



PRACE EKSPERYMENTALNE

Indukcja, proliferacja i analiza fitochemiczna tkanki kalusowej *Polygonatum verticillatum* (L.) All.

Przemysław Szybka-Hryniewicz, Zbigniew Janeczko

Katedra Farmakognozji Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Induction, proliferation and fitochemical analysis of callus tissue of *Polygonatum verticillatum* (L.) All.

Summary

In this study, we examined the effect of: coconut water (CW), plant growth regulators NAA – α -naphthaleneacetic acid, IBA – indole-3-butyric acid, 2,4-D-2,4-dichlorophenoxyacetic acid as well as 6-BAP – 6-benzyl aminopurine and steroidal hormones (progesterone, estriol, estrone, 17- β -estradiol, androsterone, androstendione) on callus of *Polygonatum verticillatum* (L.) All. induction.

The best callus formation was obtained from the hypocotyl part of plants cultivated from the seeds after their stratification (two weeks in 4°C) on the Murashige and Skoog (MS) medium, which contained: 100 mg/dm³ of myoinositol, 30 g/dm³ of sucrose, 2 mg/dm³ of 2,4-D and 1 μ M/dm³ of 17- β -estradiol. Additionally, the efforts to obtain the callus from underground parts of *P. verticillatum* were made. It was done on MS medium containing: 1 mg/dm³ 2,4-D, 1 μ M/dm³ 17- β -estradiol and 2 mg/dm³ 6 – BAP. The callus grown in *in vitro* conditions was used for the fitochemical analysis to determine the presence of diosgenin.

Key words:

callus growth, *in vitro*, 2,4-D, 6-BAP, 17- β -estradiol, auxins, cytokinins, *Polygonatum verticillatum*.

Adres do korespondencji

Przemysław
Szybka-Hryniewicz,
Katedra Farmakognozji,
Collegium Medicum,
Uniwersytet Jagielloński,
ul. Medyczna 9,
30-688 Kraków.

1. Wstęp

Gatunki rodzaju *Polygonatum* występujące na terenie Polski zawierają w całej roślinie, a szczególnie w częściach podziemnych, saponozydy steroidowe. Głównym aglikonem tych związków jest

diosgenina, która stosowana jest w półsyntezie 80% produkowanych na świecie hormonów steroidowych. Głównym źródłem wykorzystywanym do izolacji tego związku są gatunki rodzaju *Dioscorea* rosnące w strefie klimatu tropikalnego, zawierające w kłączach średnio od 2 do 8% diosgeniny (1,2).

W tkankach gatunków występujących w Polsce obecność diosgeniny została stwierdzona: w nasionach *Trigonella coerulea* Ser. – kozieradka błękitna (0,2-0,8%) (3), w nasionach *Trigonella foenum-graecum* L. – kozieradka pospolita (0,2-0,8%) (3), w tkance kalusowej *Trigonella foenum-graecum* L. (0,1-0,16%) (4), w ziele i kłączach *Maianthemum bifolium* L. – konwalijka dwulistna (5), w podziemnych i nadziemnych organach wegetatywnych *Polygonatum multiflorum* (L.) All. – kokoryczka wielokwiatowa i *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce – kokoryczka wonna (w obu gatunkach znikoma zawartość diosgeniny) oraz w *Polygonatum verticillatum* (L.) All. – kokoryczka okółkowa (1,4-3,17%) (6,7).

Gatunek *Polygonatum verticillatum* (L.) All. zawierający w częściach podziemnych ponad 3% diosgeniny (7) jest dotychczas jedyną, rosnącą w strefie klimatu umiarkowanego, rośliną o tak wysokiej zawartości tego aglikonu.

Wysoka zawartość diosgeniny w kokoryczce okółkowej daje możliwość wykorzystania tego gatunku w produkcji hormonów płciowych i kortykosteroidów.

2. Cel badań

Celem badań jest optymalizacja zakładania i prowadzenia hodowli *in vitro*, a także opracowanie metod indukcji tkanki kalusowej z części podziemnych oraz z nasion tego cennego, ze względu na możliwość wykorzystania diosgeniny w medycynie, gatunku kokoryczki.

3. Materiał i metody

Materiał do badań pozyskano ze stanowisk naturalnych kokoryczki okółkowej znajdujących się na obrzeżach aglomeracji krakowskiej, na terenie Tatr i Pienin oraz z ogrodów botanicznych Wrocławia, Warszawy, Berna, Zürichu, Innsbrucku, Genewy i Wiednia.

