

Halina Wysokińska

Zakład Biologii  
i Botaniki Farmaceutycznej  
Akademia Medyczna  
Łódź**Selekcja linii komórkowych  
*Penstemon serrulatus*  
z podwyższoną zawartością  
glukozydów irydoidowych****1. Wstęp**

Biotechnologia roślin wyższych rozwija się od czasu, gdy (w latach pięćdziesiątych naszego stulecia) udowodniono, że somatyczne komórki roślinne są totipotenne (1). Jedną z dziedzin biotechnologii, intensywnie rozwijaną na przestrzeni ostatnich 10–15 lat jest produkcja wtórnych metabolitów przez roślinne komórki hodowane *in vitro*. Dotyczy to głównie związków czynnych farmakologicznie. Pomimo postępu syntezy chemicznej rośliny stanowią ciągle ok. 25% receptur medycznych (2). Metoda hodowli *in vitro* ma szereg zalet, umożliwia bowiem prowadzenie badań w ściśle kontrolowanych warunkach na materiale dostępnym niezależnie od pory roku. Można w ten sposób otrzymać związki z roślin niedostępnych lub rzadko występujących w naszym klimacie, a także związki nowe nie występujące w świecie roślinnym. Na ogół jednak kultury komórkowe produkują wtórne metabolity w ilości mniejszej niż rośliny gruntowe i to jest jeden z powodów dlaczego kultury te nie są dotąd wykorzystywane na skalę przemysłową (wyjątek stanowi produkcja szikoniny, kwasu rozmarynowego i alkaloidu berberyny).

Problem niskiej wydajności roślinnych kultur komórkowych próbuje się rozwiązać m.in. poprzez:

- 1) optymalizację składu podłoża i warunków hodowli,
- 2) aktywację i modyfikację dróg biosyntezy pożądaných metabolitów (dodatek prekursorów, elictorów, itp.),
- 3) selekcję wysokowydajnych szczepów,
- 4) wykorzystanie komórek imobilizowanych.

**2. Wytwarzanie irydoidów w kulturze *in vitro*  
*Penstemon serrulatus***

W 1983 r. w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Łodzi wprowadzono do hodowli *in vitro* *Penstemon serrulatus* Menz. Jest to północno-amerykańska roślina z rodziny *Scrophulariaceae*. Rośliny z rodzaju *Penstemon* charakteryzują się obecnością różnego typu związków irydoidowych–heterocyklicznych monoterpenu, które zawierają w swej budowie układ dwóch pierścieni: cyklopentanu i  $\alpha$ -piranu. Irydoidy mają znaczenie chemotaksonomiczne oraz interesujące właściwości biologiczne (3–7). W rodzaju *Penstemon* obok irydoidów typowych dla rodziny *Scrophulariaceae*, takich jak aukubina, katalpol i ich estry (8), stwierdzono występowanie rzadko spotykanych w świecie roślinnym, estrów irydoidowych typu „valeriana” (9–14). Związki te są zestyfikowane kwasem izowalerianowym w pozycji C–1 i posiadają resztę cukrową w pozycji C–11 (rys. 1). Irydoidy typu „valeriana” zostały wykryte w niektórych gatunkach *Penstemon* oraz w rodzaju *Viburnum* (15) i *Valeriana* (16).

Nasze badania wykazały, że niektóre irydoidy tego typu wytwarzane są w kulturze kalusowej i zawieszinowej *Penstemon serrulatus* (17,18). Strukturę irydoidów wyizolowanych z hodowli *in*





