

Lutoslawa Skrzypczak

Katedra i Zakład
Botaniki Farmaceutycznej
Akademia Medyczna
im. Karola Marcinkowskiego
Poznań

Rośliny rodziny *Gentianaceae* z kultur *in vitro* potencjalnym źródłem sekoirydoidów aktywnych biologicznie

1. Wprowadzenie

We florze polskiej występują trzy rodzaje roślin objęte rodziną *Gentianaceae* (Goryczkowate): *Centaurium* Hill., *Gentiana* L., i *Swertia* L. Surowcem leczniczym jest ziele centurii pozyskiwane z gatunku *Centaurium erythraea* Rafn. (centuria pospolita) zbierane ze stanowisk naturalnych, których zasoby są coraz uboższe. W fitoterapii stosowane są również korzenie różnych gatunków rodzaju *Gentiana* (1). W Europie surowiec pochodzi najczęściej z następujących roślin: *Gentiana lutea* L. (goryczka żółta), *G. pannonica* Scop. (goryczka pannońska), *G. punctata* L. (goryczka kropkowana) i *G. purpurea* L. (goryczka purpurowa). Gatunki występujące w Polsce są objęte ścisłą ochroną. Na rynku krajowym *Radix Gentianae* należy do surowców deficytowych i pochodzi wyłącznie z importu. Roczne zapotrzebowanie suchego surowca, jedynie do celów leczniczych, wynosi około 3 tony. Trudności w pozyskiwaniu cennych korzeni skłoniły do podjęcia ich uprawy, szczególnie gatunku *G. lutea* (2–6). Wyniki okazały się nieekonomiczne, bowiem roślina wymaga dobrych warunków glebowych i troskliwej opieki. Zakwita po kilku latach i w takim okresie wytwarza korzenie nadające się do zbioru na surowiec leczniczy (7). Z terenów Europy korzeń goryczki jest importowany do Japonii, gdzie prowadzono również próby uprawy rośliny macierzystej (8). W Japonii, Korei i Chinach surowcem leczniczym o podobnym zastosowaniu jak korzenie goryczek, są części nadziemne gatunków rodzaju *Swertia* (niebielistka): *Swertia japonica* Makino i *S. pseudochinensis* Hara (9). W Polsce niebielistki występują rzadko (10).

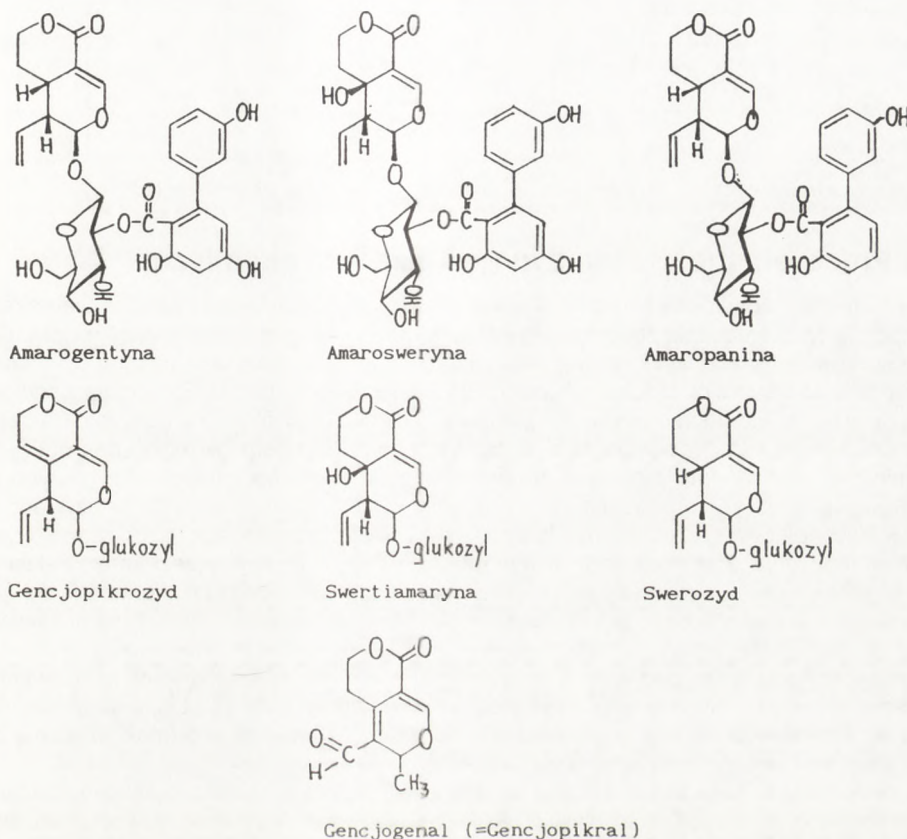
Surowcem zastępczym korzeni goryczek jest często stosowane ziele gatunku *Blackstonia perfoliata* (L.) Hudson (= *Chlora perfoliata* L.), którego terenem naturalnego siedliska są europejskie i afrykańskie regiony Morza Śródziemnego. Drugim gatunkiem z *Gentianaceae*, który nie występuje w naszej florze jest *Eustoma grandiflorum* Shinn. (= *E. russelianum* Griseb., = *Lisianthus russelianus* Hook.). Gatunek ten spotyka się w południowo-zachodniej części Ameryki Północnej i bywa nazywany goryczką prairii bądź dzwonkiem Teksasu. Został wprowadzony do upraw w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, a później w Japonii. Ze względu na okazale i barwne kwiaty, roślina wzbudziła szerokie zainteresowanie w ogrodnictwie jako kwiat cięty i doniczkowy (11–14). Zajmowano się również analizą metabolitów wtórnych tej rośliny (15,16).