W Katedrze Farmakognozji CM UJ przetestowano 21 wariantów odkażania, kilku metod stratyfikacji i skaryfikacji nasion oraz 30 różnych podłoży płynnych i agarowych. Podstawowy wariant stanowiła pożywka MS zawierająca 100 mg/dm³ mezo-inozytolu, 30 g/dm³ sacharozy, doprowadzona do pH 5,6-5,8, zestalona 0,6% agarrem, wyjałowiona w autoklawie pod ciśnieniem 0,1 MPa, w temperaturze 120°C przez 20 minut. Podłoża uzupełniano regulatorami wzrostu: kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym (2,4-D), kwasem naftylo-1-octowym (NAA), kwasem indolilo-3-masłowym (IBA) oraz 6-benzyloaminopuryną (6-BAP), wodą kokosową (CW), a także hor-

monami steroidowymi (progesteronem, estriolem, estronem, 17- β -estradiolem (17 β -E), androsteronem, androstendionem) w różnych proporcjach (8-10).

Podczas doświadczenia utrzymywano temperaturę: 22°C (noc) i 26°C (dzień), 16-godzinny fotoperiod z promiennikiem FLUORA® firmy OSRAM emitującym głównie promieniowanie z niebieskiego i czerwonego obszaru widma, o natężeniu około 2000 luksów i 60% względną wilgotność powietrza (11-13).

Do analizy fitochemicznej wykorzystano ekstrakty otrzymane z wysuszonego, zmielonego i przesianego przez sito 1,6 mm surowca (kłącza, pędy, kalus). Naważki (trzy próbki po 0,5 g) badanych surowców zwilżano wodą destylowaną (pH 6) i inkubowano w cieplarni w temperaturze 40°C przez 24 godziny. Z wilgotnych próbek umieszczonych w kolbkach okrągłodennych po dodaniu 50 ml metanolu ekstrahowano saponozydy w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 1 godzinę. Ekstrakcję powtarzano trzykrotnie, a połączone ekstrakty metanolowe zagęszczano do sucha. Do zagęszczonych ekstraktów dodano po 20 ml 3 M metanolowego roztworu chlorowodoru i prowadzono hydrolizę w temp. wrzenia przez 3 godziny. Hydrolizaty rozcieńczano dwukrotnie wodą, odparowywano metanol i wytrząsano pięciokrotnie po 3 minuty w rozdzielaczu z 15 ml eteru etylowego w celu eluowania aglikonów. Warstwa eterowa po odparowaniu i rozpuszczeniu suchej pozostałości w chloroformie oraz po przeniesieniu do kolbek miarowych o pojemności 10 ml, została użyta do analizy chromatograficznej (7).

Chromatografię cienkowarstwową (TLC) prowadzono na płytkach firmy Merck (Alufolien Kieselgel 60 bez wskaźnika fluorescencyjnego, art. nr 1.05553.). Na płytki chromatograficzne nanoszono aplikatorem LINOMAT IV firmy CAMAG (Mutenz – Szwajcaria) wzorcowy 0,05% chloroformowy roztwór diosgeniny w ilości od 2 do 4 μ l oraz od 2 do 30 μ l próbek badanych. Chromatogramy rozwijano techniką wstępującą na drodze 10 cm w fazie ruchomej: n-heksan : aceton (4 : 2) w komorze chromatograficznej firmy Merck (22 \times 12 \times 4 cm). Po rozwinięciu suszono strumieniem powietrza, spryskiwano 16% roztworem kwasu siarkowego i ogrzewano w temperaturze 100-105°C przez 2 minuty.

Analizy wykonywano na densytometrze firmy CAMAG (Mutenz – Szwajcaria) przy długości fali $\lambda = 500$ nm.

4. Wyniki i dyskusja

Najkorzystniejszą metodą odkażania nasion było mechaniczne oczyszczenie i przepłukanie ich w wodzie redestylowanej, a następnie poddanie chemicznej sterylizacji 70° alkoholem etylowym przez 60 sekund w celu odtłuszczenia i odpowietrzenia powierzchni odkażanej. Umożliwiło to lepszą penetrację właściwego roztworu odkażającego, czyli 0,1% roztworu HgCl₂, przez 30 minut. Jako zwilżacz zmniejszający napięcie powierzchniowe zastosowano Tween 20 (roztwór 0,05%). Dezynfekcję zakończyło trzykrotne płukanie odkażonych nasion w sterylnej wo-

dzie redestylowanej. Pierwsze płukanie trwało 60 sekund, a następne dwa po 5 minut.