### 3. Klonowanie i selekcja szczepów

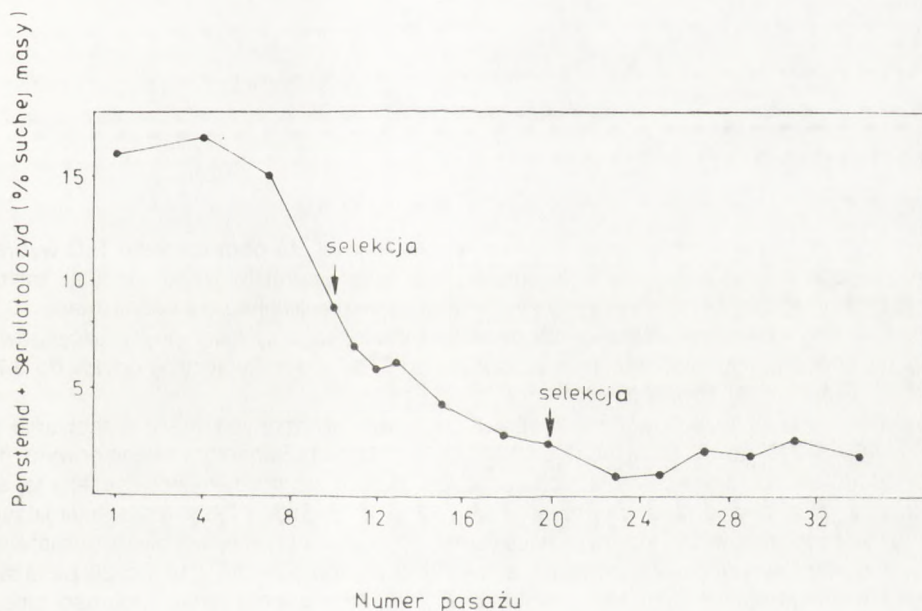
W hodowli *in vitro* stosowane są 3 metody otrzymywania szczepów z wykorzystaniem:

- 1) agregatów komórkowych,
- 2) pojedynczych komórek,
- 3) protoplastów.

Sporną kwestią pozostaje, która z tych metod jest najbardziej efektywna dla pozyskania wysokowydajnych szczepów czy linii komórkowych. Yamamoto i in. (19) otrzymali stabilne, z wysoką produkcją antocyjanów szczepy *Euphorbia millii* z agregatów komórkowych. Niestabilne okazały się natomiast szczepy otrzymane z pojedynczych komórek. Inne wyniki uzyskali Fujita i in. (20) dla szczepów *Lithospermum* produkujących szikoninę; w tym wypadku najlepszym materiałem były protoplasty.

Dla kultury *P. serrulatus* opracowałam metodę klonowania z użyciem małych, liczących 2–10 komórek agregatów. Materiałem do badań była kultura oznaczona symbolem AS–1, zapoczątkowana z kalusa pochodzącego z pylnika oraz linia komórkowa AS–210 zapoczątkowana ze szczepu A–210, otrzymanego w wyniku klonowania i selekcji kultury AS–1. Obie te kultury (AS–1 i AS–210) charakteryzowały się wysoką (ponad 15% suchej masy), ale niestabilną produkcją irydoidów; po roku hodowli poziom penstemidu i serulatolozydu obniżał się do ok. 1% suchej masy (21,22 oraz rys. 2).

W wyniku klonowania AS–1 otrzymano ok. 300 szczepów, które hodowano na agarowym (0,8%) podłożu SH–1: podłożu Schenka i Hildebrandta (23) uzupełnione 0,5 mg/l IBA (kwas indolilo–3–masłowy) i 0,2 mg/l BAP (6–benzyloaminopuryna). Opis techniki klonowania i szczegółowe informacje o wyizolowanych szczepach znajdują się w pracy Wysokińskiej i Giang (21). Szczepy różniły się morfologią, wzrostem i zawartością penstemidu. Nie obserwowano natomiast różnic w jakościowym składzie frakcji irydoidowych; dla każdego szczepu chromatogram



Rys. 2. Zmiany zawartości irydoidów w linii komórkowej AS–210 podczas pasażowania.