2. Metabolity wtórne aktywne biologicznie

Głównymi związkami leczniczymi wymienionych gatunków są glukozydy sekoirydoidowe należące do irydoidów złożonych o otwartym pierścieniu cyklopentanowym.

Związki te posiadają gorzki smak i warunkują działanie surowców roślinnych stosowanych w schorzeniach układu pokarmowego (17,18). Wpływają również pozytywnie na system immunologiczny jelit (19). Na przykład korzenie goryczki żółtej są składnikami ponad 100 specyfików żółowych (20), a wyciągi, z uwagi na gorzki smak, są stosowane przy wyrobie win i likierów (21).

Najbardziej gorzkimi związkami naturalnymi, dotąd poznanymi, są acylowe pochodne glukozydów sekoirydoidowych amarogentyna i amarosweryna (rys. 1). Właściwości biologiczne posiadają również amaropaniina i gencjopikrozyd, którego zawartość w surowcach roślinnych jest znacznie wyższa od acylowanych glukozydów sekoirydoidowych (tab. 1). Gencjopikrozyd w wyniku hydrolizy enzymatycznej uwalnia aglikon – gencjogenal (gencjopikral) wykazujący właściwości fungistatyczne (24,25) i przeciwbakteryjne (26).



Rys. 1. Struktury głównych glukozydów sekoirydoidowych gatunków rodziny *Gentianaceae*.

W częściach nadziemnych gatunku *Eustoma grandiflorum*, poza znanymi związkami, jak swercjamaryną (hydrolizującą do gencjogenu), swerozydem i gencjopikrozydem, wykryto trzy nowe sekoirydoidy, w tym związek z atomem chloru, co należy do rzadkości w obrębie irydoi-dów (15). Podobnie w ziele *Blackstonia perfoliata* występują w znikomych ilościach swercjamaryna i swerozyd oraz około 3% gencjopikrozydu. Wymienione związki dominują natomiast w gatunku *Centaurium erythraea*, gdzie znajdują się również estry swercjamaryny i swerozydu (27).

Omawiane gatunki z *Gentianaceae* zawierają również inne związki, jak: ksantony, flawonoidy czy kwasy tereftalowe. Te metabolity wtórne, o dużym znaczeniu w chemicznej taksonomii rodziny *Gentianaceae*, budzą żywe zainteresowanie z uwagi na stwierdzone właściwości biologiczne (28,29).