Kielkowało średnio 34% z wysianych nasion, inkubowanych w temperaturze 26°C.

Tkanka kalusowa proliferowała z części hipokotylowej siewek po 7 tygodniach od początku inkubacji nasion, a w przypadku fragmentów kłączy, po około 12 tygodniach. Wyniki wpływu regulatorów wzrostu, hormonu steroidowego oraz wody kokosowej na indukcję tkanki kalusowej *Polygonatum verticillatum* (L.) All. przedstawiono w tabeli.

Tabela

Wpływ współdziałania regulatorów wzrostu, hormonu steroidowego i wody kokosowej na indukcję tkanki kalusowej *Polygonatum verticillatum* (L.) All. na pożywce MS

Dodatki do podłoża MS (mg/dm ³)*			Kalus z siewek (%)
2,4-D	17β – E	6-BAP	20,5
1	1 μM	1	
2,4-D	17β – E	6-BAP	49,5
1	2 μM	1	
2,4-D	17β – E	6-BAP	36,6
2	1 μM	2	
2,4-D	17β – E	6-BAP	41,9
4	2 μM	4	
2,4-D	17β – E	–	55,7
2	1 μM	–	
NAA	17β – E	6-BAP	19,5
2	1 μM	6	
CW	NAA	6-BAP	14,4
1%	1	1	
CW	NAA	6-BAP	10,2
2%	1	1	
CW	2,4-D	6-BAP	15,4
20%	2	2	

(z 30 wariantów wybrano 9 najlepiej indukujących powstawanie kalusa);

* – stosując inne jednostki podano ich oznaczenie.

Analizując uzyskane wyniki należy stwierdzić, że najlepszy wpływ na indukcję rozwoju kalusa z części hipokotylowej siewek, rozwijających się z nasion (55,7%), miało stałe podłoże Murashige i Skooga (MS) uzupełnione 2 mg/dm³ 2,4-D i 1 μM/dm³ 17-β-estradolu.

Korzystne efekty uzyskano po dodaniu do podłoża regulatorów wzrostu i hormonu steroidowego w ilościach: 1 mg/dm³ 2,4-D, 2 μM/dm³ 17-β-estradolu

i 1 mg/dm³ 6-BAP (49,5%) oraz 4 mg/dm³ 2,4-D 2 μM/dm³ 17-β-estradolu i 4 mg/dm³ 6-BAP (41,9%), a także 2 mg/dm³ 2,4-D, 1 μM/dm³ 17-β-estradolu i 2 mg/dm³ 6-BAP (36,6%).

Zadowolający wynik przyniosło zastosowanie: 1 mg/dm³ 2,4-D, 1 μM/dm³ 17-β-estradolu i 1 mg/dm³ 6-BAP (20,5%) oraz 2 mg/dm³ 2,4-D, 1 μM/dm³ 17-β-estradolu i 6 mg/dm³ 6-BAP (19,5%).

Słabsze wyniki w tworzeniu się tkanki kalusowej (14,4 i 10,2%) uzyskano po dodaniu do podłoża hodowlanego 1 i 2% roztworu wody kokosowej łącznie z 1 mg/dm³ kwasu naftylo-1-octowego (NAA) oraz z 1 mg/dm³ 6-benzyloaminopuryny (6-BAP). Podobne wyniki (15,4%), niezbyt zadowolające, otrzymano stosując 20% roztwór wody kokosowej z dodatkiem 2 mg/dm³ kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) oraz 2 mg/dm³ 6-benzyloaminopuryny (6-BAP).

Pozostałe 21 wariantów pożywek dawały wyniki mierne, najwyżej rzędu kilku procent.

Reasumując, należy podkreślić, że najlepszy wpływ na indukcję tkanki kalusowej, z części hipokotylowej siewek, uzyskiwano dodając do pożywki 2,4-D oraz 17-β-estradol.

Indukcję tkanki kalusowej z fragmentów kłączy odnotowano u 14,7% eksplantatów, przy zastosowaniu dodatku do pożywki MS: 1 mg/dm³ kwasu 2, 4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), 1 μM/dm³ 17-β-estradolu (17β-E) i 2 mg/dm³ 6-benzyloaminopuryny (6-BAP).