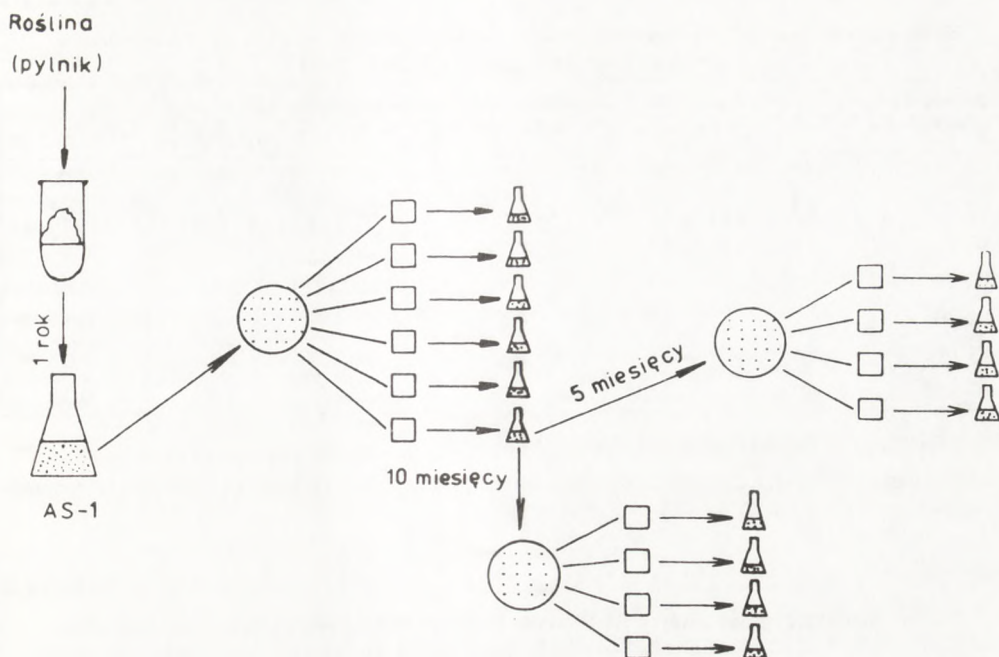


Rys. 3. Chromatogram HPLC frakcji irydoidowej z komórek *Penstemon serrulatus* hodowanych w podłożu SH-1. Oznaczenia pików: 1 – penstemid, 2 – serulatolozyd. Chromatograf: Shimadzu LC-6A, model 7125. Kolumna: Supelcosil C<sub>8</sub>DB, 5 μm, prekolumna: Supelguard C<sub>8</sub>DB, 5 μm. Eluent: CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O 32:68 (v/v). Szybkość przepływu: 0,8 ml/min. Detekcja: 220 nm.

TLC i HPLC (rys. 3) był identyczny jak dla kultury macierzystej. Za pomocą testu TLC wybrano ok. 30 szczepów i określono w nich zawartość penstemidu i serulatolozydu, stosując metodę HPLC (21). Najbardziej produktywny szczep wytwarzał w przeliczeniu na suchą masę 13,2% irydoidów, w tym 7,8% penstemidu i 5,4% serulatolozydu. Z tego i z kilku innych szczepów, w których zawartość penstemidu wahała się od 2,7% do 6,2%, a serulatolozydu od 1% do 3,7%, zapoczątkowano kultury zawiesinowe.

Następną selekcję przeprowadzono wśród szczepów otrzymanych przez klonowanie linii komórkowej AS-210 po 10 pasażach (5 miesięcy w hodowli). Badaniom skringingowym (test TLC) poddano ok. 100 losowo wybranych szczepów. Najbardziej produktywne szczepy tej serii wytwarzały, w przeliczeniu na suchą masę, 4,4%–6,7% penstemidu i 2,5%–4% serulatolozydu. Z nich także zapoczątkowano kultury zawiesinowe. Do hodowli płynnej wprowadzono również szczepy uzyskane w wyniku klonowania i selekcji linii komórkowej AS-210 po 20 pasażach. Po prawie rocznej hodowli kultura ta utraciła już w znacznym stopniu swoje zdolności biosyntetyczne (rys. 2). Schemat selekcji linii komórkowych wykorzystanych w tych badaniach przedstawia rys. 4.





Rys. 4. Schemat procedury zastosowanej do otrzymania linii komórkowych *Penstemon serrulatus* z podwyższoną zawartością irydoidów.