Tabela 1

Sekoirydoidy w gatunkach rodziny *Gentianaceae*

Nazwa związku	Średnia zawartość % (22,23)	<i>Blackstonia perfoliata</i> Hb	<i>Centaurium erythraea</i> Hb	<i>Eustoma grandiflorum</i> Hb	<i>Gentiana species</i> Rd	<i>Swertia species</i> Hb
Amarogentyna	0,05–0,3				+	+
Amarosweryna	0,03–0,1				+	+
Amaropanina	0,05–0,2				+	
Gencjopikrozyd	2,0–4,0	+	+	+	+	(+)
Swertiamaryna	1,5–3,6	(+)	+	+		+
Swerozyd		(+)	+	+		+
Inne sekoirydoidy			+	+		

Hb – części nadziemne rośliny, Rd – korzenie, + obecny, (+) obecny w małych ilościach.

3. Prace własne: Badania *in vitro* i analiza chemiczna

Niewiele gatunków roślin z rodziny *Gentianaceae* próbowano regenerować w warunkach *in vitro* (tab. 2). Nasze badania zapoczątkowaliśmy w 1982 r. kulturami tkankowymi rodzaju *Gentiana*, otrzymując po trzech latach powtarzalne wyniki (30). Poza gatunkami rodzaju *Gentiana* badaniami były objęte rośliny *Blackstonia perfoliata*, *Centaurium erythraea*, *Eustoma grandiflorum* i rodzaj *Swertia*. W kulturach tkankowych stosowano różne zmodyfikowane pożywki. Najczęściej była to pożywka Murashige-Skooga, a także White'a lub Gamborga wzbogacone auksynami, cytokininami i giberelinami. Inicjacje kultur prowadzono z zarodków i siewek otrzymanych z nasion. Badania dotyczyły również mikrorozmnażania, w którym jako eksplantatów używano fragmentów liści, pąków szczytowych i bocznych. W wielu przypadkach uzyskiwano wysokie wskaźniki mnożenia. Zregenerowane w ten sposób rośliny – bądź poprzez tkankę kalusową – osiągały pełnię rozwoju i zakwitwały po przeniesieniu do doniczek, bądź do gruntu. Wśród gatunków z *Gentianaceae* tylko sporadycznie prowadzono doświadczenia nad kulturami zawieszonymi.

Nie we wszystkich przypadkach, w otrzymanych *in vitro* roślinach, tkankach kalusowych czy zawieszonych komórek, analizowano zawartość sekoirydoidów (tab. 2). Doświadczenia nasze zmierzały do sprawdzenia czy w kulturach *in vitro* zachodzi biosynteza farmakologicznie czynnych związków i ewentualnie na jakim etapie to następuje.

W otrzymanych materiałach z kultur *in vitro* analizowaliśmy obecność sekoirydoidów metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), rozwijając równolegle związki wzorcowe. Stosowano najczęściej gotowe płytki z żelem krzemionkowym HPTLC 60 F₂₅₄ (f-my Merck). Fazą ruchomą były mieszaniny: chloroform–metanol (4+1, obj./obj.) lub octan etylu–metanol–woda (100+17+10, obj./obj.). Ilościową zawartość amarogentyny i gencjopikrozydu oznaczano metodą densytometryczną po uprzednim (TLC) rozdziale chromatograficznym (31).

Ciekawe okazały się wyniki oznaczeń zawartości gencjopikrozydu w materiale z kultur *in vitro* gatunku *Blackstonia perfoliata* (32). Roślina, z której podjęto inicjację kultury tkankowej pochodziła z terenów Grecji i zawierała 1,6% gencjopikrozydu. Tak jak stwierdziliśmy, biosynteza tego związku została zapoczątkowana już w tkankach kalusowych, gdzie zawartość wynosiła 4,2% i wzrosła w ukorzenionych roślinach aż do 5,8%. Fakt, że kultury tkankowe syntetyzują więcej aktywnych związków od rośliny gruntowej należy do rzadkości (39).

Drugim gatunkiem, budzącym nasze szczególne zainteresowanie, jest *Gentiana tibetica* nie występująca we florze polskiej, a którą łatwo rozmnażać w warunkach *in vitro*. Obecność znaczących ilości sekoirydoidów w częściach nadziemnych tej rośliny z kultur *in vitro* wskazuje, że nie tylko korzenie mogą znaleźć zastosowanie w fitoterapii.

