



## Regeneracja *Oxalis triangularis* z korzeni transformowanych i wpływ glutationu na wytwarzanie antocyjanin

Marzena Wielanek, Henryk Urbanek, Magdalena Dobras  
Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, Łódź

### Regeneration of *Oxalis triangularis* from hairy roots and the influence of glutathione on anthocyanin production

#### Summary

The *Oxalis triangularis* transformed plants were regenerated from hairy roots induced by *A. rhizogenes* LBA 9402. *In vitro* shoot proliferation of the transformed roots-regenerated plants was by 65% higher than that of the non-transformed ones. *In vivo* the hairy root syndrome was observed for the transformed roots-regenerated plants. Anthocyanin content in the leaves of non-transformed plants was about 40% higher than in the transformed roots-regenerated ones. In the non-transformed plants, GSH (1 and 5 mM) enhanced anthocyanin production by 30% at the most, while in the transformed roots-regenerated plants the maximal increase in its production was found on the 2<sup>nd</sup> and 9<sup>th</sup> days after the treatment; it reached 230-320% and 750-600% of control, respectively.

#### Key words:

altered phenotype, anthocyanins, glutathione, hairy roots, *Oxalis triangularis*, shoot regeneration, transformed roots-regenerated plants.

#### Adres do korespondencji

Marzena Wielanek,  
Katedra Fizjologii  
i Biochemii Roślin,  
Uniwersytet Łódzki,  
ul. Banacha 12/16,  
90-237 Łódź;  
e-mail:  
mawie@biol.uni.lodz.pl

## 1. Wstęp

Antocyjaniny z powodu swej aktywności antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej i antynowotworowej budzą coraz większe zainteresowanie jako związki lecznicze, składniki kosmetyków i barwniki żywności (1-3). Pochodzący z Ameryki Południowej *Oxalis triangularis* (szczawik trójkątny, *Oxalidaceae*) charakteryzuje się

szybkim wzrostem, a fioletowobordowe liście mogą dostarczać antocyjanin dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego (4).

Antocyjaniny związane są z określonymi stadiami rozwojowymi i fizjologicznymi roślin, jednocześnie ich produkcja i akumulacja są indukowane przez czynniki stresowe (5). Indukcja reakcji obronnych roślin odbywa się za pośrednictwem grupy związków sygnałowych, jednym z nich jest glutation (6,7). Rośliny zregenerowane z korzeni transformowanych posiadają geny z T-DNA plazmidu *Agrobacterium rhizogenes*. Ich ekspresja wywołuje zmiany biochemiczne i fizjologiczne, mogące prowadzić do odmiennych reakcji tych roślin na stresy, w tym zmian zawartości metabolitów wtórnych (8,9).

Celem pracy było porównanie współczynników namnażania w hodowlach *in vitro* oraz cech fenotypowych w warunkach *in vivo* nietransformowanych i zregenerowanych z korzeni transformowanych roślin *O. triangularis*, a następnie zbadanie w liściach tych roślin zawartości antocyjanin oraz wpływu glutationu (GSH) na ich wytwarzanie.

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Regeneracja roślin transformowanych

Korzenie transformowane (*A. rhizogenes* LBA 9402 Ri 1855) hodowano na podłożu B5 (10) z 3% sacharozą (pH 5,8), przy 120 obr/min, w temp. 24°C, w ciemności. Morfogenezę zainicjowano naświetlając hodowle: 350  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperiod 16/8 godz. Zregenerowane rośliny przenoszono na agarowe (0,8%) podłoże MS (11) z 3% sacharozą, pH 5,8 i hodowano w opisanych warunkach.

### 2.2. Mikropropagacja roślin

Zastosowano opisane podłoże MS z dodatkiem regulatorów wzrostu: KIN 1,0 mg/l; BAP 0,5 mg/l; IAA 0,3 mg/l (pH 5,8) i takie same warunki świetlne. Współczynnik namnażania (WN) obliczano po 7 tygodniach hodowli wg wzoru:  $\text{WN} = (A-5)/5$ , gdzie: A – liczba roślin/kolbę po 7 tygodniach hodowli; 5 – liczba eksplantatów/kolbę.

### 2.3. Hodowla *in vivo*

7-tygodniowe rośliny poddawano 3-tygodniowej aklimatyzacji i ukorzenianiu w perlicie, następnie hodowano w ziemi ogrodniczej w temp. 24°C, przy 350  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  i fotoperiodzie 16/8 godz.



## 2.4. Analiza antocyjanin metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Antocyjaniny ekstrahowano 1% HCl w metanolu (v/v). Chromatografię prowadzono na żelu celulozowym (Eastman, 13255 Cellulose), faza ruchoma: butanol, kwas octowy, woda (4:1:2; v/v/v) (12).