#### 4. Wytwarzanie irydoidów w liniach komórkowych

Następnym etapem pracy było zbadanie produkcji penstemidu i serulatolozydu w hodowli płynnej. Wszystkie linie komórkowe zapoczątkowano z jednego kalusa (rys. 4). Wybrane szczepy (po 4-tygodniowym okresie wzrostu) przenoszono pojedynczo do kolb Erlenmeyera zawierających 50 ml płynnego podłoża SH-1 (podłoże Schenka i Hildebrandta uzupełnione 0,5 mg/l IBA i 0,2 mg/l BAP). Kolby umieszczono na wytrząsarce rotacyjnej (100 obr/min) w fitotronie (temp.  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , oświetlenie ciągle lampami jarzeniowymi ok.  $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , wilgotność 70%). Po 2-tygodniowym okresie hodowli, 5 ml zawiesiny przenoszono do 50 ml świeżego podłoża SH-1. Następnych pasaży dokonywano w odstępach 2-tygodniowych; inokulum wynosiło 2 ml. W celu ustalenia stabilności wyselekcjonowanych linii komórkowych, po 8, 25 i 42 pasażach określano suchą masę oraz zawartość penstemidu i serulatolozydu. Sposób ekstrakcji irydoidów z materiału roślinnego oraz ich oznaczanie metodą HPLC opisano w poprzednich pracach (21,22). Poszczególne linie komórkowe, podobnie jak szczepy kalusowe, różniły się znacznie poziomem penstemidu i serulatolozydu (tab. 1 i 2). W większości badanych populacji wysoka początkowo (pasaż 8) zawartość penstemidu i serulatolozydu w komórkach obniża się po roku (pasaż 25) lub dwóch latach (pasaż 42) prowadzenia hodowli. Przykładem mogą być komórki AS-210, w których zawartość penstemidu i serulatolozydu po roku pasażowania obniżyła się o 85% (rys. 2). Takie obniżenie zdolności biosyntetycznej komórek podczas hodowli jest zjawiskiem powszechnie znanym i stanowi znaczną przeszkodę w ich biotechnologicznym wykorzystaniu.

Tabela 1

**Zmiany zawartości glikozydów irydoidowych w liniach komórkowych *Penstemon serrulatus* podczas 2-letniej hodowli w podłożu SH-1**

Linia komór- kowa nr	Zawartość irydoidów (% suchej masy)					
	Penstemid			Serulatolozyd		
	8*	25*	42*	8*	25*	42*
AS-4	3,4	3,9	0,2	1,9	2,0	0,07
AS-7	3,9	5,4	n.b.	1,9	2,3	n.b.
AS-25	4,1	0,3	n.b.	2,0	0,2	n.b.
AS-70	4,2	0,6	0,1	2,1	0,5	0,1
AS-82	2,1	3,8	3,7	1,4	1,9	2,0
AS-210	8,0	0,5	0,03	4,6	0,5	0,02

Linie te otrzymano w wyniku klonowania i selekcji kultury AS-1.

\* – numer pasażu; n.b. – nie badano (z powodu zakażenia kultury); SH-1 – podłoże Schenka i Hildebrandta (23) uzupełnione 0,5 mg/l IBA i 0,2 mg/l BAP.

Tabela 2

**Zmiany zawartości glikozydów irydoidowych w liniach komórkowych *Penstemon serrulatus* podczas 2-letniej hodowli w podłożu SH-1**

Linia komórko- wa nr	Zawartość irydoidów (% suchej masy)					
	Penstemid			Serulatolozyd		
	8*	25*	42*	8*	25*	42*
AS-210-20 <sup>a</sup>	3,3	3,5	4,2	1,9	1,7	2,8
AS-210-34 <sup>a</sup>	2,6	2,2	n.b.	1,7	1,4	n.b.
AS-210-49 <sup>a</sup>	7,7	5,9	4,2	4,0	3,2	2,0
AS-210-95 <sup>a</sup>	3,2	6,1	2,0	1,8	3,5	1,4
AS-210-20-1 <sup>b</sup>	8,3	4,9	1,8	4,4	3,0	1,0
AS-210-20-2 <sup>b</sup>	3,8	2,1	0,6	2,6	1,3	0,5
AS-210-20-3 <sup>b</sup>	5,4	6,4	2,3	3,1	3,7	1,6
AS-210-20-4 <sup>b</sup>	5,0	0,6	0,8	2,5	0,4	0,5

Linie te otrzymano w wyniku klonowania i reselekcji linii AS-210.