Tabela 2

Kultury *in vitro* gatunków rodziny *Gentianaceae*

Lp.	Gatunek	Eksplantat	Rezultaty	Obecność sekoirydoidów	Literatura
1	<i>Blackstonia perfoliata</i>	części siewek, fragmenty liści	kalus, pąki, pędy, rośliny,		(32)
2	<i>Centaurium erythraea</i>	części siewek, fragmenty liści	kalus, pąki, pędy, rośliny	-	nie pub.
		fragment liści albo kalus	pędy, korzenie, kalus		
		kalus, zawiesina	kalus, embriogeneza zawiesiny, rośliny	-	(27)
3	<i>Eustoma grandiflorum</i>	fragmenty liści,	pączki, pędy, rośliny	(-)	(33)
		pączki szczytowe, fragmenty łodyg i liści	kalus, pędy, rośliny	(-)	(34)
		części siewek, fragmenty liści	kalus, pąki, pędy, rośliny	+	(35)
4	<i>Gentiana cruciata</i>	siewki, fragmenty liści	kalus, pąki, pędy, rośliny,	+	(30)
5	<i>Gentiana lutea</i>	zarodki, siewki, korzenie	pędy, roślinki, kalus	+	(36)
		części siewek, merystemy wierzchołkowe, pąki przybyszowe, wierzchołki pędu	kalus, pąki, roślinki	(-)	(37)
6	<i>Gentiana pneumonantha</i>	części siewek	pąki, pędy, roślinki	(-)	(37)
7	<i>Gentiana punctata</i>	zarodki, siewki	pąki, pędy, roślinki	+	(36)
8	<i>Gentiana tibetica</i> King ex Hooker	części siewek – wierzchołki pędu, węzły, fragmenty korzonków	pąki, pędy, roślinki rośliny, kalus	+	nie pub.
9	<i>Swertia japonica</i>	korzonki z siewek	kalus, pędy bez korzeni	-	(9)
10	<i>Swertia pseudochinensis</i>	hypokotyle i korzonki siewek	kalus, pąki, pędy, rośliny	+	(9)
		wierzchołki korzonków	kultura korzeni		

+ obecne, - nie stwierdzono, (-) nie badano.

4. Podsumowanie

Na podstawie nielicznej grupy roślin *Gentianaceae* próbowano wykazać znaczenie kultur *in vitro* jako źródła surowców leczniczych, bądź materiału do izolacji wtórnych metabolitów o aktywności biologicznej. Poprzez kultury zarodków i drogą mikrorozmnażania otrzymano zregenerowane rośliny, lecz tylko niektóre o wysokim wskaźniku mnożenia.

Często już na etapie tkanki kalusowej obserwowano biosyntezę sekoirydoidów, których zawartość wzrastała w miarę regeneracji roślin. Ekonomicznym źródłem tych związków mogą okazać się również kultury zawieszinowe komórek. Zregenerowane rośliny *in vitro* obok użyteczności fitoterapeutycznej są dogodnym systemem w śledzeniu biosyntezy sekoirydoidów.

W ostatnich latach badania nad mikrozmnazaniem roślin leczniczych i produkcją wtórnych metabolitów są przedmiotem żywego zainteresowania.