## 2.5. Analiza zawartości antocyjanin i chlorofilu

Suchą masę (s.m.) wszystkich blaszek liściowych badanych roślin poddawano 3-krotnej ekstrakcji 1% HCl w metanolu. Absorbancję antocyjanin ( $A_{ant}$ ) wyliczono z różnicy:  $A_{ant} = A_{535} - A_{600} - 0,25A_{660}$  w celu eliminacji udziału chlorofilu ( $A_{660}$ ) i feofityny ( $A_{600}$ ) w absorbancji ekstraktu mierzonej przy 535 nm (13,14). Zawartość antocyjanin (mg/g s.m.) określano w przeliczeniu na 3,5-diglukozomalwidynę, wykorzystując molowy współczynnik absorpcji 37 700 i masę molową 655,5 (15). Chlorofil z ekstraktów metanolowych ekstrahowano benzenem (1:1, v/v). Absorbancję mierzono przy 660 nm. Do obliczenia zawartości chlorofilu (mg/g s.m.) wykorzystano molowy współczynnik absorpcji 90100 (13).

## 2.6. Traktowanie roślin GSH

Wykorzystano rośliny po miesiącu hodowli w ziemi ogrodniczej (warunki jw.). Na 6 godzin przed traktowaniem z każdego liścia roślin pobierano 1 listek w celu oznaczenia suchej masy i wyjściowej zawartości antocyjanin w czasie  $T_0$ . Rośliny badane spryskiwano 5 ml GSH w stężeniu 1 mM i 5 mM, rośliny kontrolne 5 ml wody destylowanej. Zawartość antocyjanin oznaczano po 1, 2, 4, 6, 9 i 12 dniu ( $T_1, T_2, T_4, T_6, T_9, T_{12}$ ) po traktowaniu. Dla wszystkich kontrolnych i badanych roślin obliczano przyrost zawartości antocyjanin jako różnicę pomiędzy zawartością antocyjanin przed i po traktowaniu:  $T_1 - T_0; T_2 - T_0; T_4 - T_0; T_6 - T_0; T_9 - T_0; T_{12} - T_0$ .

Wyniki wyrażono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD) z 3 niezależnych eksperymentów. Każdorazowo analizowano: w badaniach WN 40 kolb ( $n = 120$ ), w badaniach różnic fenotypowych 12 roślin ( $n = 36$ ), w badaniach wpływu GSH 4 rośliny ( $n = 12$ ).

## 3. Rezultaty i dyskusja

Pąki przybyszowe w kulturach korzeni transformowanych *O. triangularis* zaobserwowano w 3 pasażu hodowli na świetle. Fakt, że światło było jedynym czynnikiem indukującym regenerację roślin z korzeni transformowanych (RT) prawdopodobnie świadczy o wysokim poziomie fitochromu A w tych korzeniach (16).

Różnice fenotypowe pomiędzy roślinami nietransformowanymi (RN) a RT stwierdzono już w hodowli *in vitro*. RT wytwarzały karbowane liście, ponadto w odróżnieniu od RN namnażały się na podłożu bez regulatorów wzrostu. Wartości WN dla RN hodowanych na podłożu z regulatorami wzrostu wynosiły  $4,57 \pm 0,827$  i były o około 27 i 40% niższe od WN dla RT hodowanych na podłożu odpowiednio bez ( $5,49 \pm 0,475$ ) i z regulatorami wzrostu ( $7,49 \pm 1,28$ ).

W warunkach *in vivo* zarówno RN i RT formowały kępy składające się z kilku bulw kłączowych, z których wyrastały długoogonkowe, trójlistkowe liście złożone. Pogłębiły się jednak różnice morfologiczne; system korzeniowy RT był bardziej rozwinęty, ich kępy były niższe, ale bardziej zwarte i gęstsze, liście były karbowane, nie wykształcały się bulwy korzeniowe. Nie stwierdzono różnic zawartości chlorofilu (tab.). Wyższa efektywność namnażania RT wraz ze zmienionym fenotypem, określanym jako „syndrom korzeni transformowanych”, świadczy o ekspresji genów *rol* i *aux* (17). Analiza TLC antocyjanin z liści RN i RT wykazała obecność trzech plam o identycznych  $R_f$ , odpowiadających prawdopodobnie pochodnym malwidyny (4). Stwierdzono natomiast różnice w całkowitej zawartości antocyjanin, która u RN była około 40% wyższa niż u RT (tab.). Podobnie transformacja *Hyoscyamus muticus* szczepem LBA 9402 obniżyła produkcję alkaloidów tropanowych w regenerowanych tkankach (8). Prawdopodobne jest, że u RT *O. triangularis* geny *rol*, przez zmiany w aktywności i metabolizmie regulatorów wzrostu (9), wpłynęły na biosyntezę antocyjanin.