\* – numer pasażu; n.b. – nie badano; a – linia macierzysta AS-210 pasaż 10; b – linia macierzysta AS-210 pasaż 20; SH-1 – podłoże Schenka i Hildebrandta (23) uzupełnione 0,5 mg/l IBA i 0,2 mg/l BAP.

Deus i Zenk (24) wyróżniają dwa rodzaje kultur komórkowych. Pierwsze to kultury stabilne, w których produkcja wtórnych metabolitów jest utrzymywana na wysokim poziomie przez wiele lat; przykładem mogą być kultury *Morinda citrifolia* (25), *Coleus blumei* (26) lub niektóre linie komórkowe *Coptis japonica* (27). Jest także drugi typ kultur komórkowych, które stopniowo tracą swą produktywność w warunkach *in vitro*. Takie kultury reprezentowane są m.in. przez *Catharanthus roseus* (24), *Nicotiana rustica* (28), *Solanum laciniatum* (29). Przyczyny zmienności biosyntetycznej w hodowanych komórkach nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione. Sugeruje się, że mają one głównie charakter epigenetyczny i sama procedura klonowania (izo-



lacja szczepów, pasażowanie) może wywołać modyfikacje w strukturze, organizacji lub regulacji fenotypu prowadząc do niestabilnych klonów (30). Ta niestabilność ujawnia się także w kulturze *P. serrulatus* prowadząc do znacznego obniżenia zdolności do biosyntezy irydoidów podczas pasażowania. Przykład linii komórkowej AS-210 świadczy, że obniżenie poziomu irydoidów nie ma charakteru trwałego i poprzez ponowną selekcję można uzyskać linie komórkowe z wysoką produkcją tych metabolitów (tab. 2). Pasażowanie wpływa jednak na ponowne obniżenie zawartości irydoidów w tych hodowlach. Stosując opisaną procedurę można uzyskać również linie komórkowe *P. serrulatus* o dość znacznym stopniu stabilności. Linie te (AS-82, AS-210-20, AS-210-49) po prawie 2-letniej hodowli bez selekcji wytwarzają ok. 4% penstemidu i 2-3% serulatolozydu (tab. 1 i 2). Stopień utraty zdolności biosyntetycznej podczas pasażowania, jak się wydaje, zależy od pochodzenia linii komórkowych. Bardziej stabilne są linie otrzymane po reSelekcji ze szczepu AS-210; z ośmiu przebadanych linii jedynie w populacji AS-210-20-4 poziom penstemidu po roku hodowli obniżył się więcej niż o 50% (tab. 2). Efekt ten występował natomiast aż w połowie kultur pochodzących ze szczepów po jednorazowej selekcji (tab. 1).

Tabela 3

**Przyrost biomasy w wyselekcjonowanych liniach komórkowych *Penstemon serrulatus* w podłożu SH-1 po 14 dniach hodowli**

Linia komórkowa nr	Sucha masa (g/l)		
	8*	25*	42*
AS-4	3,8	2,4	2,4
AS-7	2,2	9,5	n.b.
AS-25	9,1	13,6	n.b.
AS-70	2,7	15,7	16,0
AS-82	4,0	14,4	14,3
AS-210	2,9	13,1	16,5
AS-210-20	2,5	13,1	14,2
AS-210-34	1,7	12,3	n.b.
AS-210-49	1,9	14,1	13,7
AS-210-95	1,5	10,3	13,8
AS-210-20-1	14,1	15,6	13,9
AS-210-20-2	11,0	14,1	13,9
AS-210-20-3	9,2	4,9	13,4
AS-210-20-4	5,3	5,8	13,2

\* - numer pasażu; n.b. - nie badano (z powodu zakażenia kultury); SH-1 - podłoże Schenka i Hildebrandta (23) uzupełnione 0,5 mg/l IBA i 0,2 mg/l BAP.