Literatura

1. Penso G., (1983), *Index Plantarum Medicinalum Totius Mundi Eorumque Synonymorum*. OEMF, Milano, 436–437.
2. Franz C., Fritz D., (1975), *Planta Med.*, 28, 289; (1978), *Acta Hort.*, 73, 307.
3. Barralis G., Chadoeuf R., Desmaretz P., (1978), *Acta Hort.*, 73, 303.
4. Schultze J., Franz C., (1980), *Acta Hort.*, 96, 311.
5. Procyk A., (1982), *Wiad. Zielar.*, 24, (1–2), 7.
6. Gawłowska J., (1986), *Wiad. Zielar.*, 27, (6), 1.
7. Kozłowski J., (1983), *Wiad. Zielar.*, 25, (10–11), 16.
8. Hayashi T., Yamagishi T., (1988), *Phytochemistry*, 27, 3696.
9. Miura H., (1991), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 15, *Medicinal and Aromatic Plants III*, ed. Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, 451.
10. Pawłowski B., Jasiewicz A., (1971), *Flora Polska*, 12, 32.
11. Halevy A. H., Kofranek A. M., (1984), *Hort. Sci.*, 19, 845.
12. Roh M., Lawson R., (1984), *Greenhouse Manager*, 2, 102.
13. Krause J., (1986), *Ogrodnictwo*, 23, 22.
14. Hetman J., (1986), *Owoce, Warzywa, Kwiaty*, 26, 9.
15. Uesato S., Hashimoto T., Inouye H., (1979), *Phytochemistry*, 18, 1981.
16. Asen S., Griesbach R., Norris K., Leonhardt B., (1986), *Phytochemistry*, 25, 2509.
17. Maiwald L., (1987), *Zeitschr. Phytotherapie*, 8, 184.
18. Weiss R. F., (1988), *Arztezeitsch. Naturheilverf.*, 29, 429.
19. Zimmermann W., Gaisbauer G., Gaisbauer M., (1986), *Zeitschr. Phytotherapie*, 7, 56.
20. Rote Liste (1986), *Verzeichnis von Fertigarzneimitteln der Mitglieder des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie*, Cantor, Aulendorf.
21. Wenzel H., (1972), *Alkohol-Ind.*, 85, 24.
22. Sticher O., Meier B., (1978), *Pharm. Acta Helv.*, 53, 40.
23. Koshioka M., Takino Y., Hayashi T., (1980), *Planta Med. Suppl.*, 38, 64.
24. Van der Sluis W. G., Labadie R. P., (1981), *Planta Med.*, 42, 139.
25. Van der Nat J., Van der Sluis W. G., Labadie R. P., (1982), *Planta Med.*, 45, 161.
26. El-Sedawy A., Hattori M., Kobashi K., Namba T., (1989), *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 2435.
27. Baresová H., (1988), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 4, *Medicinal and Aromatic Plants I*, (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, 350.
28. Havsteen B., (1983), *Biochemical Pharmacology*, 32, 1141.
29. Wagner H., (1985), *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur.*, 25, 409.
30. Wesotowska M., Skrzypczak L., Dudzińska R., (1985), *Acta Polon. Pharm.*, 42, 79.
31. Krupińska A., Segiet-Kujawa E., Skrzypczak L., Ellnain-Wojtaszek M., (1991), *Sci. Pharm.*, 59, 135.
32. Skrzypczak L., Wesotowska M., Krupińska A., Thiem B., (1992), *Acta Soc. Bot. Pol.*, (w druku).
33. Zenkteleer E., Zenkteleer M., (1987), *Ogrodnictwo*, 24, 19.

34. Semeniuk P., Griesebach R. J., (1987), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 8, 249.
35. Skrzypczak L., Wesolowska M., Thiem B., (1988), *Acta Soc. Bot. Polon.*, 57, 423.
36. Skrzypczak L., Wesolowska M., Skrzypczak E., (1991), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 21, *Medicinal and Aromatic Plants IV.*, (ed. Y. P. S. Bajaj) Springer-Verlag, Berlin (w druku).
37. Lamproye A., Crevecoeur M., Kevers C., Gaspar T., (1987), *Med. Fac. Landbouw Rijkuniv. Gent.*, 52, 1255.
38. Viola U., Franz C., (1989), 37th Annual Congress on Medicinal Plant Research, Abstracts of short lectures and poster presentations, Braunschweig, 115.
39. Phillipson J. D., (1990), 7th Inter. Congress on Plant Tissue and Cell Culture (IAPTC), Amsterdam, 326.

***In vitro* cultures of plants from the family *Gentianaceae* as a potential source of biologically active secoiridoids**

Summary

Data on the tissue culture of several rare plants from the *Gentianaceae* are presented. The presence of secoiridoid glucosides in regenerated plants, callus tissue and suspension cultures has been determined using a TLC method. Quantitative determination of these compounds was made by TLC-densitometry. In some cases, the biosynthesis of secoiridoides has already been observed in callus tissues. The regenerated *in vitro* plants may be useful not only as a source of medicinal plants, but also as a simple experimental system for studies on the biosynthesis of bitter glucosides.

Adres dla korespondencji:

Lutosława Skrzypczak, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, ul. Wieniawskiego 1, 61-712 Poznań.