Na podstawie ilościowej analizy densytometrycznej ekstraktów z tkanki kalusowej oraz z kłączy *Polygonatum verticillatum* (L.) All. potwierdzono występowanie diosgeniny zarówno w tkance kalusowej (średnio 0,55%), w kłączach (średnio 1,22%), owocach (średnio 0,015%), jak i w pędach (średnio 0,014%).

5. Wnioski

1. Przygotowane metody odkażania, stratyfikacji i skaryfikacji nasion oraz eksplantatów z kłączy mogą być wykorzystane do zakładania hodowli *in vitro* *Polygonatum verticillatum* (L.) All.

2. Zoptymalizowano skład pożywki najlepiej nadającej się do indukcji tkanki kalusowej kokoryczki okółkowej.

3. Na podstawie przeprowadzonych badań dowiedziono, że możliwy jest wzrost w hodowli *in vitro* tkanki kalusowej *Polygonatum verticillatum* (L.) All.

4. Opracowana metoda analizy densytometrycznej może być wykorzystana do ilościowego oznaczania diosgeniny w ekstraktach z materiału roślinnego pochodzącego zarówno z hodowli sztucznej, jak i ze stanowisk naturalnych.

5. Wyniki ilościowej analizy densytometrycznej zachęcają do zbadania wpływu składu pożywki i warunków hodowli na rozwój oraz na zawartość diosgeniny w tkance kalusowej kokoryczki okółkowej.

6. Właściwie dobrane warunki oznaczania pozwalają uzyskać zadowalającą powtarzalność wyników.

6. Podsumowanie

Kalusowanie tkanki zależne jest nie tylko od gatunku rośliny, ale także od wprowadzenia modyfikacji w składzie pożywki indukującej rozwój kalusa. Szczególnie trudne do osiągnięcia jest to w przypadku roślin jednoliściennych, do których należy kokoryczka okółkowa *Polygonatum verticillatum* (L.) All. (rodzina *Liliaceae*), m.in. ze względu na brak przyrostu wtórnego.

Dalsze badania nad oceną wpływu ściśle określonych proporcji regulatorów rozwoju roślin, hormonów steroidowych oraz czynników fizycznych na przyrost biomasy tkanki kalusowej oraz na zawartość saponin w tkance kalusowej kokoryczki okółkowej, a szczególnie na ilość, interesującego ze względów praktycznych, aglikonu diosgeniny są kontynuowane. Podejmowane są także próby inicjowania procesu organogenezy w tkance kalusowej, w celu otrzymania roślin potomnych nadających się do aklimatyzacji w uprawach glebowych.

Literatura

1. Furmanowa M., Guzewska J., (1988), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 7, Medicinal and Aromatic Plants II*, Ed. Y .P. S. Bajaj, Springer Verlag, Berlin, 162-184.
2. Šavikin-Fodulović K., Grubišić D., Čulafić L., Menković N., Ristić M., (1998), *Plant Science*, 135, 63-67.
3. Nowak A., Krajewska A., (1982), *Herba Polonica*, 28, 75.
4. Furmanowa, M. J., Guzewska, Bełdowska B., Rzędowski M., (1985), *Herba Polonica*, 31(3-4), 155-166.
5. Sibiga A., Sendra J., (1983), *Streszczenia Ref. XII Nauk. Zjazdu Pol. Tow. Farm.*, Kraków.
6. Mirek Z., Piękoś-Mirek H., Zajac A., Zajac M., (1995), *Vascular Plants of Poland a Checklist*, Wydaw. Inst. Botaniki PAN, Kraków.
7. Janeczko Z., (1993), *Badania nad saponozydami steroidowymi krajowych gatunków w rodzaju Polygonatum All.*, rozprawa habilitacyjna, AM, Kraków.
8. Jankiewicz L. S., (1997), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, PWN, Warszawa.
9. Heble M. R., Staba E. J., (1980), *Planta Medica*, Suppl., 120.
10. Janeczko A., (2000), *Wpływ wybranych steroidów na procesy fizjologiczne roślin ze szczególnym uwzględnieniem indukcji kwitnienia*, praca doktorska, AR, Kraków.
11. Chmiel A., (1992), *Biotechnologia*, 4 (19), 5-16.
12. Zenktele M., (1986), *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*, PWN, Warszawa.
13. Sengupta J., Sen S., (1987), *Current Science*, 56 (24), 1287-1289.