Stwierdzono, że wraz z pasażowaniem zmienia się również przyrost biomasy (tab. 3). Jest on wyższy w starszych kulturach (pasaż 25 i 42) i po 14-dniowym okresie wzrostu wynosi 13-16,5 g suchej masy w litrze kultury (wyjątek stanowi linia AS-4). Fakt ten sprawia, że produktywność niektórych linii komórkowych (wyrażona w mg irydoidu produkowanego w litrze kultury w ciągu 14 dni) wzrasta po roku hodowli pomimo obniżenia się bezwzględnej zawartości penstemidu i serulatolozydu w komórkach. W tab. 4 podają produkcję (w mg/l kultury) penstemidu i serulatolozydu w trzech najbardziej wydajnych liniach komórkowych (AS-82, AS-210-49, AS-210-20) po 2 latach hodowli. Ta produkcja wynosi dla penstemidu: 529-596 mg



w litrze kultury, a dla serulatolozydu 274–398 mg/l. Są to wartości prawie 2-krotnie wyższe niż maksymalne ilości irydoidów (225 mg/l) uzyskane dla kultury nieklonowanej AS-1 (22). Jeszcze po dwóch latach hodowli zawartość penstemidu i serulatolozydu w tych trzech wyselekcjonowanych liniach jest zbliżona do zawartości tych związków w roślinach gruntowych, których liście akumulują 3,3% penstemidu i 1,5% serulatolozydu w przeliczeniu na suchą masę (Wysokińska, dane nie opublikowane).

Tabela 4

**Produkcja irydoidów w podłożu SH-1 w trzech wybranych liniach komórkowych\***  
*Penstemon serrulatus*, po ok. 2 latach hodowli (42 pasażach)

Linia komórkowa nr	Produkcja irydoidów (mg/l kultury)	
	Penstemid	Serulatolozyd
AS-82	529	286
AS-210-20	596	398
AS-210-49	575	274

\* Linie te wybrano jako najbardziej produktywne w oparciu o dane tab. 1 i 2; SH-1 – podłoże Schenka i Hildebrandta (23) uzupełnione 0,5 mg/l IBA i 0,2 mg/l BAP.

## 5. Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują, że kultury *P. serrulatus* są heterogenne i zjawisko to można wykorzystać dla podwyższenia poziomu penstemidu i serulatolozydu w hodowli *in vitro*. Ze szczepów otrzymanych w wyniku pojedynczej lub dwukrotnej selekcji założono kilka linii komórkowych *P. serrulatus*, które różniły się produkcją irydoidów i stopniem stabilności. Linie AS-82, AS-210-20 i AS-210-49, jak się wydaje, są najbardziej korzystne dla celów biotechnologicznych; jeszcze prawie po dwóch latach przebywania w warunkach *in vitro* produkują one 3,7–4,2% penstemidu i 2,0–2,8% serulatolozydu, w przeliczeniu na suchą masę. Natomiast pozostałe linie są bardziej niestabilne i po roku lub 2 latach hodowli w znacznym stopniu tracą zdolności do biosyntezy irydoidów. Przywrócenie tych zdolności możliwe jest przez ponowne klonowanie i reselekcję, ale również wówczas linie komórkowe były mało stabilne. Nie wyklucza to jednak pracy z takimi liniami i ich biotechnologicznego wykorzystania, pod warunkiem prowadzenia ich okresowej reselekcji.