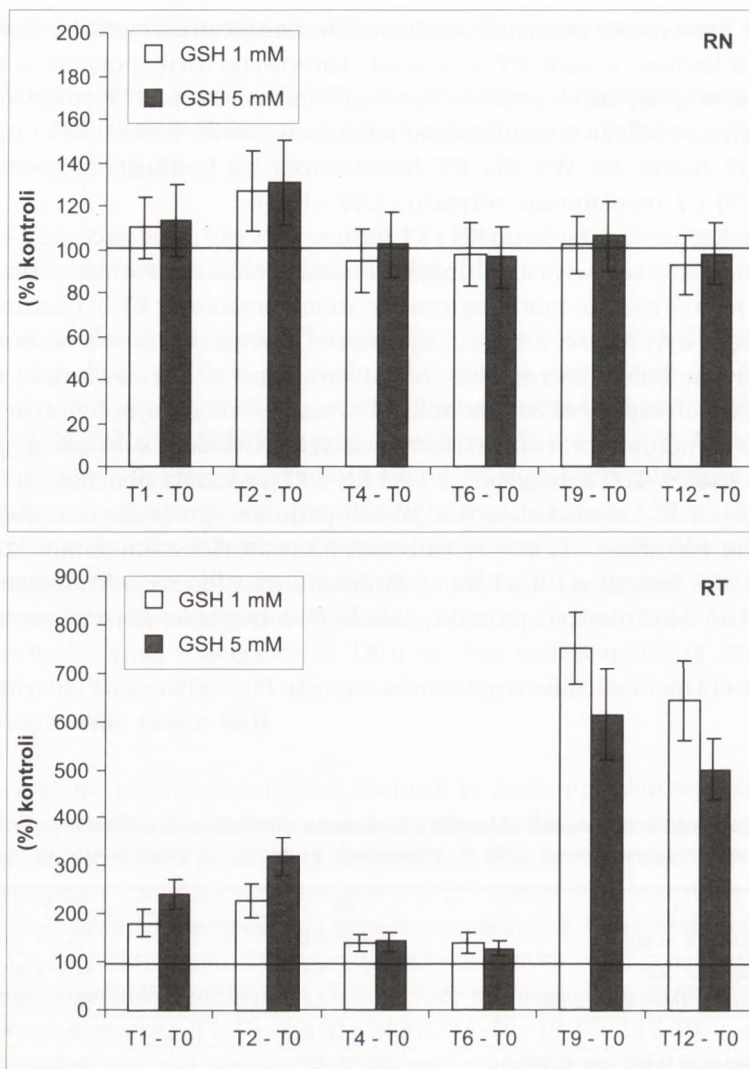
Tabela

**Porównanie morfologii oraz zawartość chlorofilu i antocyjanin w liściach nietransformowanych i zregenerowanych z korzeni transformowanych roślin *O. triangularis* po miesiącu hodowli *in vivo* (n = 36)**

	RN	RT
wysokość pędów (cm $\pm$ SD)	14,4 $\pm$ 3,48	7,57 $\pm$ 1,67
liczba liści / kępę ( $\pm$ SD)	14,1 $\pm$ 4,41	31,9 $\pm$ 8,52
zawartość chlorofilu (mg/g s.m. $\pm$ SD)	20,9 $\pm$ 2,43	20,1 $\pm$ 2,71
$R_f$ antocyjanin	0,40; 0,51; 0,55	0,40; 0,51; 0,55
zawartość antocyjanin (mg/g s.m. $\pm$ SD)	23,1 $\pm$ 4,39	16,8 $\pm$ 4,23

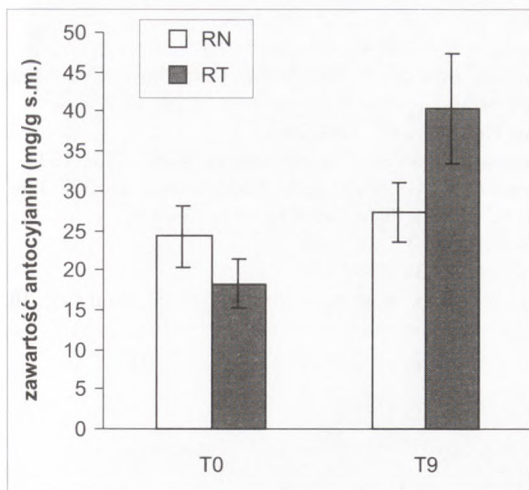
Transformacja roślin genami plazmidu *Agrobacterium* może prowadzić do zmian odporności na atak patogenów. Na przykład RT pomidora charakteryzowały się wyższą odpornością na *Phytophthora infestans* (18). Na podstawie danych eksperymentalnych wskazuje się na glutation jako na jeden z głównych związków w systemie transdukcji sygnałów reakcji obronnych. W formie zredukowanej (GSH) stymuluje transkrypcję wielu genów, szczególnie istotną rolę w ich regulacji odgrywa zmiana stosunku GSH do formy utlenionej (GSSG) (6,7). Ponadto GSH bierze udział w transporcie antocyjanin do wakuol (19). U RN *O. triangularis* GSH w niewielkim





Rys. 1. Wpływ GSH na przyrost zawartości antocyjanin w liściach nietransformowanych i zregenerowanych z korzeni transformowanych roślin *O. triangularis* w 1, 2, 4, 6, 9, 12 dniu po traktowaniu; T0 – 6 godz. przed traktowaniem (n = 12).

stopniu wpływał na przyrost zawartości antocyjanin (różnica pomiędzy zawartością po i przed traktowaniem). Najwyższy przyrost zawartości, drugiego dnia po traktowaniu, osiągnął 130% kontroli (rys. 1). Natomiast u RT GSH silnie stymulował produkcję antocyjanin. Przyrost zawartości antocyjanin następował już drugiego dnia po traktowaniu, w czwartym i szóstym dniu obserwowano spadek przyrostu, a ponowny, silniejszy przyrost nastąpił w dziewiątym dniu (rys. 1). W dziewiątym dniu



Rys. 2. Zawartość antocyjanin w liściach nietransformowanych i zregenerowanych z korzeni transformowanych roślin *O. triangularis* w dziewiątym dniu po traktowaniu 1 mM GSH; T0 – 6 godz. przed traktowaniem.

po traktowaniu 1 mM GSH przyrost zawartości antocyjanin osiągnął 750% kontroli (rys. 1). W efekcie, całkowita zawartość antocyjanin w liściach RT przewyższyła o 50% zawartość tych związków w liściach RN (rys. 2). Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że u RT GSH zniósł obniżoną przez działanie genów *rol* ekspresję genów i/lub aktywność enzymów szlaku biosyntezy antocyjanin. Cykliczne wzrosty i spadki przyrostu zawartości antocyjanin sugerują także wpływ GSH na dostępność substratu/ów do biosyntezy.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że RT *O. triangularis* w porównaniu z RN mają wyższą efektywność namnażania *in vitro*, charakteryzując się zmienionym fenotypem oraz obniżoną zawartością antocyjanin. Produkcja antocyjanin u RT jest bardziej wrażliwa na GSH niż u RN.

## Literatura

1. Yan X., Murphy B. T., Hammond G. B., Vinson J. A., Neto C. C., (2002), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5844-5849.
2. Wang H., Nair M. G., Strasburg G. M., Chang Y-C., Booren A. M., Gray J. I., Dewitt D. L., (1999), *J. Natural Prod.*, 62, 294-296.
3. Wissgott U., Bortlik K., (1996), *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 298-302.
4. Pazmiño-Durán E. A., Giusti M. M., Wrolstad R. E., Glória M. B. A., (2001), *Food Chemistry*, 75, 211-216.
5. Chalker-Scott L., (1999), *Phytochem. Phytobiol.*, 70(1), 1-9.
6. Foyer C. H., Theodoulou F. L., Delrot S., (2001), *Trends Plant Sci.*, 6(10), 486-492.
7. Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C. H., (2002), *J. Exp. Bot.*, 53(372), 1283-1304.
8. Sevón N., Dräger B., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K.-M., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 605-611.
9. Bulgakov V. P., Tchernoded G. K., Mischenko N. P., Khodakovskaya M. V., Glzunov V. P., Radchenko S. V., Zvereva E. V., Fedoreyev S. A., Zhuravlev Y. N., (2002), *J. Biol.*, 97, 213-221.



10. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., (1968), *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
11. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-479.
12. Wagner H., Bladt S., (1996), *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 281-288.
13. Hodges D. M., Nozzolillo C., (1996), *J. Plant Physiol.*, 147, 749-754.
14. Hosokawa K., Fukunaga Y., Fukushi E., Kawabata J., (1996), *Phytochemistry*, 41(6), 1531-1533.
15. Giusti M. M., Rodriguez-Saona L. E., Wrolstad R. E., (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 322-326.
16. Saitou T., Tokutomi S., Harada H., Kamada H., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 754-758.
17. Christey M. C., (2001), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 37, 687-700.
18. Barna B., Pogány M., (2001), *Acta Physiol. Plant.*, 23(3), 273-277.
19. Alfenito M. R., Souer E., Goodman C. D., Buell R., Moi J., Koes R., Walbot V., (1998), *Plant Cell*, 10, 1135-1149.