40	434,90	8,05
7-O-diglukozyd genisteiny	1008,64	26	21,00	221,81	8,15	1146,4	26	11,80	135,20	5,20
7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	339,58	50	25,01	84,89	1,69	342,1	54	26,40	90,30	1,67
Malonylogenistyna	852,47	60	24,62	209,87	3,49	282,4	42	20,90	59,00	1,40
Acetylogenistyna	111,10	60	24,62	27,30	0,45	-	-	-	-	-

* wszystkie wartości umieszczone w tabeli odnoszą się do dni, w których uzyskano maksymalną zawartość poszczególnych metabolitów.

$$\text{produktywność} = \frac{\text{maksymalne stężenie związku w mg/100g DW} \times \text{ilość biomasy w g l}^{-1}}{100 \text{ g suchej masy (DW)}}$$

$$\text{specyficzna produktywność} = \frac{\text{produktywność}}{\text{ilość dni po których stwierdzono maksymalne stężenie określonego związku w kulturze}}$$

* All measurements throughout the table are quoted for the day on which maximum concentration of each molecule was recorded.

$$\text{productivity} = \frac{\text{max. concentration for each molecule in mg/100g DW} \times \text{culture biomass in g l}^{-1}}{100 \text{ g DW}}$$

$$\text{specific productivity} = \frac{\text{productivity}}{\text{the number of days after which the max. concentration of the certain molecule was reached}}$$

Piśmiennictwo

1. Ames T.T., Worden R.M., Continuous Production of Daidzein and Genistein from Soybean in a Magnetofluidized Bed Bioreactor, *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 336-339.
2. Aoki T., Akashi T., Ayabe S., Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity and biosynthesis, *J. Plant Res.* 113 (2000) 475-488.
3. Barz W., Mackenbrock U., Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpanes in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 199-211.
4. Berlin J., Fecker L., Rügenhagen C., Sator C., Strack D., Witte L., Wray V., Isoflavone Glycoside Formation in Transformed and Non-Transformed Suspension and Hairy Root Cultures of *Lupinus polyphyllus* and *Lupinus hartwegii*, *Z. Naturforsch.* 46 c (1991) 725-734.
5. Bourgaud E., Bouque V., Guckert A., Production of flavonoids by *Psolarea* hairy root cultures, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56 (1999) 97-104.
6. Cos P., de Bruyne T., Apers S., vanden Berghe D., Pieters L., Vlietinck A.J., Phytoestrogens: Recent developments, *Planta Med.* 69 (2003) 589-599.
7. Dixon R.A., Harrison M.J., Paiva N.L., The isoflavonoid phytoalexin pathway: From enzymes to genes to transcription factors, *Physiol. Plant.* 93 (1995) 385-392.
8. Federici E., Touché A., Choquart S., Avanti O., Fay L., Offord E., Courtois D., High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures, *Phytochemistry* 64 (2003) 717-724.
9. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Glebko L.I., Kulesh N.I., Muzarok T.I., Seletskaya L.D., Bulgakov V.P., Zhuravlev Yu.N., Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*, *Fitoterapia* 71 (2000) 365-372.
10. Giri A., Narasu M.L., Transgenic hairy roots: recent trends and applications, *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 1-22.
11. Paiva N.L., Oommen A., Harrison M.J., Dixon R.A., Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 38 (1994) 213-220.
12. Schenk R.U., Hildebrandt A.C., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.* 50 (1972) 199-204.
13. Sidwa-Gorycka M., Królicka A., Kozyra M., Głowniak K., Bourgaud F., Łojkowska E., Establishment of a co-culture of *Ammi majus* L. and *Ruta graveolens* L. for synthesis of furanocoumarins, *Plant Sci.* 165 (2003) 1315-1319.
14. Subroto M.A., Kwok K.H., Hamill J.D., Doran P.M., Co-culture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996) 481-494.
15. van der Plas L.H.W., Eijkelboom C., Hagendoorn M.J.M., Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions. *Competition between secondary metabolite production and growth in a model system* (*Morinda citrifolia*), *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 43 (1995) 111-116.
16. Wysockińska H., Chmiel A., Transformed root cultures for biotechnology, *Acta Biotechnol.* 17 (2) (1997) 131-159.
17. Wysockińska H., Micropropagation of *Penstemon serrulatus* and iridoid formation in regenerated plants, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33 (1993) 181-186.

18. Zobayed S.M.A., Murch S.J., Rupasinghe H.P.V., de Boer J.G., Glickman B.W., Saxena P.K., Optimized system for biomass production, chemical characterisation and evaluation of chemo-preventive properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi, Plant Sci. 167 (2004) 439-446.

13. LC-DAD UV I LC-MS W ANALIZIE IZOFLAWONÓW ORAZ FLAWONÓW W RÓŻNYCH CZĘŚCIACH MORFOLOGICZNYCH *GENISTA TINCTORIA* Z UPRAW GRUNTOWYCH

Wstęp

Integralną częścią doświadczeń biotechnologicznych ukierunkowanych na produkcję, w hodowlach *in vitro*, aktywnych farmakologicznie metabolitów roślinnych, są badania fitochemiczne. Dotyczą one zarówno wstępnego rozpoznania składu, wprowadzanych do kultur *in vitro*, gatunków roślinnych w zakresie badanych związków jak i późniejszego ciągłego monitorowania zawartości analizowanych metabolitów w biomasach uzyskanych na poszczególnych etapach eksperymentu [5,10,12,14,26,27,37,40]. Ze względu na konieczność oceny fitochemicznej nawet tysięcy próbek roślinnych otrzymanych w projekcie biotechnologicznym dąży się do opracowania metody analizy badanych związków, umożliwiającej przetestowanie jak największej ilości biomas w jak najkrótszym czasie [5,14,26,27,40].

Jak wykazują dane literaturowe do analizy zarówno jakościowej jak i ilościowej izoflawonoidów w matrycach roślinnych, obok chromatografii gazowej [34,44,49] oraz elektroforezy kapilarnej [1,43,49,50] najczęściej stosuje się wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) [2,3,13,15,19,21-23,25,35,38,45,49,51]. Większość doświadczeń obejmujących opracowanie warunków rozdzielania omawianych związków z zastosowaniem HPLC dotyczy analiz przeprowadzonych na mieszaninach substancji wzorcowych [13,21-23,25,49] bądź na wyciągach roślinnych, które poddano wstępnej hydrolizie tak, że ostatecznie w ekstraktach oznaczano jedynie połączenia o charakterze aglikonów [21,49]. Ponadto, znaczna ilość badań chromatograficznych prowadzona była na soi (*Glycine max*) lub produktach sojowych, gdzie koncentrowano się głównie na oznaczeniu pochodnych: genisteiny, glicyteiny i daidzeiny [2,19,35,49,51].

Skład chemiczny frakcji flawonoidowych roślin z rodzaju *Genista*, stanowiących przedmiot badań objętych niniejszą rozprawą habilitacyjną, jest poznany i wyczerpująco opisany w literaturze (rozdz. 2). W przeciwieństwie do soi, będącej głównym obiektem badań ukierunkowanych na fitoestrogeny [2,19,35,49,51], w janowcach w zespole flawonoidów, obok bardzo bogatej frakcji izoflawonoidowej (pochodne genisteiny, daidzeiny, formononetyny i biochaniny A) występują również proste flawony, pochodne luteoliny i apigeniny [6,16,28,48]. Ponadto na obydwie klasy związków składają się połączenia o charakterze mono- i diglikozydów, estrów oraz wolnych aglikonów [6,16,28,48]. Pomimo licznych badań fitochemicznych ukierunkowanych na bioflawonoidy w rodzaju *Genista* [6,16,17,28,47,48] dotychczas nie opracowano warunków chromatograficznego rozdzielania HPLC tych związków, występujących w zespole, w poszczególnych gatunkach.

Ze względu na charakter projektu habilitacyjnego obejmującego badania nad izoflawonami w kulturach *in vitro* wybranych janowców postanowiono opracować warunki chromatograficznego rozdzielania HPLC 22-składnikowego zespołu wzorcowych bioflawonoidów (izoflawony oraz flawony) występujących powszechnie w rodzaju *Genista* [6,16,48]. Zoptymalizowaną metodę rozdzielania zamierzano następnie wykorzystać do separacji flawonoidów występujących w roślinach gruntowych oraz kulturach *in vitro* badanych janowców (rozdz. 6-12).

Z danych literaturowych wynika, że skład frakcji flawonoidowych występujących w roślinach z rodzaju *Genista* jest bardzo zbliżony [6,16,17,28,47,48]. Z tego względu w badaniach opisywanych w niniejszym rozdziale postanowiono skoncentrować się na janowcu barwierskim (*G. tinctoria*), który spośród wszystkich objętych projektem gatunków akumulował, w warunkach upraw gruntowych, najbogatszą frakcję flawonoidową [28,48]. Zamierzano określić chromatograficznie (HPLC) skład jakościowy oraz ilościowy *G. tinctoria* w zakresie badanych związków z uwzględnieniem poszczególnych części morfologicznych rośliny (ulistnione pędy, kwiaty i korzenie). Porównanie uzyskanych wyników z zawartością poszczególnych izoflawonów w biomasach z kultur *in vitro*, namnożonych w kolejnych etapach doświadczeń umożliwiało określenie przydatności opracowanych systemów hodowlanych do produkcji znacznych ilości aktywnych leczniczo połączeń (rozdz. 6-12).

W niniejszym rozdziale przedstawiono, po raz pierwszy, wykorzystanie chromatografu cieczonego sprzężonego z detektorem masowym lub matrycą diodową do bezpośredniej identyfikacji oraz określenia zawartości izoflawonów i flawonów w janowcu barwierskim z upraw gruntowych.

Materiały i metody

Materiał roślinny

W zakresie połączeń bioflawonoidowych przebadano ulistnione pędy, kwiaty oraz korzenie *Genista tinctoria* zebrane w okresie kwitnienia, w Ogrodzie Roślin Leczniczych Katedry i Zakładu Farmakognozji Akademii Medycznej w Gdańsku, w 2002 roku. Tożsamość gatunku potwierdzono po izolacji DNA roślinnego i porównaniu otrzymanych sekwencji z biblioteką danych GeneBank [41]. Materiały zielnikowe poszczególnych części morfologicznych janowca barwierskiego zdeponowano pod numerami: 00-01-01-Z, 00-01-02-C i 00-01-03-K, w Herbarium Ogrodu Roślin Leczniczych Katedry i Zakładu Farmakognozji Akademii Medycznej w Gdańsku.

Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej

Zliofilizowany (48 h, próżnia 1×10^{-3} mbar – liofilizator LYOVAC GT2 firmy FINAQUA SANTASALO-SOHLBERG Co – Finlandia) i sproszkowany materiał roślinny (po 300 mg ulistnionych pędów, kwiatów i korzeni *G. tinctoria*) ekstrahowano 4 godziny, trzema porcjami 80% wodnego roztworu metanolu (200 ml), na łaźni ultradźwiękowej, w temperaturze pokojowej (± 20 °C). Połączone, odsączone od resztek surowca, wyciągi zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem (temp. ± 35 °C) do syropowatej konsystencji i rozpuszczano w niewielkiej ilości wody redestylowanej. Pierwotne ekstrakty oczyszczano następnie od lipofilnych substancji balastowych metodą ekstrakcji ciecz-ciecz, przy użyciu chloroformu (3×200 ml rozpuszczalnika). Połączone wyciągi chloroformowe z uwagi na brak połączeń flawonoidowych (analiza TLC) wyłączono z dalszego cyklu badań. Oczyszczone pozostałości wodne, zawierające frakcje flawonoidowe suszono na drodze liofilizacji, w warunkach podanych powyżej, a następnie rozpuszczono w 10 ml 80% wodnego roztworu metanolu (Merck) i po przesączeniu (0,45 μ m filtr J.T. Baker) nastrzykiwano bezpośrednio na kolumnę chromatograficzną.

W celu określenia procentowego odzysku związków flawonoidowych, z badanych matryc roślinnych, w procesie przygotowania ekstraktów do analiz HPLC, do poszczególnych próbek janowca barwierskiego, dodano znane ilości następujących substancji wzorcowych: genisteiny, 7-O-glukozydu genisteiny (genistyna), 6''-O-malonylo-7-O-glukozydu genisteiny (malonylogenistyna),

7-O-glukozydu luteoliny i izolikwirytygeniny. Ostatni z wymienionych związków stosowany był następnie jako wzorzec wewnętrzny podczas ilościowych analiz HPLC biomas roślinnych. Flawonoidy wzorcowe dodawano do próbek poszczególnych części morfologicznych *G. tinctoria* w ilości od 20 do 200 µg/300 mg biomasy. Tak przygotowane matryce roślinne poddano następnie procesowi ekstrakcji i oczyszczania według procedury opisanej powyżej. Eksperyment powtórzono 5-krotnie, a uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne $\pm$ S. D.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Aparatura i odczynniki

LC-DAD UV

W badaniach stosowano system HPLC firmy Merck-Hitachi (Frankfurt – Niemcy, Tokio – Japonia) wyposażony w dwie pompy (L-7100), detektor z matrycą fotodiodową (DAD L-7455), automatyczny podajnik próbek (L-7200), termostat (L-735) i interfejs (D-700).

LC-MS

Eksperymenty LC-MS prowadzono z zastosowaniem systemu HPLC Shimadzu (Kyoto, Japonia) złożonego z dwóch pomp (LC-10 AD i LC-10 AD_{VP}), detektora UV (SPD-10A), detektora masowego (LC/MS-QP 8000α), automatycznego podajnika próbek (SIL-10 AD_{VP}), zaworu dozującego (Rheodyne, Cotati, CA, USA-Model 7127) o objętości pętli 35 µl i systemu kontrolnego (SCL-10 AD_{VP}).

Analizy LC/MS prowadzono techniką ESI-MS (Electrospray Ionisation) w trybie jonów ujemnych (NI-ESI) na spektrometrze masowym, przy następujących parametrach doświadczalnych: temperatura kapilary 250 °C, napięcie SDL – 50V, napięcie sondy – 1,8 kV, prędkość przepływu gazu nebulizera 2,5 ml min⁻¹, napięcie defragmentacji -45 V. Rejestrację sygnałów prowadzono w trybie przemiatania w zakresie wartości mas m/z –100-800.

Rozdziały HPLC prowadzono na kolumnie LiChrospher RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, Niemcy).

Do sporządzania fazy ruchomej stosowano rozpuszczalniki organiczne, do chromatografii cieczowej (acetonitryl – Merck, kwas octowy – J.T. Baker) oraz wodę redestylowaną (redestylator elektryczny RL 5 – MERA-POLNA – Przemyśl). Przygotowane fazy ruchome, przed użyciem, sączono przez filtr 0,45µm (J. T. Baker, Phillipsburg, NY. USA)

Faza ruchoma

Bioflawonoidy z ulistnionych pędów, kwiatów i korzeni *G. tinctoria* rozdzielano stosując elucję gradientową, z zastosowaniem mieszaniny rozpuszczalników: A (woda : acetonitryl – 99,9:0,1) oraz B (acetonitryl : kwas octowy – 99,9:0,1) według następującego programu:

- 0 min do 35 min: 10% - 35% B w A (gradient liniowy)
- 35 min do 80 min: 35% - 80% B w A (gradient liniowy).

Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1,0 ml/min. Stosowano detekcję UV, przy długości fali λ = 262 nm (czułość 0,008 AUFS). Czas kondycjonowania kolumny, pomiędzy poszczególnymi analizami, wynosił 10 min.

Sporządzanie krzywej kalibracji

Roztwory substancji wzorcowych przygotowano przez rozpuszczenie 5 mg poszczególnych związków w 100 ml metanolu. Ilości bioflawonoidów (20 µl) nastrzykiwane na kolumnę

odpowiadały stężeniom badanych związków w zakresie od 0,6 do 4,0 µg. Krzywe kalibracyjne wykreślono przez korelację pól powierzchni pików (y) do stężenia substancji wzorcowych (x).

Substancje wzorcowe

W analizach chromatograficznych stosowano 0,1% metanolowe roztwory następujących substancji wzorcowych: genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny (genistyna), 7-O-glukozyd daidzeiny (daidzina), daidzeina, pueraryna, 7-O-glukozyd luteoliny, luteolina, 7-O-glukozyd apigeniny, apigenina, 7,3',4'-trihydroksyizoflawon, ononina, ekwol, likwirytygenina, izolikwirytygenina, sisotryna, biochanina A, formononetyna, kumestrol (Extrasynthese, Francja), 7-O-digluukozyd genisteiny, 7-O-glukozyd-2''-hydroksygenisteiny, 6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny (malonylogenisztyna) oraz 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny (acetylogenisztyna) (LC Laboratories, USA).

Omówienie wyników

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono warunki rozdziału techniką HPLC 22-składnikowego zespołu izoflawonów oraz flawonów występujących w formie aglikonów, mono- i diglikozydów oraz estrów w ulistnionych pędach, kwiatach oraz korzeniach *G. tinctoria*.

Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej

Jednym z najistotniejszych etapów prowadzonych doświadczeń było przygotowanie próbek materiału roślinnego do analiz HPLC. Badane matryce roślinne zawierały obok analizowanych bioflawonoidów znaczne ilości związków towarzyszących (żywice, woski, chlorofil). Mogły one istotnie wpływać na końcowy wynik analizy poprzez „impregnowanie” kolumny chromatograficznej (zmiana warunków rozdzielania) oraz jednocześnie wymywanie z badanymi związkami (spadek selektywności rozdziału). Z tego względu pierwotne ekstrakty z różnych części morfologicznych janowca barwierskiego poddano procedurze oczyszczania od wyżej wymienionych substancji balastowych. Ponadto, jak wynika z danych literaturowych, w skład zespołów izoflawonoidowych występujących w większości roślin z rodziny *Fabaceae* wchodzi połączenia o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów [2,48,51]. Udowodniono, że zwłaszcza pochodne malonowe oraz acetylowe izoflawonów podatne są zarówno na, indukowaną wysoką temperaturą, dekarboksylację oraz de-estryfikację z utworzeniem odpowiednich pochodnych β - glikozydowych [2,31,33,42,41,49]. W rezultacie typowa, w przypadku połączeń flawonoidowych, ciągła ekstrakcja na gorąco, w aparacie Soxhleta, prowadzi w końcowym etapie, do identyfikacji aglikonów oraz β-glikozydów izoflawonoidowych jako głównych składników badanych wyciągów roślinnych [2,42,49]. Jak już wspomniano w rozdziale 6, malonowe pochodne izoflawonów w roślinach pełnią rolę form magazynowych określonych fitoestrogenów (fitoantycypin), uwalnianych następnie w warunkach stresu biotycznego lub abiotycznego [3]. Roślinne kultury *in vitro* akumulujące znaczne ilości tych związków mogą okazać się niezwykle cenne jako materiał biologiczny do prowadzenia badań podstawowych, dotyczących metabolizmu izoflawonów w biomasach roślinnych oraz eksperymentów farmakologicznych, których celem jest określenie stosunkowo słabo poznanej aktywności biologicznej połączeń estrowych. Procedura ekstrakcyjna prowadząca do nawet częściowego rozkładu malonianów uniemożliwiłaby wysunięcie rzetelnych wniosków z poszczególnych etapów doświadczeń nad akumulacją izoflawonów w kulturach *in vitro* (rozdz. 6 - 12). W związku z powyższym, w przygotowaniu wyciągów flawonoidowych z biomas *G. tinctoria* zastosowano ochronny typ ekstrakcji na zimno, 80% metanolem, a poszczególne procedury związane z oczyszczaniem pierwotnych ekstraktów również prowadzono w niskiej temperaturze (Materiały i metody).

Analiza chromatograficzna HPLC oczyszczonych wyciągów, uzyskanych z próbek roślinnych, zawierających określony dodatek wzorców flawonoidowych (wybrane połączenia z grupy aglikonów, glikozydów i estrów), wykazała zadawalający procent odzysku dodanych substancji. W przypadku wzorca wewnętrznego – izolikwirytygeniny wynosił on $95 \pm 0,47\%$. Przyjęta procedura ekstrakcyjna spowodowała również niewielką stratę ilościową pozostałych związków (genisteina – $92 \pm 0,35\%$; genistyna – $94 \pm 0,47\%$; 7-O-glukozyd luteoliny – $93 \pm 0,21\%$; malonian genistyny – $89 \pm 0,25\%$). W rezultacie stwierdzono, że opracowana dla biomas janowca barwierskiego metoda ekstrakcji nie powoduje istotnych strat i rozkładu badanych połączeń. Przyjęta procedura wydaje się odpowiednia do analizy innych surowców roślinnych zawierających związki izoflawonoidowe o charakterze estrów.

Warunki chromatografowania

Do badań chromatograficznych nad frakcją bioflawonoidową w *G. tinctoria* wybrano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Próby wykorzystania chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z detekcją densytometryczną, do analizy flawonoidów występujących w biomasach *G. tinctoria*, nie zakończyły się sukcesem. Stwierdzono m. in., że całkowite rozdzielanie flawonów i izoflawonów występujących w badanym zespole jest niemożliwe z powodu zróżnicowanych, wręcz skrajnych stężeń poszczególnych połączeń w matrycach roślinnych (tab. 1). Dodatkowo, zbliżone wartości współczynników retencji (R_f) analizowanych związków, wynikające z dużych podobieństw strukturalnych, powodowały, że połączenia występujące w dużych stężeniach pokrywały na chromatogramach pasma pochodzące od bioflawonoidów występujących w ilościach śladowych [28].

Jak już wspomniano we wstępie, HPLC jest techniką chromatograficzną stosowaną powszechnie do badań składu jakościowego i ilościowego frakcji flawonoidowych w matrycach roślinnych [2,3,7,13,15,19,21-23,25,35,38,45,49,51]. Ze względu na znaczącą ilość ugrupowań chromoforowych w strukturach bioflawonoidów oraz względnie polarny charakter omawianych połączeń w analizach HPLC tak flawonów jak i izoflawonów wykorzystuje się systemy rozdzielania w układach faz odwróconych z detekcją w nadfiolecie [2,3,7,13,15,19,21-25,30,35,38,39,45,49,51,52]. W związku z powyższym rozdziały HPLC połączeń wzorcowych (22 związki) prowadzono na kolumnie LiChrospher RP-18, z elucją gradientową dla mieszaniny rozpuszczalników: acetonitryl – woda – kwas octowy. Całkowitą separację bioflawonoidów uzyskano właśnie w wyniku zastosowania elucji gradientowej oraz czasu analizy wydłużonego do 70 min. Chromatografowanie mieszaniny flawonów i izoflawonów w warunkach opisanych w literaturze, jako optymalnych do rozdzielania połączeń izoflawonoidowych obecnych w roślinach z rodziny *Fabaceae* (stosunkowo krótki, 15-30 min. czas analizy oraz elucja izokratyczna) [2,19,21,22,51], nie doprowadziło do całkowitej separacji badanych związków. Wiąże się to bezpośrednio z obecnością, w badanym zespole bioflawonoidów o stosunkowo podobnych strukturach i tym samym zbliżonych wartościach czasów retencji (t_R) (ryc.1). Ponieważ stosowanie w fazie ruchomej roztworów buforowych może się wiązać z rozkładem izoflawonów o charakterze estrów [22,49], elucję gradientową omawianych połączeń optymalizowano w oparciu o mieszaninę acetonitrylu, wody oraz kwasu octowego (Materiały i metody). W wyniku zastosowania w fazie ruchomej 0,1% dodatku modyfikatora kwasowego uzyskano na chromatogramach znacznie lepsze kształty pików, w szczególności tych, które odpowiadały poszczególnym aglikonom oraz monoglikozydom (ryc. 1 i 2). Ze względu na tematykę habilitacyjnego projektu badawczego, ukierunkowanego na połączenia izoflawonoidowe, detekcję badanych związków prowadzono przy długości fali $\lambda = 262$ nm (max. absorpcji w UV dla większości izoflawonów [16,39,45,49,]). W opisanych warunkach chromatografowania udało się rozdzielić 22 - składnikową mieszaninę bioflawonoidów (aglikony, monoglikozydy, diglikozydy i połączenia estrowe) oraz wieloskładnikowe

frakcje flawonów i izoflawonów występujących w ulistnionych pędach, kwiatach oraz korzeniach janowca barwierskiego (ryc. 1 i 2). Uogólniając, w zoptymalizowanym układzie rozdzielczym analizowane związki flawonoidowe wymywane były z kolumny chromatograficznej w następującej kolejności: diglikozydy, monoglikozydy, estry i na końcu aglikony (ryc. 2).

W wyniku przeprowadzonych badań uznano, że wybór izolikwirytygeniny jako wzorca wewnętrznego stosowanego w analizach HPLC wyciągów z *G. tinctoria* był optymalny. Powyższego związku będącego bezpośrednim prekursorem izoflawonów, pochodnych daidzeiny [9] nie stwierdzono w badanych matrycach roślinnych (tab. 1). Ponadto izolikwirytygenina tylko nieznacznie wydłużała czas analizy poszczególnych ekstraktów ($t_R = 52$ min), a *maximum* absorpcji omawianego połączenia w nadfiolecie ($\lambda_{max} = 262$ nm) odpowiadało długości fali stosowanej do detekcji badanych frakcji flawonoidowych (ryc. 1 i 2).

Identyfikacja flawonoidów

Celem identyfikacji związków flawonoidowych występujących w poszczególnych częściach morfologicznych *G. tinctoria* z upraw gruntowych, w analizach chromatograficznych, zastosowano dwa rodzaje detekcji: matrycę diodową (DAD) oraz detektor masowy (ESI-MS).

Przyjęta procedura umożliwiła identyfikację badanych połączeń w oparciu o trzy parametry: t_R , widma UV oraz wartości m/z jonów molekularnych $[M-H]^+$ i jonów fragmentacyjnych $[A-H]^+$, powstałych w wyniku rozpadu wiązań glikozydowych bądź estrowych w cząsteczkach analizowanych flawonoidów (ryc. 3-9) [2,4,8,18,23,32,39,45,46,52].

W przypadku detekcji DAD uzyskano widma poszczególnych pików w zakresie długości fali $\lambda = 220$ -500 nm, których profile wskazywały jednoznacznie na flawonoidowy charakter poszczególnych sygnałów (tab. 2, ryc. 3-9). W badanym zespole stosunkowo łatwo było odróżnić połączenia izoflawonoidowe od flawonów na podstawie widm UV, które w przypadku pierwszej grupy związków charakteryzowały się intensywnym II pasmem absorpcji ($\lambda = 245$ -270 nm; $\lambda_{max} = 262$ nm) oraz pasmem I, o znacznie niższej intensywności, wykazującym niekiedy tendencje do zaniku (ryc. 1) [7,8,39]. Przeciwnie, w grupie flawonów I pasmo absorpcji ($\lambda = 330$ -350) było znacznie bardziej intensywne niż II ($\lambda = 250$ -270 nm) [7].

W tym miejscu należy zaznaczyć, że widma UV izoflawonów o charakterze estrów (związki 8 i 10) były tożsame z widmem pochodnej monoglikozydowej obydwu połączeń (genistyna - zw. 7) (ryc. 5-7). Na tej podstawie można sądzić, że w badanych związkach, podstawniki: malonowy oraz acetylowy nie są związane z grupami funkcyjnymi aglikonu [11,20,24]. Ponadto powszechnie wiadomo, że estryfikacja izoflawonów (powstawanie głównie pochodnych malonowych i acetylowych) dotyczy reszty cukrowej cząsteczki (najczęściej w pozycji C 6''), a nie samego aglikonu [22,23,49,]. W związku z powyższym oraz z uwagi na identyczne wartości t_R dla związków 8 i 10 oraz odpowiednich substancji wzorcowych można uznać, że omawiane połączenia to: 6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny (malonylogenistyna – zw. 8) oraz 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny (acetylogenistyna – zw. 10) (ryc. 6 i 7, tab. 2).

Również pozostałe składniki badanych frakcji flawonoidowych z *G. tinctoria* wstępnie zidentyfikowano w oparciu o całkowitą zbieżność omawianych bioflawonoidów z wzorcami w zakresie wartości t_R oraz widm UV (ryc. 3-9, tab. 2).

Potwierdzenie uzyskanych wyników w zakresie identyfikacji poszczególnych struktur flawonoidowych umożliwiła analiza HPLC ekstraktów z janowca barwierskiego z detekcją masową. Do badań LC/MS wyciągów flawonoidowych zastosowano metodę jonizacji przez elektrorozproszczenie (*Electrospray Ionisation* – ESI-MS) w trybie jonów ujemnych. Z danych literaturowych wynika, że powyższy typ jonizacji polecany jest do bezpośredniej identyfikacji

flawonoidów występujących w zespółach, z uwagi na czułość metody i prostą interpretację uzyskanych widm [8,11,20], w przeciwieństwie do jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation* – APCI) stosowanej często do określania struktur połączeń wyizolowanych uprzednio z matrycy roślinnej [8,39,52]. Ponadto w przypadku analiz LC/MS frakcji izoflawonoidowych z *G. tinctoria* z zastosowaniem APCI otrzymano widma o wysokim poziomie szumów często nakładających się na sygnały pochodzące od jonów molekularnych oraz fragmentacyjnych i tym samym uniemożliwiających właściwą interpretację wyników (wstępne badania nie zostały zawarte w dysertacji).

W wyniku przeprowadzonych analiz LC/MS otrzymano widma związków flawonoidowych występujących w janowcu barwierskim, pozwalające na potwierdzenie struktury poszczególnych połączeń zidentyfikowanych wstępnie na podstawie wartości t_R oraz widm w nadfiolecie (tab. 2). Stwierdzono, że w skład frakcji flawonoidowych występujących w poszczególnych częściach morfologicznych *G. tinctoria* wchodzi połączenia o charakterze aglikonów, monoglikozydów, diglikozydów oraz estrów (tab. 2).

Uogólniając, sygnały pochodzące od jonów molekularnych związków estrowych oraz glikozydowych – $[M-H]^-$ wykazywały znacznie niższą intensywność względną niż sygnały odpowiadające aglikonom (ryc. 3-9, tab. 2). Opisywane zjawisko wynika ze stosunkowo wysokiej temperatury wymaganej do nebulizacji estrów oraz glikozydów [8]. W przeciwieństwie do aglikonów, w opisywanych warunkach analizy LC-MS, omawiane połączenia prawdopodobnie nie zostały całkowicie odparowane z badanej matrycy. W rezultacie uzyskane na widmach sygnały jonów molekularnych pochodzących od estrów i glikozydów charakteryzowała stosunkowo niska intensywność (ryc. 3-9).

W widmach masowych aglikonów (genisteina, daidzeina, luteolina, apigenina itd.), występujących we frakcjach flawonoidowych *G. tinctoria*, sygnały o najwyższej intensywności pochodziły od jonów pseudomolekularnych $[M-H]^-$. Jak już wspomniano, dla glikozydów oraz połączeń estrowych stwierdzono w widmach obecność jonów molekularnych o niskiej intensywności (ryc. 3-9). Podstawowe sygnały o najwyższej intensywności pochodziły natomiast od jonów fragmentacyjnych powstałych w wyniku odłączenia od cząsteczki bioflawonoidu reszty cukrowej ($[M-Glu]^-$ dla monoglikozydów) bądź reszty cukrowej wraz z kwasem alifatycznym ($[M-Glu-Mal]^-$ lub $[M-Glu-Ac]^-$ dla estrów). W obydwu wypadkach otrzymano jony fragmentacyjne przy m/z właściwej dla odpowiednich aglikonów (tab. 2) [8,11,22, 23,49,52]. Widmo masowe 7-O-diglikozydu genisteiny cechowało, obok obecności jonu molekularnego $[M-H]^-$, występowanie jonów fragmentacyjnych powstałych po odłączeniu jednej ($[M-Glu]^-$) lub dwóch ($[M-2Glu]^-$) reszt glukozy (ryc. 3). Dotychczas w publikacjach eksperymentalnych, dotyczących analiz LC-MS zespółów flawonoidowych, nie stwierdzono w widmach masowych diglikozydów izoflawonowych obecności jonów fragmentacyjnych, powstałych w wyniku utraty tylko jednej cząsteczki cukru [8,32,39,49,52]. Autorzy powyższych doniesień uznali, że wiązanie glikozydowe między resztą cukrową a aglikonem rozpada się szybciej niż wiązanie między kolejnymi resztami cukrowymi. W związku z powyższym opisane widma masowe diglikozydów charakteryzowały się brakiem sygnałów pochodzących od jonów fragmentacyjnych przy m/z odpowiednich monoglikozydów [8,32]. Na obecnym etapie badań trudno ocenić przyczynę opisywanych rozbieżności między danymi literaturowymi, a wynikami doświadczeń nad frakcją flawonoidową zawartą w *G. tinctoria*. Być może pełniejszych danych dostarczyłyby eksperymenty wykonane na 7-O-diglikozydzie genisteiny wyizolowanym uprzednio z matrycy roślinnej [46].

W badaniach LC-MS zespołu flawonów i izoflawonów z janowca barwierskiego, w widmach masowych poszczególnych połączeń, nie stwierdzono obecności jonów fragmentacyjnych

powstałych w wyniku utraty grup metoksyowych, metylowych bądź karbonylowych. Ponadto, w omawianym przypadku nie obserwowano również jonów potomnych tworzących się w wyniku degradacji Diels-Aldera (RDA) pierścienia C flawonoidu [4,8,32,46,52].

Wynikiem przeprowadzonych doświadczeń było opracowanie warunków rozdziału bogatej frakcji flawonoidowej zawartej w poszczególnych częściach morfologicznych *G. tinctoria* oraz określenie składu jakościowego i ilościowego badanego zespołu wtórnych metabolitów.

Porównawcza analiza HPLC frakcji flawonoidowych występujących w pędach, kwiatach oraz korzeniach G. tinctoria z upraw gruntowych

Zoptymalizowane warunki rozdziału HPLC 22- składnikowej mieszaniny flawonoidów wykorzystano w porównawczych analizach chromatograficznych zespołu izoflawonów i flawonów występujących w kwiatach, ulistnionych pędach oraz korzeniach *G. tinctoria*. Z uwagi na temat projektu habilitacyjnego dotyczącego opracowania w warunkach *in vitro* roślinnego systemu hodowlanego zdolnego do produkcji znacznych ilości izoflawonów, niezwykle istotnym było określenie wyjściowej zawartości tych związków w roślinie macierzystej. Użyte wyniki miały stanowić swoistą próbę kontrolną, z którą porównywano następnie zawartość izoflawonów otrzymaną w biomasach janowca barwierskiego na poszczególnych etapach doświadczeń biotechnologicznych (rozdz. 6-12).

W wyniku przeprowadzonych analiz HPLC stwierdzono istotne różnice jakościowe oraz ilościowe pomiędzy poszczególnymi częściami morfologicznymi *G. tinctoria* w zakresie badanych wtórnych metabolitów (tab. 1). Spośród trzech przebadanych biomas roślinnych kwiaty janowca barwierskiego stanowiły surowiec charakteryzujący się najwyższą zawartością bioflawonoidów. Wyjątkowo bogata frakcja flawonoidowa (4151,42 mg/100 g suchej masy) złożona była z pochodnych prostych flawonów (luteoliny i apigeniny) oraz izoflawonów (pochodne genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A – ryc. 2). Dominującym składnikiem zespołu izoflawonoidowego był 7-O-glukozyd genisteiny (1751,8 mg/100 g suchej masy), a frakcji flawonowej 7-O-glukozyd luteoliny (626,5 mg/100 g suchej masy). Ponadto kwiaty janowca barwierskiego zawierały znaczne stężenia 7-O-diglukozydu genisteiny (578,3 mg/100 g suchej masy), 7-O-glukozydu 2'-hydroksygenisteiny (593,1 mg/100 g suchej masy) oraz daidziny i daidzeiny (tab. 1). Pozostałe połączenia występowały w badanym surowcu jedynie w niewielkich ilościach. Na uwagę zasługuje również obecność, we frakcji izoflawonowej *G. tinctoria*, związków estrowych, tj. 6''-O-malonylo-7-O-glukozydu genisteiny oraz 6''-O-acetylo-7-O-glukozydu genisteiny, połączeń pełniących w tkankach roślinnych rolę form magazynowych odpowiednich fitoantycypin [9].

Pędy janowca barwierskiego zawierały frakcję flawonoidową tożsamą pod względem jakościowym z zespołem związków zidentyfikowanych uprzednio w kwiatach badanego gatunku (tab. 1). Różnice między obydwoma surowcami dotyczyły jedynie zawartości ilościowej poszczególnych wtórnych metabolitów. Ogólnie pędy akumulowały nieznacznie mniej izoflawonów niż kwiaty (3422,98 mg/100 g suchej masy). Zawartość flawonów w omawianym surowcu była natomiast wyższa (728,44 mg/100 g suchej masy – tab. 1).

Korzenie *G. tinctoria* w porównaniu z pędami oraz kwiatami badanej rośliny produkowały najuboższą frakcję flawonoidową (3921,01 mg/100 g suchej masy – tab. 1). Stwierdzenie to dotyczy zarówno składu jakościowego jak i zawartości ilościowej poszczególnych metabolitów we frakcji izoflawonoidowej (3573,71 mg/100 g suchej masy) oraz zespole flawonów (347,3 mg/100 g suchej masy). Wyjątkiem jest genisteina, która występowała w korzeniach janowca w ilości 514,88 mg/100 g suchej masy, czyli w stężeniu ponad 10 krotnie wyższym niż w przypadku kwiatów i pędów badanego gatunku (tab. 1).

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych badań opracowano dokładną oraz powtarzalną metodą chromatograficznego rozdzielania HPLC bogatej, 22-składnikowej mieszaniny wzorców flawonoidowych występujących w rodzaju *Genista*, wykorzystaną następnie do separacji flawonów oraz izoflawonów występujących w janowcu barwierskim.

Z uwagi na możliwość rozkładu połączeń estrowych zawartych w badanych matrycach roślinnych przygotowanie próbek do analiz HPLC obejmowało ochronną ekstrakcję surowców 80% wodnym roztworem metanolu, w temperaturze pokojowej. Pominięcie na etapie oczyszczania wyciągów procedur związanych z użyciem wysokiej temperatury pozwoliło uniknąć rozkładu malonylo- oraz acetylogeniasty, co stwierdzono w wyniku analiz próbek roślinnych z dodatkiem wzorców wewnętrznych.

Sprzężenie chromatografu z detektorem masowym oraz matrycą diodową umożliwiło identyfikację poszczególnych połączeń flawonoidowych, zawartych w badanych surowcach, w oparciu o: t_R , widma masowe oraz UV.

Zoptymalizowane warunki rozdzielania HPLC wykorzystano do analiz porównawczych frakcji flawonoidowych występujących w różnych częściach morfologicznych *G. tinctoria*. W wyniku przeprowadzonych badań wybrano ulistnione pędy janowca jako biomasę stosowaną następnie w charakterze swoistej próby kontrolnej, na wszystkich etapach doświadczeń biotechnologicznych (rozdz. 6-12). Kwiaty badanego gatunku, w których stwierdzono najwięcej izoflawonów stanowiły jedynie 2,3% całkowitej biomasy rośliny. Z uwagi na powyższe nie mogły być postrzegane jako wydajne, naturalne źródło fitoestrogenów z klasy izoflawonów.

Opracowana metoda chromatograficznego rozdzielania HPLC okazała się skuteczna nie tylko do analiz frakcji flawonoidowych zawartych w janowcu barwierskim, ale również do separacji flawonów oraz izoflawonów występujących w pozostałych 5 janowcach objętych projektem habilitacyjnym, tj. *G. radiata* L., *G. aethnensis* D.C., *G. sagittalis* L., *G. germanica* L. oraz *G. monosperma* L (rozdz. 6 i 7). Ponadto, zoptymalizowane warunki rozdzielania HPLC połączeń bioflawonoidowych wykorzystywano do badań skryningowych biomas roślinnych otrzymanych na wszystkich etapach doświadczeń *in vitro* (rozdz. 6-12).

Tab. 1. Analiza ilościowa związków flawonoidowych w różnych częściach morfologicznych *Genista tinctoria* z upraw gruntowych (zawartość flawonoidów w mg/100g suchej masy).*

Tab. 1. Quantitative analysis of flavonoids in *Genista tinctoria* L. (flavonoid content in mg per 100g dry weight plant material).*

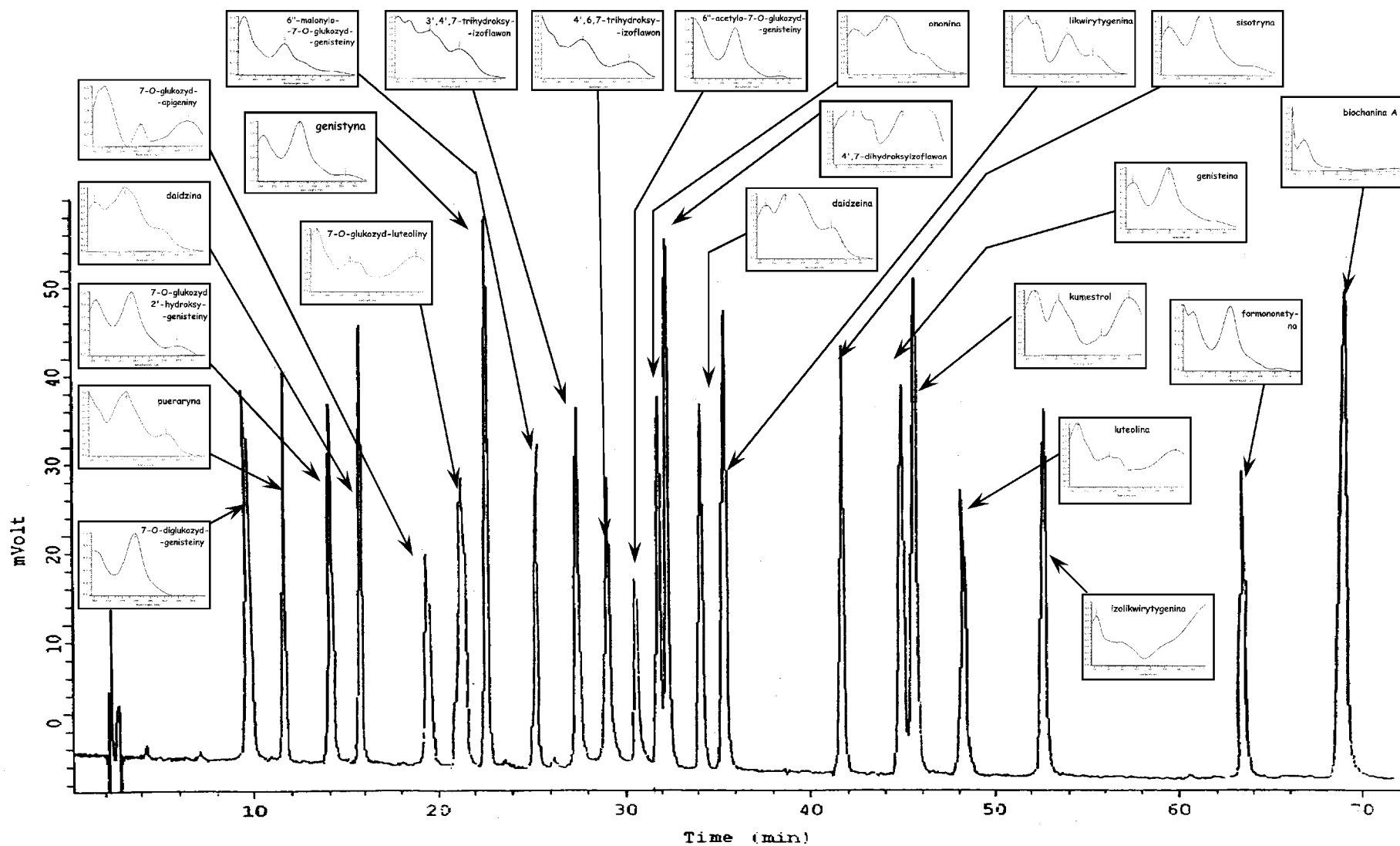
Związek	Pędy	Kwiaty	Korzenie
7-O-diglukozyd genisteiny	437,94 ± 0,1	578,3 ± 0,2	531,5 ± 0,4
pueraryna	5,4 ± 0,09	5,8 ± 0,1	-
7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny	420,6 ± 0,11	593,1 ± 0,2	631,3 ± 0,1
daidzina	42,8 ± 0,21	54,4 ± 0,3	28,6 ± 0,2
7-O-glukozyd apigeniny	169,6 ± 0,15	73,2 ± 0,09	-
7-O-glukozyd luteoliny	1097,0 ± 0,1	626,5 ± 0,3	347,3 ± 0,2
genistyna	1454,2 ± 0,1	1751,8 ± 0,29	1477,9 ± 0,3
malonylogenistyna	303,7 ± 0,09	307,5 ± 0,1	374,2 ± 0,1
7,3',4'-trihydroksyflawon	11,5 ± 0,18	19,7 ± 0,14	-
acetylogenistyna	68,3 ± 0,19	74,2 ± 0,21	-
ononina	6,2 ± 0,28	9,4 ± 0,34	-
7,4'-dihydroksyflawan	6,42 ± 0,21	7,67 ± 0,01	-
daidzeina	0,3 ± 0,01	1,2 ± 0,09	11,52 ± 0,29
sisotryna	1,4 ± 0,08	3,17 ± 0,1	3,81 ± 0,09
genisteina	32,7 ± 0,13	44,2 ± 0,28	514,88 ± 0,1
luteolina	5,4 ± 0,07	1,4 ± 0,09	-
suma izoflawonów	3073,54	3422,98	3573,71
suma flawonów	1289,9	728,44	347,3
suma izoflawonów i flawonów	4063,46	4151,42	3921,01

* Wartości przedstawione w tabeli są średnimi arytmetycznymi pochodzącymi z pięciu pomiarów ± S. D.

* Each value represents the mean ± S.D. of five samples.

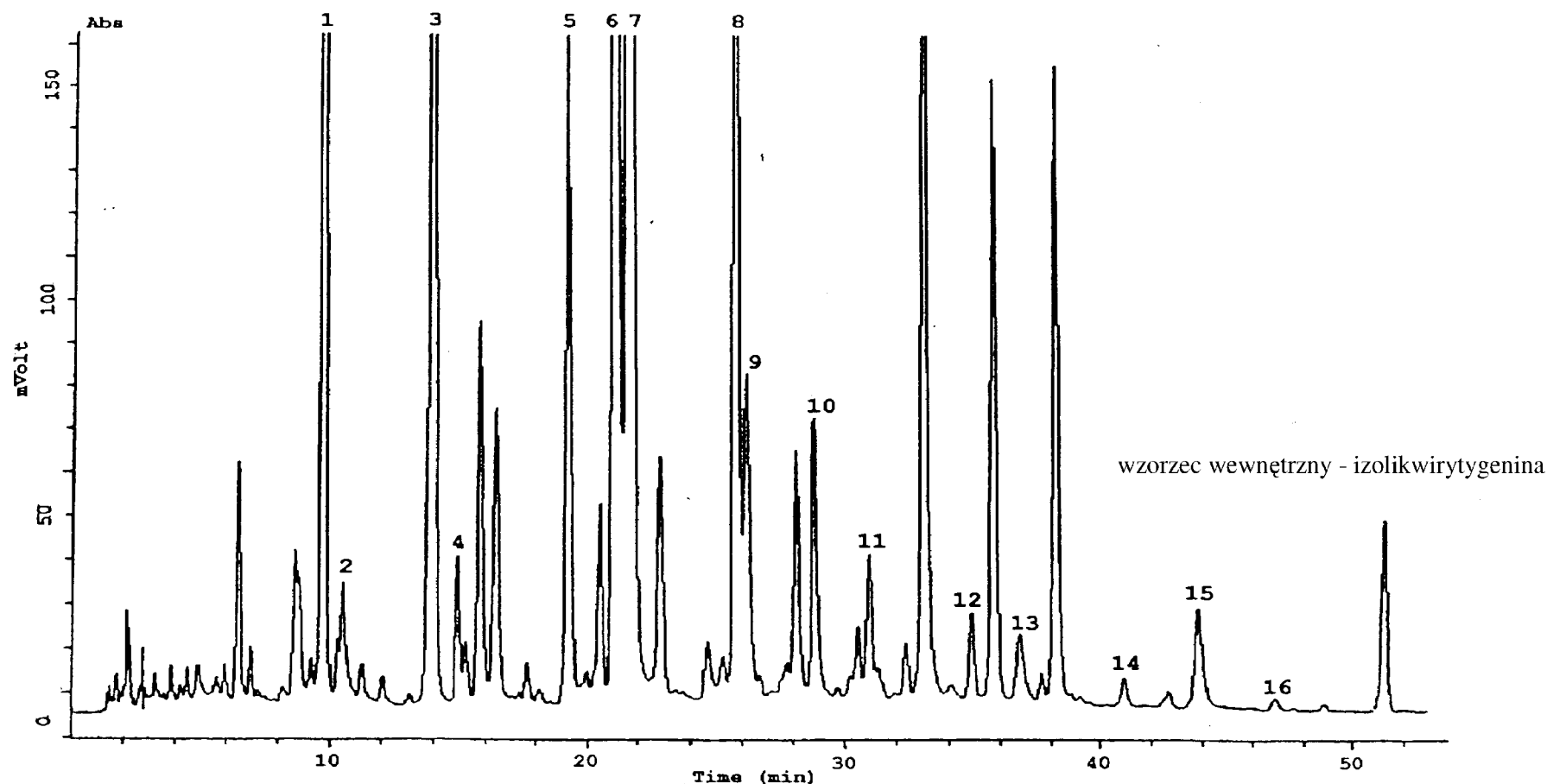
Tab. 2. Wyniki badań LC-MS i LC - DAD UV frakcji flawonoidowych w ulistnionych pędach *Genista tinctoria*.Tab. 2. Identification of flavonoids in the herb of *Genista tinctoria* L. (DAD and ESI-MS detection).

Nr piku	t_R	[M-H] ⁻		Jony fragmentacyjne		λ_{max} (nm)	Związek
		m/z	Intensywność względna (%)	m/z	Intensywność względna (%)		
1	9,8	593	100,0	431 269	70,3 69,2	258	7-O-diglukozyd genisteiny
2	10,5	271	100,0			248 303	pueraryna
3	14,0	447	94,2	285	58,3	254 318	7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny
4	15,2	415	76,5	253	100,0	248	daidzina
5	19,4	431	100,0	269	82,6	214 266 336	7-O-glukozyd apigeniny
6	21,7	447	100,0	285	46,0	205 253 346	7-O-glukozyd luteoliny
7	22,0	431	52,4	269	100,0	258 326	genistyna
8	25,8	517	59,7	431 269	100,0 74,5	260	malonylogenistyna
9	26,2	269	100,0			246 289	7,3',4'-trihydroksyflawon
10	28,9	473	98,4	431 269	54,3 82,4	258 324	acetylogenistyna
11	31,2	429	68,4	267	100,0	249	ononina
12	34,9	241	75,4			226 298	7,4'-dihydroksyflawan
13	36,5	253	100,0			208 236 300	daidzeina
14	40,9	445	49,3	283	100,0	205 249	sisotryna
15	43,9	269	100,0			205 258	genisteina
16	46,7	285	100,0			208 253 346	luteolina



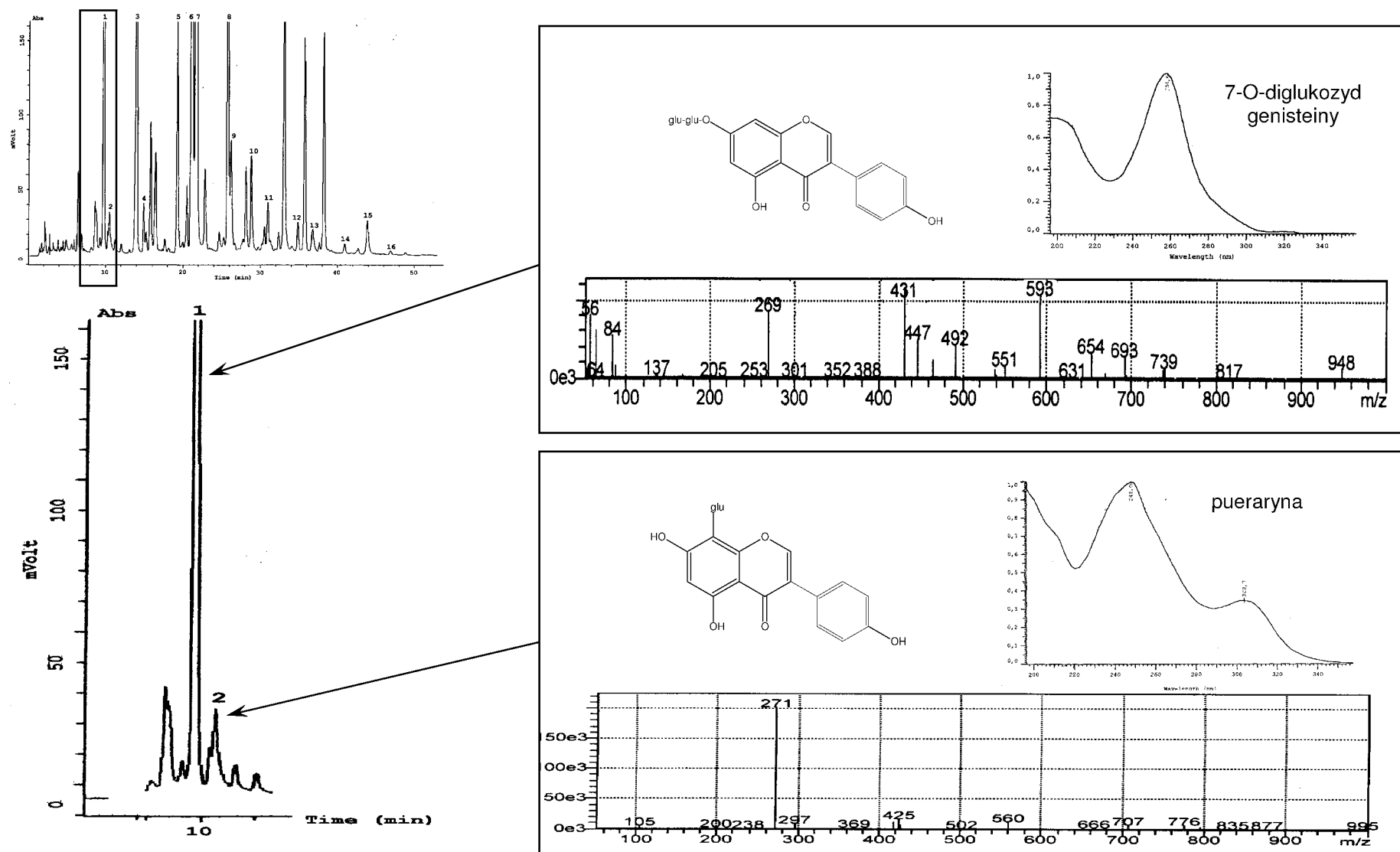
Ryc. 1. Chromatogram HPLC wzorcowych bioflawonoidów występujących w rodzaju *Genista*; detekcja DAD oraz UV ($\lambda=262$ nm).

Fig. 1. HPLC chromatogram of isoflavone standards, DAD and UV detection ($\lambda=262$ nm).



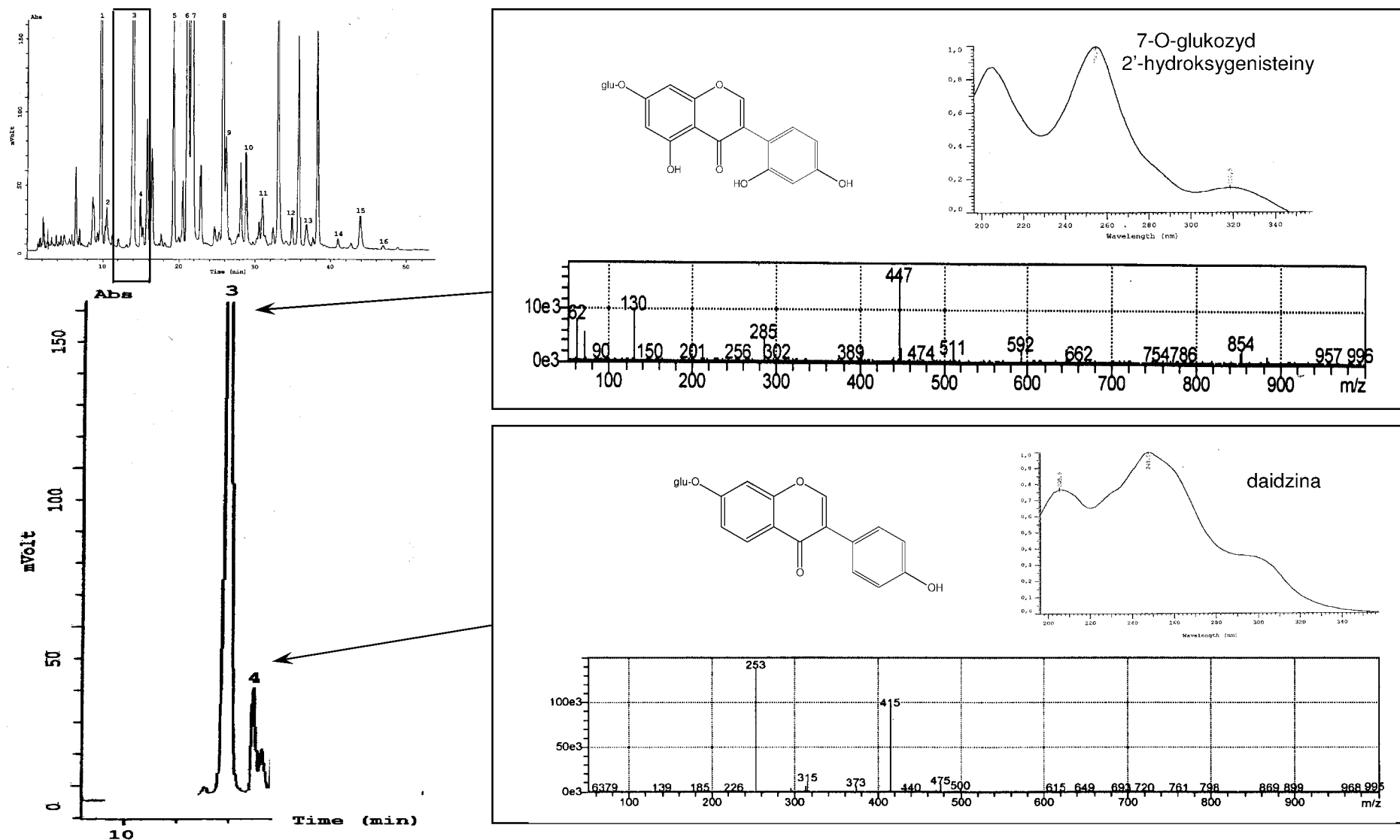
Ryc. 2. Chromatogram HPLC wyciągu metanolowego z ulistnionych pędów *Genista tinctoria* L.: 1 – 7-O-diglukozyd genisteiny; 2 – pueraryna; 3 – 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny; 4 – daidzina; 5 – 7-O-glukozyd apigeniny; 6 – 7-O-glukozyd luteoliny; 7 – 7-O-glukozyd genisteiny; 8 – 6"-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny; 9 – 7,3',4'-trihydroksyflawon; 10 – 6"-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny; 11 – ononina; 12 – 7,4'-dihydroksyizoflawan; 13 – daidzeina; 14 – sisotryna; 15 – genisteina; 16 – luteolina; wzorzec wewnętrzny – izolikwirytygenina; detekcja UV ($\lambda=262$ nm).

Fig. 2. HPLC of flavonoid fraction from *Genista tinctoria* L. herb; peaks: 1 – genistein-7-O-diglucoside; 2 – puerarin; 3 – 2'-hydroxygenistein 7-O-glucoside; 4 – daidzin; 5 – apigenin-7-O-glucoside; 6 – luteolin-7-O-glucoside; 7 – genistin; 8 – genistein-7-O-(6"-malonyl)-glucoside; 9 – 7,3',4'-trihydroxyflavone; 10 – genistein-7-O-(6"-acetyl)-glucoside; 11 – ononin; 12 – 7,4'-dihydroxyisoflavane; 13 – daidzein; 14 – sissotrin; 15 – genistein; 16 – luteolin; internal standard – isoliquiritigenin.



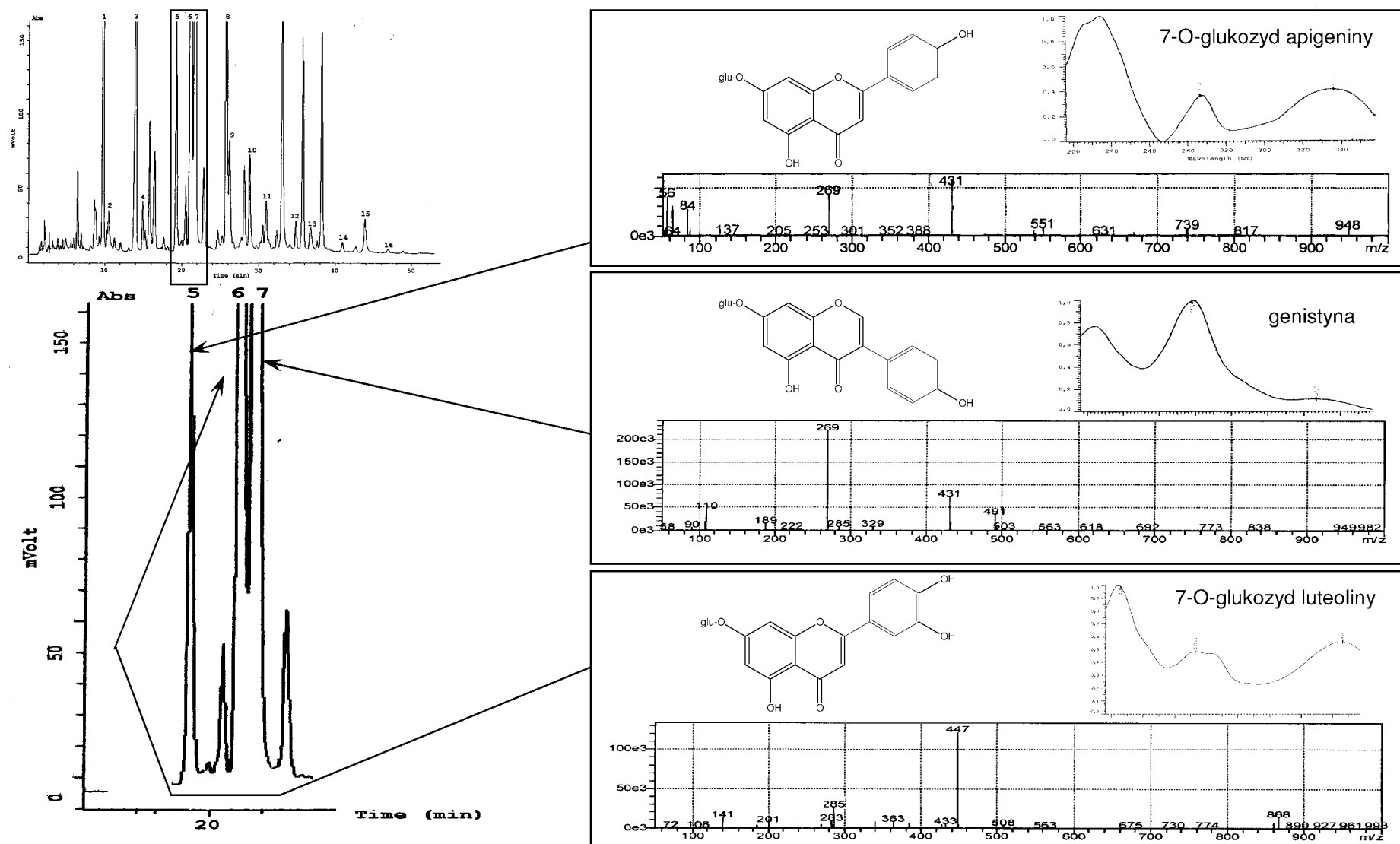
Ryc. 3. Chromatogram HPLC frakcji flawonoidowej ulistnionych pędów *Genista tinctoria* L. (detekcja DAD i ESI-MS); piki: 1 – 7-O-diglukozyd genisteiny; 2 – pueraryna.

Fig. 3. HPLC of flavonoid fraction from *Genista tinctoria* L. herb (DAD and ESI-MS detection); peaks: 1 – genistein-7-O-diglucoside; 2 – puerarin.



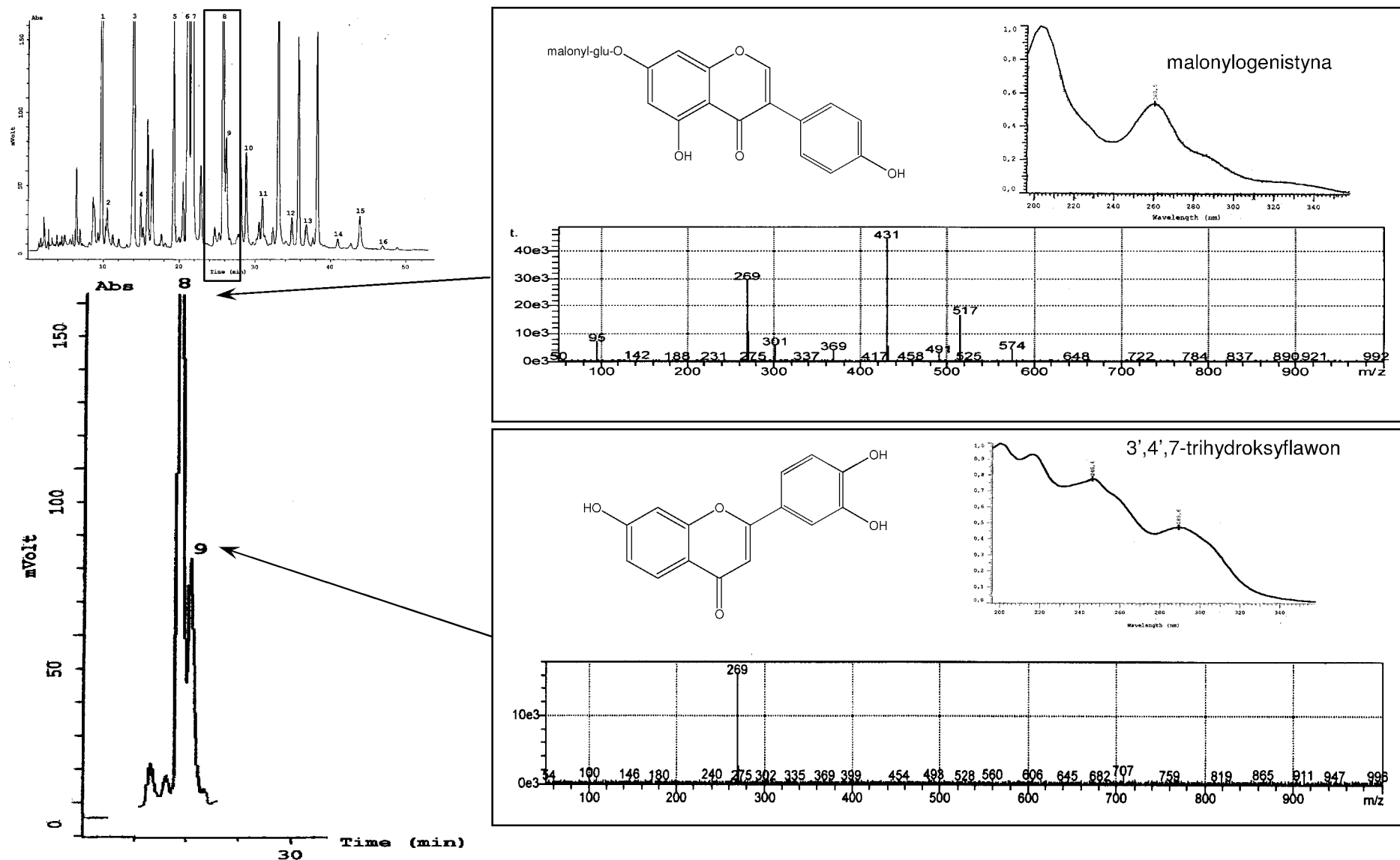
Ryc. 4. Chromatogram HPLC frakcji flawonoidowej z ulistnionych pędów *Genista tinctoria* L. (detekcja DAD i ESI-MS); piki: 3 – 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny; 4 – daidzina.

Fig. 4. HPLC of flavonoid fraction from *Genista tinctoria* L. herb (DAD and ESI-MS detection); peaks: 3 – 2'-hydroxygenistein-7-O-glucoside; 4 – daidzin.



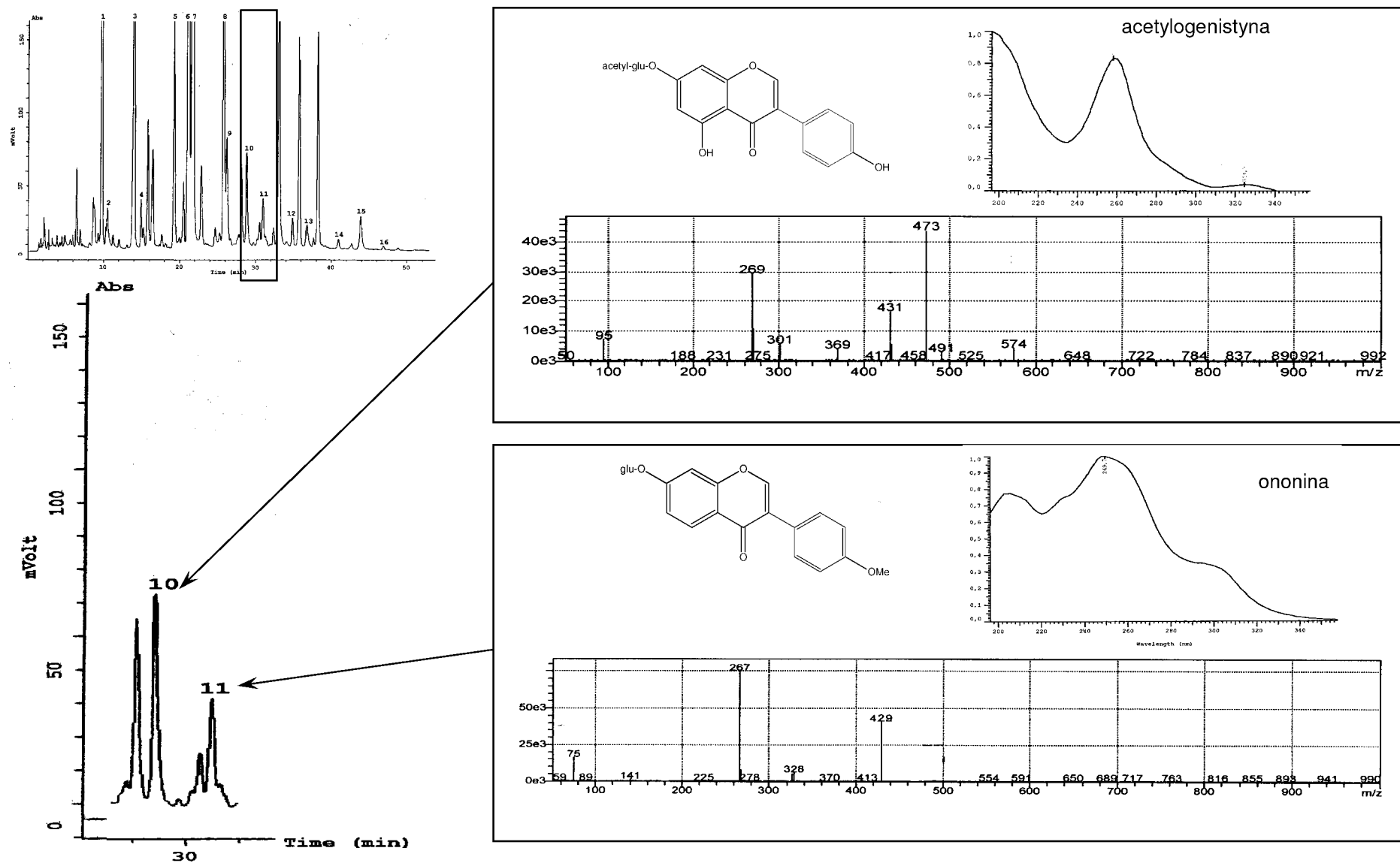
Ryc. 5. Chromatogram HPLC frakcji flawonoidowej z ulistnionych pędów *Genista tinctoria* L. (detekcja DAD i ESI-MS); piki: 5 – 7-O-glukozyd apigeniny; 6 – 7-O-glukozyd luteoliny, 7 – genistyna.

Fig. 5. HPLC of flavonoid fraction from *Genista tinctoria* L. herb (DAD and ESI-MS detection); peaks: 5 – apigenin-7-O-glucoside; 6 – luteolin-7-O-glucoside, 7 – genistin.

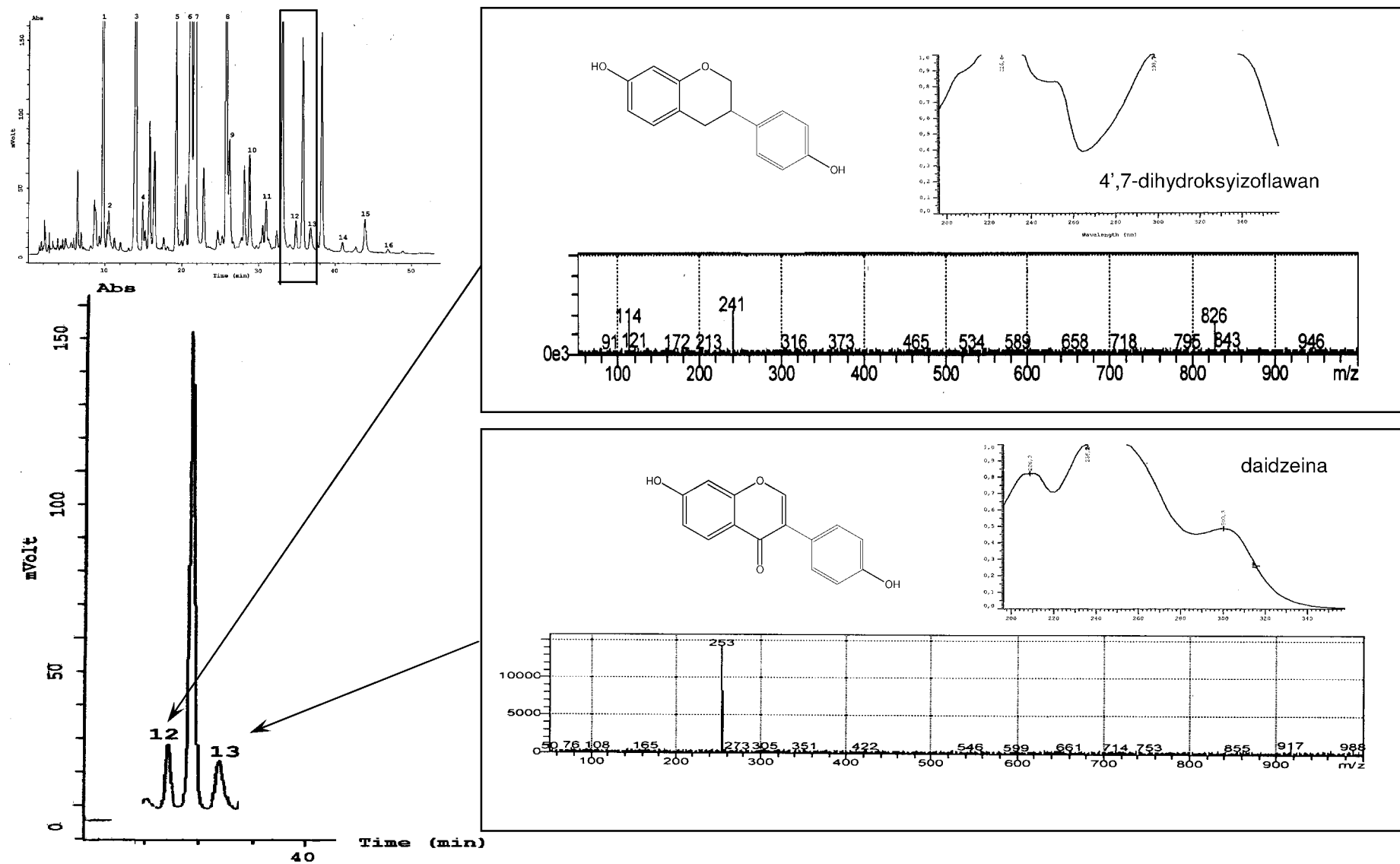


Ryc. 6. Chromatogram HPLC frakcji flawonoidowej z ulistnionych pędów *Genista tinctoria* L. (detekcja DAD i ESI-MS); piki: 8 – malonylogenistyna; 9 – 7,3',4'-trihydroksyflawon.

Fig. 6. HPLC of flavonoid fraction from *Genista tinctoria* L. herb (DAD and ESI-MS detection); peaks: 8 – genistein-7-O-(6''-malonyl)-glucoside; 9 – 7,3',4'-trihydroxyflavone.

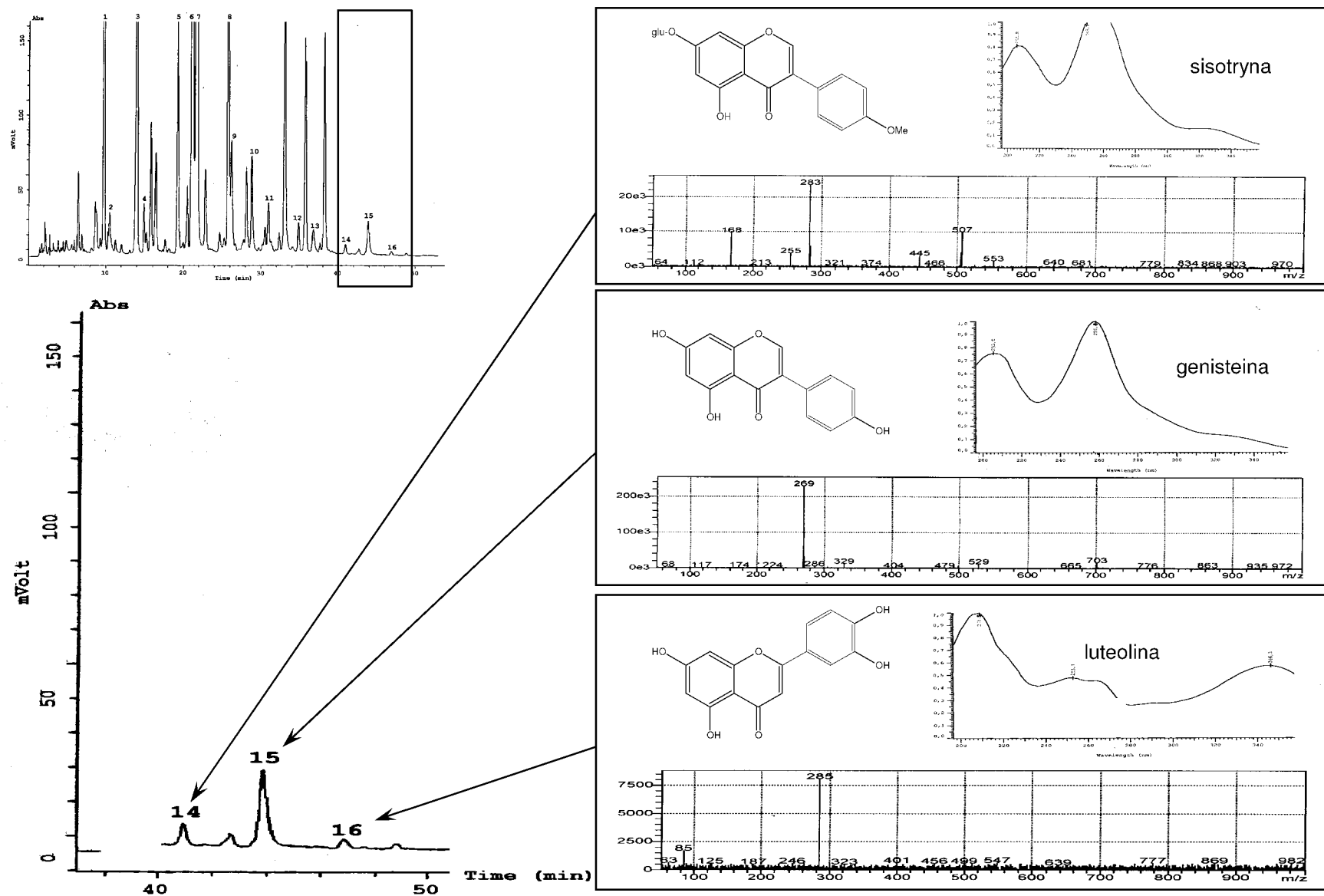


Ryc. 7. Chromatogram HPLC frakcji flawonoidowej z ulistnionych pędów *Genista tinctoria* L. (detekcja DAD i ESI-MS); piki: 10 – acetylogenistyna; 11 – ononina.
 Fig. 7. HPLC of flavonoid fraction from *Genista tinctoria* L. herb (DAD and ESI-MS detection); peaks: 10 – genistein-7-O-(6''-O-acetyl)-glucoside; 11 – ononin.



Ryc. 8. Chromatogram HPLC frakcji flawonoidowej z ulistnionych pędów *Genista tinctoria* L. (detekcja DAD i ESI-MS); piki: 12 – 7,4',-dihydroksy-izoflawan; 13 – daidzeina.

Fig. 8. HPLC of flavonoid fraction from *Genista tinctoria* L. herb (DAD and ESI-MS detection); peaks: 12 – 7,4'-dihydroxyisoflavane; 13 – daidzein.



Ryc. 9. Chromatogram HPLC frakcji flawonoidowej z ulistnionych pędów *Genista tinctoria* L. (detekcja DAD i ESI-MS); piki: 14 – sissotryna; 15 – genisteina; 16 – luteolina.
 Fig. 9. HPLC of flavonoid fraction from *Genista tinctoria* L. herb (DAD and ESI-MS detection); peaks: 14 – sissotrin; 15 – genistein; 16 – luteolin.

Piśmiennictwo

1. Aramendia M.A., Garcia I., Lafont F., Marinas J.M., Determination of isoflavones using capillary electrophoresis in combination with electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 707 (1995) 327-333.
2. Barnes S., Kirk M., Coward L., Isoflavones and Their Conjugates in Soy Foods: Extraction Conditions and Analysis by HPLC-Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2466-2474.
3. Bednarek P., Frański R., Kerhoas L., Einhorn J., Wojtaszek P., Stobiecki M., Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor, *Phytochemistry* 56 (2001) 77-85.
4. Bouë S.M., Carter-Wientjes C.H., Shih B.Y., Cleveland T.E., Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 991 (2003) 61-68.
5. Cisowski W., Dembińska-Migas W., Krauze-Baranowska M., Łuczkiwicz M., Migas P., Matysik G., Soczewiński E., Application of Planar Chromatography to the Analysis of Secondary Metabolites in Callus Cultures of Different Plant Species, *J. Planar Chromatogr.* 11 (1998) 441-446.
6. De Castro O., Cozzolino S., Jury S.L., Caputo P., Molecular relationships in *Genista* L. Sect. *Spartocarpus* Spach (Fabaceae), *Plant. Syst. Evol.* 231 (2002) 91-108.
7. de Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.Th., Analytical separation and detection methods for flavonoids, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 31-63.
8. de Rijke E., Zappy H., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.Th., Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 45-58.
9. Dixon R.A., Harrison M.J., Paiva N.L., The flavonoid phytoalexin pathway: from enzymes to genes to transcription factors, *Physiol. Plant.* 93 (1995) 385-392.
10. Dörnenburg H., Knorr D., Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures, *Enz. Microb. Technol.* 17 (1995) 674-684.
11. Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Leclercq J.Q., Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 12 (2001) 707-715.
12. Furmanowa M., Głowniak K., Sykłowska-Baranek K., Zgórka G., Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus × media* var. *Hatfieldii*, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 49 (1) (1997) 75-79.
13. Gagnon H., Tahara S., Bleichert E., Ibrahim R.K., Separation of aglucones, glucosides and prenylated isoflavones by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 606 (1992) 255-259.
14. Głowniak K., Zgórka G., Józefczyk A., Furmanowa M., Sample preparation for taxol and cephalomannine determination in various organs of *Taxus* sp., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (8-10) (1996) 1215-1220.
15. Gryniewicz G., Ksycińska H., Ramza J., Zagrodzka J., Chromatographic quantification of isoflavones (why and how), *Acta Chromatogr.* 15 (2005) 31-65.
16. Harborne J.B., Chemosystematics of the *Leguminosae*. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe *Genisteae*, *Phytochemistry* 8 (1969) 1449-1456.

17. Hrochova V., Sitaniova H., Pharmacognostic study of the taxon *Genista tinctoria* L. sensu lato, Farm. Obz. 51 (3) (1982) 131-135.
18. Hughes R.J., Croley T.R., Metcalfe Ch.D., March R.E., A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids, Int. J Mass Spectr. 210/211 (2001) 371-385.
19. Hutabarat L.S., Mulholland M., Greenfield H., Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soy bean, J. Chromatogr. A 795 (1998) 377-382.
20. Jensen A.G., Ndjoko K., Wolfender J.L., Hostettman K., Camponovo F., Soldati F., Liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry: a rapid and selective method for the quantitative determination of ginkgolides and bilobalide in ginkgo leaf extracts and phytopharmaceuticals, Phytochem. Anal. 13 (2002) 31-38.
21. Kernn L., Unterrieder I., Ruprechter R., Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. B 777 (2002) 123-128.
22. Klejdus B., Vitamvásová D., Kubán V., Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction, J. Chromatogr. A 839 (1999) 261-263.
23. Klejdus B., Vitamvásová-Štěbrová D., Kubán V., Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pretense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction, Anal. Chim. Acta 450 (2001) 81-97.
24. Krauze-Baranowska M., Bączek T., Głód D., Kaliszan R., Wollenweber E., HPLC separation of O-acylated flavonoids and biflavonoids from some species from *Gymnospermae*, Chromatographia 60 (1/2) (2004) 9-15.
25. Ksycińska H., Sobik B., Popiołkiewicz J., Polkowski K., Krzeczyński P., Ramza J., Pucko W., Gryniewicz G., Determination of new derivatives of genistein in culture media by liquid chromatography, J. Chromatogr. B 799 (2004) 217-231.
26. Lucumi E., Łuczkiwicz M., Vera A., Hallard D., van der Heijden R., Verpoorte R., Alkaloid formation in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* after feeding of tryptamine and loganin, Biotechnol Lett. 23 (20) (2001) 1694-1696.
27. Łuczkiwicz M., Cisowski W., The RP-HPLC analysis of anthocyanins, Chromatographia 48 (5/6) (1998) 360-364.
28. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Gryniewicz G., Bączek T., Kaliszan R., Isoflavones of estrogenic activity in tissue cultures of *Glycine soja* and *Genista tinctoria*, w: Amado R. i in. (Ed.), Bioactive compounds in plant foods: health effects and perspectives for the food industry, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002, str. 147-148.
29. Łuczkiwicz M., Piotrowski A., Two-Stage System for Micropropagation of Several *Genista* Plants Producing Large Amounts of Phytoestrogens, Z. Naturforsch. 60c (2005) 557-566.
30. Łuczkiwicz M., Cisowski W., Majewska E., High-performance liquid chromatographic determination of polymethoxylated flavonols in soil-grown plant and *in vitro* cultures of *Rudbeckia hirta* L., Acta Pol. Pharm.-Drug Res. 55 (2) (1998) 143-147.
31. Ma X., Tu P., Chen Y., Zhang T., Wei Y., Ito Y., Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mogholicus* (Bge.) Hsiao by high-speed counter-current chromatography, J. Chromatogr. A 992 (2003) 193-197.
32. March R.E., Miao X.Sh., Metcalfe Ch.D., Stobiecki M., Marczak Ł., A fragmentation study of an isoflavone glycoside, genistein-7-O-glucoside, using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution, Int. J. Mass Spectr. 232 (2004) 171-183.

33. Mitani K., Narimatsu S., Kataoka H., Determination of daidzein and genistein in soybean foods by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 169-177.
34. Morton M., Arisaka O., Miyake A., Evans B., Analysis of phyto-oestrogens by gas chromatography-mass spectrometry, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7 (1999) 221-225.
35. Müllner C., Sontag G., Determination of some phytoestrogens in soybeans and their processed products with HPLC and coulometric electrode array detection, *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 261-265.
36. Nakov N., Akhtardzhiev Kh., Flavonoid content of some representatives of the genus *Genista* in Bulgaria, *Prob. Farm.* 10 (1982) 46-52.
37. Piątczak E., Wielanek M., Wysockińska H., Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centurium erythraea* Rafn, *Plant Sci.* 168 (2) (2005) 431-437.
38. Pietta P., Mauri P., Determination of isoflavones from *Ononis spinosa* L. extracts by high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode-array detection, *J. Chromatogr.* 513 (1990) 397-400.
39. Queiroz E.F., Wolfender J.L., Atindehou K.K., Traore D., Hostettmann K., On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic microfractionation, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 123-134.
40. Rao S.R., Ravishankar G.A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 101-153.
41. Rostagno M.A., Araujo J.M.A., Sandi D., Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour, *Food Chem.* 78 (2002) 111-117.
42. Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G., Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 119-128.
43. Shihabi Z.K., Kute T., Garcia L.L., Hinsdale M., Analysis of isoflavonoids by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 181-185.
44. Stobiecki M., Wojtaszek P., Application of gas chromatography-mass spectrometry to the identification of isoflavonoids in lupine root extracts, *J. Chromatogr. B* 508 (1990) 391-398.
45. Stobiecki M., Malosse C., Kerhoas L., Wojtaszek P., Einhorn J., Detection of isoflavonoids and their glycoside by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry in lupin (*Lupinus albus*) root extract, *Phytochem. Anal.* 10 (1999) 198-207.
46. Stobiecki M., Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides, *Phytochemistry* 54 (2000) 237-256.
47. Ulubelen A., Cetin E.T., Guran A., Iyengar M.A., Flavonoid compounds of *Genista tinctoria*, *Lloydia* 34 (2) (1971) 258-259.
48. van Rensen I., Veit M., van Rensen U.R., Cantó P., Vogt H., Greinwald R., Czygan F.Ch., Line-scatter plots in chemotaxonomy of *Genista* L. Section *Spartenoides* SPACH in Western Europe, *Biochem. System. Ecol.* 27 (1999) 687-708.
49. Wang Ch.Ch., Prasain J.K., Barnes S., Review of the methods used in the determination of phytoestrogens, *J. Chromatogr. B* 777 (2002) 3-28.
50. Wang Ch.Y., Huang H.Y., Kuo K.L., Hsieh Y.Z., Analysis of *Pueraria radix* and its medicinal preparations by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 802 (1998) 225-231.

51. Wang H., Murphy P.A., Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1666-1673.
52. Wolfender J.L., Ndjoko K., Hostettmann K., Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 437-455.

14. ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA-TLC ALKALOIDÓW CHINOLIZYDYNOWYCH W CZĘŚCIACH NADZIEMNYCH ORAZ KULTURACH *IN VITRO* WYBRANYCH GATUNKÓW Z RODZAJU *GENISTA*

Wstęp

Alkaloidy chinolizydynowe, obok izoflawonów, stanowią najliczniejszą grupę wtórnych metabolitów syntetyzowanych przez rośliny należące do kilku spokrewnionych ze sobą plemion rodziny *Fabaceae* [2,3,7,9,23,28]. Przeprowadzone badania farmakologiczne wykazały, że poszczególne połączenia, należące do omawianej klasy związków, zmniejszają wrażliwość autonomicznych zwojów w sercu oraz pobudzają ośrodki nerwu błędnego, powodując tym samym zwolnienie akcji serca [1,7,15,28,29]. Opisywana aktywność biologiczna, której towarzyszy rozszerzenie naczyń krwionośnych spowodowała, że alkaloidy chinolizydynowe jeszcze do niedawna wykorzystywane były w leczeniu nadciśnienia tętniczego [15,28]. Obecnie związki te budzą zainteresowanie jedynie ze względu na silne działanie neuro- i hepatotoksyczne [1,15,28]. Ponadto, wykorzystuje się je jako czynniki chemotaksonomiczne w klasyfikacji poszczególnych gatunków w obrębie rodziny *Fabaceae* [7,13,28].

Doświadczenia biotechnologiczne nad wybranymi roślinami z rodzaju *Genista* wykazały, że wprowadzenie badanych gatunków do kultur *in vitro* wiązało się z zasadniczą zmianą metabolizmu wtórnego hodowanych biomas w zakresie połączeń flawonoidowych (rozdz. 6 i 7). W ramach badań prezentowanych w niniejszym rozdziale postanowiono sprawdzić, czy w wyniku kultywacji janowców w warunkach *in vitro* doszło również, w poszczególnych biomasach, do zmian w akumulacji toksycznych alkaloidów chinolizydynowych. Zasadniczym celem dysertacji było otrzymanie, w oparciu o kultury *in vitro* janowców, systemu hodowlanego, z przeznaczeniem do wybiórczej produkcji znacznych ilości fitoestrogenów pochodzenia izoflawonoidowego. Obecność w namnażanych biomasach alkaloidów chinolizydynowych wiązałaby się z koniecznością opracowania, dla badanych matryc roślinnych, procedur izolacji frakcji flawonoidowych z uwzględnieniem czasochłonnego etapu oczyszczania wyciągów od „balastów” alkaloidowych. Korzystne było więc wyselekcjonowanie, na początkowym etapie badań biotechnologicznych, biomas roślinnych charakteryzujących się brakiem alkaloidów chinolizydynowych bądź ich niską zawartością. Omawiane prace doświadczalne wymagały ciągłego monitorowania namnażanych tkanek pod kątem obecności połączeń alkaloidowych. Z uwagi na konieczność przebadania znacznej ilości biomas z kultur *in vitro* oraz z upraw gruntowych zasadniczym celem prezentowanych badań było opracowanie metody chromatograficznego rozdzielania badanych związków umożliwiającej, w jak najkrótszym czasie, przeprowadzenie analizy jak największej ilości próbek bez konieczności ich wieloetapowego oczyszczania, bądź derywatyzacji [5,19,27].

Obok nielicznych doniesień odnośnie stosowania w analizach alkaloidów chinolizydynowych wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [4,21,30,36] oraz elektroforezy kapilarnej [21,25], z danych literaturowych wynika, że techniką z wyboru w badaniach tej grupy związków, obok TLC [3,6,9,16,21,23], jest chromatografia gazowa, na kolumnach kapilarnych (GLC) z zastosowaniem wysoce specyficznego detektora fosforowo-azotowego (PNP) [21,30-35]. Oprócz TLC wszystkie wyżej wymienione techniki chromatografowania wymagają zastosowania drogiego sprzętu i wiążą się z czasochłonnym przygotowaniem próbek oraz długim czasem pojedynczej analizy [4,21,25,30-36]. Z uwagi na powyższe, w badaniach

skryningowych biomas janowców ukierunkowanych na połączenia alkaloidowe, zdecydowano się wykorzystać chromatografię cienkowarstwową - TLC.

W początkowym etapie doświadczeń postanowiono opracować metodę chromatograficznego rozdzielania techniką TLC 9 - składnikowego zespołu wzorcowych alkaloidów chinolizydynowych występujących powszechnie w rodzaju *Genista* (tab. 1) [1-3,7,9,13,15,23,28]. Zoptymalizowaną metodę rozdzielania zamierzano następnie wykorzystać do separacji frakcji alkaloidowych występujących w częściach nadziemnych oraz kulturach *in vitro* (kalusy oraz hodowle mikropędów) badanych janowców. Jednocześnie postanowiono określić skład jakościowy badanych matryc roślinnych w zakresie połączeń alkaloidowych, na podstawie analizy TLC badanych wyciągów wobec substancji wzorcowych.

Materiały i metody

Materiał roślinny

W zakresie połączeń alkaloidowych przebadano części nadziemne sześciu gatunków z rodzaju *Genista* (*G. tinctoria* L., *G. radiata* L., *G. sagittalis* L., *G. germanica* L., *G. aethnensis* D.C. oraz *G. monosperulana* L.), zebranych w okresie kwitnienia w Ogrodzie Roślin Leczniczych Katedry i Zakładu Farmakognozji Akademii Medycznej w Gdańsku, w 2003 roku. Tożsamość poszczególnych gatunków potwierdzono po izolacji DNA roślinnego i porównaniu otrzymanych sekwencji z biblioteką danych GeneBank [20]. Analizie chromatograficznej poddano ponadto biomasy powyższych janowców pochodzące z kultur *in vitro* (kalusy oraz kultury mikroroślinek poszczególnych gatunków kultywowane na zmodyfikowanych podłożach Schenk- Hildebrandt'a – rozdz. 6 i 7).

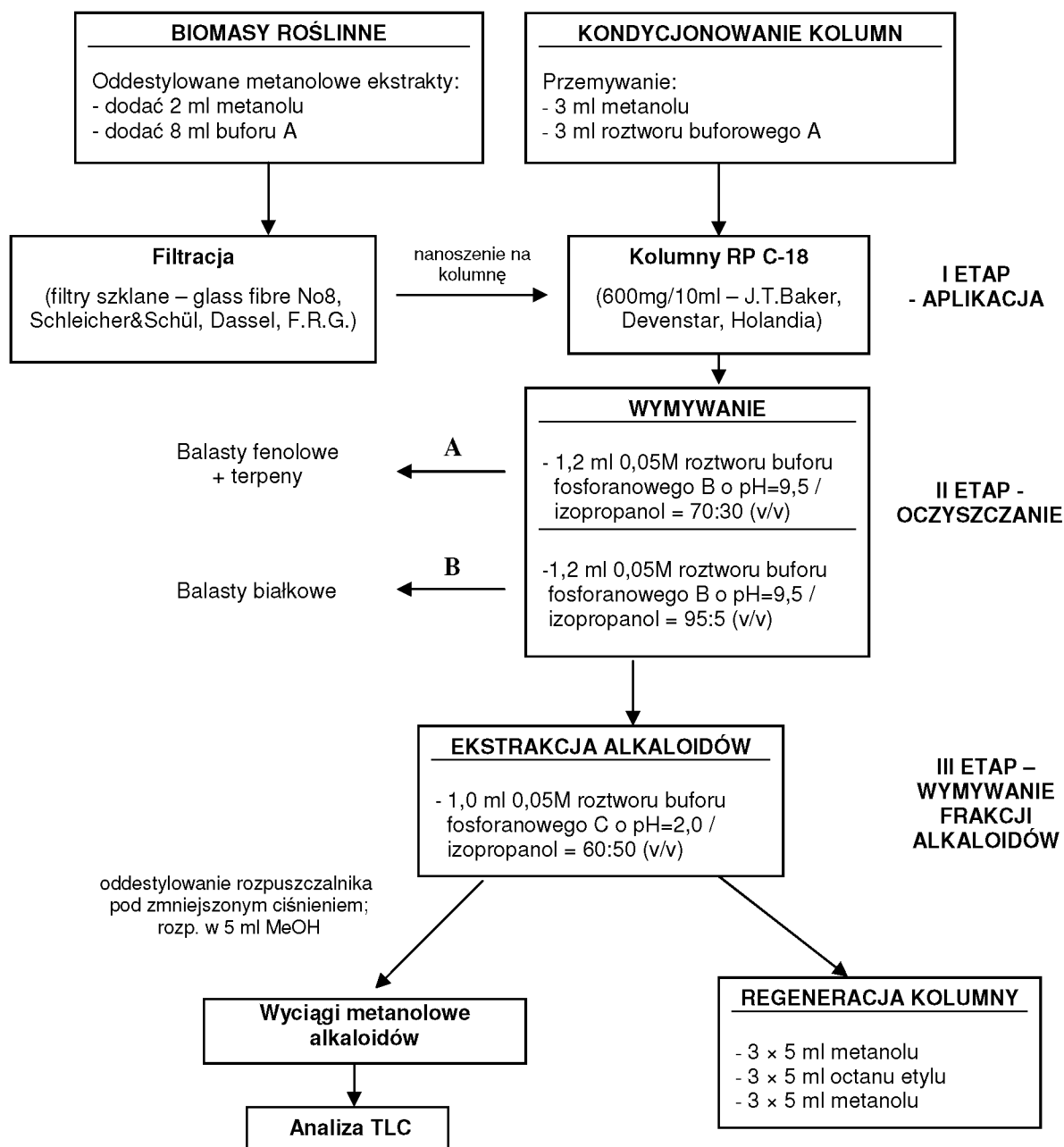
Ekstrakcja oraz analiza chromatograficzna frakcji alkaloidowych z kultur in vitro oraz części nadziemnych roślin gruntowych

Odczynniki chemiczne oraz substancje wzorcowe

Do ekstrakcji i oczyszczania frakcji alkaloidowych oraz sporządzania faz ruchomych, stosowanych na etapie analiz TLC, użyto rozpuszczalników o analitycznym stopniu czystości takich jak: 25% amoniak, cykloheksan, chloroform, octan etylu (POCH Gliwice), acetonitryl, metanol, woda, 36% kwas solny, izopropanol (J.T. Baker, USA) oraz dimetyloaminę (Sigma, USA). Bufory fosforanowe, stosowane na etapie ekstrakcji wyciągów roślinnych do fazy stałej (SPE) przygotowano na bazie sodowego fosforanu dwuzasadowego (Na_2HPO_4), sodowego fosforanu jednozasadowego (NaH_2PO_4), oraz kwasu ortofosforowego (H_3PO_4) (J.T. Baker, USA). Roztwory buforowe przechowywano w chłodni, w temp. $\pm 5^\circ\text{C}$. Wzorce alkaloidów chinolizydynowych (tab. 1) otrzymano z Fluka (Szwajcaria).

Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej

Zliofilizowany i sproszkowany materiał roślinny (500 mg części nadziemnych roślin gruntowych oraz kalusów i kultur pędowych poszczególnych gatunków) ekstrahowano czterokrotnie 100% metanolem ($4 \times 125\text{ ml}$) z zastosowaniem homogenizatora (Ultraturax DI 25, IKA Werke, Niemcy) przez 30 min., w temperaturze pokojowej ($\pm 20^\circ\text{C}$). Powstałe zawiesiny sączono próżniowo przez sączek Büchnera, zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem (temp. $\pm 35^\circ\text{C}$) i oczyszczano od substancji balastowych, zgodnie z procedurą przedstawioną na schemacie (ryc. 1) [19,27]. Oczyszczone wyciągi alkaloidowe zagęszczano ponownie do syropowatej konsystencji (temp. $\pm 35^\circ\text{C}$) a otrzymane pozostałości rozpuszczano w 10 ml 100% metanolu i przeznaczono do analiz TLC.



Roztwór buforowy A = 0,05M bufor fosforanowy o pH=7,0
 Roztwór buforowy B = 0,05M bufor fosforanowy o pH=9,5
 Roztwór buforowy C = 0,05M bufor fosforanowy o pH=2,0
 Buffer solution A = 0.05M sodiumphosphate solution; pH=7.0
 Buffer solution B = 0.05M sodiumphosphate solution; pH=9.5
 Buffer solution C = 0.05M sodiumphosphate solution; pH=2.0

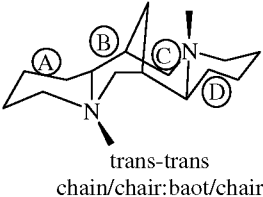
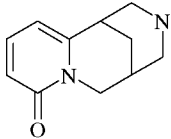
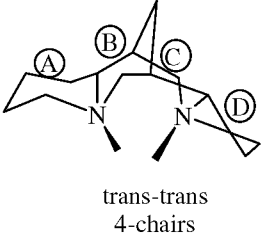
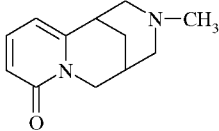
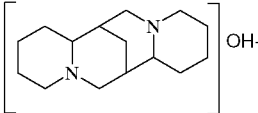
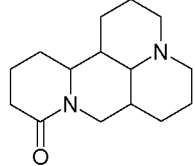
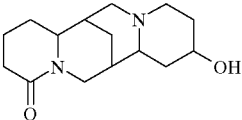
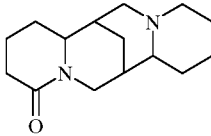
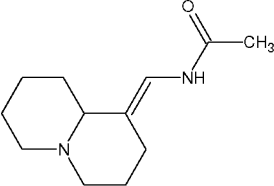
Ryc. 1. Protokół ekstrakcji do fazy stałej (SPE) zespołu alkaloidów chinolizydynowych występujących w kulturach *in vitro* i częściach nadziemnych wybranych gatunków z rodzaju *Genista*.
 Fig. 1. Solid Phase Extraction (SPE) protocol of quinolizidine alkaloids from the herb and *in vitro* cultures of several *Genista* species.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Analizy TLC przeprowadzono na szklanych płytkach (10 × 10 cm) pokrytych żelem krzemionkowym (Silica Si 60), żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami diolowymi (DIOL F_{254s}) oraz żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktaacylowymi (RP-18W F_{254s}; HPTLC) (Merck, Darmstadt, Niemcy). 0,1% roztwory metanolewe alkaloidów wzorcowych (tab. 1) nanoszono na płytki w ilości 0,5 µl pojedynczo lub w 9-składnikowej mieszaninie, techniką pasmową.

Tab. 1. Struktury wzorcowych alkaloidów chinolizydynowych.

Tab. 1. The structures of quinolizidine alkaloid standards.

<i>sparteina</i>	 trans-trans chain/chair:baot/chair	<i>cytyzyna</i>	
<i>α-izosparteina</i>	 trans-trans 4-chairs	<i>metrylocytyzyna</i>	
<i>retamina</i>		<i>sofokarpina</i>	
<i>hydroksylupanina</i>		<i>lupanina</i>	
<i>lusitanina</i>			

Wyciągi roślinne nanoszono na płytki w ilości 5,0 µl w formie 5 mm pasm. Stosowane w jednokierunkowej TLC układy faz ruchomych przedstawiono w tabeli 2. Chromatogramy rozwijano na dystansie 5 cm, w temp. pokojowej (22 ± 1 °C; wilgotność 60%), w pionowej komorze Chrop'a (200 mm×200 mm; Standard-Trennkammern, Fisher Scientific, Holandia). W celu uniknięcia efektów demiksji, przed analizą, komory wysycano świeżo sporządzonymi fazami ruchomymi, przez 30 min. Dokumentację rozdziałów TLC stanowią fotografie (ryc. 2-4) oraz tabela 3.

Tab. 2. Charakterystyka faz stacjonarnych i ruchomych stosowanych w jednokierunkowej TLC.
 Tab. 2. *The one dimensional TLC systems used.*

Nr	Skład fazy ruchomej	Stężenia modyfikatorów [% , v/v]	Faza stacjonarna
I	cykloheksan: dietyloamina	100+0; 90+10; 80+20; 70+30; 60+40; 50+50	żel krzemionkowy (Silica Si 60),
II	chloroform:metanol: 25% amoniak	100+0+1; 95+5+1; 90+10+1; 85+15+1	żel krzemionkowy (Silica Si 60); żel krzemionkowy modyfik. (DIOL F _{254s})
III	acetonitryl:woda: 36% kwas solny	30+100+5; 30+100+6; 30+100+7; 30+100+10; 30+100+15; 30+100+20	żel krzemionkowy modyfik. (RP-18W F _{254s}) żel krzemionkowy modyfik. (DIOL F _{254s})

Dwukierunkową TLC (2D TLC) przeprowadzono na płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami diolowymi (DIOL F_{254s}). Chromatogramy rozwijano w dwóch kierunkach stosując optymalne fazy ruchome:

1 kierunek:

- chloroform-metanol- 25% roztwór amoniaku, 85:15:1 (v/v/v) – **faza ruchoma I**

2 kierunek:

- acetonitryl - woda - 36% roztwór kwasu solnego, 30:100:7 (v/v/v) – **faza ruchoma II**.

Po rozwinięciu w pierwszym kierunku, płytki chromatograficzne, przed ponownym umieszczeniem w komorze Chrop'a, suszono w strumieniu powietrza (10 min).

W dwukierunkowej TLC, z gradientem fazy stacjonarnej, do rozdzielania mieszaniny alkaloidów, w pierwszym kierunku, stosowano płytki pokryte żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami diolowymi (DIOL F_{254s}) oraz fazę ruchomą I. Rozwinięte pasma alkaloidów przerzucano następnie na płytkę pokrytą żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktadecylowymi (RP-18W F_{254s}; HPTLC) za pomocą fazy ruchomej II. Powyższa faza ruchoma stosowana była również do rozdzielania alkaloidów chinolizydynowych w drugim kierunku. Płytki szklane pokryte różnymi złożami łączono, na długości 2 mm, za pomocą urządzenia skonstruowanego w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji, przez dr. Piotra Migasa. Procedura ta umożliwiała pionowe ustawienie połączonych płytek chromatograficznych w komorze Chrop'a (ryc. 5). Otrzymane w toku analizy chromatogramy wywoływano odczynnikami Dragendorff'a [16], ogrzewano w temp. 100 ± 5 °C przez 3 min, a następnie analizowano w świetle dziennym. Dokumentację rozdziałów frakcji alkaloidowych za pomocą 2D TLC, w gradiencie fazy stacjonarnej, stanowią fotografie (ryc. 6-8) i tab. 3.

Omówienie wyników

W wyniku przeprowadzonych badań zoptymalizowano warunki rozdziału techniką dwukierunkowej TLC, z gradientem fazy stacjonarnej, mieszaniny, blisko spokrewnionych strukturalnie, 9 alkaloidów chinolizydynowych oraz wyciągów alkaloidowych otrzymanych z części nadziemnych oraz kultur *in vitro* wybranych gatunków z rodzaju *Genista* (ryc. 3-8, tab. 3).

Przygotowanie oczyszczonych wyciągów alkaloidowych do badań chromatograficznych

W przypadku badań fitochemicznych frakcji alkaloidowych, występujących w częściach nadziemnych i kulturach *in vitro* roślin z rodzaju *Genista*, bardzo istotnym etapem prowadzonych doświadczeń było otrzymanie oczyszczonych, od substancji balastowych, wyciągów z przeznaczeniem do dalszych analiz chromatograficznych. Liczne doniesienia literaturowe dotyczące alkaloidów chinolizydynowych wskazują, że związki z tej klasy należą do słabych zasad [2,15,16,21,23,29]. Z tego względu do ekstrakcji omawianych połączeń z matryc roślinnych stosuje się obojętne rozpuszczalniki organiczne, w tym najczęściej metanol [3,9,14,19,23,27,35]. Przyjęcie takiej procedury doświadczalnej powoduje, że w pierwotnych wyciągach metanolowych, obok alkaloidów, obecne są związki o charakterze balastów, takie jak: cukry, białka, żywice oraz barwniki roślinne, utrudniające zasadniczo późniejszą analizę obecnych w ekstraktach alkaloidów [16,21,29]. W większości metod oczyszczania „surowych” wyciągów alkaloidowych, od substancji towarzyszących, wykorzystuje się zmienną rozpuszczalność alkaloidów, występujących jako wolne lub protonowane zasady, w rozpuszczalnikach różniących się polarnością oraz pH [3,6,9,14,16,23,27,29,30]. Pierwotne ekstrakty metanolowe, otrzymane z biomas badanych janowców, postanowiono oczyścić od substancji balastowych stosując procedurę opracowaną uprzednio dla alkaloidów indolowych występujących w kulturach *in vitro* *Tabernaemontana divaricata* [14,19,27]. Zarówno alkaloidy chinolizydynowe, jak i indolowe należą do słabych zasad, uznano więc, że metoda oczyszczania pierwotnych frakcji alkaloidowych z kultur *Tabernaemontana divaricata* może okazać się odpowiednia również w przypadku wyciągów metanolowych z biomas janowców.

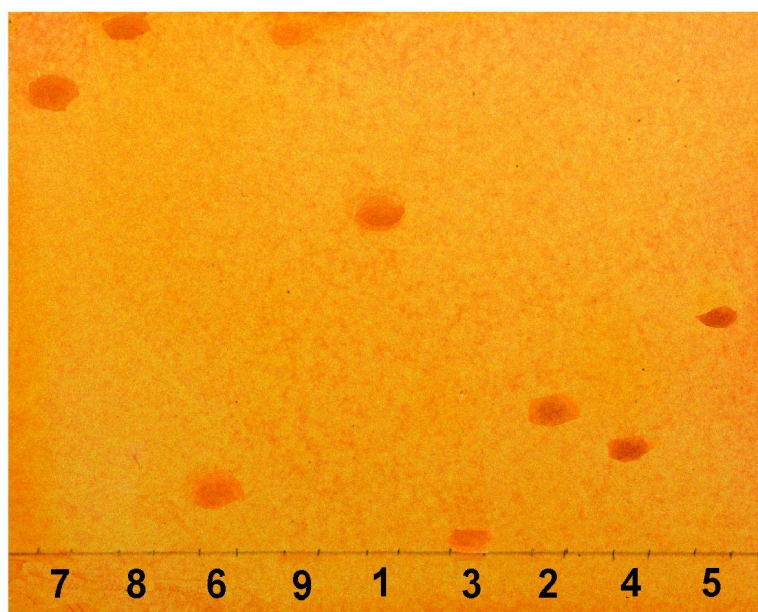
Przyjęta procedura postępowania miała charakter wieloetapowy (ryc. 1). Obejmowała ona ekstrakcję pierwotnych wyciągów metanolowych do fazy stałej (kolumnienki SPE wypełnione żelalem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktadecylowymi – RP-18). Na poszczególnych etapach aplikacji, oczyszczania oraz wymywania frakcji alkaloidowych stosowano fazy ruchome stanowiące mieszaniny izopropanolu oraz buforów fosforanowych, różniące się polarnością, pH oraz siłą elucyjną (ryc. 1). Analiza TLC wyciągów otrzymanych na wszystkich etapach ekstrakcji SPE wykazała skuteczność przyjętej procedury w oczyszczaniu frakcji alkaloidowych występujących w biomasach janowców (brak alkaloidów w eluatach na etapie aplikacji i oczyszczania oraz obecność badanych związków w wyciągach otrzymanych w fazie wymywania – ryc. 1).

Pierwotne wyciągi metanolowe, zawierające alkaloidy chinolizydynowe występujące w postaci wolnych zasad, nanoszono na kolumnienki SPE kondycjonowane uprzednio w roztworze buforu fosforanowego o pH 7, co umożliwiło całkowitą retencję badanych związków na fazie stacjonarnej [14,19,27]. Wymywanie balastów (związki fenolowe, cukry oraz białka) uzyskano w procesie dwuetapowym, stosując fazy ruchome charakteryzujące się znaczną polarnością oraz wysokim pH (ryc. 1). W opisywanych warunkach alkaloidy jako wolne zasady zatrzymywane były na kolumnienkach SPE. Całkowite wymywanie, z fazy stacjonarnej, badanych związków, w postaci protonowanych zasad, umożliwiło dopiero zastosowanie buforu fosforanowego o pH 2. Znaczny dodatek izopropanolu w fazie ruchomej przyspieszył wymywanie badanych związków z fazy stacjonarnej (zwiększenie siły elucyjnej) oraz umożliwił

zagęszczenie badanych frakcji alkaloidowych. Kolumnienki SPE, między kolejnymi aplikacjami, przemywano w szeregu eluotropowym (ryc. 1), co pozwoliło na ich wielokrotne stosowanie (około 10 razy). Oczyszczone wyciągi alkaloidowe po rozpuszczeniu w metanolu, przeznaczono do dalszych analiz chromatograficznych.

Analiza TLC alkaloidów chinolizydynowych

Zgodnie z celem pracy optymalizację separacji TLC alkaloidów chinolizydynowych przeprowadzono na 9-składnikowej mieszaninie substancji wzorcowych, zbliżonych pod względem budowy chemicznej (tab. 1). W oparciu o dane literaturowe [3,6,9,16,21,23], wstępnego rozdziału alkaloidów wzorcowych, dokonano stosując jednokierunkową TLC na płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym (Silica Si 60). Fazę ruchomą stanowiły, w tym wypadku mieszaniny cykloheksanu i dimetyloaminy (ryc. 9) bądź chloroformu, metanolu i amoniaku (ryc. 10). W opisywanych warunkach nie uzyskano całkowitego rozdziału badanych związków. Zmiany stężenia cykloheksanu ze 100 % do 50% i dimetyloaminy z 0% do 50% w fazie ruchomej nie spowodowały znaczącego wzrostu selektywności rozdziału (ryc. 9). Najlepsze wyniki otrzymano w przypadku, gdy fazę ruchomą stanowiła mieszanina cykloheksanu i dimetyloaminy w stosunku 70:30 (v/v) (ryc. 2).

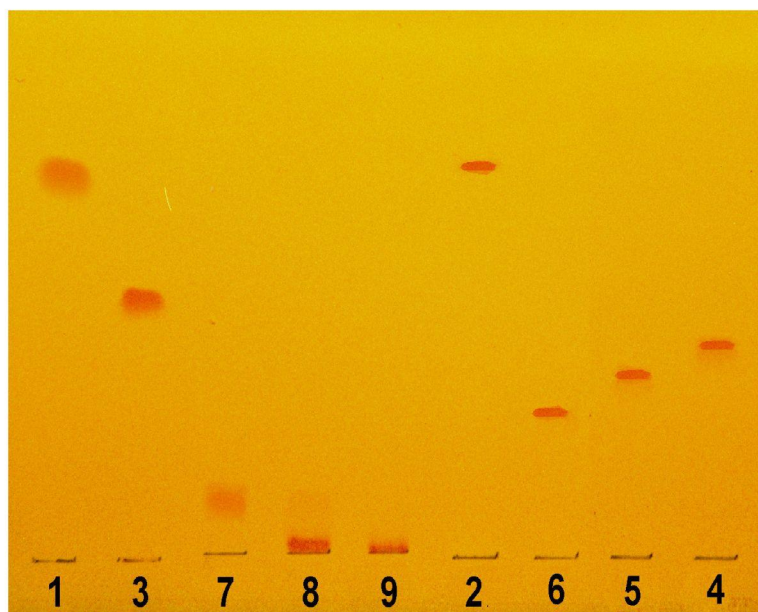


Ryc. 2. Chromatogram wzorców alkaloidów chinolizydynowych na płytkach żelowych (Silica Si 60 TLC); faza ruchoma – cykloheksan : dietyloamina (70 : 30, v/v); wzorce alkaloidów: 1 – lupanina, 2 – metylocytyzyna, 3 – cytyzyna, 4 – hydroksylupanina, 5 – sofokarpina, 6 – lusitanina, 7 – retamina, 8 – sparteina, 9 – izosparteina.

Fig. 2. Chromatogram of quinolizidine alkaloid standards on the Silica gel Si60 plate developed in cyclohexane and diethylamine (70+30 v/v); alkaloid standards: 1 – lupanine, 2 – methylcytisine, 3 – cytisine, 4 – hydroxylupanine, 5 – sophocarpine, 6 – lusitanine, 7 – retamine, 8 – sparteine, 9 – isosparteine.

W powyższych warunkach rozdzielono całkowicie jedynie 5 związków, takich jak: hydroksylupaninę, retaminę, sofokarpinę, cytyzynę i metylocytyzynę. Natomiast pary alkaloidów: lupanina i lusitanina oraz L- α -izosparteina i sparteina, posiadające bardzo zbliżone wartości R_f migrowały jako dwa pojedyncze pasma (ryc. 2).

Całkowitej separacji badanego zespołu alkaloidów nie udało się również uzyskać w układach faz ruchomych złożonych z różnych stężeń chloroformu, metanolu i 25% amoniaku (tab. 2, ryc. 10). Najlepsze wyniki otrzymano w przypadku, gdy fazę ruchomą stanowiła mieszanina chloroformu, metanolu i 25% amoniaku w stosunku 85:15:1 (v/v). W opisywanych warunkach rozdzielono 9-składnikową mieszaninę wzorcowych alkaloidów na 4 pasma, gdzie retamina, sparteina i L- α -izosparteina migrowały jako pojedyncze pasmo, podobnie jak pary: hydroksylupanina i cytyzyna, sofokarpina i lusitanina oraz metylocytyzyna i lupanina (ryc. 3).



Ryc. 3. Chromatogram wzorców alkaloidów chinolizydynowych na płytkach żelowych (Silica Si 60 TLC); faza ruchoma – chloroform : metanol : 25% amoniak (85:15:1 v/v); wzorce alkaloidów: 1 – lupanina, 2 – metylocytyzyna, 3 – cytyzyna, 4 – hydroksylupanina, 5 – sofokarpina, 6 – lusitanina, 7 – retamina, 8 – sparteina, 9 – izosparteina.

Fig. 3. Chromatogram of quinolizidine alkaloid standards on the Silica gel Si60 plate developed in chloroform, methanol, ammonia (85+15+1 v/v); alkaloid standards: 1 – lupanine, 2 – methylcytisine, 3 – cytisine, 4 – hydroxylupanine, 5 – sophocarpine, 6 – lusitanine, 7 – retamine, 8 – sparteine, 9 – isosparteine.

W tym miejscu należy zaznaczyć, że na rozdzielanie alkaloidów w omawianych układach chromatografowania znaczny wpływ miało stężenie modyfikatora zasadowego w fazie ruchomej. W separacji badanych związków wykorzystano fakt, że alkaloidy chinolizydynowe w postaci wolnych zasad, nanoszone na płytki chromatograficzne, wykazywały znaczne i wybiórcze powinowactwo do lipofilnej fazy ruchomej, zależne bezpośrednio od stężenia modyfikatora zasadowego w mieszaninie rozpuszczalników (ryc. 9 i 10) [3,6,9,14,16,21,23].

Przykładowo, na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym (Silica Si 60), gdy poszczególne fazy ruchome stanowiły mieszaniny cykloheksanu i dimetyloaminy, wraz ze wzrostem stężenia dimetyloaminy w układzie rozdzielczym z 0% do 30%, obserwowano znaczący wzrost selektywności rozdzielania. Dalsze zwiększanie zawartości modyfikatora zasadowego w fazie ruchomej (30-50%) wiązało się niestety z pogorszeniem rozdzielania badanych alkaloidów chinolizydynowych (wyraźne poszerzenie rozdzielonych pasm) (ryc. 9). Zjawisko to było prawdopodobnie związane z tworzeniem, w gradiencie pH, alkaloidowych par jonowych [14].

W przypadku stosowania faz ruchomych z dimetyloaminą, podczas rozdzielania alkaloidów chinolizydynowych, wystąpiły ponadto problemy związane z detekcją badanych związków.

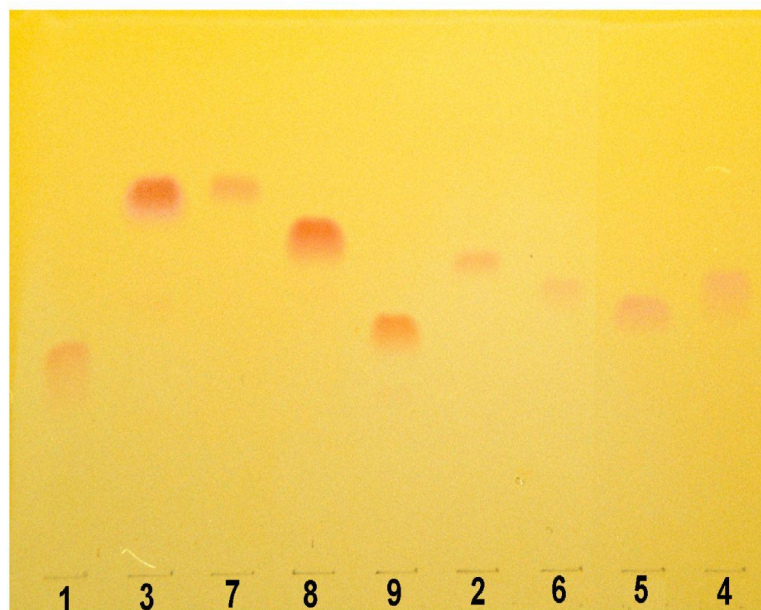
Jako, że analizowane połączenia poza sparteiną i jej pochodnymi nie wykazują fluorescencji w świetle UV [4,16,21,29,30,35,36], w detekcji omawianych związków wykorzystano zjawisko tworzenia przez alkaloidy, widocznych w świetle dziennym, pomarańczowych kompleksów z odczynnikiem Dragendorff'a [16]. Niestety w przypadku rozdzielania alkaloidów w fazach ruchomych z dimetyloaminą, związek ten nawet po odparowaniu (suszenie płytek chromatograficznych, przez 15 min. w temp. 105 °C) modyfikował fazę stacjonarną tak, że po wywołaniu chromatogramów odczynnikiem Dragendorff'a, tło płytek zabarwiał się na intensywnie pomarańczowo (reakcja odczynnika ze śladami dimetyloaminy [16]) uniemożliwiając lokalizację pasm alkaloidowych. W związku z powyższym faza ruchoma złożona z chloroformu, metanolu i 25% amoniaku (85:15:1 – v/v) okazała się bardziej odpowiednia do rozdzielania mieszaniny alkaloidów chinolizydynowych, na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym, w systemie jednokierunkowym (łatwe odparowanie amoniaku z fazy stacjonarnej).

W celu poprawienia rozdziału badanych związków, w systemie jednokierunkowym, przeprowadzono również separację wzorcowych alkaloidów na płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktadecylowymi (RP-18W F_{254s}; HPTLC). Jako fazy ruchome stosowano w tym wypadku mieszaninę złożoną z acetonitrylu i wody (30:100) w połączeniu z różnymi stężeniami kwasu solnego (ryc. 11, tab. 2). Zastosowanie tak silnego modyfikatora kwasowego, jakim jest kwas solny było podyktowane koniecznością przeprowadzenia badanych alkaloidów w formy protonowanych zasad. Wstępnie stosowane w fazach ruchomych takie kwasy organiczne jak: kwas mrówkowy i octowy okazały się zbyt słabe by przeprowadzić „wolne” alkaloidy w odpowiednie sole, zdolne do migracji w polarnych fazach ruchomych [16,21].

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że w układach faz odwróconych kluczowym czynnikiem zwiększającym selektywność rozdziału mieszaniny alkaloidów chinolizydynowych było stężenie modyfikatora kwasowego w fazie ruchomej, podobnie jak to miało miejsce w przypadku modyfikatora zasadowego stosowanego w układach faz prostych (ryc. 9-11). Zjawisko to można wiązać ze zmienną rozpuszczalnością alkaloidów występujących w postaci wolnych bądź protonowanych zasad, w fazach ruchomych o różnej polarności [3,9,14,16,23,29].

W opisywanych warunkach chromatografowania, podobnie jak w przypadku stosowania faz prostych, nie udało się rozdzielić wszystkich alkaloidów chinolizydynowych, obecnych w mieszaninie wzorców (ryc. 4).

W optymalnym układzie rozdzielczym, gdzie fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu, wody i 36% kwasu solnego (30:100:7), retamina i cytyzyna migrowały jako jedno pasmo, a lusitanina, sofokarpina i hydroksylupanina posiadały bardzo zbliżone wartości R_f (ryc. 4).

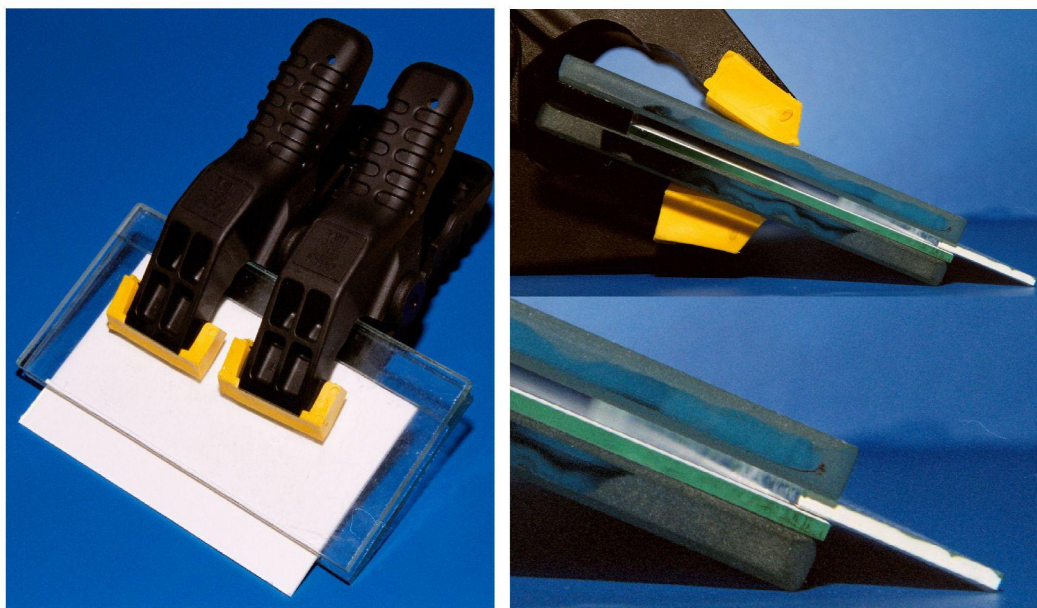


Ryc. 4. Chromatogram wzorców alkaloidów chinolizydynowych na płytkach żelowych (RP-18W, F_{254s}, HPTLC); faza ruchoma – acetonitryl : woda : 36% kwas solny (30 : 100 : 7, v/v); wzorce alkaloidów: 1 – lupanina, 2 – metylocytyzyna, 3 – cytyzyna, 4 – hydroksylupanina, 5 – sofokarpina, 6 – lusitanina, 7 – retamina, 8 – sparteina, 9 – izosparteina.

Fig. 4. Chromatogram of quinolizidine alkaloid standards on the RP-18W plates developed in acetonitrile: water and hydrochloric acid (30+100+7 v/v). Alkaloid standards: 1 – lupanine, 2 – methylcytisine, 3 – cytisine, 4 – hydroxylupanine, 5 – sophocarpine, 6 – lusitanine, 7 – retamine, 8 – sparteine, 9 – isosparteine.

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że w opracowanych, z wykorzystaniem jednokierunkowej TLC, układach rozdzielczych niemożliwe jest uzyskanie całkowitej separacji 9-składnikowej mieszaniny alkaloidów chinolizydynowych. W związku z tym w dalszych doświadczeniach posłużono się chromatografią dwukierunkową, z zastosowaniem pojedynczego złoża (*monolayer stationary phase*) bądź w gradiencie fazy stacjonarnej (tzw. *graft chromatography*) [22].

W przypadku analiz w technice dwukierunkowej na pojedynczym złożu zastosowano płytki szklane pokryte żel krzemionkowym modyfikowanym grupami diolowymi (DIOL F_{254s}) umożliwiającym prowadzenie rozdzielczych zarówno w układach faz prostych jak i odwróconych [17]. Jako fazy ruchome użyto w tym wypadku mieszaniny złożonej z chloroformu, metanolu i 25% amoniaku (85:5:1 – I kierunek) oraz acetonitrylu, wody i 36% kwasu solnego (30:100:7 – II kierunek). Powyższe fazy ruchome, w układach jednokierunkowych warunkowały najefektywniejsze rozdzielanie badanej mieszaniny alkaloidów chinolizydynowych (ryc. 3 i 4). Ponadto poprzez zastosowanie żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami diolowymi oraz faz ruchomych o krańcowo różnej polarności możliwe było wykorzystanie do separacji badanych związków dwóch różnych mechanizmów rozdzielczych [10,16].



Ryc. 5. Urządzenie służące do rozdzielania związków w gradiencie fazy stacjonarnej (szerokość powierzchni łączącej 2 mm).

Fig. 5. The device constructed in the Department of Pharmacognosy Medical University of Gdańsk for an easy transfer of separated mixtures from one stationary phase to another (2mm overlapping distance).

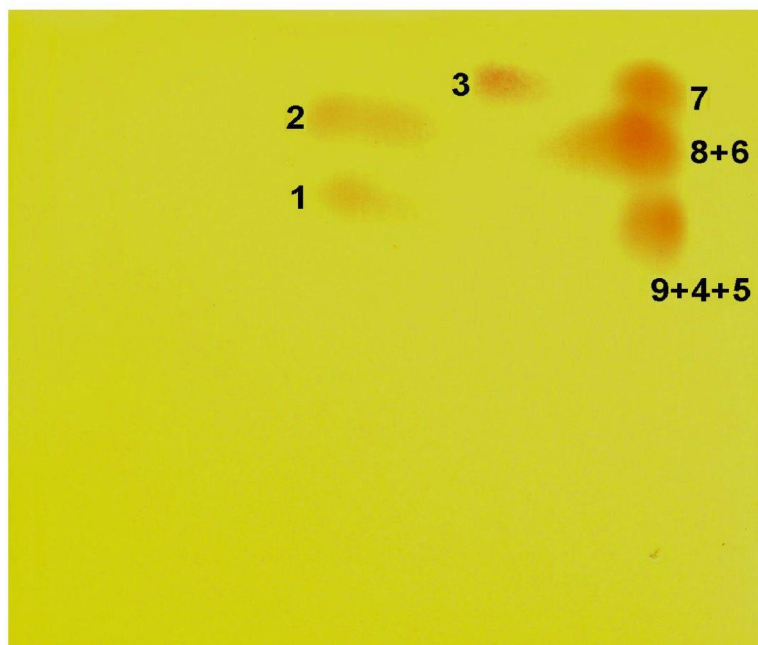
Niestety w opracowanym systemie chromatografowania nie udało się również uzyskać rozdziału wszystkich badanych alkaloidów chinolizydynowych (ryc. 6).

Sparteina i lusitania migrowały jako pojedyncze, rozmyte pasmo, a hydroksylupanina, L- α -izosparteina i sofokarpina posiadały bardzo zbliżone wartości R_f .

Całkowite rozdzielanie, 9-składnikowej mieszaniny wzorcowych alkaloidów umożliwiło dopiero zastosowanie 2D-TLC w gradiencie fazy stacjonarnej (ryc. 7).

Tę stosunkowo nową technikę chromatografowania używano z powodzeniem do rozdzielania mieszanin saponin, fenolokwasów oraz flawonoidów, w ekstraktach roślinnych [10-12,18].

W opisywanym doświadczeniu, w pierwszym kierunku, chromatogramy rozwijano na żelu krzemionkowym modyfikowanym grupami diolowymi (DIOL F_{254s}), z zastosowaniem fazy ruchomej I, a w drugim kierunku na żelu modyfikowanym resztami oktadecylowymi (RP-18W F_{254s}; HPTLC) przy użyciu fazy ruchomej II. Oryginalne urządzenie łączące płytki chromatograficzne umożliwiło przerzucenie poszczególnych pasm analizowanych alkaloidów z jednej fazy stacjonarnej na drugą i utrzymanie płytek w pionie podczas rozwijania w komorze Chrop'a (ryc. 5).

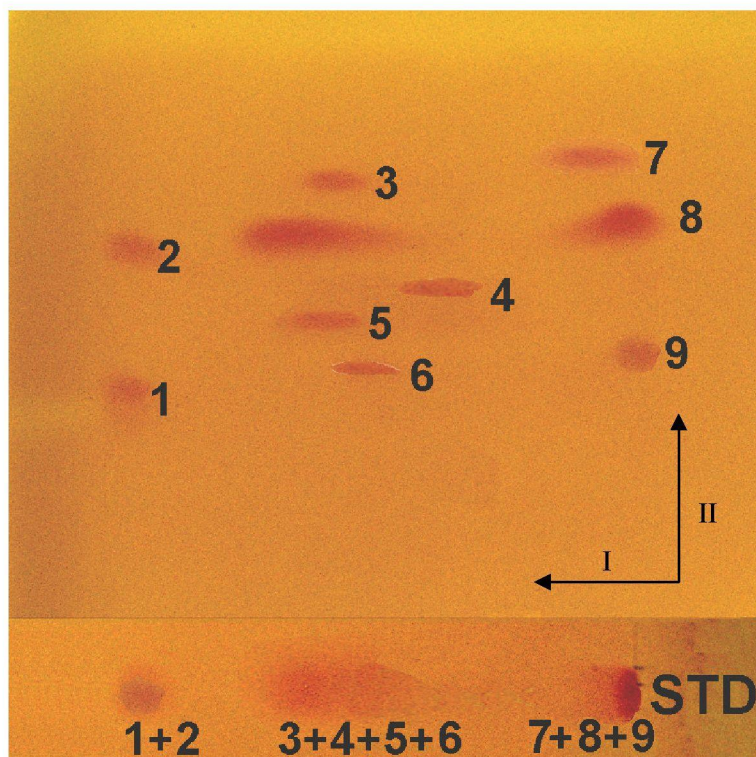


Ryc. 6. Dwukierunkowy chromatogram TLC wzorców alkaloidów chinolizydynowych na modyfikowanych płytkach żelowych (DIOL F_{245S}); fazy ruchome: chloroform : metanol : 25% amoniak (85:15:1, v/v) – I kierunek; acetonitryl : woda : 36% kwas solny (30:100:7, v/v) – II kierunek; wzorce alkaloidów: 1 – lupanina, 2 – metylocytyzyna, 3 – cytyzyna, 4 – hydroksylupanina, 5 – sofokarpina, 6 – lusitanina, 7 – retamina, 8 – sparteina, 9 – izosparteina.

Fig. 6. 2D TLC of quinolizidine alkaloid standards on the DIOL F_{254S} plate developed in mobile phase I (chloroform:methanol:25% ammonia – 85:15:1, v/v) – I direction and mobile phase II (acetonitrile:water:36% hydrochloric acid – 30:100:7, v/v) – II direction; alkaloid standards: 1 – lupanine, 2 – methylcytisine, 3 – cytisine, 4 – hydroxylupanine, 5 – sophocarpine, 6 – lusitanine, 7 – retamine, 8 – sparteine, 9 – isosparteine.

Zoptymalizowane warunki 2D TLC, w gradiencie fazy stacjonarnej, zastosowano następnie do rozpoznania składu frakcji alkaloidowych występujących w częściach nadziemnych roślin gruntowych i w kulturach *in vitro* (kalusy oraz hodowle pędowe) badanych janowców (ryc. 8, tab. 3)

Analiza chromatograficzna wobec substancji wzorcowych wykazała, w ziele analizowanych gatunków, bogate, wieloskładnikowe frakcje alkaloidowe (tab. 3). Jednocześnie potwierdzono dane literaturowe odnośnie istotnych różnic między badanymi surowcami w zakresie obecności poszczególnych alkaloidów chinolizydynowych [1,3,7-9,13,15,23,28]. Zgodnie z powyższym, sofokarpinę zidentyfikowano chromatograficznie jedynie w częściach nadziemnych *G. germanica*, a lusitaninę w ziele *G. sagittalis*. Obecność metylocytyzyny okazała się charakterystyczna dla ziele *G. aethnensis* i *G. monospessulana*, a lupaniny dla *G. germanica* i *G. sagittalis*. Jedynie w częściach nadziemnych *G. radiata* nie stwierdzono obecności cytyzyny, podobnie jak w ziele *G. germanica* nie zidentyfikowano retaminy. Również *G. sagittalis*, w przeciwieństwie do pozostałych badanych gatunków, charakteryzowała się brakiem obecności L- α - izosparteiny. Jedynym alkaloidem chinolizydynowym występującym we wszystkich janowcach była natomiast sparteina (tab. 3).

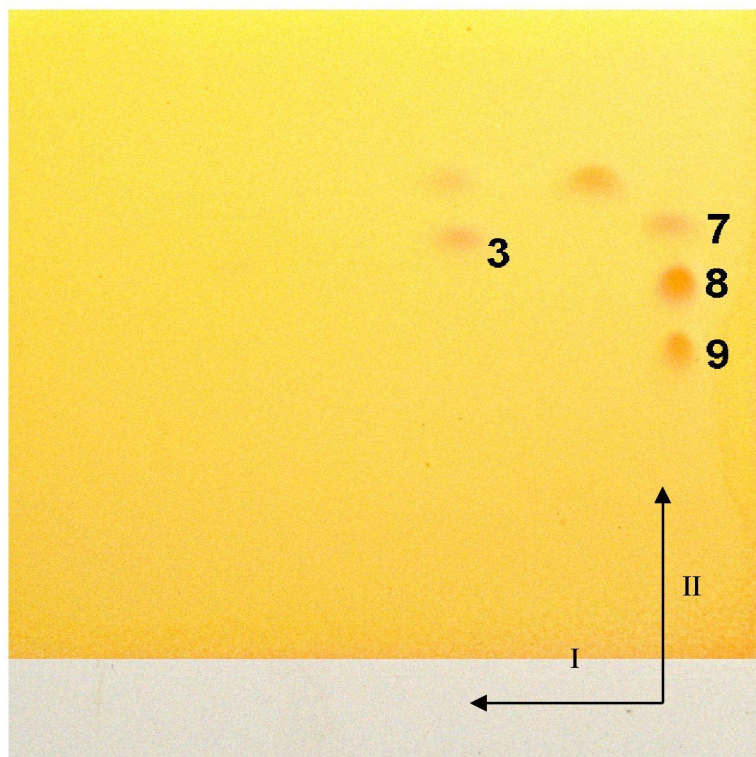


Ryc. 7. Dwukierunkowy chromatogram TLC, w gradiencie fazy stacjonarnej, wzorców alkaloidów chinolizydynowych; I kierunek: płytka żelowa - DIOL F_{245S} , faza ruchoma I; II kierunek: modyfikowana płytka żelowa -RP-18W, F_{254S} ; HPTLC, faza ruchoma II. Wzorce alkaloidów: 1 – lupanina, 2 – metylocytyzyna, 3 – cytyzyna, 4 – hydroksylupanina, 5 – sofokarpina, 6 – lusitanina, 7 – retamina, 8 – sparteina, 9 – izosparteina.

Fig. 7. 2D TLC with adsorbent gradient of quinolizidine alkaloid standards; I direction – DIOL F_{245S} plate – mobile phase I, II direction – RP-18W plate mobile phase II. Alkaloid standards: 1 – lupanine, 2 – methylcytisine, 3 – cytisine, 4 – hydroxylupanine, 5 – sophocarpine, 6 – lusitanine, 7 – retamine, 8 – sparteine, 9 – isosparteine.

Wykorzystując zoptymalizowane warunki chromatografowania stwierdzono, że biomasy kalusowe badanych roślin z rodzaju *Genista* nie akumulowały zupełnie charakterystycznych dla gatunków macierzystych alkaloidów chinolizydynowych. Produkcja omawianych połączeń, w stacjonarnych kulturach pędowych janowców, była natomiast ograniczona jedynie do retaminy, sparteiny, lusitaniny i L- α - izosparteiny (tab. 3). Wymienione alkaloidy chinolizydynowe występowały w mikroślinkach janowców w ilościach śladowych.

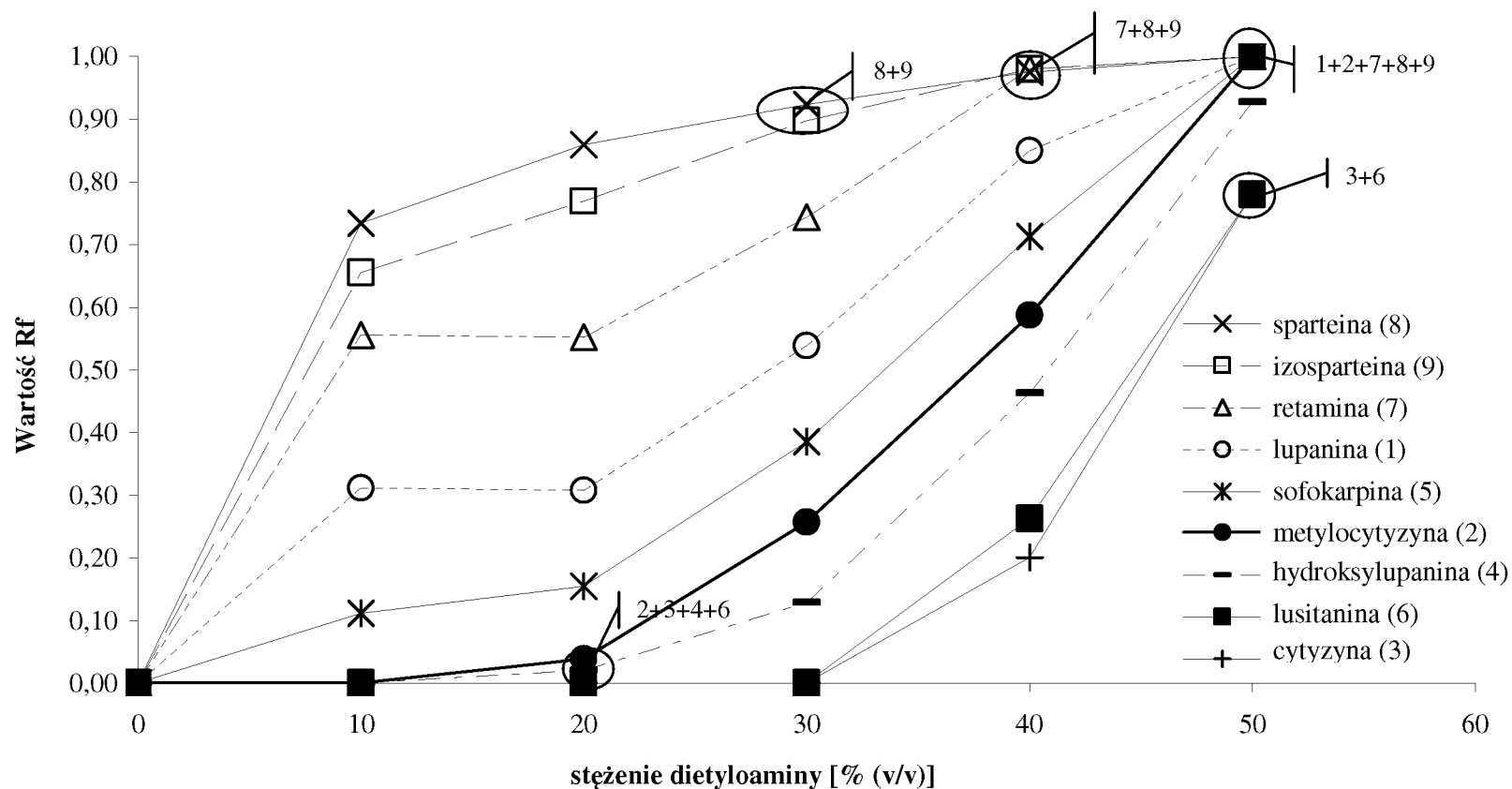
Porównanie części nadziemnych roślin gruntowych oraz kultur *in vitro* wybranych gatunków z rodzaju *Genista* w zakresie połączeń alkaloidowych wskazuje, że biosynteza omawianych związków wydaje się być zależna od stopnia zróżnicowania morfologicznego badanych biomas. Tym samym, nienaruszone rośliny charakteryzowały się znaczną zawartością alkaloidów zaś pędy namnożone w warunkach *in vitro* i pozbawione statusu morfologicznego rośliny gruntowej syntetyzowały znacznie mniej omawianych związków. Nieuorganizowana biomasa kalusowa była natomiast zupełnie pozbawiona toksycznych alkaloidów chinolizydynowych, stając się, wybiórczym i bogatym źródłem izoflawonów, wykazujących aktywność fitoestrogenną (rozd. 6).



Ryc. 8. Dwukierunkowy chromatogram TLC, w gradiencie fazy stacjonarnej, frakcji alkaloidowej z ziela *Genista tinctoria* L. I kierunek : płytka żelowa- DIOL F_{245S} , faza ruchoma I; II kierunek: modyfikowana płytka żelowa -RP-18W, F_{254s}; HPTLC, faza ruchoma II. Alkaloidy: 3 – cytyzyna, 7 – retamina, 8 – sparteina, 9 – izosparteina.

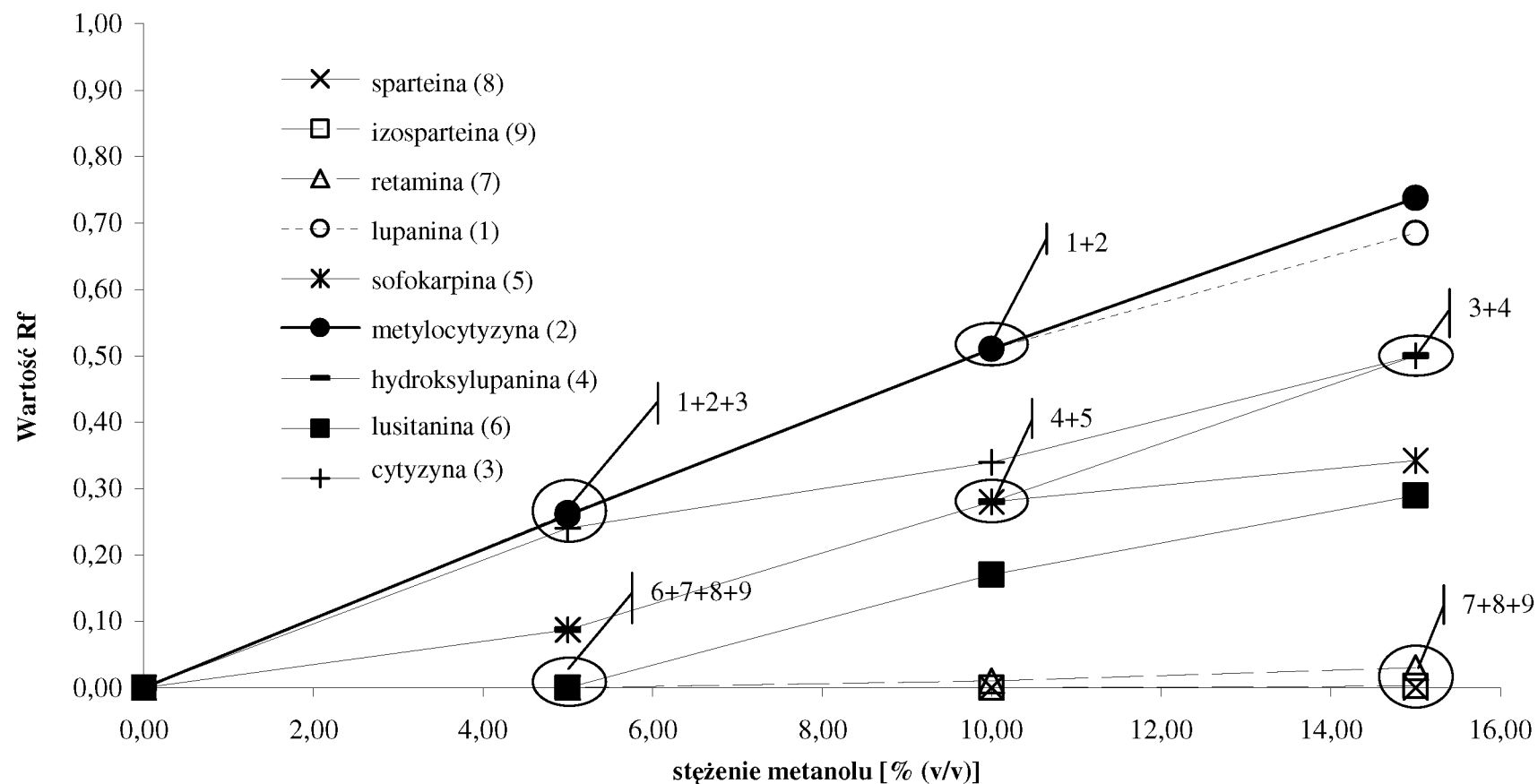
Fig. 8. 2D TLC with sorbent gradient of the alkaloid fraction from *Genista tinctoria* herb. Alkaloids: 3 – cytisine, 7 – retamine, 8 – sparteine, 9 – isosparteine. Separation conditions: I direction – DIOL F₂₅₄ plate – mobile phase I; II direction – RP18W plate – mobile phase II.

Przeprowadzone badania chromatograficzne wykazały, że rozdzielenie wieloskładnikowej mieszaniny blisko spokrewnionych strukturalnie alkaloidów chinolizydynowych, z zastosowaniem jednokierunkowej TLC, jest bardzo trudne. Całkowitą separację analizowanych połączeń, występujących w postaci mieszaniny wzorców, bądź w oczyszczonych ekstraktach metanolowych z badanych matryc roślinnych, umożliwiła jedynie 2D TLC w gradiencie fazy stacjonarnej. Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że opracowane warunki rozdziału mogą być z powodzeniem wykorzystane do badań skryningowych złożonych matryc roślinnych w zakresie alkaloidów chinolizydynowych.



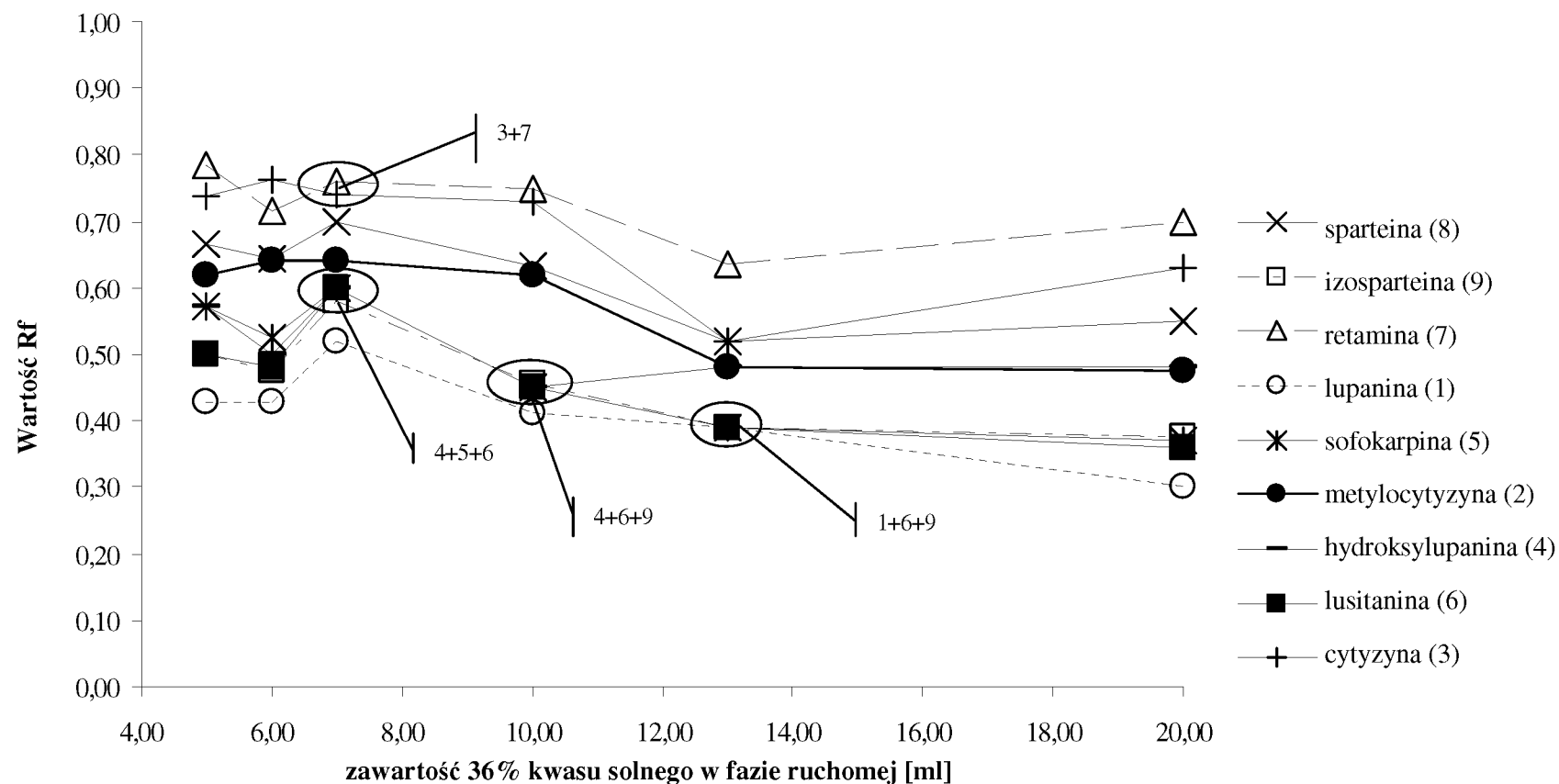
Ryc. 9. Porównanie wartości współczynników R_f wzorców alkaloidów chinolizydynowych, rozdzielanych na płytkach żelowych (Silica Si 60 TLC); fazy ruchome – mieszaniny różnych stężeń cykloheksanu i dietyloaminy. Warunki rozdzielania: temperatura pokojowa ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), wilgotność 60%; pionowa komora Chrop'a.

Fig. 9. Comparison of the retention of quinolizidine alkaloid standards on Silica Si60 TLC plates developed in mobile phase consisted of cyclohexane and diethylamine in various proportions. Separation conditions: room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, humidity 60%); vertical "Chrop" chamber.



Ryc. 10. Porównanie wartości współczynników R_f wzorców alkaloidów chinolizydynowych rozdzielanych na płytkach żelowych (Silica Si 60 TLC); fazy ruchome-mieszaniny różnych stężeń chloroformu, metanolu i 25% amoniaku. Warunki rozdziału: temperatura pokojowa ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), wilgotność 60%; pionowa komora Chrop`a.

Fig. 10. Comparison of the retention of quinolizidine alkaloid standards on silica Si60 TLC plates developed in mobile phases consisted of chloroform, methanol and ammonia in various proportions. Separation conditions: room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, humidity 60%); vertical "Chrop" chamber.



Ryc. 11. Porównanie wartości współczynników R_f wzorców alkaloidów chinolizydynowych rozdzielanych na płytkach żelowych (RP-18W; F₂₅₄₈; HPTLC); fazy ruchome - mieszanina acetonitrylu i wody (30:100) oraz różnych stężeń 36% kwasu solnego. Warunki rozdzielania: temperatura pokojowa (22 ± 1 °C), wilgotność 60%; pionowa komora Chrop`a.

Fig. 11. Comparison of the retention of quinolizidine alkaloid standards on RP-18W HPTLC plates developed in mobile phases consisted of acetonitrile and water with varying concentration of hydrochloric acid. Separation conditions: room temperature (22 ± 1°C, humidity 60%); vertical "Chrop" chamber.

Tab. 3. Alkaloidy chinolizydynowe obecne w ziele i kulturach *in vitro* roślin z rodzaju *Genista*. Limit detekcji od 15⁻¹⁵ µg sparteiny do 5⁻⁴ µg lupaniny.
 Tab. 3. *Quinolizidine alkaloids identified in Genista species (herbs and in vitro cultures). Detection limit from 15⁻¹⁵ µg of sparteine to 5⁻⁴ µg of lupanine.*

Lp.	Związek	<i>G. tinctoria</i>		<i>G. sagittalis</i>		<i>G. germanica</i>		<i>G. radiata</i>		<i>G. aethnensis</i>		<i>G.monospessulana</i>	
		roślina grunt.	pędy <i>in vitro</i>	roślina grunt.	pędy <i>in vitro</i>	roślina grunt.	pędy <i>in vitro</i>	roślina grunt.	pędy <i>in vitro</i>	roślina grunt.	pędy <i>in vitro</i>	roślina grunt.	pędy <i>in vitro</i>
1.	Lupanina	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2.	Metylocytyzyna	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
3.	Cytyzyna	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
4.	Hydroksylupanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.	Sofokarpina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6.	Lusitanina	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	Retamina	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
8.	Sparteina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.	L-α-izosparteina	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-

Piśmiennictwo

1. Aniszewski T., The biological basis of quinolizidine alkaloids, *Sci. Legumes* 1 (1994) 1-24.
2. Balandrin M.F., Robbins E.F., Kinghorn A.D., Alkaloids of *Papilionideae*. Part II. Alkaloid distribution in some species of the papilionaceous tribes *Thermopsideae* and *Genisteae*, *Biochem. Syst. Ecol.* 10 (4) (1982) 46-52.
3. Bernasconi R., Gill St., Steinegger E., Chemotaxonomic-phylogenetic classification of the genus *Genista* based on the determination of alkaloid. I. Quantitative distribution of alkaloids in 26 species and varieties of *Genista*. 8. Alkaloids of the *Leguminosae*, *Pharm. Acta Helv.* 40 (4) (1965) 246-256.
4. Chen X., Yi Ch., Yang X., Wang X., Liquid chromatography of active principles in *Sophora flavescens* root, *J. Chromatogr. B* 812 (1/2) (2004) 149-163.
5. Cisowski W., Dembińska-Migas W., Krauze-Baranowska M., Łuczkiwicz M., Migas P., Matysik G., Soczewiński E., Application of Planar Chromatography to the Analysis of Secondary Metabolites in Callus Cultures of Different Plant Species, *J. Planar Chromatogr.* 11 (1998) 441-446.
6. Coe F.G., Anderson J.G., Screening of medicinal plants used by the Garifuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds, *J. Ethnopharmacol.* 53 (1) (1996) 29-50.
7. De Castro O., Cozzolino S., Jury S.L., Caputo P., Molecular relationships in *Genista* L. Sect. *Spartocarpus* Spach (Fabaceae), *Plant. Syst. Evol.* 231 (2002) 91-108.
8. de Luca V., Laflamme P., The expanding universe of alkaloid biosynthesis, *Curr. Op. Plant Biol.* 4 (3) (2001) 225-233.
9. Gill St., Steinegger E., Occurrence of alkaloids in *Genista* species, *Pharm. Acta Helv.* 39 (9) (1964) 565-574.
10. Gleńsk M., Biały Z., Jurysta M., Cisowski W., Two-dimensional TLC with sorbent gradient for the analysis of alfalfa root saponins, *Chromatographia* 54 (9/10) (2001) 669-672.
11. Gleńsk M., Czekalska M., Cisowski W., Resolution of saponins from a ginseng preparation by 2D TLC with an adsorbent gradient, *J. Planar Chromatogr.* 14 (6) (2001) 454-456.
12. Gleńsk M., Sawicka U., Mażol I., Cisowski W., 2D TLC- graft planar chromatography in the analysis of a mixture of phenolic acids, *J. Planar Chromatogr.* 15 (6) (2002) 463-465.
13. Greinwald R., van Rensen I., Veit M., Canto P., Witte L., A chemical dichotomy in quinolizidine alkaloids accumulation within the section *Spartenoides* of the genus *Genista* (Fabaceae: *Genisteae*), *Biochem. Syst. Ecol.* 23 (1) (1995) 89-97.
14. Hermans-Lokkerbol A., Verpoorte R., Droplet Counter Chromatography of Alkaloids. The Influence of pH gradient and Ion-Pair Formation on the Retention of Alkaloids, *Planta Med.* 41 (1986) 299-302.
15. Kinghorn A.D., Balandrin M.F., Quinolizidine alkaloids of the *Leguminosae*: structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities, *Alkaloids*, 2 (1984) 105-148.
16. Kirchner J.G., Alkaloids, w: E.S. Perry (Ed.), *Techniques of chemistry*. Vol. XIV. Thin-layer chromatography, Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A., 1990, str. 386-417.

17. Kowalska T., Adsorbents in thin-layer chromatography, w Sz. Nyiredy (Ed.), Planar chromatography. A perspective view for the third millennium, Springer, Budakalász, Węgry, 2001, str. 33-46.
18. Krauze-Baranowska M., Malinowska I., Skwierawska J., TLC of flavonol truxinic esters from *Pseudotsuga menziesii*, J. Planar Chromatogr. 15 (6) (2002) 437-441.
19. Lucumi E., Łuczkiwicz M., Vera A., Hallard D., van der Heijden R., Verpoorte R., Alkaloid formation in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* after feeding of tryptamine and loganin, Biotechnol Lett. 23 (20) (2001) 1694-1696.
20. Łuczkiwicz M., Piotrowski A., Two-Stage System for Micropropagation of Several *Genista* Plants Producing Large Amounts of Phytoestrogens, Z. Naturforsch. 60c (2005) 557-566.
21. Molyneaux R.J., Garner D.R., James L.F., Colegate S.M., Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis, J. Chromatogr. A 967 (1) (2002) 57-74.
22. Nyiredy Sz., Multidimensional planar chromatography, w Sz. Nyiredy (Ed.), Planar chromatography. A perspective view for the third millennium, Springer, Budakalász, Węgry, 2001, str. 103-119.
23. Przyborowska M., Soczewiński E., Waksmundzki A., Gólkiewicz W., Investigations on the alkaloids from *Genista tinctoria*, Diss. Pharm. Pharmacol. 19 (3) (1967) 289-295.
24. Schmeller T., Sauerwein M., Sporer F., Wink M., Mueller W.E., Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors, J. Nat. Prod. 57 (9) (1994) 1316-1319.
25. Song J.Z., Xu H.X., Tian S.J., But P.H., Determination of quinolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal drugs by nonaqueous capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A 857 (1999) 303-311.
26. Szabady B., The different modes of development, w: Sz. Nyiredy (Ed.), Planar chromatography. A perspective view for the third millennium, Springer, Budakalász, Węgry, 2001, str. 88-102.
27. van der Heijden R., Lamping P.J., Out P.P., Wijnsma R., Verpoorte R., High-performance liquid chromatographic determination of indole alkaloids in suspension culture of *Tabernaemontana divaricata*, J. Chromatogr. 396 (1987) 287-295.
28. van Rensen I., Veit M., van Rensen U.R., Cantó P., Vogt H., Greinwald R., Czygan F.Ch., Line-scatter plots in chemotaxonomy of *Genista* L. Section *Spartenoides* SPACH in Western Europe, Biochem. System. Ecol. 27 (1999) 687-708.
29. Wink M., Quinolizidine alkaloids, Methods Plant Biochem. 8 (1993) 197-239.
30. Wink M., Witte L., Schiebel H.M., Hartmann T., Alkaloid Pattern of Cell Suspension Cultures and Differentiated Plants of *Lupinus polyphyllus*, Planta Med. 38 (1980) 238-245.
31. Wink M., Hartmann T., Production of Quinolizidine Alkaloids by Photomixotrophic Cell Suspension Cultures: Biochemical and Biogenetic Aspects, Planta Med. 40 (1980) 149-155.
32. Wink M., Hartmann T., Witte L., Biotransformation of Cadaverine and Potential Biogenetic Intermediates of Lupanine Biosynthesis by Plant Cell Suspension Cultures, Planta Med. 40 (1980) 31-39.
33. Wink M., Witte L., Hartmann T., Quinolizidine Alkaloid Composition of Plants and of Photomixotrophic Cell Suspension Cultures of *Sarothamnus scoparius* and *Orobancherapumgenistae*, Planta Med. 43 (1981) 342-352.

34. Wink M., Quinolizidine Alkaloids: Biochemistry, Metabolism, and Function in Plants and Cell Suspension Cultures, *Planta Med.* 45 (1987) 509-514.
35. Wink M., Meissner C., Witte L., Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*, *Phytochemistry* 38 (1) (1995) 139-153.
36. Yi Ch., Li P., Tao Y., Chen X., High performance liquid chromatographic determination of quinolizidine alkaloids in radix *Sophora flavescens* using Tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) electrochemiluminescence, *Microchim. Acta* 147 (4) (2004).

15. STRESZCZENIE

W niniejszej rozprawie habilitacyjnej przedstawiono wybrane aspekty regulacji produkcji izoflawonów, w kulturach *in vitro* 6 gatunków z rodzaju *Genista* (*G. tinctoria* L., *G. radiata* L., *G. aethnensis* D.C., *G. sagittalis* L., *G. germanica* L. oraz *G. monosperulana* L.).

Prezentowana dysertacja składa się z dwóch części. W pierwszej z nich zaprezentowano charakterystykę botaniczną oraz fitochemiczną badanych janowców. W rozdziale dotyczącym składu chemicznego analizowanych gatunków uwzględniono połączenia izoflawonoidowe oraz alkaloidy chinolizydynowe, czyli dwie podstawowe grupy wtórnych metabolitów, decydujące o aktywności biologicznej roślin z rodzaju *Genista*. Ponadto, w części teoretycznej rozprawy, omówiono aktualny stan wiedzy, obejmujący biosyntezę izoflawonów oraz badania nad niniejszymi połączeniami w hodowlach tkankowych roślin wyższych. Po raz pierwszy spróbowano usystematyzować dotychczasowe dane odnośnie szeroko rozumianych doświadczeń nad izoflawonami w kulturach *in vitro*, uwzględniając ich wielowątkowość, metodykę oraz aplikacyjny charakter poszczególnych eksperymentów. Informacje zawarte w niniejszym rozdziale wykorzystano następnie w badaniach eksperymentalnych projektu habilitacyjnego. Część teoretyczną dysertacji zamyka rozdział dotyczący aktywności biologicznej izoflawonów. Ze względu na znaczną ilość prac przeglądowych obejmujących powyższe zagadnienie, w opisywanym fragmencie manuskryptu przedstawiono jedynie podstawowe kierunki działania fitoestrogenów by tym samym uzasadnić celowość podjętych badań.

Druga część dysertacji obejmuje prace eksperymentalne nad akumulacją aktywnych leczniczo izoflawonów w kulturach *in vitro* wybranych janowców. Nadrzędny cel projektu, którym było otrzymanie roślinnych systemów hodowlanych, ukierunkowanych na wybiórczą produkcję znacznych ilości fitoestrogenów, realizowano stosując standardowe oraz nowoczesne procedury doświadczalne, które modyfikowano oraz optymalizowano w toku eksperymentu. Ogólnie ujmując obejmowały one badania w zakresie doboru materiału roślinnego oraz warunków hodowli, umożliwiających opracowanie kultur *in vitro*, akumulujących wysokie stężenia połączeń izoflawonoidowych.

Integralną częścią projektu habilitacyjnego były badania fitochemiczne w zakresie analizy chromatograficznej frakcji flawonoidowych (HPLC) oraz alkaloidowych (TLC) obecnych w roślinach gruntowych oraz biomasach janowców otrzymanych z kultur *in vitro*. Opisywane doświadczenia realizowano stosując, opracowane w toku eksperymentu, warunki rozdzielania badanych związków, dokonując jednocześnie ciągłej selekcji biomas roślinnych, uwzględniając obecność w poszczególnych surowcach wysokich stężeń izoflawonów oraz brak akumulacji toksycznych alkaloidów chinolizydynowych.

W oparciu o dane literaturowe oraz wstępne badania własne do realizacji projektu wybrano 6 gatunków z rodzaju *Genista*, charakteryzujących się niezwykle bogatą frakcją izoflawonoidową, przewyższając w tym względzie *Glycine max.*, stanowiącą podstawowe źródło fitoestrogenów stosowanych w lecznictwie.

Wstępny etap doświadczeń zawartych w projekcie habilitacyjnym dotyczył wprowadzenia wybranych janowców do kultur *in vitro*, opracowania warunków do prowadzenia hodowli otrzymanych biomas w systemie ciągłym oraz określenia potencjału poszczególnych kalusów w zakresie produkcji połączeń izoflawonoidowych.

Z uwagi na całkowity brak danych literaturowych odnośnie hodowli tkankowych badanych janowców, na etapie inicjacji kalusowania, niezbędne było empiryczne dobranie zarówno odpowiedniego *inoculum* roślinnego jak również pożywki eksperymentalnej, umożliwiając otrzymanie żywotnych, szybko rosnących biomas. W opisywanych doświadczeniach przebadano 6 pożywek wzrostowych (Gamborga, Nitscha i Nitscha, Millera, Mc Cowna, Schenk - Hildebrandt'a oraz Murashige'a i Skooga), stosowanych w biotechnologii roślin wyższych, różniących się zawartością soli mineralnych oraz składników organicznych (węglowodany, aminokwasy oraz witaminy). Poszczególne biomasy kalusowe wyprowadzano z fragmentów hypocotylowych, liścieniowych oraz korzeniowych, jałowych siewek badanych gatunków. Stwierdzono, że w przypadku wszystkich analizowanych janowców, wyprowadzenie żywotnych tkanek przyranych, bez skłonności do redyferencji i stopniowego zamierania, możliwe jest jedynie w oparciu o fragmenty hypocotylowe siewek. Ponadto, otrzymane biomasy kalusowe zdolne były do ciągłego wzrostu tylko na podłożach bogatych w składniki mineralne oraz organiczne (pożywki Schenk - Hildebrandt'a oraz Murashige'a i Skooga).

Inicjalne kultury kalusowe janowców oceniono następnie z uwagi na zawartość frakcji flawonoidowych oraz alkaloidowych, porównując w tym względzie namnażane biomasy z odpowiednimi gatunkami macierzystymi. W celu przeprowadzenia powyższych analiz fitochemicznych, w projekcie habilitacyjnym, opracowano chromatograficzną metodę rozdzielania zespołu alkaloidów oraz flawonoidów występujących powszechnie w rodzaju *Genista*. Ponadto, zoptymalizowano warunki ekstrakcji badanych wtórnych metabolitów z matryc roślinnych, a następnie ich oczyszczania od substancji balastowych, uwzględniając własności fizykochemiczne związków towarzyszących (procedury dotyczące alkaloidów) oraz termolabilność analizowanych połączeń (pochodne estrowe izoflawonów).

W przypadku związków flawonoidowych, techniką z wyboru, stosowaną do rozdzielania flawonów oraz izoflawonów obecnych w badanych janowcach była wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Powyższa metoda w przeciwieństwie do chromatografii gazowej (GLC) nie wymagała derywatyzacji analizowanych połączeń. Ponadto, z uwagi na złożony charakter zespołu flawonoidowego występującego, w badanych gatunkach, w skrajnie różnych stężeniach, niemożliwe okazało się stosowanie do analiz skryningowych biomas roślinnych chromatografii cienkowarstwowej (TLC).

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, po raz pierwszy, warunki rozdzielania HPLC, 22-składnikowego zespołu izoflawonów oraz flawonów występujących powszechnie w rodzaju *Genista*, w formie aglikonów, mono- i diglikozydów oraz estrów. Całkowitą separację omawianych połączeń uzyskano na kolumnie LiChrospher RP-18, w układzie faz odwróconych, stosując elucję gradientową dla 3-składnikowej mieszaniny rozpuszczalników: acetonitryl : woda : kwas octowy. Zoptymalizowaną metodę rozdzielania HPLC badanych związków wykorzystano następnie do rozpoznania składu frakcji flawonoidowych występujących w różnych częściach morfologicznych janowca barwierskiego, gatunku charakteryzującego się, w warunkach upraw gruntowych, najbogatszą frakcją bioflawonoidową. Na opisywanym etapie analiz posłużono się chromatografem cieczowym sprzężonym z detektorem masowym oraz matrycą diodową. Zastosowanie powyższej procedury umożliwiło identyfikację poszczególnych składników frakcji flawonoidowej janowca barwierskiego, w systemie *on-line*, w oparciu o trzy parametry: t_R , widmo masowe oraz widmo w nadfiolecie.

Przeznaczone do badań chromatograficznych frakcje flawonoidowe, z poszczególnych części morfologicznych janowca barwierskiego otrzymano na drodze ekstrakcji matryc roślinnych na łaźni ultradźwiękowej, a następnie oczyszczanie pierwotnych wyciągów z pominięciem procesów wymagających stosowania wysokiej temperatury. W rezultacie uniknięto

rozkładu połączeń o charakterze estrów. Skuteczność przyjętej procedury potwierdzono w oparciu o analizę fitochemiczną surowców roślinnych zawierających określony dodatek substancji wzorcowych (wybrane aglikony, glikozydy oraz estry flawonoidowe).

W wyniku przeprowadzonych analiz HPLC stwierdzono w *G. tinctoria* z upraw gruntowych bogaty 16-składnikowy zespół bioflawonoidów, złożony z frakcji izoflawonoidowej (pochodne genisteiny, daidzeiny, fomononetyny i biochaniny A) oraz prostych flawonów, pochodnych luteoliny i apigeniny. Omawiane związki występowały w poszczególnych częściach morfologicznych rośliny w różnych stężeniach. Największą zawartość bioflawonoidów stwierdzono w kwiatach janowca barwierskiego (4151,42 mg/100 g suchej masy). W przeciwieństwie do korzeni również ulistnione pędy omawianego gatunku akumulowały znaczne ilości badanych wtórnych metabolitów (4063,46 mg/100 g suchej masy). Z uwagi na niski udział procentowy (2,3%) kwiatów w biomase janowca uznano, że jedynie części nadziemne *G. tinctoria* (pędy z kwiatami) mogą być rozpatrywane jako źródło fitoestrogenów. Z tego względu właśnie powyższy materiał roślinny stosowano jako „próbę kontrolną” w doświadczeniach nad akumulacją izoflawonów w kulturach *in vitro* *G. tinctoria*.

Opracowana metoda chromatograficznego rozdzielania 22-składnikowego zespołu wzorców flawonoidowych okazała się również skuteczna w separacji izoflawonów oraz flawonów występujących w pozostałych 5 janowcach objętych projektem habilitacyjnym. Analiza porównawcza badanych gatunków w zakresie frakcji bioflawonoidowych, wykazała we wszystkich roślinach bogaty zespół izoflawonów (pochodne genisteiny, daidzeiny, fomononetyny i biochaniny A) oraz prostych flawonów (pochodne luteoliny oraz apigeniny), podobnie jak w przypadku *G. tinctoria*. Różnice pomiędzy poszczególnymi janowcami dotyczyły ilościowej zawartości badanych związków oraz wybiórczej obecności wtórnych metabolitów, występujących w ilościach śladowych. Największe stężenia izoflawonów stwierdzono w częściach nadziemnych *G. tinctoria* (3073,54 mg/100 g suchej masy). Dominującym związkiem badanej frakcji była genistyna (1454,2 mg/100 g suchej masy).

Podobnie jak w przypadku frakcji flawonoidowych, w niniejszym projekcie habilitacyjnym, opracowano warunki chromatograficznego rozdzielania 9-składnikowego zespołu alkaloidów chinolizydynowych, występujących powszechnie w rodzaju *Genista*. Do separacji frakcji alkaloidowych, występujących w badanych surowcach, wykorzystano chromatografię cienkowarstwową (TLC), która w przeciwieństwie do HPLC nie wymagała derywatyzacji badanych związków lub stosowania wysoce specyficznego detektora fosforowo-azotowego (PNP- GLC). Optymalizację warunków rozdzielania wzorców alkaloidów chinolizydynowych prowadzono w systemie jedno- lub dwukierunkowym, na płytkach chromatograficznych pokrytych żelalem krzemionkowym (Silica Si 60) bądź żelami modyfikowanymi grupami diolowymi (DIOL F_{254S}) lub oktadecylowymi (RP-18W, HPTLC). Fazy ruchome stanowiły trójskładnikowe mieszaniny rozpuszczalników, różniących się polarnością oraz siłą elucyjną. Ponadto, analizowane połączenia separowano stosując elucję izokratyczną, bądź gradient fazy stacjonarnej.

W wyniku przeprowadzonych badań nie udało się rozdzielić 9-składnikowej mieszaniny alkaloidów wzorcowych, z wykorzystaniem jednokierunkowej TLC, zarówno w układach faz prostych jak i odwróconych. Podobnie niezadowalające wyniki uzyskano stosując dwukierunkową TLC na pojedynczym złożu (*monolayer stationary phase*). Całkowitą separację blisko spokrewnionych alkaloidów chinolizydynowych umożliwiło dopiero posłużenie się techniką dwukierunkową, z wykorzystaniem gradientu fazy stacjonarnej (*graft chromatography*). W opisywanym wypadku do rozdzielania mieszaniny substancji wzorcowych stosowano w I-kierunku płytki pokryte żelalem modyfikowanym chemicznie (DIOL F_{254S}) oraz fazę ruchomą

złożoną z: chloroformu : metanolu : 25% roztworu amoniaku (85:15:1 – v/v/v). Rozwinięte pasma alkaloidów przetrucano następnie na płytki żelowe modyfikowane grupami oktadecylowymi (P-18W F_{254S}, HPTLC), za pomocą fazy ruchomej stanowiącej mieszaninę następujących rozpuszczalników: acetonitryl : woda : 36% roztwór kwasu solnego (30:100:7 – v/v/v). Powyższą fazę ruchomą stosowano następnie do separacji alkaloidów w II- kierunku. Skuteczne przetrucanie analizowanych związków z jednej fazy stacjonarnej na drugą, z zachowaniem pionowego ustawienia płytek w komorze chromatograficznej, umożliwiło zastosowanie urządzenia skonstruowanego w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji przez dr Piotra Migasa.

Zoptymalizowane warunki rozdziału 9-składnikowej mieszaniny substancji wzorcowych wykorzystano następnie do rozpoznania składu frakcji alkaloidowych występujących w częściach nadziemnych badanych gatunków z rodzaju *Genista*.

W toku prowadzonego eksperymentu opracowano metodę ekstrakcji oraz oczyszczania zespołu analizowanych wtórnych metabolitów. Alkaloidy chinolizydynowe, jako słabe zasady, ekstrahowano z matrycy roślinnych czystym metanolem, z pominięciem wcześniejszej alkalizacji. Na etapie oczyszczania pierwotnych wyciągów z substancji balastowych wykorzystano zjawisko zmiennej rozpuszczalności alkaloidów występujących w postaci wolnych bądź protonowanych zasad, w rozpuszczalnikach różniących się polarnością oraz pH. Ostatecznie oczyszczone frakcje badanych związków otrzymano w wyniku ekstrakcji pierwotnych wyciągów metanolowych do fazy stałej (SPE-kolumnienki RP-18). Opisywana procedura obejmowała aplikację frakcji alkaloidowych, dwuetapowy proces oczyszczania poszczególnych wyciągów od balastów fenolowych, terpenów i białek oraz wymywanie zespołu badanych wtórnych metabolitów.

W wyniku przeprowadzonych analiz TLC, w częściach nadziemnych janowców, stwierdzono obecność: sparteiny, L- α -izosparteiny, retaminy, hydroksylupaniny, cytyzyny, metylocytyzyny, sofokarpiny, lupaniny oraz lusitaniny. Spośród powyższych związków jedynie sparteina występowała we wszystkich sześciu badanych gatunkach. Obecność pozostałych alkaloidów w analizowanych surowcach była zależna bezpośrednio od rośliny, co potwierdza dane literaturowe wskazujące, że niniejsze metabolity można traktować jako markery chemo-taksonomiczne janowców.

Analiza chromatograficzna inicjalnych kultur kalusowych badanych gatunków z rodzaju *Genista* wykazała, że w omawianych biomasach doszło do całkowitego zahamowania biosyntezy toksycznych alkaloidów chinolizydynowych charakterystycznych dla surowców macierzystych. Ponadto kalusy janowców nie produkowały również prostych flawonów, pochodnych luteoliny oraz apigeniny, występujących w roślinach gruntowych. Opisywane zjawiska mogą wiązać się zarówno z hodowlą biomas w warunkach *in vitro* (elementy stresu abiotycznego) jak również ze zmianą statusu morfologicznego kultur (powstanie nieorganizowanej tkanki przyrannej). W związku z powyższym, kalusy wszystkich badanych gatunków z rodzaju *Genista* stały się wybiórczym i bogatym źródłem izoflawonów pochodnych genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A, występujących w formie aglikonów, mono- i diglikozydów oraz estrów. Dominującymi składnikami akumulowanych frakcji izoflawonoidowych, niezależnie od analizowanego gatunku, były zawsze związki znajdujące się w szlaku metabolicznym genisteiny (genisteina, 7-O-glukozyd genisteiny /genistyna/, 7-O-diglukozyd-genisteiny, 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny oraz 6''-O-malonylo-7-O-glukozyd genisteiny i 6''-O-acetylo-7-O-glukozyd genisteiny). W tym miejscu należy zaznaczyć, że powyższe połączenia były syntetyzowane, w kalusach janowców, w wielokrotnie wyższych stężeniach niż to miało miejsce w przypadku roślin macierzystych. Prezentowane wyniki wskazują, że rodzaj *Genista* jest wyjątkowo korzystny do prowadzenia eksperymentów

z zakresu roślinnych kultur *in vitro* ukierunkowanych na otrzymanie biomas produkujących znaczne stężenia aktywnych leczniczo izoflawonów.

Modyfikacja warunków hodowli na etapie kultur inicjalnych, obejmująca doświadczenia prowadzone przy zmiennym naświetleniu (brak lub dostęp do światła), z zastosowaniem 6 różnych pożywek wzrostowych, wykazała, że zarówno skład podstawowego podłoża eksperymentalnego, jak i również reżim oświetleniowy wywierają istotny wpływ na wzrost biomas janowców jak i zdolność poszczególnych kalusów do produkcji izoflawonów. Stwierdzono, że rodzaj pożywki wzrostowej wpływa raczej na sumaryczną zawartość produkowanych metabolitów, a nie na skład jakościowy zespołu izoflawonoidowego. Bezpośredni dostęp światła lub jego brak warunkuje natomiast wybiórczą akumulację estrowych pochodnych genisteiny, uznanych za formę magazynową fitoaleksyn.

Optymalne rezultaty w zakresie wzrostu biomas kalusowych oraz znacznej zawartości frakcji izoflawonoidowych, w tkankach przyrastających janowców, uzyskano na „bogatym” podłożu Schenk - Hildebrandt'a (SH), suplementowanym $22,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2,4-D i $23,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny. Jednocześnie stwierdzono, że w zoptymalizowanych warunkach hodowli, kultury *G. tinctoria* akumulowały, spośród wszystkich badanych janowców, najbogatszy zespół izoflawonów (14 związków – 6586,5 mg/100 g suchej masy). Uzyskane stężenie analizowanych wtórnych metabolitów, w przypadku omawianej biomasy, było ponad dwukrotnie wyższe niż w częściach nadziemnych rośliny gruntowej (3073,54 mg/100 g suchej masy). Dominującym składnikiem frakcji izoflawonoidowej w kalusie janowca barwierskiego była genistyna (3016,3 mg/100 g suchej masy).

W badaniach obejmujących niniejszy projekt habilitacyjny opracowano, po raz pierwszy, efektywny sposób mikrorozmnażania, skuteczny dla wszystkich sześciu analizowanych janowców. W przeciwieństwie do stosowanej dotychczas, w rozmnażaniu wegetatywnym *Genista monosperma*, somatycznej embriogenezy, w prezentowanych doświadczeniach posłużono się metodą bezpośredniej mikropopagacji, z wykorzystaniem fragmentów pędowych badanych roślin, na pożywkach wzbogaconych zmienną kompozycją regulatorów wzrostu z klasy auksyn oraz cytokinin. Tym samym ustalono wpływ poszczególnych fitohormonów na powstawanie struktur primordialnych, wydłużanie pędów i ukorzenianie roślin z rodzaju *Genista*.

W wyniku stosowanych procedur doświadczalnych zaproponowano II - stopniowy system mikrorozmnażania badanych gatunków. W I - stadium, obejmującym otrzymanie mikroślinek janowców, testowano wpływ wybranych cytokinin (kinetyny, zeatyny, 1/6-{ γ - γ -dimetyloallilo}-aminopuryny/ – 2iP, 6-benzyloaminopuryny – BAP oraz tidiazuronu – TDZ), stosowanych w pożywce, w połączeniu z auksyną (kwas indolilo-3-octowy – IAA) lub bez, na ogólnie rozumiany proces powstawania primordiów pędowych. Na opisywanym etapie eksperymentu stwierdzono korzystną rolę dodatku do podłoża TDZ, umożliwiającego anergizację powstających kultur pędowych od auksyn (IAA) i tym samym uniknięcie procesu szklenia mikroślinek oraz tworzenia się liści anormalnych. Optymalna pożywka proliferacyjna SH, zawierająca $9,84 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP i $0,99 \mu\text{mol l}^{-1}$ TDZ warunkowała, w przypadku wszystkich badanych janowców, 100% tworzenie kultur mikroślinek, przy średnio 30 pędach powstających z jednego eksplantatu. Ze względu na trudności w izolacji bardzo krótkich struktur pędowych, otrzymanych w I fazie mikrorozmnażania, otrzymane mikroślinki poddano procesowi wydłużania (II stadium procesu), na podłożach zawierających kwas giberelinowy (GA_3) oraz kwas indolilo-3-masłowy (IBA), jako jedyne regulatory wzrostu lub w połączeniu z cytokininami (2iP i TDZ). Stwierdzono, że tylko zastosowanie pożywki SH pozbawionej cytokinin i suplementowanej $4,92 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA powodowało, że 100% primordialnych

kultur badanych janowców ulegało znacznemu wydłużeniu, tworząc pędy o morfologii charakterystycznej dla odpowiednich roślin gruntowych.

Ryzogenezę otrzymanych kultur pędowych obserwowano na pożywce SH pozbawionej regulatorów wzrostu (SH₀) lub zawierającej wybrane auksyny (IAA, IBA i kwas naftylo-1-octowy – NAA). Najwyższą wydajność opisywanego procesu (100% ryzogeneza kultur oraz powstawanie znacznej ilości korzeni przybyszowych) stwierdzono na podłożu suplementowanym 2,68 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NAA.

W wyniku zastosowanej procedury mikrorozmnażania, w przypadku wszystkich badanych janowców, po półrocznej hodowli w gruncie, otrzymano rośliny, które pod względem morfologicznym oraz z uwagi na zawartość frakcji alkaloidowych i flawonoidowych były tożsame z gatunkami macierzystymi. Tym samym opracowana metoda mikropropagacji wybranych gatunków z rodzaju *Genista*, w porównaniu z techniką tradycyjną, umożliwiła szybkie otrzymanie znacznych ilości materiału roślinnego, bogatego w związki farmakologicznie aktywne. Co najistotniejsze, zaproponowana procedura doświadczalna może być z powodzeniem wykorzystana do rozmnażania wegetatywnego janowca etneńskiego (*G. aethnensis*) będącego gatunkiem endemicznym.

Analiza chromatograficzna (HPLC) kultur mikropędowych, w zakresie połączeń flawonoidowych wykazała, że wszystkie otrzymane biomasy, podobnie jak kultury kalusowe janowców, charakteryzowały się niezwykle bogatą frakcją izoflawonoidową (pochodne genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A), przy jednoczesnym braku produkcji prostych flawonów, pochodnych luteoliny oraz apigeniny. W tym miejscu należy zaznaczyć, że biomasy pędowe akumulowały wyższe stężenia estrowych izoflawonów, w porównaniu z odpowiednimi tkankami przyrannymi. Opisywane zjawiska wydają się wskazywać, że zarówno sam proces hodowli w warunkach *in vitro* jak również stopień cytodyferencjacji biomas (kultury kalusowe oraz pędowe) wpływają wybiórczo na produkcję związków bioflawonoidowych w badanych gatunkach z rodzaju *Genista*. Stwierdzenie to dotyczy również alkaloidów chinolizydynowych, które produkowane były w znacznych ilościach jedynie w roślinach gruntowych. Nieuorganizowane tkanki przyranne omawianych janowców były całkowicie pozbawione powyższych połączeń, a biomasy pędowe o statusie morfologicznym zmienionym w stosunku do roślin macierzystych syntetyzowały alkaloidy jedynie w ilościach śladowych (wybiórczo – retaminę, sparteinę, lusitaninę oraz L- α - izosparteinę).

Prace eksperymentalne dotyczące inicjalnych kultur kalusowych wybranych gatunków z rodzaju *Genista* wykazały, że wszystkie otrzymane biomasy charakteryzowały się wysoką zawartością izoflawonów, przy jednoczesnym braku akumulacji prostych flawonów oraz toksycznych alkaloidów chinolizydynowych. W obrębie namnażanych tkanek przyrannych, kultury kalusowe *G. tinctoria* syntetyzowały najwyższe stężenia izoflawonów (6586,5 mg/100 g suchej masy) i w efekcie stanowiły doskonały materiał wyjściowy do otrzymania roślinnych systemów hodowlanych, z przeznaczeniem do produkcji, w warunkach *in vitro*, bogatego zespołu aktywnych leczniczo fitoestrogenów. Z tego względu oraz z uwagi na znaczną juwenilność biomas janowca barwierskiego dalsze doświadczenia nad akumulacją izoflawonów w kulturach *in vitro*, zawężono właśnie do niniejszego gatunku.

W ramach przygotowania kalusów *G. tinctoria* do doświadczeń w systemie kultur wytrząsanych, na etapie hodowli stacjonarnych, podjęto się optymalizacji podstawowego podłoża SH, mającego w efekcie indukować powstawanie puszystych, łatwych do zdyspergowania w pożywce płynnej, tkanek przyrannych, charakteryzujących się intensywnym przyrostem oraz wysoką zawartością połączeń izoflawonoidowych.

W oparciu o dane literaturowe oraz doświadczenia własne, podłoża hodowlane modyfikowano w zakresie regulatorów wzrostu z klasy auksyn (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), kwas naftylo-1-octowy (NAA), kwas indolilo-3-masłowy (IBA), kwas indolilo-3-propionowy (IPA), kwas indolilo-3-octowy (IAA), kwas p-chlorofenoksyoctowy (4-CPA), pikloram (PICL), kwas β -naftoksyoctowy (β -NOA), kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (2,4,5-T) oraz kwas 2,3,5-trijodobenzoesowy (TIBA)) oraz cytokinin (zeatyna (ZEA), kinetyna (KIN), 6-benzyloaminopuryna (BAP), 6- $\{\gamma\text{-}\gamma\text{-dimetyloallilo}\}$ -aminopuryna (2iP), N-(2-chloro-4-pirydylo)-N'-fenylomocznik (4-PPU), 1,3-difluoromocznik (1,3-DFM) oraz 1-fenyl-3-(1,2,3-tiazolo-5-yl)mocznik / tidiazuron / (TDZ)). W prezentowanym eksperymencie przetestowano, po raz pierwszy, na jednym modelu hodowlanym, 17 różnych fitohormonów, stosowanych w biotechnologii roślin wyższych, ustalając ich wpływ na przyrost kalusów *G. tinctoria* oraz akumulację w badanych biomasach frakcji izoflawonoidowych. Poszczególne auksyny oraz cytokininy dodawano do pożywek w dwóch skrajnych stężeniach (0,5 lub 5,0 mg l⁻¹) co umożliwiło stwierdzenie istotnych zależności między ilością stosowanego fitohormonu, a wzrostem namnażanych biomas oraz zawartością w kalusach badanych związków. Ocenę wpływu regulatorów wzrostu na pierwotny oraz wtórny metabolizm tkankowy prowadzono oddzielnie w grupie auksyn oraz cytokinin, uwzględniając jednocześnie wybiórczą rolę poszczególnych fitohormonów w procesie produkcji połączeń o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów. Z uwagi na brak anergizacji kalusów *G. tinctoria* zarówno w stosunku do auksyn jak i cytokinin, w opisywanym eksperymencie próby kontrolne stanowiły biomasę namnożoną na pożywce ze stałym dodatkiem 2,4-D (ocena wpływu cytokinin) bądź kinetyny (doświadczenia z udziałem auksyn).

W oparciu o analizę statystyczną uzyskanych wyników (analiza dynamiki) stwierdzono istotny wpływ regulatorów wzrostu na przyrost kalusów janowca barwierskiego oraz akumulację izoflawonów w poszczególnych biomasach. Opisywany wpływ był związany (w grupie auksyn oraz cytokinin) zarówno z rodzajem jak i stężeniem stosowanego fitohormonu. W tym miejscu należy zaznaczyć, że niezależnie od stosowanej modyfikacji podłoża hodowlanego, kalusy *G. tinctoria* syntetyzowały zawsze 14-składnikowy zespół izoflawonów, pochodnych genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A. Obserwowany wpływ fitohormonów na produkcję badanej klasy wtórnych metabolitów dotyczył natomiast ilościowej zawartości poszczególnych izoflawonów w kulturze.

W grupie auksyn, za wyjątkiem β -NOA oraz TIBA, większość stosowanych regulatorów wzrostu stymulowała produkcję izoflawonów w stężeniach wysokich (5,0 mg l⁻¹). Dodatek 0,5 mg l⁻¹ omawianych fitohormonów hamował natomiast akumulację badanych związków. Opisywane zależności dotyczyły zarówno sumy izoflawonów jak i wybiórczo połączeń o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów. Jednocześnie stwierdzono, że niska zawartość auksyn w pożywce (0,5 mg l⁻¹) indukowała przyrost kalusów *G. tinctoria*, podczas gdy wysokie stężenia omawianych fitohormonów wywierały wyraźnie efekt hamujący. Uzyskane wyniki wskazują na wystąpienie ujemnej korelacji między przyrostem kalusów janowca, a akumulacją związków izoflawonoidowych, będącej bezpośrednim wynikiem modyfikacji pożywek eksperymentalnych auksynami. Stwierdzenie to nie dotyczy jedynie TIBA. Powyższy fitohormon paradoksalnie indukował produkcję izoflawonów oraz wzrost namnażanych biomas w obydwu stężeniach. Jednocześnie niniejsza auksyna już w dawce 0,5 mg l⁻¹ warunkowała otrzymanie kalusów syntetyzujących najwyższe, w całej serii doświadczeń, stężenia badanych wtórnych metabolitów (10474,2 mg/100 g suchej masy).

W przeciwieństwie do auksyn, cytokininy wywierały zmienny wpływ na akumulację izoflawonów o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów. Opisywana aktywność zależna była bezpośrednio od ilości stosowanego fitohormonu. Stwierdzono, że większość cytokinin

w niskich stężeniach ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$), za wyjątkiem zeatyny oraz 1,3-DFM, indukowała produkcję glikozydów oraz estrów izoflawonoidowych, co wiązało się z jednoczesnym wzrostem sumarycznej zawartości badanych wtórnych metabolitów w biomasach. W omawianych warunkach doświadczalnych, stosowane regulatory wzrostu hamowały natomiast wybiórczo produkcję związków izoflawonoidowych o charakterze aglikonów. Opisywane zjawiska związane były z jednoczesnym, intensywnym przyrostem testowanych kultur (dodatnia korelacja między wzrostem tkanek a akumulacją izoflawonów).

Cytokiny dodawane do pożywek w wysokich stężeniach ($5,0 \text{ mg l}^{-1}$), za wyjątkiem 1,3-DFM i zeatyny, stymulowały akumulację połączeń glikozydowych, co dotyczyło również sumarycznej zawartości badanych metabolitów w kalusach *G. tinctoria*. W przeciwieństwie do wariantów eksperymentalnych obejmujących podłoża z $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ dodatkiem omawianych fitohormonów, cytokiny w wysokich dawkach indukowały również produkcję aglikonów izoflawonoidowych. Analiza statystyczna danych uzyskanych z eksperymentu, w którym testowane pożywki suplementowano $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ poszczególnych cytokin nie wykazała istotnych korelacji między wzrostem namnażanych biomas a produkcją izoflawonów, aczkolwiek omawiane fitohormony nieznacznie stymulowały przyrost badanych kalusów.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń dokonano wyboru podłoża doświadczalnego, łączącego cechy pożywki wzrostowej (W_p -983,072) oraz produkcyjnej (maks. zawartość izoflawonów – $1047,23 \text{ mg/100 g}$ suchej masy). Na modyfikacji eksperymentalnej stanowiącej pożywkę SH zawierającą $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ TIBA i $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ kinetyny uzyskano największe, w hodowlach stacjonarnych *G. tinctoria*, stężenia omawianych wtórnych metabolitów, przekraczające 3 krotnie zawartość izoflawonów w roślinie macierzystej ($3073,54 \text{ mg/100 g}$ suchej masy). Jednocześnie na zoptymalizowanym podłożu, namnażane kalusy charakteryzowały się puszystą strukturą, łatwą do zdyspergowania w warunkach hodowli zawieszinowych. Na drodze modyfikacji medium hodowlanego, wybranymi regulatorami wzrostu, nie tylko otrzymano szybko rosnący kalus *G. tinctoria*, o wysokim potencjale produkcyjnym, w stosunku do połączeń izoflawonoidowych, ale również uniknięto stosowania w dalszych eksperymentach II fazowych systemów hodowlanych złożonych z pożywek wzrostowych oraz produkcyjnych.

W ramach zasadniczego celu projektu habilitacyjnego, z uprzednio otrzymanych hodowli stacjonarnych *G. tinctoria*, wyprowadzono kultury wytrząsane, stwarzające bezpośrednią możliwość pełniejszej kontroli i sterowania procesami doświadczalnymi (elicytacja, dokarmianie i permeablizacja biomas) i tym samym uzyskanie zwiększonej akumulacji izoflawonów w namnażanych tkankach. Eksperymenty realizowane na poziomie kultur stacjonarnych (hodowle kalusowe oraz pędowe) wykazały, że stopień morfogenezy biomas na równi z wprowadzeniem badanych gatunków do hodowli *in vitro* może wywierać określony wpływ na wtórny metabolizm tkankowy janowców w zakresie analizowanych związków.

W celu pełniejszego wyjaśnienia roli cytodyferencji w procesie akumulacji izoflawonów w biomasach *G. tinctoria*, z odpowiednich kultur stacjonarnych, wyprowadzono płynne hodowle korzeni odciętych, pędów oraz zawiesiny rozproszonych komórek parenchymatycznych bądź embrionów. Poszczególne typy kultur uzyskano na drodze doboru *inoculum* roślinnego oraz pożywki wzrostowej, modyfikowanej w zakresie regulatorów wzrostu.

Zawiesiny rozproszonych komórek janowca barwierskiego wyprowadzono z puszystej biomasy kalusowej badanego gatunku, kultywowanej na pożywce SH, zawierającej $1,0 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) TIBA oraz $23,23 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ ($5,0 \text{ mg l}^{-1}$) kinetyny. Powyższe podłoże, w przypadku odpowiedniej hodowli stacjonarnej, warunkowało maksymalną produkcję izoflawonów oraz intensywny przyrost badanych biomas.

Płynną kulturę embrionów *G. tinctoria* otrzymano z tkanki przyrannej, rosnącej na stacjonarnej pożywce SH suplementowanej $2,46 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA oraz $22,19 \mu\text{mol l}^{-1}$ BAP. Na podłożu o niniejszym składzie podstawowa biomasa kalusowa różnicowała się w jasnozielone globularne embriony.

Wytrząsaną hodowlę pędową uzyskano natomiast ze stacjonarnych kultur mikroroślinek rosnących na pożywce SH z $9,84 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP i $0,99 \mu\text{mol l}^{-1}$ TDZ. W hodowli płynnej pędu janowca kultywowano w podstawowej pożywce z dodatkiem $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, co warunkowało wydłużanie i rozgałęzianie się poszczególnych pędów.

Hodowle korzeni odciętych wyprowadzono z ryzogennego kalusa *G. tinctoria* kultywowanego na pożywce SH z dodatkiem $80,55 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA i $260,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ kwasu cytrynowego, zapobiegającego produkcji prostych fenoli w kulturze.

Zarówno płynne kultury pędowe jak i embrionalne oraz zawiesinowe, zachowały znaczny potencjał do produkcji związków izoflawonoidowych, magazynowanych całkowicie wewnątrzkomórkowo. Niezależnie od stopnia cytodyferencjacji omawiane hodowle syntetyzowały zawsze 14-składnikowy zespół wtórnych metabolitów, pochodnych genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A, w ilościach 3 - 6 krotnie wyższych niż w przypadku rośliny gruntowej. Dominującymi składnikami frakcji izoflawonoidowych w powyższych hodowlach były pochodne genisteiny. Daidzina i daidzeina występowały natomiast w stężeniach znacznie niższych. Ponadto omawiane kultury charakteryzowały się zupełnym brakiem akumulacji prostych flawonów, stanowiąc tym samym wybiórcze źródło fitoestrogenów.

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że produkcja izoflawonów o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów, w kulturach janowca barwierskiego, związana jest bezpośrednio ze stopniem morfogenezy poszczególnych biomas. W przypadku połączeń glikozydowych oraz aglikonów stwierdzono odwrotnie proporcjonalną zależność między ilością syntetyzowanych metabolitów a zróżnicowaniem tkankowym. W związku z powyższym najwyższe stężenia omawianych związków oznaczono w biomasach parenchymatycznych, a najniższe w kulturach pędowych. Przeciwnie, akumulacja estrów genistyny rosła, w kulturach wytrząsanych, wraz ze stopniem morfogenezy tkanek. W efekcie hodowle pędowe zawierały najwyższe stężenia niniejszych połączeń ($1008,2 \text{ mg}/100 \text{ g}$ suchej masy – malonylogenistyna). Spośród wszystkich otrzymanych hodowli wytrząsanych janowca barwierskiego jedynie kultury korzeni odciętych syntetyzowały pojedynczy metabolit bioflawonoidowy – izolikwirytygeninę (maks. stężenie – $978,4 \text{ mg}/100$ suchej masy). Sugeruje to, że w przeciwieństwie do korzeni rośliny macierzystej oraz pozostałych biomas *G. tinctoria* hodowanych w warunkach *in vitro*, w kulturach korzeni odciętych doszło do blokady biosyntezy izoflawonów na poziomie chalkonów. W efekcie niniejsze hodowle stały się wybiórczym źródłem bliskiego prekursora izoflawonoidowego.

Dla poszczególnych kultur wytrząsanych *G. tinctoria* określono profile wzrostowe oraz prześledzono kinetykę produkcji, w cyklach hodowlanych, izoflawonów znajdujących się w łańcuchu przemian biogennej genisteiny oraz daidzeiny. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że wszystkie otrzymane biomasy charakteryzowały się znacznym przyrostem (wysokie wartości współczynników przyrostu) oraz maksymalną akumulacją analizowanych związków, przypadającą na fazę stacjonarną cyklu hodowlanego. Opisywane zjawisko wskazuje, że biosynteza izoflawonów w kulturach *in vitro* *G. tinctoria* realizowana była przede wszystkim od momentu ustania przyrostu podstawowej materii roślinnej. Dominującym metabolitem frakcji izoflawonoidowych, we wszystkich badanych kulturach, oprócz korzeni janowca, był 7-O-glukozyd genisteiny (genistyna). W wyniku monitorowania, w cyklach eksperymentalnych, wzajemnych zależności między związkami znajdującymi się

w szlaku metabolicznym genisteiny stwierdzono, że końcowa, wysoka zawartość powyższego połączenia jest zarówno wynikiem biosyntezy substancji *de novo*, poprzez glikozydację genisteiny jak i również związana jest z hydrolitycznym rozpadem 7-O-diglukozydu genisteiny.

Śledzenie wzajemnych relacji między metabolitami izoflawonoidowymi znajdującymi się w szlakach biogennych genisteiny oraz daidzeiny potwierdziło dane literaturowe, że biosynteza omawianych połączeń zachodzi w biomasach roślinnych równolegle i niezależnie od siebie, nie konkurując o substancje o charakterze prekursorów. Stwierdzenie w kulturach zawiesinowych, embrionalnych oraz pędowych janowca obecności 7-O-glukozydu 2'-hydroksygenisteiny, związku będącego metabolitem pośrednim między prostymi izoflawonami a kumestanami wskazuje, że wszystkie otrzymane kultury stanowią dynamiczne systemy hodowlane o niezwykle wysokim potencjale do produkcji fitoestrogenów. Spośród wszystkich otrzymanych kultur najwyższą sumaryczną zawartość izoflawonów, przekraczającą ponad 3 krotnie stężenia badanych związków w roślinie gruntowej, określono w zawieszynie parenchymatycznej janowca barwierskiego (11138,95 mg/100 g suchej masy). Główny metabolit frakcji – genistyna, syntetyzowana była w stężeniu 9414,7 mg/100 g suchej masy, co stanowi jedną z najwyższych ilości wtórnych metabolitów uzyskanych w hodowlach *in vitro* roślin wyższych. W związku z powyższym oraz z uwagi na wysoką produktywność omawianych związków, kultury zawiesinowe *G. tinctoria* można uznać za roślinny system hodowlany z przeznaczeniem do produkcji znacznych ilości pochodnych genisteiny.

Większość związków izoflawonoidowych syntetyzowanych w kulturach *in vitro* *G. tinctoria* stanowiły połączenia o charakterze fitoaleksyn bądź fitoantycypin, w których biosyntezie znaczną rolę mogą odgrywać czynniki stresowe. W związku z powyższym, w niniejszym projekcie habilitacyjnym, podjęto próbę zwiększenia akumulacji izoflawonów w wysokoprodukcyjnej zawieszynie *G. tinctoria* za pomocą wybranych elicytorów (jasmonian metylu oraz chitosan), stosowanych powszechnie w kulturach tkankowych roślin z rodziny *Fabaceae*.

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu, obejmującego suplementację pożywek niniejszymi elicytorami, w dniu inokulacji oraz w momencie uzyskania maksymalnej produkcji izoflawonów w biomasach (26 dzień hodowli), stwierdzono istotny wpływ dodawanych substancji zarówno na żywotność tkanek jak i również akumulację analizowanych wtórnych metabolitów. Pod wpływem stosowanych elicytorów i niezależnie od ich rodzaju kultywowane biomasy gwałtownie zamierały. Z uwagi na szybką nekrozę namnażanych komórek, już w pierwszych dniach po zastosowaniu elicytora, niemożliwe było, w omawianym modelu hodowlanym, przyjęcie procedury, w której jasmonian metylu ($100,0 \mu\text{mol l}^{-1}$) oraz chitosan ($150,0 \text{ mg l}^{-1}$) dodawano by już do zawiesiny inokulacyjnej.

Obydwa stosowane elicytory, suplementowane w 26 dniu doświadczenia, warunkowały wielokrotny wzrost stężenia aglikonów izoflawonoidowych w biomasach janowca (genisteina i daidzeina). Maksymalną zawartość obydwu połączeń uzyskano w zawieszynie *G. tinctoria* w 30 dniu eksperymentu, czyli 4 dni po elicytacji. W przypadku dodatku do pożywki chitosanu stężenie aglikonów izoflawonoidowych w namnażanych kulturach wzrosło 4 i 6 krotnie, odpowiednio dla genisteiny (258,4 mg/100 g suchej masy) i daidzeiny (17,5 mg/100 g suchej masy). Zawartość omawianych związków uzyskana w wyniku dokarmiania kultur jasmonianem metylu była nieznacznie niższa (198,3 mg/100 g suchej masy – genisteina; 15,21 mg/100 g suchej masy – daidzeina). Ponadto, w zawieszynie *G. tinctoria*, stwierdzono różnice w metabolizmie estrowych izoflawonów, znajdujących się w łańcuchu przemian biogennych genisteiny, jako bezpośredni rezultat rodzaju dodawanego elicytora. W przypadku jasmonianu metylu całkowite stężenie genisteiny, uzyskane w efekcie stosowania niniejszego elicytora, było wynikiem biosyntezy powyższego aglikonu *de novo* jak również hydrolitycznego rozpadu

malonylogenisteiny. Przeciwnie, obecność w pożywce chitosanu wiązała się z jedynie z produkcją genisteiny *de novo* (stała zawartość w kulturze estrów izoflawonoidowych). Obydwa elicytory nie wpływały natomiast na akumulację i metabolizm podstawowych, glikozydowych metabolitów w zawiesinie (genistyna, 7-O-diglukozyd genisteiny, 7-O-glukozyd 2'-hydroksygenisteiny, daidzina).

W efekcie stosowanej procedury dokarmiania kultur zawiesinowych *G. tinctoria* wybranymi elicytorami uzyskano wzbogaconą, pod względem ilościowym, frakcję izoflawonoidową, zawierającą, w porównaniu z biomasą podstawową, 3 do 6-krotnie wyższe stężenia połączeń o charakterze aglikonów. Wszystkie związki izoflawonoidowe, w omawianej kulturze, podobnie jak w tkance kontrolnej, magazynowane były wewnątrzkomórkowo.

Zmianę sposobu magazynowania omawianych metabolitów uzyskano dopiero w wyniku suplementacji pożywek hodowlanych DMSO (20 ml l⁻¹). Zastosowana procedura spowodowała stopniowy wyciek połączeń izoflawonoidowych z matrycy roślinnych do medium hodowlanego już pół godziny po permeabilizacji chemicznej. Maksymalne stężenie badanych wtórnych metabolitów w pożywce wzrostowej określono w siódmej godzinie eksperymentu i wynosiło ono odpowiednio dla estrów, glikozydów i aglikonów izoflawonoidowych: 95%, 80% i 67% maksymalnej zawartości niniejszych połączeń w zawiesinie *G. tinctoria*. Jako, że DMSO, podobnie jak stosowane elicytory, powodował szybką nekrozę tkanek, zastosowana permeabilizacja chemiczna możliwa była dopiero po zakończeniu intensywnego wzrostu tkanek i osiągnięciu maksymalnej zawartości izoflawonów w biomasach (26 dzień eksperymentu).

Ostatecznie, w wyniku elicytacji kultur zawiesinowych *G. tinctoria* uzyskano roślinny system hodowlany, syntetyzujący znaczne ilości izoflawonów (11350,5 mg/100 g suchej masy), wyrzucanych w efekcie permeabilizacji chemicznej do medium hodowlanego (około 80% ogólnej zawartości związków w biomasach). Uzyskane rezultaty wskazują, że w oparciu o niniejsze kultury można opracować wydajne procesy technologiczne ukierunkowane na produkcję aktywnych leczniczo fitoestrogenów.

Istotną część projektu habilitacyjnego stanowiły doświadczenia z zakresu hodowli korzeni włóśnikowatych *G. tinctoria*. Zasadniczym celem niniejszych eksperymentów było ustalenie czy proces transformacji dzikimi szczepami *Agrobacterium rhizogenes* wpływa na metabolizm powstałych kultur, w zakresie produkcji związków izoflawonoidowych. Na podstawie chromatograficznej analizy porównawczej otrzymanych tkanek transgenicznych, z korzeniami rośliny gruntowej i wcześniej wyprowadzonymi hodowlami korzeni odciętych *G. tinctoria*, starano się odpowiedzieć na pytanie czy biomasy transformowane janowca mogą być rozpatrywane jako roślinny system hodowlany, z przeznaczeniem do produkcji izoflawonów.

Przeprowadzone badania potwierdziły liczne dane literaturowe odnośnie szeregu ograniczeń w przypadku prób transformacji roślin z rodziny *Fabaceae*. Procedurę wyprowadzenia korzeni włóśnikowatych *G. tinctoria* ustalono empirycznie na drodze doboru *inoculum* roślinnego (części hypokotylowe siewek, 2-letnie kultury mikroroślinek janowca oraz fragmenty pędów i liści pochodzących ze zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślinek), transformującego szczepu bakteryjnego (*A. rhizogenes* LBA 9402 i ATCC 15834), techniki transformacji (infiltracja, „smarowanie”) oraz procedury hodowlanej.

Ostatecznie, korzenie włóśnikowate *G. tinctoria* otrzymano jedynie techniką „smarowania”, w wypadku zastosowania szczepu bakteryjnego ATCC 15834 *A. rhizogenes* i tylko, gdy bakterie przed infiltracją kultywowano na pożywce z dodatkiem acetosyringonu (200 μmol l⁻¹). Ponadto skuteczność transformacji (32%) gwarantowało jedynie posłużenie się roślinnym materiałem inokularnym, stanowiącym zgrubiałe fragmenty pędów, pobrane z kultur mikroroślinek janowca.

Transgeniczny charakter otrzymanych kultur korzeniowych potwierdzono w oparciu o analizę morfologiczną powstałych klonów, kochromatografię biomas wobec wzorcowej agropiny oraz porównanie wzrostu korzeni transformowanych z hodowlami korzeni odciętych, na pożywce pozbawionej regulatorów wzrostu (SH₀). Ustalono, że korzenie włośnikowate, podobnie jak korzenie *de novo* *G. tinctoria*, zdolne są jedynie do wybiórczej syntezy bliskiego prekursora izoflawonoidowego – izolikwirytygeniny, nie występującej w roślinie macierzystej. Opisane zjawisko wskazuje na istnienie, w namnażanej biomasie, blokady biosyntezy izoflawonów, na poziomie izomerazy chalkonowej.

W wyniku hodowli linii (3M) korzeni transformowanych janowca barwierskiego w płynnej pożywce SH₀, przy ciągłym oświetleniu, otrzymano intensywnie przyrastające kultury wytrząsane (maks. zawartość świeżej masy – 801,3 g l⁻¹), syntetyzujące prawie 3-krotnie więcej izolikwirytygeniny (2272,2 mg/100 g suchej masy) niż kultury korzeni odciętych. Ponadto omawiany metabolit, podobnie jak to miało miejsce w przypadku kultur korzeni *de novo* był, w korzeniach włośnikowatych, magazynowany całkowicie wewnątrzkomórkowo. Dopiero w wyniku procedury dodawania do pożywki doświadczalnej kwasu abscyzynowego – ABA (37,8 μmol l⁻¹ – 0 lub 42 dzień hodowli) uzyskano wyrzucenie izolikwirytygeniny z biomas korzeniowych do medium hodowlanego (80% maksymalnej zawartości metabolitu w biomasie). Jako, że ABA powodował szybką i postępującą nekrozę namnażanych tkanek, ostatecznie niniejszy związek dodawano do kultury dopiero w 42 dniu eksperymentu, czyli w momencie zakończenia intensywnego wzrostu biomas oraz uzyskania maksymalnej zawartości izolikwirytygeniny w korzeniach włośnikowatych.

Obliczona dla hodowli korzeni transformowanych, rosnących tradycyjnie w kolbach Erlenmeyer'a, produktywność oraz specyficzna produktywność wskazują, że otrzymany system hodowlany może być rozpatrywany jako obiecujące i wybiórcze źródło prekursora izoflawonoidowego, łatwego do izolacji ze względu na zewnątrzkomórkowy status magazynowania niniejszego związku. W związku z powyższym badane biomasy poddano procesowi adaptacji do hodowli w skali półtechnicznej. W specjalnie skonstruowanym do tego celu bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym, poprzez immobilizację korzeni na siatce ze stali nierdzewnej oraz zmianę sposobu napowietrzania kultury (mieszanie pneumatyczne) uzyskano system hodowlany, charakteryzujący się intensywnym przyrostem (maks. zawartość świeżej masy – 914,5 g l⁻¹), akumulujący ogółem 2887,9 mg izolikwirytygeniny /100 g suchej masy (biomasa z pożywką). Obliczona dla danej kultury produktywność (733,52 mg l⁻¹) i specyficzna produktywność (13,58 mg l⁻¹) wskazują, że kultury korzeni transformowanych *G. tinctoria* mogą być wykorzystane w procesach technologicznych ukierunkowanych na produkcję izolikwirytygeniny.

Przeprowadzone doświadczenia z zakresu hodowli wytrząsanych *G. tinctoria* wykazały, że akumulacja poszczególnych połączeń izoflawonoidowych, w badanych biomasach, jest bezpośrednio zależna od charakteru i stopnia zróżnicowania namnażanych tkanek. W związku z powyższym, zarówno kultury zawieszinowe, embrionalne jak i pędowe akumulowały znaczne ilości izoflawonów, znajdujących się w łańcuchu metabolicznym genisteiny, przy niewielkiej produkcji daidzeiny i daidziny. Jednocześnie w omawianych biomasach stwierdzono, że biosynteza pochodnych genisteiny i daidzeiny wydaje się zachodzić równolegle, nie konkurując o związki o charakterze prekursorów. Kultury korzeni odciętych oraz transformowanych janowca syntetyzowały natomiast wybiórczo pojedynczy metabolit flawonoidowy – izolikwirytygeninę. Jako, że zarówno zawiesziny jak i pędy *G. tinctoria* akumulowały jedynie niewielkie stężenia daidzeiny i jej pochodnych, a korzenie produkowały wybiórczo znaczne ilości bezpośredniego prekursora omawianych związków, postanowiono sprawdzić, czy w wyniku kokultywacji powyższych biomas w jednym zbiorniku hodowlanym, możliwe jest

doprowadzenie do międzykankowej translokacji izolikwirytygeniny, a następnie jej biotransformacji do pochodnych daidzeiny w kulturach pędowych bądź zawieszinowych janowca.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń opracowano, po raz pierwszy, roślinny system hodowlany, o charakterze kokultur wewnątrzgatunkowych, zdolny do akumulacji znacznych ilości pochodnych genisteiny oraz daidzeiny, syntetyzowanych na drodze biokonwersji endogenego prekursora – izolikwirytygeniny.

Wstępne doświadczenia z zakresu kokultur janowca barwierskiego obejmowały selekcję monokultur przeznaczonych do kultywacji we wspólnym zbiorniku hodowlanym oraz dobór podłoża eksperymentalnego, warunkującego jednoczesny wzrost obydwu namnażanych biomas. Ponadto ustalono wzajemny stosunek ilościowy poszczególnych tkanek w biomasie inokularnej, zapewniający zachowanie tempa wzrostu kokultur oraz akumulacji poszczególnych związków izoflawonoidowych na poziomie odpowiadającym odpowiednim monokulturom.

System wewnątrzgatunkowych kokultur *G. tinctoria* opracowano ostatecznie w oparciu o korzenie transformowane badanego gatunku, stanowiące bogate źródło prekursora izoflawonoidowego – izolikwirytygeniny jak również charakteryzujące się anergizacją w stosunku do regulatorów wzrostu. Tym samym możliwe było kokultywowanie niniejszej biomasy w pożywkach zapewniających optymalny wzrost tkankom nietransformowanym. Jako swoistą „matrycę roślinną” do przeprowadzenia biokonwersji izolikwirytygeniny w pochodne daidzeiny, wybrano kulturę pędową, która w przeciwieństwie do zawiesziny komórek i embriónów *G. tinctoria* nie zamierała w toku kokultywacji i nie powodowała postępującego kalusowania biomas korzeniowych.

W przeciwieństwie do danych literaturowych wskazujących na zasadnicze trudności w doborze pożywki wzrostowej do prowadzenia kokultur międzygatunkowych, w omawianym przypadku obydwie tkanki (pędy i korzenie) rosły na tym samym podłożu SH już na etapie monokultur. Zastosowanie $24,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ dodatku IBA w medium hodowlanym, korzystnego dla przyrostu biomasy pędowej nie wpłynęło negatywnie na parametry wzrostowe korzeni transgenicznych w kokulturze.

W wyniku eksperymentów związanych, ogólnie ujmując, z doborem *inoculum* tkankowego w kokulturze, ustalono wyjściowy stosunek ilościowy pędów do korzeni wynoszący 4:1. W opisywanym przypadku zarówno profile wzrostowe obydwu tkanek jak i również zawartość poszczególnych metabolitów izoflawonoidowych w kokulturze były najbardziej zbliżone do wyników uzyskanych w odpowiednich monokulturach. Przeprowadzona analiza fitochemiczna pędów i korzeni *G. tinctoria* oraz pożywek wzrostowych otrzymanych z poszczególnych dni eksperymentu wykazała, że sam proces kokultywacji niniejszych tkanek w jednym zbiorniku hodowlanym nie wpłynął na produkcję oraz magazynowanie metabolitów izoflawonoidowych. Ponadto okazało się, że izolikwirytygenina syntetyzowana przez korzenie janowca i magazynowana wewnątrzkomórkowo nie była dostępna dla układów enzymatycznych występujących w pędach badanego gatunku i odpowiedzialnych za biokonwersję prekursora do bardziej złożonych struktur izoflawonoidowych.

Jedynie dokarmianie kokultury kwasem abscyzynowym ($37,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ – 42 dzień eksperymentu), podobnie jak to miało miejsce w przypadku monokultur korzeniowych, umożliwiło wyrzucenie niniejszego chalkonu z matrycy roślinnej do medium hodowlanego i następnie wykorzystanie go do syntezy daidzeiny i daidziny w kulturach pędowych. W tym miejscu należy zaznaczyć, że dodatek ABA do kokultury nie wpłynął negatywnie na profil wzrostowy pędów badanego gatunku oraz akumulację i magazynowanie metabolitów izoflawonoidowych, pochodnych genisteiny i daidzeiny. Zgodnie z oczekiwaniem i w oparciu o dane dotyczące

równolegle przebiegających szlaków biosyntezy genisteiny i daidzeiny, w wyniku translokacji i biokonwersji izolikwirytygeniny w pędach, doszło jedynie do wybiórczego wzrostu produkcji daidzeiny i daidziny. Tym samym uzyskano roślinny system hodowlany o cechach wysokoprodukcyjnej, z uwagi na pochodne genisteiny, monokultury pędowej, „uszlachetniony” dodatkową akumulacją znacznych stężeń daidzeiny i daidziny. Opracowane kokultury umożliwiły ponadto utylizację monokultur korzeni transformowanych *G. tinctoria*, które początkowo, ze względu na wybiórczą akumulację izolikwirytygeniny, wydawały się mało atrakcyjne z technologicznego punktu widzenia. Swoiste „dokarmianie” pędów endogennym prekursorem, produkowanym w kokulturze, w przeciwieństwie do substratu egzogenego, stosowanego w formie dodatku do pożywki, jest procedurą ekonomicznie opłacalną.

W efekcie przeprowadzonych doświadczeń otrzymano nowy roślinny system hodowlany, produkujący 19 - krotnie więcej daidziny (1647,5 mg/100 g suchej masy) i 68 razy więcej daidzeiny (328,7 mg/100 g suchej masy) niż monokultury pędowe janowca. Stężenie podstawowego metabolitu izoflawonoidowego hodowli pędowej, tj. genistyny pozostało natomiast w kokulturze na mniej więcej zbliżonym do monokultury poziomie (6941,5 mg/100 g suchej masy). Z uwagi na powyższe postanowiono, w ramach adaptacji systemu doświadczalnego do warunków hodowli w skali półtechnicznej, przeprowadzić eksperymenty obejmujące namnażanie kokultury w bioreaktorze. Z racji braku na rynku urządzeń komercyjnych do prowadzenia tego typu doświadczeń, skonstruowano w ramach niniejszego projektu prototypowy bioreaktor typu „basket - bubble”. Kulturowane w niniejszym urządzeniu kokultury pędowo-korzeniowe *G. tinctoria* zachowały zdolność do znacznej produkcji fitoestrogenów oraz charakterystyczny potencjał do biokonwersji izolikwirytygeniny. Konstrukcja bioreaktora zapewniająca przestrzenne oddzielenie obydwu tkanek oraz zmiana napowietrzania kokultury zlikwidowały ograniczenia obserwowane w trakcie namnażania niniejszego systemu hodowlanego w klasycznych kolbach doświadczalnych. W rezultacie, w skali półtechnicznej zaobserwowano zwiększenie tempa przyrostu obydwu tkanek jak i również wzrost stężenia poszczególnych metabolitów frakcji izoflawonoidowej. Produktywność oraz specyficzna produktywność systemu w zakresie akumulacji genistyny (odpowiednio: 1381 g l⁻¹ i 34,53 g l⁻¹) oraz daidziny (odpowiednio 434,90 g l⁻¹ i 8,0 g l⁻¹ g l⁻¹) wskazują, że otrzymane kokultury mogą być rozpatrywane jako roślinny system hodowlany z przeznaczeniem do przemysłowej produkcji i biokonwersji wybranych fitoestrogenów.

Reasumując, rezultatem opisywanych badań, obejmujących niniejszą rozprawę habilitacyjną, jest opracowanie wysokowydajnych, roślinnych systemów hodowlanych, z przeznaczeniem do produkcji znacznych ilości aktywnych leczniczo izoflawonów. Uzyskane wysokie zawartości poszczególnych metabolitów w kulturach janowca, będące jednocześnie jednymi z najwyższych stężeń substancji aktywnych otrzymanych z hodowli tkankowych, wskazują, że roślinne kultury *in vitro* mogą być w określonych warunkach traktowane jako swoiste „bioreaktory”, stanowiące podstawę opłacalnych procesów technologicznych, ukierunkowanych na pozyskanie cennych substancji leczniczych, niemożliwych do otrzymania na drodze syntezy chemicznej.

16. SUMMARY

This thesis presents selected aspects of isoflavone production control in *in vitro* cultures of 6 *Genista* species (*G. tinctoria* L., *G. radiata* L., *G. aethnensis* D.C., *G. sagittalis* L., *G. germanica* L. and *G. monosperulana* L.).

The dissertation consists of two parts. The first one presents the botanical and phytochemical characteristics of the investigated *Genista* plants. The chapter dealing with the chemical composition of the analysed species covers isoflavonoids and quinolizidine alkaloids, i.e. the two main groups of secondary metabolites which determine the biological activity of *Genista* plants. Moreover, the theoretical part of the thesis discusses the current state of research into the biosynthesis of isoflavones and the production of these compounds in tissue cultures of higher plants. For the first time an attempt has been made to systematise the existing information about broadly understood experiments involving isoflavones in *in vitro* cultures, giving consideration to their multifaceted nature, the methodology and the applied character of the experiments. Information included in this chapter has been subsequently used in the experimental part of the dissertation project. The theoretical part ends with the chapter dealing with the biological activity of isoflavones. Since there is a considerable number of review papers which thoroughly cover the above topic, this part of the manuscript substantiates the research by only presenting the main areas of activity of phytoestrogens.

The second part of the dissertation covers the experiments into the accumulation of medically active isoflavones in *in vitro* cultures of the selected *Genista* plants. The overriding goal of the project, i.e. the development of plant-based growth systems focussed on producing selectively large quantities of phytoestrogens, was achieved using both standard and advanced experimental procedures which were modified and optimised in the course of the experiment. Generally speaking, they covered the research into the selection of plant material and the growth conditions, making it possible to develop *in vitro* cultures accumulating high concentrations of isoflavonoids.

Phytochemical research, which was an integral part of the dissertation project, covered chromatographic analysis of the flavonoid (HPLC) and alkaloid (TLC) fractions present in the natural *Genista* plants and the biomass produced *in vitro*. The conditions developed in the course of research for the separation of the investigated compounds, were used to select plant biomass with high concentration of isoflavones and low accumulation of toxic quinolizidine alkaloids.

Based on previous reports and the preliminary research carried out at the outset of this project, 6 species of the *Genista* genus were selected for uniquely rich isoflavonoid fraction, much more so, than in the case of *Glycine max.*, which is the main source of phytoestrogens used in medicine.

The preliminary stage of the experiments focused on establishing *in vitro* cultures of the selected *Genista* plants, developing growth conditions for continuous production of biomass and determining the ability of the various callus cultures to produce isoflavonoids.

Due to the complete absence of previous reports on tissue cultures of the investigated *Genista* species, it was necessary at the stage of initiating callus formation to empirically select both the appropriate plant *inoculum*, but also the experimental media, to achieve the production of vital, fast growing biomass. The experiments described here tested 6 growth media

(Gamborg, Nitsch and Nitsch, Miller, Mc Cown, Schenk - Hildebrandt and Murashige and Skoog) used in biotechnological study of higher plants, which differ in the contents of mineral salts and organic components (carbohydrates, amino acids and vitamins). The various callus cultures were originated from hypocotyls, cotyledons and roots of sterile seedlings of these species. It has been found that for all of the analysed *Genista* species, it was only possible to initiate vital callus biomasses without tendencies for redifferentiation and gradual necrosis using hypocotyls. Moreover, the callus biomass obtained was only able to sustain growth on media rich in mineral and organic components (Schenk – Hildebrandt and Murashige & Skoog).

The initial callus cultures were then evaluated for the content of flavonoids and alkaloids, comparing the propagated biomass with the intact plants in that respect. In order to carry out the above phytochemical analysis, the dissertation project included the development of a chromatographic separation for alkaloids and flavonoids commonly present in *Genista* plants. Moreover, optimum conditions were established for the extraction of the investigated secondary metabolites from plant matrices, and then purifying them by removing ballast substances, with consideration for the physical and chemical properties of the accompanying compounds (procedures for alkaloids) and thermolability of the investigated flavonoids (ester derivatives of isoflavones).

In case of bioflavonoids, the method of choice used to separate flavones and isoflavones present in the investigated plants was high performance liquid chromatography (HPLC). Unlike gas liquid chromatography (GLC), the above method did not require derivatisation of the analysed compounds. Moreover, due to the complex nature of the flavonoid set present in the investigated species, with extremely varying concentrations, it was impossible to use thin layer chromatography (TLC) for screening analysis of the plant biomass.

In the course of the research, for the first time the conditions were defined for the HPLC separation of a 22-element isoflavone and flavone set, commonly present in *Genista* plants in the form of aglycones, mono- and diglycosides and esters. The complete separation of the discussed compounds was performed on a LiChrospher RP-18 column with reversed phases, using gradient elution for a 3- element mixture of solvents: acetonitrile : water : acetic acid. The optimised method for HPLC separation of the investigated compounds was then used to identify the composition of the flavonoid fraction present in various morphological parts of *G. tinctoria*, the species which has the richest bioflavonoid fraction in the intact plant. The described stage of the analysis used a liquid chromatograph coupled with a mass detector and a diode array. The use of the above procedure made it possible to identify the particular components of the flavonoid fraction in *G. tinctoria on-line*, based on three parameters: t_R , mass spectrum and ultraviolet spectrum.

The flavonoid fractions which underwent chromatographic analysis were obtained from various morphological parts of *G. tinctoria* using a plant matrix extraction in ultrasonic bath, followed by purification of the primary extracts with the exclusion of any high temperature processes. As a result the decomposition of isoflavonoid esters was avoided. The effectiveness of this procedure was confirmed by phytochemical analysis of plant material containing a specified addition of internal standards (selected flavonoid aglycones, glycosides and esters).

The HPLC analysis of *G. tinctoria* intact plants, revealed a rich, 16-element bioflavonoid set, consisting of an isoflavonoid fraction (derivatives of genistein, daidzein, formononetin and biochanin A) and simple flavones, derivatives of luteolin and apigenin. In the respective morphological parts of the plant, the discussed compounds were present in various concentrations.

The largest concentration of bioflavonoids was found in the flowers of *G. tinctoria* (4151,42 mg/100 g dry weight). Unlike the roots, also foliate shoots of this species accumulated considerable quantities of the investigated secondary metabolites (4063,46 mg/100 g dry weight). Due to the low percentage share of flowers (2.3%) in the total biomass of *G. tinctoria*, it was concluded that only the herb of *G. tinctoria* (shoots with flowers) may be considered as a source of phytoestrogens. That is why this particular plant material was used as the “control sample” in the experiments into the accumulation of isoflavones by *in vitro* cultures of *G. tinctoria*.

The chromatographic method developed here for the separation of a 22-element set of flavonoid standards also proved effective for the separation of isoflavones and flavones present in the other 5 *Genista* species analysed in this project. The comparative analysis of bioflavonoid fractions in the investigated species, showed in all plants a rich set of isoflavones (derivatives of genistein, daidzein, formononetin and biochanin A) and simple flavones (derivatives of luteolin and apigenin), like in the case of *G. tinctoria*. The differences between the various *Genista* species were mainly in the quantity of the investigated compounds and the selective presence of secondary metabolites present in trace quantities. The largest concentrations of isoflavones were found in the herb of *G. tinctoria* (3073,54 mg/100 g dry weight). The dominating compound in the investigated fraction was genistin (1454,2 mg/100 g dry weight).

Like in the case of flavonoid fractions, in this dissertation project the conditions were developed for a chromatographic separation of a 9 – element set of quinolizidine alkaloids, which are commonly present in *Genista* plants. The alkaloid fraction was separated with the use of thin layer chromatography (TLC) which, unlike HPLC, did not require derivatisation of the investigated compounds or the use of highly specific phosphorus-nitrogen detector (PND-GLC). The conditions for the separation of the standard quinolizidine alkaloids were optimised in one- and two-dimensional systems on silica gel plates (Silica Si 60), diol plates (DIOL F_{254S}) or RP-18W plates (RP-18W HPTLC). The mobile phases were three-component mixtures of solvents, differing in polarity and elution potential. Moreover, the analysed compounds were separated with the use of isocratic elutions or stationary phase gradient.

The experiments did not lead to a successful separation of the 9-element mixture of standard alkaloids with the use of one-dimensional TLC, in either normal or reverse phase systems. Two-dimensional TLC on a monolayer stationary phase resulted in similarly unsatisfactory results. A complete separation of the closely related quinolizidine alkaloids was only achieved by 2D-TLC technique with a solid phase gradient (graft chromatography). In the described experiment, the mixture of alkaloid standards was developed in the 1st direction on modified precoated diol F_{254S} TLC plates with mobile phase I composed of: chloroform : methanol : 25% ammonia solution (85 : 15 : 1 - v/v/v). The developed bands of alkaloids were then transferred to silica gel plates modified with octadecyl groups (P-18W F_{254S}, HPTLC) with the use of mobile phase II composed of: acetonitrile : water : 36% solution of hydrochloric acid (30 : 100 : 7 - v/v/v). The above mobile phase was then used to develop alkaloids in the 2nd direction. The effective transfer of the analysed compounds from one stationary phase to the other maintaining vertical orientation of the plates in the chromatographic chamber was possible thanks to the device designed at the Department of Pharmacogony by Dr Piotr Migas.

The optimised conditions for the separation of the 9-component mixture of standards was then used to analyse the composition of the alkaloid fraction present in the herbs of the investigated *Genista* plants.

In the course of the experiments, a method for extracting and purifying the analysed set of secondary metabolites was developed. Quinolizidine alkaloids, being weak bases, were extracted

from the plant matrix with pure methanol, omitting the earlier alkalisation. At the stage of purification of the primary extracts from ballast substances, the effect of variable solubility was used: alkaloids as free bases or respective hydrochlorides differ in solubility, depending on the solvent's polarity and acidity.

The finally purified alkaloid sets were obtained by solid phase extraction (SPE – columns RP-18) of primary methanol fractions. The described procedure involved the application of the alkaloid fractions into the RP-18 column, a two-stage process of extract purification (removing simple phenols, terpenoids and protein ballast) and, finally, washing away the investigated set of metabolites.

The TLC analysis of the herbs of *Genista* plants revealed the presence of: sparteine, L- α -isosparteine, retamine, hydroxylupanine, cytisine, methylcytisine, sophocarpine, lupanine and lusitanine. Of all the above compounds only sparteine was present in all six species. The presence of the other alkaloids in the analysed material depended directly on the species, which is confirmed by other reports indicating that these metabolites can be treated as chemotaxonomic markers of *Genista* plants.

The chromatographic analysis of callus cultures of the examined *Genista* plants showed that the biosynthesis of toxic quinolizidine alkaloids, characteristic for the intact plants, was completely inhibited in the discussed biomasses. Moreover, the callus cultures of *Genista* plants did not produce simple flavones, derivatives of luteolin and apigenin, also present in the intact plants. The described phenomena can be related both to the fact that the biomasses were grown *in vitro* (elements of abiotic stress), and to the changed morphological status of the cultures (the development of unorganised biomass). In view of the above, the callus cultures of all the investigated *Genista* plants became a rich, selective source of isoflavones, derivatives of genistein, daidzein, formononetin and biochanin A, present in the form of aglycones, mono- and diglycosides and esters. The dominating components of the accumulated isoflavonoid fractions, irrespective of the species, were always compounds from the metabolic pathway of genistein (genistein, genistein-7-O-glucoside /genistin/, genistein-7-O-diglucoside, 2'-hydroxygenistein-7-O-glucoside, genistein-7-O-(6''-O-malonyl-glucoside) and genistein-7-O-(6''-O-acetyl) glucoside).

It should be noted here, that in the callus cultures of *Genista* plants, the above compounds were accumulated in concentrations many times higher than in the case of intact plants. The results presented here indicate that the *Genista* genus is particularly appropriate for experiments into *in vitro* cultures oriented for the biomasses producing considerable concentrations of medically active isoflavones.

The modification of growth conditions at the stage of initial callus cultures, including experiments carried out in variable lighting conditions (lack or presence of light) with the use of 6 different growth media showed that both the composition of the basic experimental medium and the lighting regimen had a considerable impact on the growth of biomass of *Genista* plants and the ability of the particular calli to produce isoflavones. It has been established that the type of growth media affects the summary content of the accumulated metabolites, rather than the quantitative composition of the isoflavonoid set. On the other hand, the presence or absence of light seems to have a selective effect on the accumulation of ester derivatives of genistein, which are considered to be a storage form of phytoalexins.

The optimum results in terms of biomass growth and large concentration of isoflavonoids in the callus cultures of *Genista* plants were achieved on a "rich" Schenk – Hildebrandt medium (SH), supplemented with 22.6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 2,4-D and 23.2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ kinetin. It was also found that under the optimised growth conditions, the *G. tinctoria* cultures accumulated the

richest set of isoflavones (14 compounds, 6586,5 mg/100 g dry weight) of all the investigated *Genista* plants. The concentration of the secondary metabolites achieved in the case of this biomass was more than double of that in the herb of the intact plant (3073.54 mg/100 g dry weight). The dominating compound in the isoflavonoid fraction in the callus of *G. tinctoria* was genistin (3016.3 mg/100 g dry weight).

In the course of experiments including this dissertation project, for the first time an effective micropropagation method was developed, which proved successful with all six analysed *Genista* plants. Unlike the somatic embryogenesis used so far in the *in vitro* propagation of *Genista monosperma*, the presented experiments involved direct micropropagation, through the auxiliary shoot from shoot tip explants proliferation on media supplemented with a variable composition of growth regulators – auxins and cytokinins. Thus, the effect of particular phytohormones on primordial cultures formation, shoots elongation and root formation in *Genista* plants was established.

As a result of the experimental procedures applied, a 2-stage micropropagation system was proposed for these species. In the 1st stage, involving the development of *Genista* plantlets, the effect of selected cytokinins (kinetin, zeatin, 6- $\{\gamma\text{-}\gamma\text{-dimethylallylamino}\}$ purine/-2iP, 6-benzylaminopurine – BAP and thidiazuron – TDZ) on shoot proliferation was tested. The cytokinins were used in the media alone, or in combination with an auxin (indole-3-acetic acid – IAA). At this stage of the experiment, the beneficial role of TDZ supplement in the media was established, allowing for the anergization of the forming shoot cultures to auxins (IAA) and thus preventing hyperhydracidity of the plantlets and abnormal leaf formation. The optimum proliferation SH medium, containing 9.84 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP and 0.99 $\mu\text{mol l}^{-1}$ TDZ, conditioned 100% formation of microshoot cultures in case of all of the investigated *Genista* plants, with an average of 30 shoots originating from a single explant. Due to the difficulties in isolating the very short shoot structures obtained in the 1st phase of micropropagation, the plantlets were subjected to elongation (2nd stage of the process) on media containing gibberellic acid (GA₃) and indole-3-butyric acid (IBA), as the only growth regulators, or in combination with cytokinins (2iP and TDZ). It was found that using an SH medium without cytokinins, supplemented with 4.92 $\mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, caused 100% of the primordial cultures to significantly elongate, forming shoots with the morphology typical for the intact plant.

The rhizogenesis of the obtained shoot cultures was tested on SH media without growth regulators (SH₀) or containing selected auxins (IAA, IBA and 1-naphthaleneacetic acid – NAA). The highest efficiency of this process (100% rhizogenesis of the cultures with considerable amount of adventitious roots) was observed on the medium supplemented with 2.68 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NAA.

As a result of the micropropagation procedure used, in case of all of the investigated *Genista* plants, after growing for half a year in the garden, plants were obtained which morphologically, and in terms of the content of alkaloids and flavonoids, were same as maternal plants. In this way, the micropropagation method developed here for the selected *Genista* species, as compared to the traditional technique, allowed for fast production of considerable amounts of plant material rich in pharmacologically active compounds. Most importantly, the proposed experimental procedure can be successfully used for the vegetative propagation of *G. aethnensis*, which is an endemic species.

The chromatographic analysis (HPLC) of the microshoot cultures for flavonoid content showed that all of the biomasses obtained, like callus cultures of *Genista* plants, were characterised with exceptionally rich isoflavonoid fraction (derivatives of genistein, daidzein, formononetin and biochanin A), with the absence of simple flavones, derivatives of luteolin and

apigenin. It should be noted here, that the shoot biomass cultures accumulated higher concentrations of ester isoflavones than the callus cultures. The described phenomena seem to indicate that both the process of *in vitro* growth and the degree of cytodifferentiation of the biomasses (callus and shoot cultures) selectively affect the production of bioflavonoids in the investigated *Genista* plants. This statement is also true for quinolizidine alkaloids, which were accumulated in large quantities only in intact plants. The unorganised callus cultures of the discussed *Genista* plants were completely lacking the above compounds, and shoot biomasses with the morphological status different than the maternal plant only synthesised alkaloids in trace quantities (selectively – retamine, sparteine, lusitanine and L- α - isosparteine).

The experiments on the initial callus cultures of the selected *Genista* plants showed that all of the obtained biomasses were characterised with high concentration of isoflavones, with the absence of simple flavones or the toxic quinolizidine alkaloids. Of all the propagated callus cultures, the cultures of *G. tinctoria* accumulated the highest concentrations of isoflavones (6586.5 mg/100 g dry weight) which make it an excellent material for plant-based growth systems for *in vitro* production of a rich set of pharmacologically active phytoestrogens. Given the above, and the considerable vitality of *G. tinctoria* biomass, further research on the accumulation of isoflavones in *in vitro* cultures focussed on this species only.

In the course of the preparation of *G. tinctoria* biomasses for experiments in the liquid media, at the stage of callus cultures, an optimisation of the basic SH media was undertaken, to induce callus, which would easily disperse in liquid media and be characterised by intensive growth and high concentration of isoflavones.

Based on literature and own experiments, the growth media were modified with various auxins (2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1-naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA), indole-3-propionic acid (IPA), indole-3-acetic acid (IAA), p-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA), picloram (PICL), β -naphthoxyacetic acid (β -NOA), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) and 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA)) and cytokinins (zeatin (ZEA), kinetin (KIN), 6-benzylaminopurine (BAP), 6- $\{\gamma$ - γ -dimethylallylamino $\}$ -purine (2iP), N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (4-PPU), 1,3-difluorourea (1,3-DFM) and 1-phenyl-3-(1,2,3,4-thiadiazol-5-yl) urea/thiadiazuron (TDZ)). In the experiment presented here, for the first time 17 different growth regulators used in the biotechnological research of higher plants were tested in a single growth model, establishing their effect on the growth of *G. tinctoria* callus cultures and the accumulation of isoflavonoids by those biomasses. The various auxins and cytokinins were supplemented to the media in two extreme concentrations (0.5 or 5.0 mg l⁻¹) making it possible to establish essential relations between the amount of the phytohormone used on the one hand and the growth of biomasses and the concentration of the investigated compounds in the callus cultures on the other. The effect of the growth regulators on the primary and secondary tissue metabolism was assessed separately for auxins and cytokinins, taking into consideration the selective role of the particular phytohormone in the process of producing isoflavone aglycones, glycosides and esters. Due to the absence of anergisation of *G. tinctoria* callus cultures towards either auxins or cytokinins, in the described experiments biomasses propagated on media with a constant supplement of 2,4-D (assessment of the influence of cytokinins) or kinetin (experiments with auxins) were used as control samples.

The statistical analysis of the results (dynamics analysis) showed a considerable effect of growth regulators on the growth of *G. tinctoria* callus cultures and the accumulation of isoflavones in the particular biomass. The effect was correlated (in case of both auxins and cytokinins) with the type and concentration of the growth regulator. It should be noted here, that irrespective of the type of growth media modification, *G. tinctoria* callus cultures always synthesised a 14-

element set of isoflavones, derivatives of genistein, daidzein, formononetin and biochanin A. The observed effect of growth regulators on the production of the investigated class of secondary metabolites pertained to the concentration of the particular isoflavones in the culture.

Except for β -NOA and TIBA, most auxins stimulated the production of isoflavones when used in high concentrations (5.0 mg l^{-1}). The addition of 0.5 mg l^{-1} of these growth regulators, on the other hand, inhibited the accumulation of the investigated compounds. The relations described here were true both for total isoflavones and, selectively, for aglycones, glycosides and esters. It was also found that the low content of auxins in the media (0.5 mg l^{-1}) induced the growth of *G. tinctoria* callus cultures, while high concentrations clearly inhibited it. These results indicate a reverse correlation between the growth of *G. tinctoria* callus and the accumulation of isoflavonoids, as a direct result of supplementing the experimental media with auxins. However, this is not true for TIBA. This growth regulator, paradoxically, induced the production of isoflavones and biomass growth when used in both concentrations. Even added at 0.5 mg l^{-1} , it conditioned the formation of calluses which synthesised the highest concentrations of secondary metabolites in the whole series ($10474.2 \text{ mg/100 g dry weight}$).

Unlike auxins, cytokinins had variable effect on the accumulation of isoflavones in the form of aglycones, glycosides and esters. The described activity was in direct proportion to the amount of the growth regulator. It was found that most cytokinins, except for zeatin and 1,3-DFM, when used in low concentrations (0.5 mg l^{-1}) induced the production of isoflavonoid glycosides and esters, which was connected with an increase of the total accumulation of the investigated secondary metabolites in the biomass. On the other hand, in the described experimental conditions those growth regulators selectively inhibited the production of isoflavonoid aglycons. These phenomena were related to intensive growth of *G. tinctoria* cultures (positive correlation between tissue growth and isoflavone accumulation).

Cytokinins added to growth media in high concentrations (5.0 mg l^{-1}), apart from 1,3-DFM and zeatin, stimulated the accumulation of glycosides, which also increased the total accumulation of the investigated secondary metabolites in *G. tinctoria* callus. Unlike the experimental variants including media with a 0.5 mg l^{-1} supplement of the discussed phytohormones, cytokinins used in high concentrations also induced the production of isoflavonoid aglycones. Statistical analysis of the data obtained from the experiment in which the tested media were supplemented with 5.0 mg l^{-1} of the particular cytokinin did not show any significant correlation between the growth of the propagated biomass and the production of isoflavones, although the cytokinins slightly stimulated callus growth.

As a result of the experiments, an optimum medium was selected, which combined the properties of a growth medium (W_p - 983.072) and a production medium (maximum concentration of isoflavones – $10474.23 \text{ mg/100 g dry weight}$). On the modified experimental SH medium containing 0.5 mg l^{-1} TIBA and 5.0 mg l^{-1} kinetin, callus cultures produced the largest concentrations of isoflavones of all stationary cultures of *G. tinctoria*, exceeding their accumulation in the maternal plant ($3073.54 \text{ mg/100 g dry weight}$) by a factor of 3. In addition, the callus grown on the optimised medium was easy to disperse in the liquid medium. The modifications of the media with selected growth regulators not only produced a fast growing callus of *G. tinctoria* with high isoflavonoid accumulation potential, but also eliminated the need to use a 2-phase system, consisting of growth and production media, in further experiments.

Pursuing the main goal of the dissertation project, the previously obtained stationary cultures of *G. tinctoria* were used to induce liquid cultures, which provide conditions for better control over the experimental processes (elicitation, feeding and permeabilisation of biomass)

and in this way, higher accumulation of isoflavones in the propagated tissues. The experiments utilising stationary cultures (callus and shoot cultures) showed that the degree of morphogenesis of the biomass, together with the introduction of the investigated species into *in vitro* conditions, can have a particular effect on the secondary tissue metabolism of the analysed compounds in *Genista* plants.

In order to achieve a better understanding of the role of cytodifferentiation in the process of isoflavone accumulation in *G. tinctoria* biomass, liquid cultures of *de novo* roots, shoots and suspensions of dispersed parenchymatic cells or embryos were established from the stationary cultures. The various types of cultures were obtained by selecting the plant *inoculum* and the growth media modified with phytohormones.

The suspensions of dispersed cells of *G. tinctoria* were established from the callus cultivated on SH medium containing $1.0 \mu\text{mol l}^{-1}$ (0.5 mg l^{-1}) TIBA and $23.23 \mu\text{mol l}^{-1}$ (5.0 mg l^{-1}) kinetin. This was the medium which provided the best growth and maximum accumulation of isoflavones in callus cultures of this plant.

The liquid culture of *G. tinctoria* embryos was obtained from callus grown on stationary SH medium supplemented with $2.46 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA and $22.19 \mu\text{mol l}^{-1}$ BAP. On this medium, the basic callus biomass differentiated into bright green, globular embryos.

The liquid shoot cultures were obtained from stationary microshoot cultures grown on SH medium with $9.84 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP and $0.99 \mu\text{mol l}^{-1}$ TDZ. In the liquid culture, the shoots of *G. tinctoria* were cultivated on the basic SH medium supplemented with $24.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA, which conditioned elongation and branching of the shoots.

The liquid *de novo* root cultures were initiated from the rhizogenous callus of *G. tinctoria* cultivated on SH medium supplemented with $80.55 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA and $260.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ citric acid, preventing the production of simple phenols in the culture.

The liquid shoot cultures, the embryo and the suspension cultures all retained significant potential for producing isoflavonoids, stored fully inside the cells. Irrespective of the morphological status, the discussed cultures always synthesised a 14-element set of secondary metabolites, derivatives of genistein, daidzein, formononetin and biochanin A, in concentrations exceeding those found in the intact plant by a factor of 3 to 6. In the above cultures, the dominant components of the isoflavonoid fraction were derivatives of genistein. Daidzin and daidzein, on the other hand, were present in significantly lower concentrations. Moreover, the discussed cultures were characterised by complete absence of accumulation of simple flavones, becoming by that token a selected source of phytoestrogens.

The experiment showed that the production of isoflavones in the form of aglycones, glycosides and esters in *G. tinctoria* cultures is directly related to the degree of morphogenesis of the various biomasses. A reverse relation was noted between the amount of glycosides and aglycones synthesised and the level of tissue differentiation. Therefore, the highest concentrations of these compounds was identified in parenchymatic biomasses, the lowest in shoot cultures. To the contrary, in liquid cultures the accumulation of genistin esters increased with the degree of tissue cytodifferentiation. In effect the shoot cultures contained the highest concentrations of these compounds (1008.2 mg/100 g dry weight of genistin malonate). Of all *G. tinctoria* liquid cultures, only the *de novo* roots synthesised a single bioflavonoid – isoliquirtigenin (max. concentration – $978.4 \text{ mg/100 dry weight}$). This indicates that unlike the roots of the maternal plant and other *in vitro* cultures of *G. tinctoria*, in the *de novo* root cultures the biosynthesis of isoflavones was inhibited at the level of chalcones. In effect, these cultures became a selective source of a close isoflavonoid precursor.

For each liquid culture of *G. tinctoria* growth profiles were established and the kinetics of the production of isoflavones belonging to the metabolic pathway of genistein and daidzein were examined. The experiments showed that all biomasses were characterised with considerable growth (high values of growth factors) and maximum accumulation of the analysed compounds, occurring during the stationary phase of the growth cycle. This phenomenon indicates that the biosynthesis of isoflavones in *in vitro* cultures of *G. tinctoria* was mainly taking place after the basic plant matter stopped growing. In all cultures, except the roots of *G. tinctoria*, the dominant metabolite in the isoflavonoid fraction was genistein-7-O-glucoside (genistin). The monitoring, carried out in the experimental cycles, of the mutual relations between the compounds belonging to the metabolic pathway of genistein showed that the eventual high concentration of genistin resulted from both *de novo* biosynthesis of this substance through glycosidation of genistein, and from the hydrolysis of the respective diglucoside (genistein-7-O-diglucoside). The observation of mutual relations between isoflavonoid metabolites which are in the metabolic pathways of genistein and daidzein confirmed literature reports that the biosynthesis of these compounds occurs in the plant biomass simultaneously and independently, without competing for precursor substances. The identification of 2'-hydroxygenistein-7-O-glucoside, a compound which is an intermediate metabolite between simple isoflavones and coumestans in the embryo, shoot and suspension cultures of *G. tinctoria* indicates that all of these biomasses are dynamic growth systems with exceptionally high potential for both simple and complex phytoestrogen production. Of all the obtained cultures, the highest total accumulation of isoflavones, over 3 times more than in the intact plant, was identified in the parenchymatic suspension of *G. tinctoria* (11138.95 mg/100 g dry weight). The main metabolite in this fraction, genistin, was synthesised to the concentration of 9414.7 mg/100 g dry weight, which is one of the highest amounts of a single secondary metabolite obtained in *in vitro* cultures of higher plants. In view of the above, and considering the high accumulation of the discussed compounds, suspension cultures of *G. tinctoria* can be considered as a plant growth system appropriate for the production of large amounts of genistein derivatives.

Most isoflavonoids synthesised in *in vitro* cultures of *G. tinctoria* were either phytoalexins or phytoanticipins, in the biosynthesis of which a considerable role could be played by stress factors. In view of the above, an attempt was made in this dissertation project to increase isoflavone accumulation in highly productive suspension of *G. tinctoria* by using selected elicitors (methyl jasmonate and chitosan), commonly used in tissue cultures of *Fabaceae* plants.

As a result of the experiment in which the medium was supplemented with these elicitors at inoculation and on the day of maximum production of isoflavones in the biomass (day 26), an essential effect of the added substances on the vitality of tissues and the accumulation of the analysed secondary metabolites was noted. Under the influence of the elicitors, irrespective of their type, the biomasses died rapidly. Because of the quickly progressing necrosis of the propagated cells, occurring already in the first days after applying the elicitor, in the discussed growth model it was impossible to adopt a procedure of adding methyl jasmonate (100.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$) and chitosan (150.0 mg l^{-1}) already to the plant *inoculum*.

When supplemented on day 26 of the experiment, both elicitors conditioned increase of concentration of isoflavonoid aglycones in *G. tinctoria* biomass (genistein and daidzein) by a multiple. The maximum concentration of both compounds was obtained in *G. tinctoria* suspension on day 30 of the experiment, i.e. 4 days after elicitation. When chitosan was added to the medium, the concentration of isoflavonoid aglycones in the propagated cultures increased 4 and 6 times over, respectively for genistein (258.4 mg/100 g dry weight) and daidzein (17.5

mg/100 g dry weight). The concentration of these compounds achieved as a result of supplementing the media with methyl jasmonate was slightly lower (198.3 mg/100 g dry weight – genistein; 15.21 mg/100 g dry weight – daidzein). Moreover, in the suspension of *G. tinctoria* differences in the metabolism of ester isoflavones, which belong to the metabolic pathway of genistein, were noted as directly related to the type of elicitor added. In case of methyl jasmonate the total concentration of genistein achieved as a result of using this elicitor, was the result of the biosynthesis of this aglycon *de novo*, as well as the hydrolysis of genistein malonate. The presence of chitosan in the medium was only associated with the production of genistein *de novo* (constant concentration of isoflavonoid esters in the culture). Neither of the elicitors had any effect on the accumulation and metabolism of the basic glycoside metabolites in the suspension (genistin, genistein-7-O-diglucoside, 2'-hydroxygenistein-7-O-glucoside, daidzin).

As a result of the procedure to supplement suspension cultures of *G. tinctoria* with selected elicitors, an isoflavone fraction was obtained, which much had higher quantity of aglycones compared to the basic biomass, by a factor of 3 to 6. All isoflavonoids in the discussed culture, like in the control tissue, were stored inside cells.

The change in the way the isoflavones were stored was only achieved after supplementing the growth media with DMSO (20ml l⁻¹). The procedure resulted in a gradual leak of isoflavonoids from the plant matrix to the growth medium already half an hour after chemical permeabilisation. Maximum concentration of the secondary metabolites in the growth medium was observed in the 7th hour of the experiment and it was 95%, 80% and 67% of the maximum content of these compounds in *G. tinctoria* suspension for isoflavonoid esters, glycosides and aglycones respectively. Since DMSO, like the elicitors, resulted in quickly progressing necrotic process of the tissues, the chemical permeabilisation was only possible after intensive tissue growth was completed and the maximum concentration of isoflavones in the biomass was achieved (day 26 of the experiment).

Eventually, as a result of elicitation of suspension cultures of *G. tinctoria*, a plant growth system was developed, which synthesised considerable amounts of isoflavones (11350.5 mg/100 g dry weight), ejected as a result of chemical permeabilisation into the growth medium (approximately 80% of the total amount of these compounds in the biomass). These results indicate that *G. tinctoria* suspension cultures could be used to develop efficient technological processes to produce medically active phytoestrogens.

An important part of the dissertation project were experiments involving the cultures of *G. tinctoria* hairy roots. The main goal of these experiments was to find out whether the process of transformation with wild strains of *Agrobacterium rhizogenes* would affect the metabolism of the obtained cultures in terms of isoflavonoid production. Based on comparative chromatographic analysis of the obtained transgenic tissues with the roots of the intact plant and the earlier established cultures of *de novo* roots of *G. tinctoria*, an attempt was made to find out whether the transformed biomasses of *G. tinctoria* could be seen as plant growth system for the production of isoflavones.

The experiments confirmed the reported numerous limitations in the attempts to transform plants of the *Fabaceae* family. The procedure to obtain hairy roots of *G. tinctoria* was established empirically by selecting the plant *inoculum* (hypocotyl regions of the seedlings, 2-year microshoot cultures of *G. tinctoria*, leaves and stems of 2-month old plantlets grown *in vitro*), the transforming bacteria strain (*A. rhizogenes* LBA 9402 and ATCC 15834), the transformation technique (infiltration, “smearing” the bacteria on the wounded areas) and the growth procedure.

Eventually, the hairy roots of *G. tinctoria* were obtained only with the “smearing” technique, using the bacteria strain ATCC 15834 of *A. rhizogenes* and only when prior to infiltration the bacteria were cultivated on a medium supplemented with acetosyringone ($200\ \mu\text{mol l}^{-1}$). The effectiveness of transformation (32%) was only guaranteed by using inocular plant material, in the form of thickened shoot fragments, collected from *G. tinctoria* microshoot cultures.

The transgenic nature of these root cultures was confirmed by morphological analysis of the clones, co-chromatography of the *in vitro* biomasses against agropine standard and comparison of the growth of transformed roots with *G. tinctoria de novo* roots on the medium without growth regulators (SH_0). It was found that hairy roots, like *de novo* roots of *G. tinctoria*, are only capable of selective synthesis of a close isoflavonoid precursor – isoliquiritigenin, absent in the maternal plant. The described phenomenon indicates that an isoflavone biosynthesis is inhibited in the propagated biomass at the level of chalcone isomerase.

As a result of growing a line (3M) of *G. tinctoria* transformed roots in liquid SH_0 medium under constant lighting, intensively growing root cultures were obtained (max. dry weight content – $801.3\ \text{g l}^{-1}$), which synthesized about 3 times more isoliquiritigenin ($2272.2\ \text{mg}/100\ \text{g dry weight}$) than the *de novo* root cultures. Moreover, as was the case with *de novo* root cultures, in the hairy roots the discussed metabolite was stored entirely inside cells. Only after the procedure of supplementing the experimental medium with abscisic acid – ABA ($37.8\ \mu\text{mol l}^{-1}$ – 0 or 42 day of growth) was isoliquiritigenin released from the root biomass into the experimental medium (80% of the maximum concentration of the metabolite in the biomass). Since ABA caused quickly progressing necrosis of the propagated tissues, eventually this compound was added only in day 42 of the experiment, so after the intensive growth of biomasses was completed and the highest concentration of isoliquiritigenin in the hairy roots was achieved.

The productivity and specific productivity calculated for transformed root cultures growing in Erlenmeyer’s flasks indicates that the obtained growth system may be considered to be a promising and selective source of the isoflavonoid precursor, easy to isolate thanks to the extracellular storage status of this compound. In view of the above, the investigated biomasses underwent the process of upgrading to large scale production. In the specially designed basket-bubble bioreactor, by immobilising the roots in a stainless steel mesh and changing the aeration method (pneumatic stirring), a growth system was developed, characterised by intensive growth (maximum dry weight content – $914.5\ \text{g l}^{-1}$), accumulating $2887.9\ \text{mg}/100\ \text{g dry weight}$ of isoliquiritigenin (biomass and the medium). Productivity ($73352\ \text{mg l}^{-1}$) and specific productivity ($13.58\ \text{mg l}^{-1}$) calculated for this culture indicates, that transformed hairy root cultures of *G. tinctoria* may be used in technological processes oriented for the production of isoliquiritigenin.

Experiments involving liquid cultures of *G. tinctoria* showed that the accumulation of the particular isoflavones in the investigated biomasses depends directly on the nature and the level of cytodifferentiation of the propagated tissues. Considering the above, the suspension, embryonic and shoot cultures accumulated considerable amounts of isoflavones, which are in the metabolic pathway of genistein, with relatively small production of daidzein and daidzin. It was also noted that the biosynthesis of genistein and daidzein in the discussed biomasses could be simultaneous, without competing for precursors. On the other hand, the *de novo* and transformed root cultures of *G. tinctoria* selectively synthesised a single flavonoid metabolite – isoliquiritigenin. Since both the suspensions and shoots of *G. tinctoria* accumulated only small amounts of daidzein and its derivatives, and the roots selectively produced considerable

quantities of the direct precursor of these compounds, a decision was made to check whether the co-culture of these biomasses in a single growth vessel could lead to an inter-tissue translocation of isoliquiritigenin, and then its biotransformation into daidzein derivatives in the shoot or suspension cultures of *G. tinctoria*.

As a result of the experiments, for the first time a plant growth system was developed as an inter-species co-culture, capable of accumulating considerable quantities of derivatives of genistein and daidzein, synthesised through bioconversion of an endogenous precursor – isoliquiritigenin.

Preliminary experiments on co-cultures of *G. tinctoria* involved the selection of monocultures to be cultivated in a single growth flask, and the selection of experimental medium, which would condition good growth of both biomasses. Moreover, the mutual quantitative relation between the tissues in the inoculated biomass was established, ensuring good growth rate of the co-cultures and accumulation of the various isoflavonoid compounds at the level typical for monocultures.

The inter-species system of *G. tinctoria* co-cultures was eventually based on transformed roots, which are a rich source of an isoflavonoid precursor, i.e. isoliquiritigenin, and anergise growth regulators. It was thus possible to co-culture this biomass on media, ensuring optimum growth of non-transformed tissues. The shoot culture was selected as a “plant matrix” for the bioconversion of isoliquiritigenin into daidzein derivatives, as unlike the cell and embryo suspensions, it did not die in co-culture and did not cause callus formation in root biomass.

Contrary to literature reports which indicate fundamental difficulties in selecting growth media for cultivating inter-species co-cultures, in the discussed case two tissues (shoots and roots) grew on the same basic SH medium already at the monoculture stage. The use of $24.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ of the IBA supplement in the growth medium, which supports the growth of shoot biomass, did not have an adverse effect on growth parameters of transgenic roots in the co-culture.

As a result of the experiments which were generally related with the selection of tissue *in-oculum* in the co-culture system, the initial ratio of shoots to roots was established at 4 : 1. In the described case the growth profiles for both tissues, as well as the concentration of the particular isoflavonoid metabolites in the co-culture were closest to the results achieved in the respective monocultures. Phytochemical analysis of shoots and roots of *G. tinctoria* and the growth media obtained on different days of the experiment showed that the actual process of co-culturing these tissues in a single Erlenmeyer flask did not affect the production or storage of isoflavonoids. Moreover, it was found that isoliquiritigenin synthesised by *G. tinctoria* roots and stored inside cells was not available for enzymatic systems present in the shoots of this plant and responsible for the bioconversion of the precursor to more complex isoflavonoid structures.

It was only after supplementing the co-culture with abscisic acid ($37.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ – 42 day of the experiment), like in the case of root monocultures, that the chalcone was released from the plant matrix to the growth medium and then used for the synthesis of daidzein and daidzin in shoot cultures. It should be noted here, that the addition of ABA to the co-cultures did not have adverse effect on the growth profile of the shoots or the accumulation and storage of isoflavonoid derivative of genistein and daidzein. As expected, and based on information about parallel pathways of biosynthesis of genistein and daidzein, following the translocation and bioconversion of isoliquiritigenin in the shoots, selective increase in the production of daidzein and daidzin occurred. In this way, a plant culture system was obtained which, in terms of high genistein and genistin productivity, resembled the shoot monoculture but was

“enriched” with the additional accumulation of considerable amounts of daidzein and daidzin. The development of the co-cultures made it possible to utilise *G. tinctoria* transformed root monocultures which, initially, due to their selective accumulation of isoliquiritigenin, seemed unattractive from the technological point of view. The “feeding” of the shoots with endogenous precursor produced in a co-culture, unlike the application of an exogenous substrate in the form of media supplement, is economically viable.

As a result of the experiments, a new growth system was obtained, which produced 19 times more daidzein (1647.5 mg/100 g dry weight) and 68 times more daidzin (328.7 mg/100 g dry weight) than shoot monocultures of *G. tinctoria*. The concentration of the basic isoflavonoid metabolite of the shoot culture, i.e. genistin, in the co-cultures remained at the similar level as in the monoculture (6941.5 mg/100 g dry weight). In view of the above, it was decided to upgrade the experimental system to production scale, and to carry out further experiments, involving the propagation of the co-culture in a bioreactor. Since such commercial devices are not available, in order to carry out the experiments a prototype basket-bubble bioreactor was built for use in this research. The shoot/root co-cultures of *G. tinctoria* grown in this device retained the capacity for producing large amounts of phytoestrogens and the characteristic potential for the bioconversion of isoliquiritigenin. The construction of the bioreactor which provided for the separation of the two tissues and the changed aeration system eliminated the limitations observed when the growth system was propagated in classic Erlenmeyer flasks. As a result, in the experiment carried out on larger scale, faster growth of both tissues was observed, as well as an increased concentration of the particular metabolites of the isoflavonoid fraction. Productivity and specific productivity of the system in terms of genistin accumulation (respectively: 1381 g l⁻¹ and 34.53 g l⁻¹) and daidzin accumulation (respectively 434.90 g l⁻¹ and 8.0 g l⁻¹ g l⁻¹) indicates that the obtained co-cultures may be seen as a plant growth system for industrial production and bioconversion of selected phytoestrogens.

Summing up, the result of the above described research, included in this dissertation project, is the development of highly productive plant growth systems, designed for producing large quantities of medically active isoflavones. The concentrations of the particular metabolites in the *G. tinctoria* cultures were some of the highest ever obtained from *in vitro* biomasses. This indicates that plant *in vitro* cultures may be treated as potential bioreactors of a kind, providing the basis for viable technological processes delivering valuable medical substances, otherwise impossible to obtain through chemical synthesis.

17. WYNIKI I WNIOSKI

Na podstawie doświadczeń prezentowanych w niniejszej dysertacji sformułowano wniośki dotyczące badań na akumulacją izoflawonów oraz wybiórczo alkaloidów chinolizydynowych, w kulturach *in vitro* wybranych janowców.

BADANIA Z ZAKRESU KULTUR *IN VITRO*

1. Zgodnie z celem pracy, w badaniach wstępnych obejmujących projekt habilitacyjny, wyprowadzono żywotne kultury kalusowe z 6 wybranych gatunków rodzaju *Genista*: *G. tinctoria* L., *G. radiata* L., *G. aethnensis* D.C., *G. sagittalis* L., *G. germanica* L. oraz *G. monosperulana* L.
 2. Testowanie, na etapie inicjacji kalusowania, podstawowych podłoży wzrostowych, różniących się w zakresie zawartości makro- i mikroelementów, aminokwasów oraz witamin, wykazało, że biomasy kalusowe janowców, wyprowadzone z fragmentów hypokotylowych siewek, do ciągłego wzrostu wymagają pożywek „bogatych” w składniki mineralne i organiczne (pożywka Schenk- Hildebrandt’a).
 3. W dobranych eksperymentalnie warunkach hodowlanych (pożywka SH suplementowana $22,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2,4-D oraz $23,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ kinetyny), juvenilne biomasy kalusowe janowców produkowały wybiórczo 14-składnikowy zespół izoflawonów, w ilościach wielokrotnie przewyższających zawartość omawianych związków w roślinach macierzystych. W skład syntetyzowanych frakcji izoflawonoidowych wchodziły połączenia o charakterze aglikonów, mono- i diglikozydów oraz estrów, będących pochodnymi: genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A.
 4. W wyniku wprowadzenia do hodowli *in vitro* oraz zmiany statusu morfologicznego namnażanych biomas (powstanie nieuorganizowanej tkanki przyrannej) stwierdzono, we wszystkich otrzymanych kulturach kalusowych janowców, całkowite zahamowanie produkcji prostych flawonów, pochodnych luteoliny oraz apigeniny, charakterystycznych dla roślin macierzystych. Ponadto w badanych biomasach nastąpiła blokada biosyntezy toksycznych alkaloidów chinolizydynowych, ograniczających zastosowanie badanych gatunków w lecznictwie.
 5. Na etapie opracowania warunków do prowadzenia hodowli ciągłych biomas kalusowych poszczególnych janowców stwierdzono wybiórczy wpływ reżimu oświetleniowego (ciemność lub ciągłe naświetlanie) na akumulację, w badanych kulturach, izoflawonów o charakterze estrów (malonylo- oraz acetylogenistyna).
- Na podstawie przeprowadzonych badań można uznać, że rodzaj *Genista* jest wyjątkowo korzystny do prowadzenia szeroko zakrojonych eksperymentów *in vitro*, mających na celu uzyskanie nowego i bogatego źródła izoflawonów o potencjalnej aktywności fitoestrogennej. Stwierdzenie to dotyczy przede wszystkim janowca barwierskiego akumulującego w biomasie kalusowej najwyższe, spośród wszystkich przebadanych gatunków, stężenia izoflawonów ($6586,5 \text{ mg/100 g}$ suchej masy).

6. W toku prowadzonych prac eksperymentalnych opracowano, po raz pierwszy, efektywną metodę mikrorozmnażania, odpowiednią dla wszystkich 6 badanych gatunków z rodzaju *Genista*.
7. Poprzez bezpośrednią mikropropagację eksplantatów stanowiących fragmenty pędów, na podłożach wzrostowych modyfikowanych zmienną kompozycją regulatorów wzrostu, ustalono wpływ poszczególnych auksyn oraz cytokinin na proces powstawania kultur primordialnych, wydłużanie pędów oraz ukorzenianie badanych gatunków.
8. W wyniku przeprowadzonych badań zaproponowano II - stopniowy system mikrorozmnażania roślin z rodzaju *Genista*. Pierwsze stadium procesu obejmowało otrzymanie mikroroślinek, na podłożu Schenk - Hildebrandt'a, wzbogaconym jedynie cytokininami ($9,84 \mu\text{mol l}^{-1}$ 2iP oraz $0,99 \mu\text{mol l}^{-1}$ tidiazuronu). W drugim stadium powstałe struktury pędowe wydłużano na pożywce SH zawierającej tylko auksynę ($4,92 \mu\text{mol l}^{-1}$ IBA), uzyskując tym samym wysoką wydajność proponowanego procesu. Pędy poszczególnych janowców ukorzeniano w pożywce SH suplementowanej $2,68 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA.
9. Porównawcza analiza chromatograficzna otrzymanych mikroroślinek, w zakresie połączeń flawonoidowych, wykazała, że biomasy wszystkich badanych gatunków z rodzaju *Genista*, podobnie jak odpowiednie tkanki przyranne, charakteryzowały się bogatą frakcją izoflawonoidową oraz brakiem prostych flawonów, pochodnych luteoliny i apigeniny. Ponadto, omawiane kultury akumulowały znacznie więcej estrowych izoflawonów niż biomasy kalusowe. Tym samym ustalono, że proces morfogenezy może wywierać bezpośredni wpływ na produkcję poszczególnych związków frakcji izoflawonoidowych i flawonowych, w hodowlach *in vitro* janowców.
- W efekcie przeprowadzonych doświadczeń opracowano wysokowydajną metodę mikrorozmnażania wybranych gatunków z rodzaju *Genista*. Wszystkie rozmnażane, w warunkach *in vitro* rośliny, po regeneracji, charakteryzowały się profilem metabolicznym, w zakresie połączeń flawonoidowych, oraz cechami morfologicznymi odpowiadającymi gatunkom macierzystym. Z uwagi na powyższe opisywana w dysertacji metoda mikrorozmnażania może okazać się odpowiednia do rozmnażania wegetatywnego całego rodzaju *Genista*. Wydaje się to szczególnie istotne z uwagi na fakt, że wiele gatunków omawianego rodzaju to rośliny endemiczne o charakterze długo rosnących krzewów. Ponadto kultury pędowe badanych janowców, ze względu na znaczną zawartość połączeń izoflawonoidowych, mogą podobnie jak odpowiednie biomasy kalusowe, posłużyć jako systemy modelowe do eksperymentów nad biosyntezą i metabolizmem fitoestrogenów.
10. W oparciu o przeprowadzoną analizę chromatograficzną HPLC kalusów otrzymanych z wybranych gatunków rodzaju *Genista*, w zakresie połączeń z grupy izoflawonów, zgodnie z celem pracy, doświadczenia biotechnologiczne zawężono do kultur *in vitro* janowca barwierskiego. Powyższa biomasa charakteryzowała się największą zawartością fitoestrogenów ($6586,5 \text{ mg}/100 \text{ g}$ suchej masy).
11. W ramach przygotowania kalusów *G. tinctoria* do eksperymentów na poziome kultur wytrząsanych, zoptymalizowano, w warunkach hodowli stacjonarnych, stosowane podłoże hodowlane Schenk - Hildebrandt'a, w zakresie regulatorów wzrostu. Zmodyfikowana pożywka warunkowała otrzymanie odpowiedniego *inoculum* hodowlanego (puszysta, luźna biomasa), produkującego niezwykle bogatą frakcję izoflawonoidową ($10474, 2 \text{ mg}/100 \text{ g}$ suchej masy). Dominującym składnikiem badanego zespołu była genistyna ($5528,69 \text{ mg}/100 \text{ g}$ suchej masy).

12. W toku przeprowadzonych eksperymentów ustalono wpływ regulatorów wzrostu z klasy auksyn i cytokinin, dodawanych do pożywek w dwóch skrajnych stężeniach, na przyrost kalusów *G. tinctoria* oraz akumulację w badanych biomasach połączeń izoflawonoidowych.
13. W niniejszej dysertacji przebadano, po raz pierwszy, 17 różnych regulatorów wzrostu (38 modyfikacji doświadczalnych) stosowanych w biotechnologii roślin wyższych, określając ich bezpośredni wpływ na akumulację, w warunkach *in vitro*, określonej klasy wtórnych metabolitów.
14. Ustalony wpływ fitohormonów na produkcję izoflawonów w biomasach *G. tinctoria* dotyczył zarówno sumy izoflawonów jak i również wybiórczo połączeń o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów. Z uwagi na obszerny materiał analityczny, wysunięcie ostatecznych wniosków możliwe było dzięki zastosowaniu statystyki jako narzędzia do oceny modyfikacji hodowlanych.
15. Ogólnie stwierdzono, że za wyjątkiem TIBA, większość stosowanych auksyn stymulowała akumulację izoflawonów w stężeniach wysokich ($5,0 \text{ mg l}^{-1}$). Dodatek $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ omawianych regulatorów wzrostu wyraźnie hamował produkcję badanej klasy wtórnych metabolitów. Stwierdzenie to dotyczy zarówno sumy izoflawonów jak i również zawartości połączeń o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów.
16. W przeciwieństwie do auksyn, cytokininy wywierały zmienny wpływ na akumulację glikozydów, aglikonów oraz estrów izoflawonoidowych, zależny bezpośrednio od ilości stosowanego regulatora wzrostu. Stwierdzono, że większość cytokinin indukowała produkcję glikozydów izoflawonoidowych zarówno w niskich ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) jak i w wysokich stężeniach ($5,0 \text{ mg l}^{-1}$), podczas gdy wzrost akumulacji aglikonów uzyskano jedynie na podłożach o wysokiej zawartości omawianych fitohormonów ($5,0 \text{ mg l}^{-1}$). Przeciwnie do aglikonów, wysokie stężenia estrów izoflawonoidowych odnotowano tylko w kalusach janowca barwierskiego, namnażanych na pożywkach z $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ zawartością cytokinin. Wpływ powyższych regulatorów wzrostu na akumulację sumy izoflawonów, w biomasach *G. tinctoria*, nie wydaje się być tak jednoznaczny i zależy bardziej od rodzaju stosowanego regulatora wzrostu niż od jego ilości.
17. Stosowane regulatory wzrostu wywierały również istotny statystycznie wpływ na przyrost biomas janowca barwierskiego. W przypadku cytokinin, większość stosowanych fitohormonów nie hamowała przyrostu kalusów *G. tinctoria*. Związki te, w zależności od stężenia, stymulowały bądź nie wpływały bezpośrednio na wzrost badanych kultur. W przeciwieństwie do cytokinin, auksyny stosowane w dużych ilościach ($5,0 \text{ mg l}^{-1}$) hamowały wzrost biomas *G. tinctoria*, a w dawkach niskich ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) wywierały istotny efekt stymulujący.
18. Analiza statystyczna danych, otrzymanych w wyniku modyfikacji podłoży eksperymentalnych regulatorami wzrostu, wykazała istotną zależność między wpływem fitohormonów na przyrost kalusów *G. tinctoria* i sumaryczną zawartość izoflawonów w badanych biomasach. Zgodnie z powyższym, w przypadku zmiennych auksyn, stwierdzono odwrotnie proporcjonalną zależność między wzrostem kalusów i produkcją izoflawonów, indukowaną modyfikacją fitohormonalną. W przypadku biomas modyfikowanych $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ dodatkiem cytokinin stwierdzono zależność wprost proporcjonalną między przyrostem tkanek, a akumulacją badanych wtórnych metabolitów. Nie stwierdzono natomiast korelacji między opisywanymi wyżej parametrami dla biomas namnażanych na pożywkach zawierających 5 mg l^{-1} określonej cytokininy.

- Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono kluczową rolę regulatorów wzrostu z klasy auksyn i cytokinin w procesie akumulacji izoflawonów, w kulturach *in vitro* janowca barwierskiego. Ze względu na szeroki zakres prowadzonych badań wysunięte wnioski mają charakter ogólny i mogą być wykorzystane w doświadczeniach biotechnologicznych ukierunkowanych na produkcję izoflawonów w kulturach *in vitro* roślin wyższych. Bezpośrednim efektem opisywanych eksperymentów było dokonanie ostatecznego wyboru pożywki doświadczalnej, z przeznaczeniem do prowadzenia hodowli zawieszinowych *G. tinctoria*. Na zoptymalizowanym podłożu SH, suplementowanym 0,5 mg l⁻¹ TIBA oraz 5,0 mg l⁻¹ kinetyny, otrzymane biomasy janowca barwierskiego zawierały 3 - krotnie więcej izoflawonów (10474,23 mg/100 g suchej masy) niż pędy nadziemne rośliny macierzystej (3073,54 mg/100 g suchej masy).
19. W wyniku modyfikacji pożywek doświadczalnych regulatorami wzrostu oraz doboru właściwego *inoculum* tkankowego otrzymano wytrąsane kultury *G. tinctoria* różniące się stopniem cytodyferencji (zawiesiny komórek parenchymatycznych bądź embrionalnych, kultury pędów oraz korzeni *de novo*), zdolne do produkcji wysokich stężeń połączeń izoflawonoidowych.
 20. Dla poszczególnych kultur wytrąsanych określono profile wzrostowe oraz prześledzono kinetykę produkcji izoflawonów, w cyklu hodowlanym, z uwzględnieniem związków znajdujących się w tym samym łańcuchu przemian biogennych.
 21. Ostatecznie stwierdzono, że akumulacja izoflawonów o charakterze aglikonów, glikozydów oraz estrów, w kulturach *in vitro* janowca barwierskiego związana jest bezpośrednio ze stopniem cytodyferencji poszczególnych biomas. W przypadku zawiesiny komórek parenchymatycznych i embrionalnych oraz hodowli pędowych wystąpiła zależność odwrotnie proporcjonalna między ilością syntetyzowanych aglikonów oraz glikozydów a zróżnicowaniem tkankowym. Zależność wprost proporcjonalną stwierdzono natomiast między wzrastającym stopniem morfogenezy, a produkcją pochodnych estrowych (malonylo- oraz acetylogenistyna).
 22. Jedynie kultury korzeni odciętych *G. tinctoria* syntetyzowały pojedynczy metabolit z klasy bioflawonoidów - izolikwirytygeninę (978,4 mg/100 g suchej masy), co sugeruje, że w omawianej biomacie nastąpiła blokada biosyntezy izoflawonów na poziomie izomeryzacji chalkonowej
 23. Najwyższą sumaryczną zawartość izoflawonów określono w zawieszynie parenchymatycznej janowca barwierskiego (11138,95 mg/100 g suchej masy). Podstawowym metabolitem frakcji izoflawonoidowej była genistyna występująca w stężeniu 9414,7 mg/100 g suchej masy, co stanowi najwyższą ilość pojedynczego wtórnego metabolitu uzyskanego z kultur *in vitro* roślin motylkowych.
- W opisywanym projekcie badawczym otrzymano po raz pierwszy wysokowydajne, ze względu na produkcję izoflawonów, roślinne systemy hodowlane, zdolne do akumulacji nawet 4 - krotnie wyższych stężeń izoflawonów niż gatunek macierzysty. Uzyskane, w poszczególnych kulturach janowca, zawartości fitoestrogenów są jednymi z najwyższych stężeń wtórnych metabolitów pozyskanych w wyniku kultury roślin wyższych w warunkach *in vitro*. Wszystkie typy kultur wytrąsanych *G. tinctoria*, w przeciwieństwie do hodowli tkankowych innych gatunków z rodziny *Fabaceae* są układami dynamicznymi, pozwalającymi na śledzenie wzajemnych relacji między izoflawonami znajdującymi się w łańcuchu przemian biogennych genisteiny oraz daidzeiny. W związku

- z powyższym mogą być wykorzystane nie tylko w celach ściśle utylitarnych (bogate źródło fitoestrogenów), ale również jako układy modelowe do prowadzenia doświadczeń dotyczących biosyntezy izoflawonów. Kultury korzeni odciętych janowca barwierskiego, jako wybiórcze źródło prekursora izoflawonoidowego, którym jest izolikwirytygenina, mogą być w przyszłości wykorzystane do eksperymentów biotechnologicznych mających na celu biokonwersję powyższego związku do bardziej złożonych struktur bioflawonoidowych.
24. W wyniku elicytacji wysokoprodukcyjnych kultur zawiesinowych janowca barwierskiego jasmonianem metylu oraz chitosanem uzyskano biomasy produkujące znaczne ilości aglikonów izoflawonoidowych, tj. genisteiny oraz daidzeiny, w ilościach 3 do 6-krotnie przewyższających stężenia omawianych związków w hodowlach podstawowych.
 25. Maksymalne stężenia badanych aglikonów, oznaczone w biomasach *G. tinctoria*, 4 dni po elicytacji (30 dzień hodowli), były wynikiem syntezy niniejszych związków *de novo* (elicytacja chitosanem) bądź wypadkową powyższego procesu i hydrolitycznego rozpadu izoflawonów o charakterze estrów (elicytacja jasmonianem metylu).
 26. Zarówno chitosan, jak i jasmonian metylu nie wpływały na zawartość podstawowych składników zespołu izoflawonoidowego w zawiesinie janowca barwierskiego, tj. połączeń o charakterze mono- i diglikozydów genisteiny, które podobnie jak syntetyzowane, w wyniku elicytacji, aglikony magazynowane były całkowicie wewnątrzkomórkowo.
 27. Zmianę statusu magazynowania badanej frakcji wtórnych metabolitów w kulturze zawiesinowej uzyskano w efekcie permeabilizacji chemicznej biomas, pod wpływem DMSO. W wyniku zastosowanej procedury większość izoflawonów została wyrzucona do medium hodowlanego (około 80% sumarycznej zawartości analizowanych związków).
 28. Zarówno dodatek do pożywki związków o charakterze elicytorów jak i również DMSO powodował gwałtowne zamieranie zawiesiny janowca barwierskiego. W związku z tym powyższe substancje suplementowane były dopiero w momencie osiągnięcia maksymalnego przyrostu biomas i optymalnego stężenia wtórnych metabolitów w zawiesinie.
- Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że w wyniku elicytacji zawiesin *G. tinctoria* można wybiórczo stymulować wtórny metabolizm badanych hodowli w zakresie połączeń izoflawonoidowych. Zaproponowana procedura doświadczalna w połączeniu ze skuteczną permeabilizacją kultur doprowadziła do otrzymania wysokoprodukcyjnego, roślinnego systemu hodowlanego, ukierunkowanego na akumulację aktywnych leczniczo izoflawonów, łatwych do ekstrakcji, ze względu na zewnątrzkomórkowy sposób magazynowania. Wydaje się, że omawiane kultury, po przystosowaniu do hodowli w warunkach technicznych, mogą stanowić atrakcyjne źródło aktywnych farmakologicznie fitoestrogenów.
29. W niniejszym projekcie otrzymano, po raz pierwszy kultury korzeni transgenicznych *G. tinctoria* jako bezpośredni wynik doboru właściwego *inoculum* roślinnego, szczepu bakteryjnego *A. rhizogenes* oraz metody transformacji.
 30. Transgeniczny charakter powstałych korzeni włósnikowatych potwierdzono w oparciu o analizę morfologiczną otrzymanych klonów oraz kochromatografię biomas wobec wzorcowej agropiny.

31. W wyniku analizy HPLC korzeni transformowanych *G. tinctoria* stwierdzono, że produkują one, podobnie jak kultury korzeni odciętych, jedynie pojedynczy metabolit z klasy bioflawonoidów, a mianowicie izolikwirytygeninę. Maksymalne stężenie powyższego związku (2887,9 mg/100 g suchej masy – bioreaktor), było jednak w biomasie transgenicznej 3-krotnie wyższe niż w przypadku kultur korzeni *de novo*.
 32. Zoptymalizowano warunki hodowli ciągłej wytrząsanych kultur korzeniowych janowca barwierskiego, charakteryzując profil wzrostowy namnażanych biomas oraz kinetykę produkcji izolikwirytygeniny w cyklu hodowlanym.
 33. Opracowano procedurę dodatku do pożywki kwasu abscyzynowego (42 dzień - 37,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$) warunkującą zmianę statusu magazynowanie izolikwirytygeniny z wewnątrzkomórkowego na zewnętrzny.
 34. Skonstruowano bioreaktor koszyczkowo - bąbelkowy umożliwiający, na skutek immobilizacji korzeni oraz zmiany napowietrzania kultury, hodowlę biomas transgenicznych w skali półtechnicznej.
- Przeprowadzone doświadczenia z zakresu kultur korzeni transformowanych *G. tinctoria* potwierdziły, opisywane szczegółowo w doniesieniach literaturowych, trudności odnośnie transgenezy w obrębie roślin motylkowych. Wydaje się, że opracowana, efektywna metoda indukcji korzeni włosnikowatych janowca barwierskiego, wykorzystująca między innymi inokularny materiał roślinny pochodzący z wieloletnich kultur *in vitro*, może okazać się przydatna w doświadczeniach nad innymi roślinami z rodziny *Fabaceae*. Obliczona dla kultur korzeni transgenicznych *G. tinctoria* produktywność oraz specyficzna produktywność wskazują jednoznacznie, że otrzymane kultury można traktować jako opłacalne i bogate źródło prekursora izoflawonoidowego tj. izolikwirytygeniny. Doświadczenia na etapie namnażania korzeni w bioreaktorze dowiodły, że omawiane kultury dobrze adaptują się do warunków hodowli w skali półtechnicznej, zachowując zdolność do produkcji izolikwirytygeniny. Prototypowy bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy, przetestowany na kulturze korzeni włosnikowatych janowca ogólnie wydaje się odpowiedni do prowadzenia kultur organowych.
35. W wyniku hodowli pędów oraz korzeni transformowanych *G. tinctoria* w jednym zbiorniku doświadczalnym otrzymano, po raz pierwszy, roślinny system hodowlany o charakterze kokultur, stanowiący bogate i wybiórcze źródło pochodnych genisteiny i daidzeiny.
 36. Dobór *inoculum* tkankowego w zakresie wzajemnego stosunku ilościowego korzeni do pędów janowca barwierskiego spowodował, że kokulturowane biomas zachowały w przybliżeniu tempo wzrostu oraz stopień akumulacji związków izoflawonoidowych, charakterystyczne dla odpowiednich monokultur.
 37. Przeprowadzono biokonwersję izolikwirytygeniny syntetyzowanej w korzeniach włosnikowatych *G. tinctoria* do pochodnych daidzeiny, wykorzystując w tym celu biomasę pędową omawianego gatunku, posiadające odpowiednie układy enzymatyczne.
 38. Proces biokonwersji prekursora izoflawonoidowego możliwy był jedynie na skutek uprzedniej translokacji omawianego związku z matrycy korzeniowej do pożywki, a następnie do kultury pędowej, pod wpływem dodatku do medium hodowlanego kwasu abscyzynowego. Zastosowana procedura doświadczalna dodatkowo umożliwiła pominięcie kosztownej ekstrakcji izolikwirytygeniny z biomas korzeniowej.

39. W efekcie przeprowadzonych eksperymentów otrzymano nowy, roślinny system hodowlany, produkujący 19-krotnie więcej daidziny (1647,5 mg/100 g suchej masy) i 68 razy więcej daidzeiny (328,7 mg/100 g suchej masy) niż hodowla pędowa janowca. Stężenie podstawowego metabolitu kultury, tj. genistyny pozostało w kokulturze na mniej więcej niezmiennym, w stosunku do monokultury, poziomie (6941,5 mg/100 g suchej masy).
 40. Kokultury pędowo-korzeniowe *G. tinctoria* hodowane, w specjalnie skonstruowanym do tego, celu bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym zachowały zdolność do produkcji fitoestrogenów oraz charakterystyczny potencjał do biokonwersji izolikwirytygeniny. Konstrukcja bioreaktora zapewniająca przestrzenny rozdział obydwu namnażanych tkanek umożliwiła zwiększenie tempa wzrostu poszczególnych biomas oraz większą akumulację połączeń izoflawonoidowych.
- Kultywowanie pędów i korzeni janowca barwierskiego w jednym zbiorniku hodowlanym wykazało, że powyższy sposób hodowli może okazać się niezwykle przydatny w prowadzeniu roślinnych kultur *in vitro*, ukierunkowanych na produkcję wtórnych metabolitów o cennych właściwościach farmakologicznych. Kokultury umożliwiają, między innymi, wykorzystanie układów enzymatycznych obecnych w określonych tkankach do syntezy metabolitów końcowych, utylizując w omawianym procesie biokonwersji biomasę produkującą jedynie związki o charakterze prekursorów. Z uwagi na wyniki opisywanych eksperymentów trzeba pamiętać o określonej kompartmentacji prekursorów oraz enzymów, która utrudnia, a nawet uniemożliwia ostateczny proces biokonwersji. W doświadczeniach typu kokultur należy więc uwzględnić procedury mające na celu zwiększenie biodostępności związków o charakterze substratów, dla odpowiednich układów enzymatycznych. Opracowany prototypowy bioreaktor koszyczkowo-bąbelkowy o konstrukcji nie stosowanej dotychczas w kulturach *in vitro* roślin wyższych wydaje się odpowiedni do wykorzystania w doświadczeniach z zakresu kokultur roślin wyższych, również w systemie międzygatunkowym, likwidując ograniczenia obserwowane w hodowlach prowadzonych w klasycznych kolbach Erlenmeyer'a.

BADANIA FITOCHEMICZNE

1. W ramach projektu habilitacyjnego przeprowadzono analizy chromatograficzne (HPLC i TLC) roślin gruntowych oraz biomas uzyskanych z kultur *in vitro* wybranych gatunków rodzaju *Genista*, w zakresie połączeń flawonoidowych oraz alkaloidów chinolizydynowych
2. Opracowano metodę chromatograficznego rozdziału HPLC bogatej 22 - składnikowej mieszaniny wzorców flawonoidowych, występujących w rodzaju *Genista*. Dobrą selektywność rozdziału badanych połączeń uzyskano na kolumnie LiChrospher RP- 18, w układzie faz odwróconych, w warunkach elucji gradientowej dla mieszaniny rozpuszczalników: acetonitryl – woda – kwas octowy.
3. Zoptymalizowaną metodę rozdziału HPLC wzorców flawonoidowych wykorzystano do separacji izoflawonów oraz flawonów występujących w różnych częściach morfologicznych janowca barwierskiego. W wyniku przeprowadzonej analizy stwierdzono w badanych surowcach bogatą frakcję izoflawonoidową, złożoną z pochodnych genisteiny, daidzeiny, formononetyny oraz biochaniny A, w postaci połączeń o charakterze

- aglikonów, mono- i diglikozydów oraz estrów. Ponadto *G. tinctoria* z upraw gruntowych charakteryzowała się obecnością prostych flawonów, pochodnych luteoliny i apigeniny.
4. Dzięki zastosowaniu ochronnej procedury obejmującej ekstrakcję oraz oczyszczanie badanych wyciągów flawonoidowych uniknięto rozkładu wtórnych metabolitów występujących, w badanych matrycach roślinnych, w postaci estrów.
 5. Sprzężenie chromatografu cieczowego z detektorem masowym i matrycą diodową umożliwiło identyfikację *on line* związków flawonoidowych zawartych w badanych surowcach roślinnych, w oparciu o trzy parametry: t_R , widmo masowe oraz widmo w nadfiolecie.
 6. Chromatograficzna analiza porównawcza różnych części morfologicznych janowca barwierskiego, w zakresie związków flawonoidowych, pozwoliła na dokonanie wyboru biomasy z hodowli gruntowej (ulistnione pędy), stosowanej następnie jako „próba kontrolna” w eksperymentach biotechnologicznych.
- Opracowana metoda chromatograficznego rozdzielania HPLC była skuteczna nie tylko w separacji frakcji flawonoidowych zawartych w *G. tinctoria* ale również w analizie bioflawonoidów występujących w pozostałych 5 gatunkach janowców objętych projektem habilitacyjnym. Z uwagi na uzyskane wyniki można sądzić, że zoptymalizowana metoda rozdzielania HPLC może okazać się przydatna w badaniach innych surowców roślinnych z rodziny *Fabaceae*, charakteryzujących się obecnością złożonych frakcji flawonoidowych. Opisane warunki rozdzielania chromatograficznego badanego zespołu bioflawonoidów wykorzystano w analizach skryningowych izoflawonów występujących w kulturach *in vitro* janowców. Uwzględnienie wyników analiz HPLC biomas pochodzących z poszczególnych etapów hodowli pozwoliło na ustalenie zależności między szeroko rozumianymi warunkami eksperymentów biotechnologicznych, a akumulacją izoflawonów w kulturach. Ponadto, w oparciu o wykonane badania chromatograficzne wysunięto wnioski, co do wzajemnych relacji między izoflawonami syntetyzowanymi w poszczególnych biomasach. Opisywana procedura umożliwiła stałą selekcję namierzanych kultur, wykazujących znaczny potencjał w kierunku produkcji izoflawonów oraz sterowanie procesami hodowlanymi tak by osiągnąć zamierzoną maksymalną akumulację fitoestrogenów w otrzymanych biomasach roślinnych.
7. Opracowano metodę chromatograficznego rozdzielania techniką TLC 9 - składnikowego zespołu wzorcowych alkaloidów chinolizydynowych, występujących w rodzaju *Genista*.
 8. Optymalizację warunków separacji mieszaniny wzorców alkaloidowych prowadzono w oparciu o jedno- lub dwukierunkową TLC. Związki rozdzielano na płytkach chromatograficznych pokrytych żelami (Silica Si 60) lub żelami modyfikowanymi chemicznie (DIOL F_{254S}; RP-18W), w trójskładnikowych układach faz ruchomych, różniących się polarnością oraz siłą elucyjną. Alkaloidy rozdzielano stosując elucję izokratyczną lub gradient fazy stacjonarnej.
 9. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że w opracowanych warunkach chromatografowania, z wykorzystaniem jednokierunkowej TLC, nie możliwe jest uzyskanie całkowitej separacji 9 - składnikowej mieszaniny alkaloidów wzorcowych.
 10. Rozdział blisko spokrewnionych strukturalnie alkaloidów chinolizydynowych możliwy był w wyniku zastosowania TLC w technice dwukierunkowej, z gradientem fazy stacjonarnej (I-kierunek – płytki żelowe modyfikowane resztami diolowymi; II-kierunek – płytki żelowe modyfikowane resztami oktaacylowymi).

11. Zoptymalizowaną metodę rozdziału TLC substancji wzorcowych wykorzystano do separacji zespołu alkaloidów występujących w częściach nadziemnych oraz kulturach *in vitro* (kalusy oraz pędy) roślin z rodzaju *Genista*.
 12. Opracowano ochronną metodę ekstrakcji oraz oczyszczania frakcji alkaloidowych (technika SPE), pochodzących z badanych matryc roślinnych. W wyniku zastosowanej procedury, z wykorzystaniem zmiennych własności fizyko-chemicznych alkaloidów, występujących w postaci wolnych bądź protonowanych zasad, otrzymano czyste wyciągi alkaloidowe przeznaczone do analiz TLC.
 13. W wyniku porównawczej analizy chromatograficznej TLC stwierdzono istotne różnice między badanymi janowcami w zakresie połączeń alkaloidowych. Dotyczyły one zarówno materiału roślinnego z upraw gruntowych jak i również kultur *in vitro*. Nieuorganizowane biomasy kalusowe, w przeciwieństwie do roślin gruntowych, były całkowicie pozbawione toksycznych alkaloidów chinolizydynowych. Ponadto pędy namnożone w warunkach *in vitro*, pozbawione statusu morfologicznego rośliny gruntowej, syntetyzowały omawiane wtórne metabolity jedynie w ilościach śladowych. Powyższy wynik sugeruje, że biosynteza alkaloidów chinolizydynowych, w badanych janowcach, zależna jest bezpośrednio od stopnia cytodyferencjacji poszczególnych tkanek.
- Przeprowadzone badania dowodzą, że rozdzielenie mieszaniny blisko spokrewnionych alkaloidów chinolizydynowych, za pomocą TLC jest bardzo trudne. Szansę na całkowitą separację omawianych połączeń stwarza technika dwukierunkowa, w gradiencie fazy stacjonarnej. Wydaje się, że opracowana metoda chromatografowania może być wykorzystana do badań skryningowych surowców roślinnych, zawierających bogaty zespół alkaloidów chinolizydynowych. Zastosowanie dwukierunkowej TLC, w gradiencie fazy stacjonarnej, do rozdziału frakcji alkaloidowych obecnych w kulturach *in vitro* janowców, pozwoliło na przeprowadzenie selekcji namnażanych tkanek w kierunku otrzymania biomas całkowicie pozbawionych toksycznych alkaloidów chinolizydynowych (kalusy). Wyselekcjonowane kultury uznano za optymalne do prowadzenia doświadczeń z zakresu roślinnych kultur *in vitro*, ukierunkowanych na wybiórczą produkcję fitoestrogenów.
- Opisywane w niniejszej dysertacji eksperymenty z zakresu roślinnych kultur *in vitro*, w połączeniu z ciągłą analizą fitochemiczną namnażanych biomas, pozwoliły na realizację zasadniczego celu pracy, którym było otrzymanie roślinnych kultur tkankowych, z przeznaczeniem do produkcji aktywnych leczniczo izoflawonów.
 - W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano trzy roślinne systemy hodowlane, charakteryzujące się znaczną akumulacją izoflawonów bądź, jak to miało miejsce w przypadku kultur korzeni włóśnikowatych janowca, interesującym potencjałem do produkcji prekursora izoflawonoidowego – izolikwitygeniny.
 - Najwyższe stężenie izoflawonów uzyskano w szybko rosnącej kulturze zawieszinowej *G. tinctoria* (11138,95 mg/100 g suchej masy). Powyższa biomasa syntetyzowała podstawowy metabolit badanej frakcji, tj. genistynę (9414,7 mg/100 g suchej masy), w ilości prawie 7-krotnie przewyższającej poziom omawianego wtórnego metabolitu w roślinie gruntowej (1454, 2 mg/100 g suchej masy). Ponadto zawieszina janowca barwierskiego akumulowała bogaty, 14-składnikowy zespół izoflawonów,

w którym dominowały pochodne mono- i diglikozydowe genisteiny. W wyniku elicytacji chitosanem, niniejsza frakcja izoflawonoidowa została wzbogacona o wielokrotnie wyższe, w porównaniu z kulturą wyjściową, stężenia połączeń o charakterze aglikonów (genisteina – 258,4 mg/100 g suchej masy oraz daidzeina – 17,5 mg/100 g suchej masy), co wiązało się bezpośrednio ze wzrostem sumarycznej zawartości badanych wtórnych metabolitów do 11350,5 mg/100 g suchej masy. Obliczona dla omawianych kultur produktywność oraz specyficzna produktywność wskazują, że zawiesina *G. tinctoria* może być wykorzystana jako bogate i wybiórcze źródło fitoestrogenów pochodzenia izoflawonoidowego. Uzyskana na skutek permeabilizacji DMSO zmiana statusu magazynowania badanych związków z wewnątrzkomórkowego na zewnętrzny (medium hodowlane) znacznie ułatwia izolację poszczególnych metabolitów z systemu produkcyjnego.

- Kultury korzeni transformowanych janowca barwierskiego stanowią natomiast źródło bliskiego prekursora izoflawonoidowego – izolikwirytygeniny, związku nie występującego w roślinie macierzystej. Znaczne stężenie powyższego metabolitu w biomasach (2887,9 mg/100 g suchej masy) oraz realna możliwość zmiany statusu magazynowania syntetyzowanego połączenia, w roślinnym systemie produkcyjnym, powodują, że korzenie transgeniczne *G. tinctoria* można rozważać jako materiał *in vitro* z przeznaczeniem do produkcji izolikwirytygeniny.
- System roślinny o charakterze wewnątrzgatunkowych kokultur *G. tinctoria* pozwolił na połączenie potencjału produkcyjnego pędów i korzeni transformowanych janowca barwierskiego, w zakresie produkcji izoflawonów. W końcowym efekcie, w wyniku biotransformacji, syntetyzowanej w korzeniach, izolikwirytygeniny do pochodnych daidzeiny w pędach badanego gatunku, otrzymano biomasę produkującą ponad 38-krotnie więcej daidziny (1647,5 mg/100 g suchej masy) oraz 5-krotnie więcej genistyny (6941,5 mg/100 g suchej masy) niż roślina gruntowa.
- Doświadczenia z zakresu namnażania korzeni transformowanych oraz kokultur *G. tinctoria* w bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym dowiodły, że opracowane roślinne systemy hodowlane adaptują się doskonale do warunków hodowli w skali półtechnicznej, zachowując zdolność do akumulacji bogatych frakcji izoflawonoidowych.
- Wyniki doświadczeń, obejmujące wzrost oraz produktywność poszczególnych biomas w prototypowym bioreaktorze koszyczkowo-bąbelkowym wskazują na możliwość wykorzystania skonstruowanego urządzenia w hodowlach *in vitro* roślin wyższych, w szczególności opierających się na eksperymentach o charakterze kokultur.