ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA
VOL. IX, SUPPLEMENTUM SECTIO EEE 2001

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej,
Akademia Medyczna w Łodzi

HALINA WYSOKIŃSKA, RENATA ROGALA

Wpływ jasmonianu metylu na wytwarzanie kwasu rozmarynowego w korzeniach transformowanych *Hyssopus officinalis* L.

Effects of Methyl Jasmonate on Rosmarinic Acid Production in *Hyssopus officinalis* L. Transformed Roots

Hyzop lekarski (*Hyssopus officinalis L.*) jest rośliną leczniczą dostarczającą surowca *Herba Hyssopi*, który ze względu na właściwości rozkurczowe, przeciwbakteryjne, ściągające i wykrztuśne znalazł zastosowanie w medycynie oficjalnej, lecznictwie ludowym oraz homeopatii (Kochan i in., 1999; Murakami i in., 1998). Kreis i in. (1990) stwierdzili, że ziele hyzopu wykazuje także aktywność przeciwwirusową i hamuje odwrotną transkryptazę wirusa HIV.

Z badań fitochemicznych wynika, że składnikami czynnymi *Hyssopus officinalis* L. są olejki eteryczne, związki diterpenowe i garbniki. Ponadto w surowcu znaleziono kwas kawowy i jego pochodne (kwas rozmarynowy i litospermowy), które mają działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne (Banthorpe i in., 1989; Holzmannova, 1995). Szczególnie silne właściwości antyutleniające posiada kwas rozmarynowy (RA), którego produkcję na skalę przemysłową metodą hodowli *in vitro* z kultur komórkowych, rozpoczęła niemiecka firma A. Nattermann & Cie. GmbH (Ulbrich i in., 1985). Kwas rozmarynowy, kwas litospermowy i kwas litospermowy B zostały wykryte również w kulturach korzeni hyzopu transformowanych *Agrobacterium rhizogenes* szczepem LBA 9402 (Kochan i in., 1999) i szczepem ATCC 15834 (Murakami i in., 1998). Nasze wcześniejsze badania wykazały, że zawartość kwasu roz-

marynowego w tych korzeniach wynosiła ok. 6% w przeliczeniu na suchą masę i zależała m.in. od stężenia sacharozy w podłożu (Kochan i in., 1999).

W niniejszej pracy zbadano wpływ jasmonianu metylu (MeJa) na poziom RA w korzeniach transformowanych *Hyssopus officinalis* L. W roślinach MeJa bierze udział m.in. w procesach obronnych, indukując biosyntezę niskocząsteczkowych związków należących do fitoaleksyn (Gundlach i in., 1992; Saniewski, 1997).

MATERIAŁ I METODA

Materiał do badań stanowiły kultury korzeni *Hyssopus officinalis* L. transformowane szczepem LBA 9402 *Agrobacterium rhizogenes*. Zapoczątkowanie kultur i warunki hodowli opisano w pracy Kochan i in. (1999). W doświadczeniach przeprowadzonych w niniejszej pracy wykorzystano czteroletnie kultury korzeni (pasaż 53 i 54).

Celem określenia wpływu MeJa na wzrost korzeni i wytwarzanie RA, elicytor wprowadzano do kultury korzeni w różnych okresach cyklu wzrostu, tj. na początku (dzień 0) oraz w 10 i 18 dniu (faza intensywnego wzrostu). Stężenie MeJa wynosiło 50 $\mu M \cdot dm^{-3}$ podłoża (elicytor rozpuszczono w 96% etanolu). Kontrolę stanowiły kultury korzeni, do których w odpowiednich okresach cyklu wzrostu (0, 10, 18 dzień hodowli) wprowadzano czysty etanol (80 µl/kolbę). Kultury prowadzono w kolbach Erlenmeyera (300 ml) zawierających 80 ml płynnego podłoża Gamborga ze zmniejszoną do połowy zawartością makro- i mikroelementów (1/2 B5), bez regulatorów wzrostu, z sacharozą (100 $g \cdot dm^{-3}$ podłoża). Kolby umieszczano w ciemności, w fitotronie (temp. 26°C), na wytrząsarce rotacyjnej (100 obr./min.). Okres hodowli wynosił 28 dni. Podczas cyklu wzrostu (w odstępach 2-, 4- lub 6-dniowych po dodaniu elicytora) określano wzrost korzeni (w oparciu o świeżą masę) oraz zawartość RA.

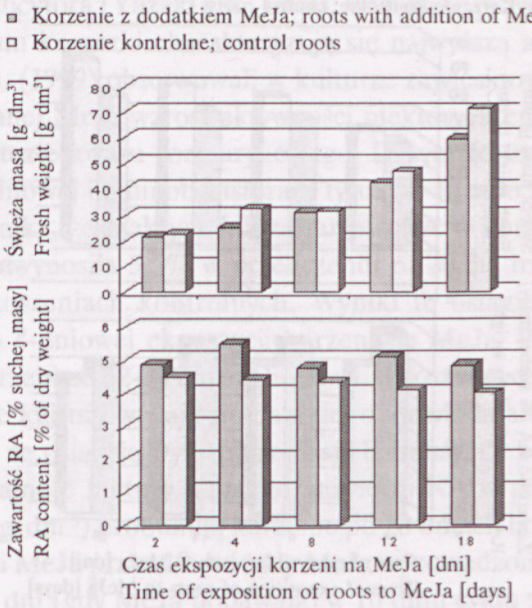
Do ilościowego oznaczenia RA wykorzystano metodę HPLC (Kochan i in., 1999). Oznaczenia wykonywano przy pomocy chromatografu cieczowego Waters (pompa typ 600, detektor spektrofotometryczny UV VIS typ 996, kolumna typ Lichrosorb RP 18). Absorbancję mierzono przy długości fali 332 nm. Do rejestracji chromatogramów wykorzystano program komputerowy – Milenium. Rozdział składników frakcji prowadzono w warunkach gradientowych przy użyciu mieszaniny: acetonitryl-woda-kwas fosforowy (10:50:1 v/v) i acetonitryl-woda-kwas fosforowy (50:50:1 v/v). Szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Zawartość RA wyznaczano porównując pole powierzchni piku z polem powierzchni obliczonym z krzywej wzorcowej. Zawartość RA w korzeniach określano w % suchej masy.

WYNIKI

Aby określić wpływ MeJa na wytwarzanie RA i na wzrost korzeni transformowanych *Hyssopus officinalis* L., MeJa po rozpuszczeniu w etanolu wprowadzano do kultury w ilości 50 $\mu M \cdot dm^{-3}$ podłoża (1/2 B5, bez regulatorów

wzrostu, z sacharozą 100 g·dm^{-3}). Stwierdzono, że efekt działania MeJa zależał od czasu wprowadzenia (0, 10, 18 dzień cyklu wzrostu korzeni) i od okresu ekspozycji korzeni na ten elicytor.

Korzenie przebywające przez cały cykl wzrostu (28 dni) w obecności MeJa wykazywały dwukrotnie niższy przyrost biomasy w stosunku do korzeni kontrolnych (hodowanych bez elicytora) i obniżoną (o 25% w stosunku do kontroli) zawartość RA. Dlatego w dalszej części pracy MeJa wprowadzano w 10 dniu cyklu wzrostu, a korzenie w obecności elicytora przebywały 2, 4, 8, 12 i 18 dni (doświadczenie 1). Wyniki przedstawiono na ryc. 1 (A, B). Wpływ MeJa na zawartość RA zauważono już w korzeniach traktowanych elicytorem przez 4 dni. W tej kulturze poziom RA wynosił 5,5% w przeliczeniu na suchą masę i był o 25% wyższy niż w korzeniach kontrolnych. Jednak jednoczesne zahamowanie wzrostu przez MeJa (o 25% w odniesieniu do kontroli) powodowało, że produkcja RA liczona w g·dm^{-3} była w obu kulturach (kontrolnej i traktowanej elicytorem) podobna i wynosiła ok. 0,3 g·dm^{-3}. Różnice

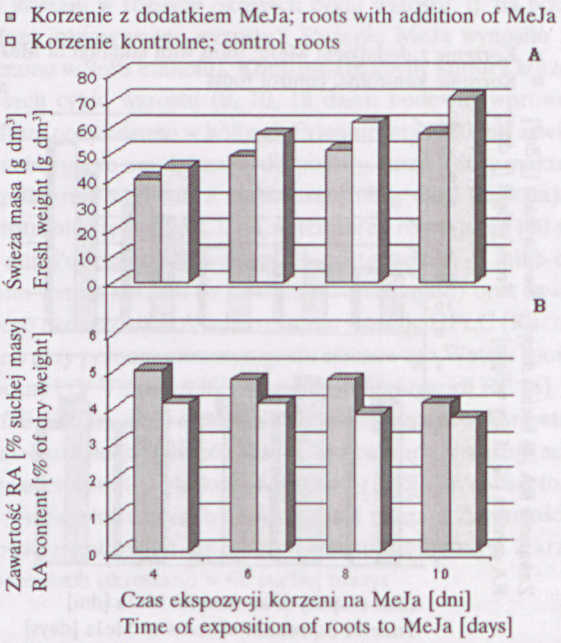


Ryc. 1. Wpływ MeJa, dodawanego w 10 dniu cyklu wzrostu, na wzrost (świeża masa) (A) i zawartość kwasu rozmarynowego (B) w korzeniach transformowanych *Hyssopus officinalis* L. Okres hodowli wynosił 28 dni

Effect of MeJa added in a 10-day-long growth cycle on root growth (fresh weight) (A) and content of rosmarinic acid (B) in transformed roots of *Hyssopus officinalis* L. Time of growth 28 days

w produkcji RA (liczone w $g \cdot dm^{-3}$) między kulturą kontrolną i poddaną działaniu MeJa, uwidaczniają się dopiero w dalszych dniach cyklu wzrostu, kiedy zmniejszyło się hamujące działanie MeJa na wzrost korzeni. Przykładowo w 22-dniowej kulturze, po 12-dniowej ekspozycji na MeJa, przyrost biomasy był tylko o 10% niższy niż w kulturze kontrolnej, a produkcja RA wynosiła 0,6 $g \cdot dm^{-3}$, podczas gdy w kulturze bez dodatku elicytora 0,5 $g \cdot dm^{-3}$.

W drugim doświadczeniu MeJa wprowadzano do korzeni transformowanych *Hyssopus officinalis* L. w 18 dniu cyklu wzrostu, a czas ekspozycji na elicytor wynosił 4, 6, 8 i 10 dni (ryc. 2A i B). W tych warunkach korzenie traktowane MeJa wytwarzały o 10-25% więcej RA niż korzenie kontrolne. Najwięcej RA (4,8% suchej masy, o 25% więcej niż w kontroli) produkowały korzenie w 26 dniu hodowli, traktowane elicytorem przez 8 dni. Produkcja RA liczona w $g \cdot dm^{-3}$ kultury wynosiła w nich 0,7, w porównaniu z 0,6 w korzeniach kontrolnych.



Ryc. 2. Wpływ MeJa, dodawanego w 18 dniu cyklu wzrostu, na wzrost (świeża masa) (A) i zawartość kwasu rozmarynowego (B) w korzeniach transformowanych *Hyssopus officinalis* L. Okres hodowli wynosił 28 dni

Effect of MeJa added in a 18-day-long growth cycle on root growth (fresh weight) (A) and content of rosmarinic acid (B) in transformed roots of *Hyssopus officinalis* L. Time of growth 28 days

DYSKUSJA

MeJa jest często stosowany dla zwiększenia zawartości metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*. Stymuluje on m.in. biosyntezę szikoniny w kulturze zawiesinowej *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. (Mizukami i in., 1993; Yazaki i in., 1997), seskwiterpenów w kulturze korzeni *Hyoscyamus muticus* L. (Singh i in., 1998) i kwasu rozmarynowego w kulturze zawiesinowej *Coleus blumei* Benth. (Szabo i in., 1999).

Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że MeJa zwiększał również poziom RA w korzeniach transformowanych *Hyssopus officinalis* L. Odpowiedź korzeni na działanie MeJa, uzależniona była od stadium rozwojowego kultury, do której wprowadzono elicytor. MeJa dodany na początku cyklu wzrostu silnie hamował wzrost korzeni i biosyntezę RA. Lepsze wyniki osiągnięto, gdy elicytor wprowadzano na początku (10 dzień) lub pod koniec (18 dzień) fazy wzrostowej. Ta faza cyklu wzrostu uważana jest również przez innych autorów, pracujących z kulturami roślinnymi, za odpowiednią dla wprowadzania elicytora (Yazaki i in., 1997). Wynika to prawdopodobnie stąd, że w tym stadium komórki charakteryzują się najwyższą aktywnością enzymów. Szabo i in. (1999) obserwowali w kulturze zawiesinowej *Coleus blumei* Benth. traktowanej MeJa wzrost aktywności niektórych enzymów biorących udział w biosyntezie kwasu rozmarynowego. Dotyczyło to m.in. amoniakoliazy fenyloalaninowej i aminotransferazy tyrozyny (Szabo i in., 1999). Z naszych badań wynika, że maksymalna zawartość RA w korzeniach traktowanych elicytorem wynosiła 5,5% w przeliczeniu na suchą masę i była o 25% wyższa niż w korzeniach kontrolnych. Wyniki te osiągnięto w kulturach 14-dniowych po 4-dniowej ekspozycji korzeni na MeJa. Podobne rezultaty uzyskano dla korzeni po 22-26 dniach hodowli, traktowanych elicytorem przez 8-12 dni. Starsze kultury wydają się bardziej odpowiednie dla produkcji RA z uwagi na fakt, że osiągają wyższe przyrosty biomasy, co z kolei wpływa korzystnie na wydajność kultury. Dlatego najwięcej RA w przeliczeniu na litr kultury (0,7-0,8 $g \cdot dm^{-3}$) produkują korzenie po 28 dniach hodowli, przebywające w obecności MeJa przez 10 dni (gdy MeJa wprowadzono w 18 dniu cyklu wzrostu) lub 18 dni (gdy MeJa dodawano w 10 dniu cyklu wzrostu).

WNIOSKI

1. Korzenie transformowane *Hyssopus officinalis* L. hodowane w podłożu bez dodatku elicytora wytwarzają kwas rozmarynowy w ilości ok. 4% suchej masy.

2. Dodanie MeJa (50 $\mu M \cdot dm^{-3}$ podłoża) zwiększa zawartość kwasu rozmarynowego do 5,5% i hamuje wzrost korzeni. Efekt zależy od czasu wprowadzenia elicytora i okresu kontaktu korzeni z elicytorem.

3. Maksymalna produkcja RA w korzeniach transformowanych wynosiła 0,8 $g \cdot dm^{-3}$ kultury i miała miejsce po 28 dniach wzrostu w korzeniach traktowanych MeJa przez 18 dni.

PIŚMIENNICTWO

Banthorpe D. V., Bilyard H. J., Brown G. D., 1989. Enol esters of caffeic acid in several genera of the Labiatae. Phytochemistry, 28: 2109-2113.

Gundlach H., Müller M. J., Kutchan T. M., Zenk M. H., 1992. Jasmonic acid is a signal trasducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2389-2393.

Holzmannova V., 1995. Kyselina rosmarinova a jeji biologicka aktivita. Chem. Listy, 90: 486-496.

Kochan E., Wysokińska H., Chmiel A., Grabias B., 1999. Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*. Z. Naturforsch., 54c: 11-16.

Kreis W., Kaplan M. N., Freeman J., Sun D. K., Sarin P. S., 1990. Inhibition of HIV replication by *Hyssop officinalis* extracts. Antiviral Res., 14: 323-337.

Mizukami H., Tabira Y., Ellis B. E., 1993. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Rep., 12: 706-709.

Murakami Y., Omoto T., Asai J., Shimomura K., Yoshihira K., Ishimaru K., 1998. Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*. Plant Cell Tissue and Organ Cult., 53: 75-78.

Saniewski M., 1997. Kwas jasmonowy i związki pokrewne. [w:] Jankiewicz L. S. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. PWN, Warszawa: 95-102.

Singh G., Gavrieli J., Oakey J. S., Curtis W. R., 1998. Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. Plant Cell Rep., 17: 391-395.

Szabo E., Thelen A., Petersen M., 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Rep., 18: 485-489.

Ulbrich B., Wiesner W., Arens H., 1985. Large scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In: Neumann K. H., Barz W., Reinhard E. Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Springer, Berlin: 293-303.

Yazaki K., Takeda K., Tabata M., 1997. Effects of methyl jasmonate on shikonin and dihydroechinofuran production in *Lithospermum* cell cultures. Plant Cell Physiol., 38: 776-782.

SUMMARY

Addition of MeJa (50 μM·dm^{-3}) to the hairy root cultures of *Hyssopus officinalis* L. led to stimulation of the accumulation of RA (up to 25% above the control level) and reduction of root growth. The elicitor response proved to be dependent on the contact time between roots and elicitor and age of root culture of the time of elicitor addition.