## Literatura

- Muir W. H., Hildebrandt A. C., Riker A. J., (1954), *Science*, 119, 877–878.
- Stafford A., Morris P., Fowler M. W., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 578–587.
- Inouye H., Takeda Y., Uobe K., Yamauchi K., Yabuuchi N., Kuwano S., (1974), *Planta Med.*, 25, 285–288.
- Isiguro K., Yamaki M., Takagi S., (1982), *Yakugaku Zasshi*, 102, 755–758.
- Isiguro K., Yamaki M., Takagi S., Ikeda Y., Kawakami K., Ito K., Nose T., (1986), *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 2375–2379.
- Jolad S., Hoffmann J. J., Wiedhopf R. M., Cole J. R., Bates R. B., Kriek G. R., (1976), *Tetrahedron Lett.*, 46, 4119–4120.
- Takeda S., Yuasa K., Endo T., Aburada M., (1980), *J. Pharmacobio-Dynamics*, 3, 485–492.
- Hegnauer R., Kooiman P., (1978), *Planta Med.*, 33, 1–33.
- Gering B., Junior P., Wichtl M., (1986), *Planta Med.*, 52, 356–358.
- Gering B., Junior P., Wichtl M., (1987), *Phytochemistry*, 26, 753–754.



11. Gering-Ward B., Wichtl M., (1988), *Planta Med.*, 54, 452-453.
12. Junior P., (1983), *Planta Med.*, 47, 161-163.
13. Junior P., (1984), *Planta Med.*, 50, 417-420.
14. Junior P., (1984), *Planta Med.*, 50, 438-439.
15. Handjieva N., Baranowska I., Mikhova B., Popow S., (1988), *Phytochemistry*, 27, 3175-3179.
16. Inouye H., Ueda S., Uesato S., Shingu T., Thies P. W., (1974), *Tetrahedron*, 30, 2317-2325.
17. Wysokińska H., Skrzypek Z., (1992), *Phytochemistry*, 31, 1235-1237.
18. Wysokińska H., Skrzypek Z., Kunert-Radek J., (1992), *J. Nat. Prod.*, 55, 58-63.
19. Yamamoto Y., Mizuguchi R., Yamada Y., (1982), *Theor. Appl. Genet.*, 61, 113-116.
20. Fujita Y., Takahashi S., Yamada Y., (1985), *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1755-1759.
21. Wysokińska H., Giang N. H. X., (1990), *Plant Cell Reports*, 9, 378-381.
22. Wysokińska H., Świątek L., (1991), *Plant Science*, 76, 249-258.
23. Schenk R. U., Hildebrandt A. C., (1972), *Can. J. Botany*, 50, 199-204.
24. Deus-Neumann B., Zenk M. H., (1984), *Planta Med.*, 50, 427-431.
25. Zenk M. H., El-Shagi H., Schulte U., (1975), *Planta Med.*, Suppl. 75, 79-101.
26. Zenk M. H., El-Shagi H., Ulbrich B., (1977), *Naturwissenschaften*, 64, 585.
27. Sato F., Endo T., Hashimoto T., Yamada Y., (1982), *Plant Tissue Culture*, ed. A. Fujiwara, 319-320. AbePhoto Printing, Tokyo.
28. Tabata M., Hiraoka N., (1976), *Physiol. Plant.*, 38, 19-23.
29. Chaudler S., Dodds J., (1983), *Plant Cell Reports*, 2, 69-72.
30. Bariaud-Fontanel A., Julien M., Coutos-Thevenot P., Brown S., Courtois D., Petriard V., (1988), *Plant Cell Biotechnology*, eds.: M. S. S. Pais, F. Mavituna, J. M. Novais, 403-419, Springer-Verlag, Berlin, New York, London, Paris, Tokyo.

### **Selection of *Penstemon serrulatus* cell lines capable of enhanced iridoid glucoside production**

#### **Summary**

Several cell lines producing high of iridoids were isolated from *Penstemon serrulatus* cell suspension cultures using a small aggregate cloning technique. Three lines (AS-82; AS-210-20 and AS-210-49) maintained high production of penstemide, 3,7-4,2% on a dry weight basis (529-596 mg/l of culture) and serrulatolósíde. 2,0-2,8% of dry weight (274-398 mg/l of culture) even after 42 non-selected subcultures (almost 2 years). The iridoid production was considerably higher than that of the original strain and was compared with iridoids levels found in the leaves of *P. serrulatus*.

However, the other selected cell lines lost their high capacity for iridoid production after one or two years of subculturing. For one of these lines (AS-210) secondary cloning and selection was attempted to solve this problem.

#### *Adres dla korespondencji:*

Halina Wysokińska, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Akademia Medyczna, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź.