



Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*

Anna Szpitter, Aleksandra Królicka

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG, Gdańsk

Stimulating the effect of biotic elicitors on the production of pharmacologically active secondary metabolites in plant *in vitro* cultures

Summary

Plant secondary products are the substances of great importance in many spheres of human life. In recent years, many methods have been investigated in order to increase yield of these compounds, synthesized in plant *in vitro* cultures – systems, which proved to be very useful and efficient for this purpose. Among these techniques, biotic elicitation, although not yet applied to a large scale production, proved to be a very efficient procedure on laboratory scale. One of the major aims of the studies on biotic elicitation of plants is to identify universal and effective, but at the same time the cheapest and simplest elicitors which could be used to increase secondary metabolites' production in plant *in vitro* cultures. This review focuses on different biotic elicitors of complex composition (e.g.: fungal culture filtrates and homogenates), as well as those with a known structure (e.g.: chitosan or ergosterol). The factors influencing the elicitation process as well as ways of improving efficiency of this method by combining it with other techniques, which can also increase plant tissue productivity, are also discussed.

Key words:

biotic elicitors, secondary metabolites, *in vitro* plant culture.

Adres do korespondencji

Aleksandra Królicka,
Zakład Ochrony
i Biotechnologii Roślin,
Katedra Biotechnologii,
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii,
Uniwersytet Gdański
i Akademia Medyczna,
ul. Kładki 24,
80-822 Gdańsk;
e-mail:
krolicka@biotech.univ.gda.pl

biotechnologia

4 (71) 82–108 2005

1. Wstęp

Rośliny syntetyzują ogromną liczbę aktywnych biologicznie związków chemicznych będących metabolitami wtórnymi. Substancje te są gatunkowo specyficzne i nie biorą udziału w metabolizmie podstawowym, ale mają zasadnicze znaczenie w przystosowaniu się roślin do zmiennych warunków środowiska (1). Wśród metabolitów wtórnych wyróżniamy szeroką gamę związków takich jak np. alkaloidy, olejki eteryczne, taniny, sterole, fitoaleksyny, związki fenolowe, terpeny, kumaryny i inne. Metabolity wtórne znalazły zastosowanie jako leki, naturalne barwniki, środki zapachowe lub pestycydy (2). Do związków roślinnych wykorzystywanych w celach użytkowych należą m.in. stosowane do barwienia żywności betalainy, chinony, flawonoidy, a także związki zapachowe i olejki eteryczne. W przemyśle kosmetycznym znalazły również zastosowanie metabolity wtórne o właściwościach przeciwutleniających. Jednak najważniejszymi cechami substancji syntetyzowanych w roślinach są ich właściwości lecznicze.

Rośliny stanowią niewyczerpane źródło różnorodnych związków, które mogą być potencjalnie wykorzystane jako leki, jednak do tej pory poznano jedynie ich niewielką część. Obecnie znanych jest około 100 000 substancji będących roślinnymi metabolitami wtórnymi, a każdego roku odkrywanych jest około 4000 nowych (3). Mimo znajomości ich struktury i właściwości, chemiczna synteza takich związków, posiadających często niezwykle skomplikowaną budowę, jest nieoptymalna lub niemożliwa do przeprowadzenia za pomocą dostępnych metod (3).

Skuteczną metodą podnoszenia produkcji metabolitów wtórnych w wielu systemach roślinnych okazała się elicytacja. Termin „elicytor” został wprowadzony w 1975 r. i wtedy też przeprowadzono pierwsze doświadczenia z elicytacją w kulturach roślinnych *in vitro* (4). Elicytory są fizycznymi lub chemicznymi czynnikami stresowymi stymulującymi odpowiedź obronną roślin (4). Ponieważ szlaki wtórnego metabolizmu aktywowane są przez czynniki stresowe, elicytory stosowane są do zwiększania syntezy tych substancji w roślinnych kulturach *in vitro*. Dodatkowo, substancje te mogą stymulować uwalnianie komórkowych produktów do pożywki (5). Ze względu na miejsce powstawania, elicytory dzielone są na endo- i egzogenne, z kolei w zależności od ich pochodzenia rozróżnia się: elicytory biotyczne i abiotyczne (6). Do abiotycznych elicytorów zalicza się m.in. promieniowanie UV, sole metali ciężkich, a także złożone substancje chemiczne jak Regalis® czy BION® (5,7).

Elicytorami biotycznymi są związki zarówno pochodzenia roślinnego (endogenne), jak i produkowane w organizmie patogena (egzogenne) (8). Najczęściej stosowanymi biotycznymi elicytorami są złożone związki chemiczne, o często nie w pełni zdefiniowanym składzie, takie jak ekstrakty grzybowe czy bakteryjne (6). Do elicytorów o zdefiniowanej budowie należą substancje o strukturze m.in. węglowodanów, białek i steroli. Dokładny mechanizm działania elicytorów nie jest do końca poznany. Wiadomo, że stymulacja szlaków metabolizmu wtórnego w elicytowanych komórkach zachodzi w wyniku odpowiedzi rośliny na stres biotyczny, którym w natu-

ralnych warunkach jest atak patogenów. Aktywacja mechanizmów obronnych, do których należy produkcja związków toksycznych dla czynnika chorobotwórczego, decyduje o przetrwaniu rośliny i zwalczeniu infekcji (3,4,9). Innymi związkami posiadającymi właściwości elicytorów, a uczestniczącymi w transmisji sygnałów w organizmie roślinnym i syntetyzowanymi w warunkach naturalnych przez komórki są m.in. kwas jasmonowy (JA) i kwas salicyłowy (SA) (5,10).

2. Elicytory biotyczne

Wiele substancji pochodzenia biotycznego posiada właściwości elicytora w stosunku do tkanek roślinnych hodowanych w systemach *in vitro*. Należą do nich m.in. mieszaniny związków o złożonym składzie otrzymywane w wyniku homogenizacji lub filtracji kultur grzybowych i bakteryjnych. W ostatnich latach wyizolowano także szereg substancji o zdefiniowanej budowie i silnej aktywności elicytorowej. Część z nich najprawdopodobniej stanowi czynnik aktywny elicytorów złożonych. Przeprowadzone są badania nad mechanizmami działania tych cząsteczek oraz ich receptorom w obrębie komórki roślinnej (4).

2.1. Elicytory o budowie złożonej

2.1.1. Elicytory grzybowe

Homogenaty i filtry z kultur wielu gatunków grzybów (głównie patogenów roślinnych) znalazły zastosowanie jako elicytory metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* (4). W większości przypadków preparaty grzybowe powodują redukcję wzrostu kultury roślinnej, a także stymulują uwalnianie metabolitów wtórnych do pożywki.

Elicytor uzyskany z tego samego gatunku grzyba może w zupełnie inny sposób oddziaływać na komórki różnych gatunków roślin. Elicytacja zawiesiny komórek *Catharanthus roseus* filtrem z patogena grzybowego *Pythium aphanidermatum* nie spowodowała stymulacji syntezy alkaloidów indolowych (11). Zaobserwowano, co prawda, znaczne zwiększenie aktywności dwóch enzymów szlaku ich syntezy: syntazy kwasu antranilowego oraz dekarboksylazy tryptofanu, ale aktywność innych pozostała bez zmian lub zmniejszyła się pod wpływem elicytacji. W rezultacie zaobserwowano akumulację tryptaminy, prekursora alkaloidów indolowych, natomiast brak zwiększenia zawartości ajmalicyny oraz syntezy katarantyny i serpentyny. Badając żywotność komórek elicytowanej kultury za pomocą barwienia diocetanem fluoresceiny, stwierdzono spadek liczby żywych komórek do 75% względem kontroli (11). Bais i in. (12) wykazali natomiast, że filtrat z mycelium tego samego grzyba

(*P. aphanidermatum*) stymulował produkcję kumaryn (eskuliny i eskuletyny) w kulturze korzeni włóśnikowatych *Cichorium intybus*, dodatkowo powodując niewielki wzrost biomasy hodowli w porównaniu do kontroli.

Homogenat z patogenicznego grzyba *Fusarium solani* był nieskuteczny w elicytacji diosgeniny w zawiesinie komórkowej *Dioscorea galeottiana* (13), natomiast powodował wzrost aktywności amoniakolizazy fenyloalaniny (PAL) poprzedzony zwiększeniem poziomu PAL mRNA w kulturze zawiesinowej *Nicotiana tabacum* (10) oraz stymulował ponad 3-krotny wzrost zawartości alkaloidów indolowych w kulturze zawiesinowej *C. roseus* (14).

Stwierdzono także, że w zależności od gatunku grzyba użytego do elicytacji, reakcja komórek roślinnych może być różna, a także, że czynniki wpływające na efektywność produkcji mogą ulec zmianie. Cline i Coscia (15) elicytowali kultury zawiesinowe *Papaver bracteatum* za pomocą homogenatu z *Dendryphion penicillatum*, patogena roślin z rodzaju *Papaver* oraz preparatu z konidiów *Verticillium dahliae*, patogena o szerokim spektrum gospodarzy. Niezależnie od obecności hormonów w pożywce, homogenat *D. penicillatum* powodował wzrost zawartości alkaloidu sanguinaryny do poziomu 460 µg/g świeżej masy (ś.m.) w porównaniu z ok. 40 µg/g ś.m. w kulturze kontrolnej. Z kolei elicytor z *V. dahliae*, stymulował produkcję tego alkaloidu jedynie na pożywce pozbawionej regulatorów wzrostu (uzyskano 4758,8 µg/g ś.m.). Oba preparaty grzybowe indukowały uwolnienie alkaloidu do pożywki (15).

Oprócz preparatów z typowych patogenów roślinnych, także preparaty uzyskane z gatunków saprofitycznych mają zdolność do wywoływania syntezy metabolitów wtórnych w komórkach roślinnych. Przykładem jest elicytacja kultury korzeni włóśnikowatych *Artemisia annua* preparatem z endofitycznego dla tego gatunku grzyba *Colletotrichum* sp. (16). Zaobserwowano wzrost zawartości artemizyny w komórkach *A. annua* oraz nieznaczny spadek tempa wzrostu korzeni w porównaniu do kontroli. Nie stwierdzono uwalniania produktu do pożywki. Skuteczność elicytacji zależała od stężenia i czasu działania elicytora oraz od wieku elicytowanych korzeni.

W zależności od sposobu przygotowania kultury grzybowej, użytej potem jako elicytor, otrzymane preparaty wykazywały różny wpływ, zarówno na przyrost biomasy jak i na produkcję metabolitów wtórnych w hodowlach roślinnych. Podczas gdy ekstrakt z grzybni *P. aphanidermatum* dodany do kultury korzeni włóśnikowatych *Cichorium intybus*, powodował spowolnienie wzrostu kultury oraz zmniejszenie produkcji kumaryn i poliamin, to filtrat z kultury tego samego grzyba stymulował zarówno wzrost hodowli jak i syntezę metabolitów (12). Zhao i in. (14) badali wpływ homogenatów grzybni i filtratów kultur 12 gatunków grzybów na produkcję alkaloidów indolowych w zawiesinie komórkowej *C. roseus*. Wszystkie elicytory spowodowały redukcję żywotności komórek roślinnych oraz zmianę barwy kultury z żółtej na brązową. Jednak, zarówno intensywność koloru zawiesiny po elicytacji, całkowita zawartość alkaloidów, odsetek produktu uwalnianego do pożywki jak i proporcje pomiędzy katarantyną, ajmalicyną i serpentyną, różniły się w zależności od gatunku grzyba oraz rodzaju elicytora (filtrat lub homogenat grzybowy). Skutecznymi elicyto-

rami były homogenaty grzybni *F. solani*, *P. irregulare*, *Aspergillum niger* oraz *Ustilaginodia verens*, natomiast nieefektywne okazały się preparaty z grzybów z rodzaju *Mucor* (*M. fragilis* i *M. rouxianus*). Jedynie 5 filtratów kultur grzybowych skutecznie stymulowało syntezę alkaloidów indolowych. Niektóre z nich powodowały słabszą, inne wyższą akumulację produktów niż uzyskane z tych samych gatunków homogenaty. Homogenat z *U. verens*, jak się okazało, był najbardziej efektywnym i uniwersalnym elicytorem spośród badanych. Optymalizując dawkę elicytora, linię komórkową *C. roseus*, wiek kultury i czas elicytacji udało się osiągnąć 5-krotny wzrost produkcji alkaloidów (14).

Wiele preparatów grzybowych stymulowało uwalnianie wtórnych metabolitów do pożywki. Preparaty z *A. niger* i *Rhizopus oryzae* oprócz skutecznej elicytacji produkcji plumbaginy w zawiesinie *Plumbago rosea* (ponad 3-krotny wzrost syntezy) powodowały wzrost odsetka uwalnianego do pożywki produktu o ok. 10% względem kontroli (co stanowiło około 30% całkowitej produkcji) (17). Zhao i in. (14) zaobserwowali uwolnienie z komórek ponad 80% całkowitej ilości wyprodukowanych alkaloidów indolowych (ponad 30-krotnie więcej niż w kontroli) w wyniku elicytacji kultury zawiesinowej *C. roseus* homogenatami z *U. verens* i *A. niger*.

W wielu przypadkach złożone elicytory grzybowe powodowały redukcję biomasy kultury (11,14,16), a mimo to niektóre z nich, jak się okazało, miały korzystny wpływ na wzrost hodowli. Bais i in. (12) wykazali, że dodatek ekstraktu lub filtratu z hodowli patogenicznego grzyba *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana* do kultury korzeni włośnikowatych *Cichorium intybus*, poza zwiększeniem ilości produkowanych kumaryn (ok. 400% w stosunku do kontroli) i poliamin (ok. 130% w stosunku do kontroli), wywołał wzrost grubości i stopnia rozgałęzienia korzeni. W rezultacie końcowa biomasa elicytowanej hodowli była 1,5-krotnie większa niż w kulturze kontrolnej (12). Także w wyniku elicytacji transformowanych korzeni *Ocimum basilicum* za pomocą preparatów z *P. cinamoni* i *P. drechsleri*, biomasa kultury wzrosła odpowiednio o 87 i 28%. Zanotowano również znaczny wzrost produkcji kwasu rozmarynowego (18).

Na szczególną uwagę zasługują grzyby z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, którego ekstrakt posiada aktywność elicytorową wykazaną w wielu systemach roślinnych. Wykazano, że w większości przypadków, jego dodatek do pożywki nie wpływa negatywnie na wzrost biomasy kultury oraz stymuluje uwalnianie produktów do pożywki.

Wykazano pozytywny wpływ ekstraktu drożdżowego (YE) na akumulację triterpenoidów (głównie kwasu ursolowego i oleanolowego) w zawiesinie komórkowej *Scutellaria baicalensis* (19). Filtrat ekstraktu z *S. cerevisiae* podzielono na 2 frakcje zawierające związki o różnej masie cząsteczkowej (YE-1 m.cz. >10,000 Da oraz YE-2 m.cz. < 10,000 Da). Skuteczniejszym elicytorem, jak się okazało, była frakcja YE-1, którą stosowano w ilości 50 mg/l pożywki. Zaobserwowano wzrost produkcji triterpenoidów, z których większość została wydzielona do podłoża oraz gwałtowną zmianę barwy kultury z jasnożółtej na jasnobrązową. Udowodniono także, że elicy-

tor działa na komórki aktywując szlak oktadekanoidowy (19). W kulturze zawiesinowej *C. roseus*, elicytor drożdżowy, działając także za pośrednictwem jasmonianów, stymulował syntezę alkaloidów indolowych (20).

Pitta-Alvarez i in. (5) zanotowali wzrost zawartości skopolaminy i hioscyjminy (o ok. 200% w porównaniu do kontroli) w kulturze korzeni włośnikowatych *Burgmansia candida* elicytowanej YE. Stwierdzono także 6-krotnie większe uwalnianie skopolaminy do pożywki, a dodatek elicytora nie wpłynął negatywnie na wzrost kultury. Pozytywny wpływ preparatu drożdżowego na biomasę hodowli zanotowano w kulturze korzeni włośnikowatych *Salvia miltiorrhiza* (dwukrotnie szybszy wzrost w kulturze z dodatkiem YE). Ponadto w elicytowanej hodowli wzrosła synteza kwasów fenolowych oraz naftochinonów (21). Najprawdopodobniej aktywnymi cząsteczkami elicytora są składniki ściany komórkowej posiadającej złożoną budowę.

Hahn i Albersheim (22) stwierdzili, że aktywną substancją ekstraktu drożdżowego był obecny w ścianie drożdży β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6) glukan. Wykazano, że stymulował on syntezę gliceoliny w hipokotylach i liścieniach *Glycine max*. Autorzy sugerują, że rośliny rozpoznają glukany obecne w różnych gatunkach grzybów niezależnie od ich patogenności. Podobnie jak w przypadku drożdży, także ściana *Phytophthora oryzae* zbudowana jest z chityny, glukanu oraz proteoheteroglikanu z dużą zawartością mannozy. Wykazano, że aktywność elicytorową w hydrolizatach ścian tego patogena, badaną w zawiesinie komórkowej ryżu, posiadała głównie frakcja oligoglukanowa (23). Również mieszanina glikoprotein otrzymana z komórek drożdży skutecznie stymulowała syntezę alkaloidów benzofenantrydynowych w kulturze zawiesinowej *Eschscholtzia californica* powodując 3,5-krotny wzrost ich syntezy. Może to sugerować udział także tej frakcji w procesie elicytacji wywołanej preparatami grzybowymi (24). Także ergosterol, związek produkowany przez większość wyższych grzybów i posiadający silne właściwości elicytorowe w stosunku do zawiesiny komórkowej *Lycopersicum esculentum*, jest prawdopodobnie substancją aktywną w grzybowych elicytorach złożonych (25). Inni autorzy przypuszczają, że właściwości elicytorowe ekstraktu drożdżowego mogą być spowodowane obecnością w pożywce jonów: Zn^{2+} , Ca^{2+} i Co^{2+} (obecnych w komórkach drożdży), które mogłyby działać jako elicytory abiotyczne (5).

2.1.2. Elicytory bakteryjne

Zastosowanie elicytorów bakteryjnych pod pewnymi względami jest korzystniejsze niż w przypadku preparatów grzybowych. Czas przygotowania kultury bakteryjnej mającej posłużyć do elicytacji jest krótszy i wynosi ok. 2-3 dni w porównaniu z dłuższą hodowlą grzybów (ok. 7-8 dni). Ponadto otrzymanie elicytora z kultur bakteryjnych jest łatwiejsze i nie wymaga homogenizacji komórek. Z tego powodu zastosowanie preparatów bakteryjnych może przyczynić się do redukcji kosztów produkcji metabolitów wtórnych na dużą skalę (26). Okazuje się, że oprócz gatunku bakterii, czynni-

kiem decydującym o wyniku elicytacji, tak jak w przypadku elicytorów grzybowych, jest sposób przygotowania elicytora bakteryjnego. Jung i in. (26) stosowali autoklawowane i nieoczyszczone zawiesiny *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Pseudomonas aeruginosa* do elicytacji produkcji alkaloidów tropanowych w korzeniach włośnikowatych *Scopolia parviflora*. Autoklawowane zawiesiny bakteryjne nie wpłynęły zarówno na biomasę hodowli jak i na produkcję metabolitów. Okazało się, że jedynie preparaty zawierające żywe bakterie wykazywały aktywność elicytorową, ale równocześnie silnie wpływały na wzrost i żywotność kultury, powodując obumieranie komórek korzeni po 48 h od podania elicytora. Preparaty z żywych bakterii gramdodatnich okazały się skuteczniejsze, a najefektywniejszy był elicytor z *S. aureus*, który 3-krotnie zwiększył produkcję skopoletyny w kulturze po 12 h elicytacji (26).

Autoklawowany lizat *Enterobacter sakazaki* został użyty do elicytacji produkcji kumaryn i furanokumaryn w kulturach *Ammi majus* (7). Elicytor indukował zwiększoną syntezę umbeliferonu w porównaniu do kontroli w kulturze zawiesinowej (z 0,1 do 9,6 mg% s.m.) oraz w korzeniach włośnikowatych (z 1,9 do 2,3 mg% s.m.), powodował natomiast spadek jego zawartości w kulturze kalusa. Obniżenie zawartości umbeliferonu jest prawdopodobnie spowodowane jego przekształceniem w bardziej skomplikowane strukturalnie furanokumaryny. W elicytowanej kulturze kalusa *A. majus* zaobserwowano produkcję znacznych ilości skopoletyny, kumaryny nieobecnej w hodowlach kontrolnych. W wyniku elicytacji korzenie włośnikowate syntetyzowały także niewielkie ilości furanokumaryny – bergaptenu, substancji nie wykrytej do tej pory zarówno u *A. majus* hodowanym *in vivo* jak i w kulturach tkankowych (7). Ten sam elicytor użyty do stymulacji wtórnego metabolizmu w kalusie *A. visnaga* stymulował wzrost kultury, natomiast nie wywołał znaczących jakościowych i ilościowych zmian w składzie produkowanych furanochromonów i piranokumaryn (27). Traktowanie autoklawowanym lizatem z *E. sakazaki* kultury zawiesinowej *A. visnaga* również nie zmieniło proporcji i ilości związków z grupy furanochromonów i piranokumaryn. Zaobserwowano jedynie silną stymulację syntezy niezidentyfikowanego związku o $R_f = 0,8$.

Większość bakterii nie posiada w ścianie frakcji glukanowej podobnej do grzybowej. Prawdopodobnie inne niespecyficzne elicytory biorą udział w aktywacji odpowiedzi obronnej roślin pod wpływem preparatów z patogenicznych i niepatogenicznych bakterii gramujemnych (22). Felix i in. (28) badali właściwości elicytorowe lizatów z bakterii z rodzaju *Agrobacterium*, *Rhizobium* oraz *Xanthomonas* i stwierdzili, że preparaty z tych gatunków nie indukowały alkalizacji podłoża ani produkcji reaktywnych rodników tlenowych (*reactive oxygen species*, ROS) w kulturze zawiesinowej *L. esculentum*. Przyczyną była najprawdopodobniej inna od konsensusowej sekwencja N-terminalna flageliny występująca u tych bakterii, która nie była rozpoznawana przez komórki roślinne. Najprawdopodobniej to właśnie flagelina odpowiada za niespecyficzną odpowiedź rośliny na patogeny bakteryjne (28).

W wielu przypadkach ekstrakty grzybowe i bakteryjne, jak się okazało, były skutecznymi elicytorami, a mimo to ich praktyczne zastosowanie do produkcji metabo-

litów wtórnych jest poważnie ograniczone słabą powtarzalnością i przewidywalnością wyników. Wykazano na przykład, że skład procentowy glukanów, chityny i mannanów w ścianie komórek drożdży (a przez to potencjalne właściwości elicytorowe) podlega zmianom w zależności od warunków hodowli, m.in. od pH, temperatury, składu podłoża, a także od rodzaju kultury (bioreaktor lub kolba) (29). Z tego względu określenie stężeń elicytora złożonego (zarówno wyrażone w %, v/v, jak i w mg równoważników cukrowych/ml) jest w wielu przypadkach niejednoznaczne. Ponadto, elicytacja za pomocą kultur żywych mikroorganizmów jest niemożliwa do zastosowania w produkcji metabolitów na dużą skalę z powodu możliwości trwałego zanieczyszczenia bioreaktora. Różnorodne efekty wywoływane w komórkach przez grzybowe i bakteryjne elicytory wynikają ze złożonego składu tych preparatów oraz specyficzności oddziaływań pomiędzy nimi a receptorami komórek roślinnych (14). Prowadzone są badania nad znalezieniem elicytorów o uniwersalnym działaniu i efektywnie stymulujących wtórny metabolizm komórek roślinnych.

2.2. Elicytory o budowie zdefiniowanej

2.2.1. Oligosacharydy

Oligosacharydy są najlepiej scharakteryzowanymi elicytorami reakcji obronnych u roślin (30). Częsteczkami te biorą udział w regulacji procesów rozwojowych, symbiotycznych oraz odpowiedzi obronnej roślin. Oligosacharydy mogą być uwalniane ze ścian grzyba w wyniku częściowego trawienia przez produkowane przez roślinę chitynazy i β -glukanazy lub z komórki roślinnej pod wpływem enzymów wydzielanych przez patogena. Stanowią one sygnał do aktywacji mechanizmów obronnych, które prowadzą między innymi do syntezy fitoaleksyn (31).

2.2.1.1. N-acetylochitoooligosacharydy (oligochityna, oligosacharydy chityny)

Oligosacharydy chityny (COs) uwalniane są przez roślinne chitynazy z chityny, polimeru N-acetyloglukozaminy, głównego składnika ścian wielu grzybów oraz egzoszkieletu stawonogów (32). Oligosacharydy chityny tworzą także szkielet czynników nodulacji (*nodulation factors*, Nod) produkowanych przez bakterie wiążące azot i rozpoznawanych przez rośliny motylkowe (33). Percepcja fragmentów chityny przez komórki roślinne odgrywa ważną rolę w komórkowej sygnalizacji patogenezie i stymulacji reakcji obronnych jak również w procesach rozwojowych – embriogenezie i organogenezie (34).

Vander i in. (35) badali wywoływanie reakcji obronnych *in vivo* pod wpływem działania chitoooligosacharydów wstrzykiwanych do przestrzeni międzykomórko-

wych liści pszenicy. Zaobserwowano indukcję aktywności peroksydazy (PO), brak stymulacji aktywności PAL, a także brak lignifikacji ścian komórkowych. Do elicytacji *in vivo* niezbędne są wysokie (1mg/ml) stężenia oligochityny (35), natomiast roślinne kultury zawiesinowe są na COs znacznie bardziej wrażliwe. Efektywną elicytację odpowiedzi obronnych wywoływano już za pomocą nanomolowych stężeń elicytora w kulturach zawiesinowych komórek pszenicy, pomidora (36) oraz ryżu (23). Oligochityny wywołują w komórkach roślinnych depolaryzację błony oraz zwiększony przepływ jonów przez plazmolemę (37), czego rezultatem jest przejściowa alkaliczacja pożywki (36). Elicytor ma również zdolność do symulacji syntezy ROS i fitoaleksyn oraz indukcji zmiany fosforylacji białek, a także oksydacji lipidów (38).

Aktywność danego oligosacharydu chityny jako elicytora zależy w dużej mierze od stopnia polimeryzacji (*degree of polymerization*, DP). N-acetylochitoooligosacharydy większe niż heksamery (DP = 7-8) były skuteczniejszymi elicytorami w kulturach zawiesinowych komórek ryżu niż oligochityny o DP < 3, które nie wywoływały w komórkach reakcji obronnych, nawet podawane w dużych stężeniach (23). Również w przypadku elicytacji *in vivo* w liściach pszenicy, tylko cząsteczki COs o DP ≥ 7, jak się okazało, były skutecznymi induktorami aktywności peroksydazy, podczas gdy krótsze oligosacharydy chityny nie wykazywały takich właściwości (35). Natomiast komórki kultury zawiesinowej pomidora były wrażliwe już na fragmenty chityny o DP ≥ 4 (36). Sugeruje to istnienie różnej specyficzności wiązania COs w komórkach różnych gatunków roślin (39). Wykazano, że w błonie komórkowej komórek ryżu znajduje się białko (75 kDa), selektywnie wiążące oligochitosacharydy (39). Obecność białka o podobnej masie i specyficzności wiązania stwierdzono również w komórkach soi (40) oraz marchwi (41). Na podstawie przeprowadzonych badań błonowej frakcji mikrosomalnej oraz powierzchni komórek pomidora, dowiedziono istnienie miejsc wiązania chitoooligosacharydów o wysokim powinowactwie do COs o DP ≥ 4, które prawdopodobnie działają jako receptory dla tych cząsteczek (32). Felix i in. (42) za pomocą testu stopnia alkalizacji pożywki badali zależne od czasu i stężenia COs, nasycenie miejsc wiążących oligosacharydy chityny na powierzchni komórek pomidora w hodowli zawiesinowej. Udowodnili oni utratę wrażliwości na elicytor przy wielokrotnym traktowaniu hodowli oligosacharydami chityny, wynikającą prawdopodobnie z wysycenia miejsc receptorowych.

Elicytację oligosacharydami chityny zastosowano w kulturze kalusa *Juniperus chinensis* otrzymując 15-krotny wzrost produkcji podofylotoksyny (43). Dodatek fenylalaniny, prekursora tego metabolitu, do elicytowanej za pomocą COs kultury, spowodował dodatkowo 11-krotny wzrost produkcji tego metabolitu.

2.2.1.2. Chitozan

Chitozan jest całkowicie lub częściowo deacetylowaną pochodną chityny zbudowaną z N-acetyloglukozaminy oraz reszt 2-amino-2-deoksyglukopiranozy połączo-

nych wiązaniami 1→4 (35). Terminem „chitozan” określa się zwykle polimery o wielkości od 50 do 2000 kDa i różnym stopniu acetylacji od 2 do 60% (44). Stwierdzono występowanie chitozanu o różnym stopniu acetylacji w ścianie komórkowej niektórych grzybów, a także w kutikuli stawonogów (35). Chitozan i jego oligomery, jak się okazało, są skutecznymi elicytorami w stosunku do szerokiej gamy komórek roślinnych i w porównaniu do innych elicytorów biotycznych, indukowały odpowiedź w największej liczbie gatunków (45,46).

Chitozan wpływa na komórki roślinne poprzez interakcję z błoną komórkową, zmieniając poziom cytozolowego Ca^{2+} (47), a także reagując z DNA jądrowym. Cząsteczki chitozanu mogą przenikać przez plazmolemę w wyniku tworzenia połączeń z polarnymi fragmentami cząsteczek fosfolipidów. Obecność chitozanu stwierdzono w jądrach komórkowych komórek grochu zainfekowanego *F. solani* (48). Dzięki właściwościom polikationitu, chitozan indukując powstawanie por w błonie komórkowej, zwiększa jej przepuszczalność (49). Posiada on także właściwości bakterio- i grzybobójcze (9). Chitozan indukuje w roślinie zwiększoną biosyntezę lignin, przyspiesza lignifikację ścian komórkowych, a także stymuluje syntezę JA (47).

Wykazano oddziaływanie chitozanu na komórki *Rubia tinctorum* poprzez aktywację fosfolipazy C oraz 3'-OH kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K), które zapoczątkowują kaskadę reakcji prowadzących do syntezy antrachinonów w elicytowanych komórkach (47,50). Jednocześnie wykluczono udział w tym procesie kinazy A (PKA) aktywowanej za pośrednictwem cykazy adenylowej (AC) (50).

Zaobserwowano różnice w odpowiedzi na elicytor w zależności od stopnia acetylacji (*degree of acetylation*, DA) cząsteczki chitozanu. Częściowo deacetylowane oligomery chitozanu stymulowały aktywność PAL i PO, a także powodowały lignifikację i nekrozy komórek liści pszenicy po podaniu do przestrzeni międzykomórkowych. Wraz ze wzrostem DA rosła aktywność PAL i PO osiągając maksimum przy DA = 60%, natomiast najsilniejszą lignifikację ścian, a także największe nekrozy stwierdzono przy DA = 35% (35). Całkowicie deacetylowany chitozan nie wykazywał aktywności elicytora reakcji obronnych w liściach pszenicy (51). Wraz ze wzrostem DA cząsteczek chitozanu rosły jego właściwości permeabilizujące oraz ilość amarantyny uwalnianej z komórek zawiesiny *Chenopodium rubrum* do pożywki (6).

Chitozan okazał się skutecznym elicytorem wielu metabolitów wtórnych należących do alkaloidów, naftochinonów, fenylopropanoidów oraz terpenoidów w kulturach zawiesinowych, kalusowych i kulturach korzeni włośnikowatych (17,46,47,52). Elicytor ten zastosowany w kulturze zawiesinowej *Vanilla planifolia* stymulował aktywność wszystkich badanych enzymów szlaku fenylopropanoidowego: PAL, ligazy kwasu 4-hydroxy cynamonowego (4CL) i dehydrogenazy kwasu koniferylowego (CAD). Jednak zawartość ekstrahowalnych fenylopropanoidów (w tym prekursorów waniliny) w elicytowanej kulturze spadła, ponieważ zostały one wykorzystane jako komponenty lignin podczas budowy ściany komórkowej (46). Chitozan podany w stężeniach 0,5 mg/g ś.m. spowodował także ponad 6-krotną indukcję aktywności PAL w kulturze zawiesinowej *N. tabacum* oraz 3-krot-

ny wzrost zawartości alkaloidów: chelerytryny i makarpiny, w hodowli komórek *E. californica* (45).

Produkcja plumbaginy w kulturze zawiesinowej *P. rosea* wzrosła po dodaniu chitozanu w stężeniu 150 mg/l ponad 6-krotnie (17). Dodatek elicytora nie spowodował znacznego spadku współczynnika wzrostu (żywność komórek wyniosła 82,75% kontroli). W kulturze elicytowanej chitozaniem ponad 70% plumbaginy zostało uwolnione do pożywki, podczas gdy w kontroli było to zaledwie 18%. Chitozan, jak się okazało, był skutecznym elicytorem syntezy mentolu w kulturze zawiesinowej komórek *Mentha piperita* (52). W wyniku elicytacji przeprowadzonej chitozaniem w stężeniu 200 mg/l przez 12 dni otrzymano 40-krotny wzrost zawartości produktu w porównaniu do kontroli. Nie zaobserwowano zahamowania wzrostu komórek spowodowanego dodatkiem elicytora, a spadek ilości mentolu po 12 dniach. Na podstawie analizy zawartości produktów pośrednich syntezy mentolu wykazano, że chitozan prawdopodobnie stymulował pierwszy etap przemiany pulegonu do mentonu, który był zablokowany w kulturze kontrolnej (52).

Chitozan podany również w stężeniu 200 mg/l znacząco zwiększył produkcję antrachinonu indirubiny w kulturze zawiesinowej *Polygonum tinctorum* (53). Po 5 dniach hodowli w obecności chitozanu zawartość tego antrachinonu zwiększyła się o 72% w porównaniu do kontroli. Elicytacja chitozaniem w stężeniu 200 mg/l kultury zawiesinowej *Rubia tinctorum* przez 48 h również spowodowała wzrost produkcji antrachinonów o 100% w porównaniu do kontroli (47). Chitozan był aktywny w stężeniu 250 mg/l w elicytacji hioscyjminy w kulturze korzeni włośnikowatych *Hyoscyamus muticus* (54), natomiast, jak się okazało, był on nieskuteczny w kulturach transformowanych korzeni *Panax ginseng* (55). Dodatek elicytora w takim samym stężeniu (250 mg/l) spowodował znaczny spadek całkowitej zawartości ginsenozydów, a także redukcję biomasy w porównaniu do kontroli. Dodatek chitozanu już w stężeniu 20 mg/l stymulował produkcję paklitakselu (wzrost z 89 do 139 $\mu\text{g/g}$ ś.m.) w kulturach kalusowych *Taxus \times media* i *T. cuspidata* (56). Również w kulturze zawiesinowej *T. chinesis*, jak się okazało, był on skutecznym elicytorem syntezy tego taksanu (57,58).

2.2.1.3. Oligoglukany

Najlepiej poznanym oligoglukanem o właściwościach elicytora i pierwszym, który został wyizolowany, jest hepta- β -glukozyd. Wyizolowano go ze ściany komórkowej patogenicznego grzyba *P. megasperma f. sp. glicinea* (*P. sojae*, Pmg). Wykazano, że elicytor ten indukował syntezę fitoaleksyn w siewkach *Glycine max* (23,59,60). Błonowe białko (75 kDa) (*glucan elicitor binding protein*, GEBP) wyizolowane z komórek korzenia *G. max* i specyficznie wiążące hepta- β -glukozyd z *P. sojae* jest do tej pory najlepiej poznanym receptorem β -glukanów (61).

Sharp i in. (59) zidentyfikowali i określili strukturę 8 różnych oligosacharydów powstałych w wyniku częściowej, kwaśnej hydrolizy ścian komórkowych Pmg.

Struktura wszystkich zidentyfikowanych związków była bardzo podobna, jednak tylko jeden z nich, jak się okazało był efektywnym elicytorem fitoaleksyn w siewkach soi. Autorzy podają, że zidentyfikowany aktywny β -glukan był jedynym skutecznym elicytorem spośród ok. 150 heptaglukozydów obecnych w ekstrakcie grzybowym. Świadczy to o niezwykle wysokiej specyficzności struktury oligoglukanu wymaganej do aktywności elicytorowej. Wykazano także, że aktywny heptaglukan indukował syntezę fitoaleksyn w komórkach liścieni soi już w stężeniach rzędu 10^{-8} - 10^{-9} M (60).

Wyizolowano także β -glukan ze ścian komórkowych patogena ryżu, grzyba *Pyricularia oryzae*, który silnie indukował syntezę fitoaleksyn w kulturach zawieszonych komórek ryżu. Wykazano, że aktywność elicytora posiadały cząsteczki o długości większej niż trimer, a efektywność elicytacji wzrastała wraz z rosnącą wielkością oligosacharydu. Najsilniejsze właściwości posiadał pentaglukozyd zbudowany z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami β 1 \rightarrow 3 oraz reszty glukozy dołączonej wiązaniem 1 \rightarrow 6 (23).

Dowiedziano, że hepta- β -glukozyd z *P. sojae* jest w stanie indukować odpowiedź obronną w komórkach innych niż soja gatunków roślin (62-63), natomiast nie zaobserwowano indukcji w kulturze zawieszonych ryżu. Jednakże pentaglukozyd z *P. oryzae* nie wykazywał aktywności elicytorowej w stosunku do komórek liścieni soi (23). Różnice w budowie między oligoglukanami wywołującymi reakcje obronne w soi i ryżu świadczą o różnej swoistości receptorów dla oligosacharydów w komórkach tych gatunków roślin (39). Heptaglukan z *P. sojae*, jak się okazało, był również nieskuteczny w elicytacji alkaloidów w kulturze zawieszonych komórek *E. californica* (62) oraz w indukcji aktywności PAL w komórkach *N. tabacum* (30).

Innymi oligoglukanami posiadającymi właściwości elicytorów są oligosacharydy laminaryny, liniowego β -1,3 glukanu otrzymanego z brunatnic z gatunku *Laminaria digitata*. Są to analogi oligosacharydów biorących udział w odpowiedzi rośliny na patogena. Klarzyński i in. (30) badali wpływ laminaryny o DP = 33 na *N. tabacum*. Liście tych roślin infiltrowane elicytorem syntetyzowały białka związane z patogenezą (*pathogenesis-related*, PR) i wykazywały odporność na infekcje bakteryjnym patogenem *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. W kulturze zawieszonych *N. tabacum* laminaryny wywoływały przejściową alkalizację pożywki po 30 sekundach od podania elicytora, zwiększenie aktywności lipooksygenazy (LOX) oraz gwałtowne uwolnienie H_2O_2 . Zaobserwowano także silną indukcję szlaku syntezy fenylopropanoidów – wzrost aktywności PAL, O-metylotransferazy kwasu kawowego (COMT) oraz intensywniejszą produkcję SA. Elicytor nie indukował uszkodzeń tkanki ani śmierci komórek w kulturze zawieszonych. Nie powodował także kumulacji typowej dla tytoniu seskwiterpenoidowej fitoaleksyny: kapsidiolu. Podobnie jak w przypadku β -glukanu będącego elicytorem w kulturze zawieszonych ryżu, najmniejszą cząsteczką laminaryny indukującą odpowiedź w komórkach tytoniu jest pentaglukan (30). Oligosacharydy laminaryny stymulowały również aktywność PAL w kulturze *L. esculentum* oraz *Triticum aestivum*, natomiast nieaktywne okazały się w stosunku

do kultury *Petroselinum crispum* (30,63). Kobayashi i in. (63) zaobserwowali syntezę przeciwgrzybowych substancji w *Medicago sativa* pod wpływem elicytacji enzymatycznym hydrolizatem laminaryny. Elicytor ten został również zastosowany w kulturze kalusa *J. chinensis*, gdzie wywołał nieznaczny (3,5-krotny) wzrost zawartości podofylotoksyny w elicytowanej kulturze w porównaniu do kontroli (43).

Do innych β -glukanów stosowanych do elicytacji w roślinnych kulturach *in vitro* należą: skleroglukan otrzymywany ze ścian nitkowatych grzybów z rodzaju *Sclerotinia* oraz glukan ze ściany *S. cerevisiae*. Drożdżowy β -glukan stymulował akumulację sojowej fitoaleksyny, gliceoliny, w liścieniach i hipokotylach *G. max* (22). Skleroglukan wpływał korzystnie na wzrost kultury kalusa *Ammi visnaga* (27,64). Dodatek elicytora spowodował znaczny (50%) wzrost biomasy hodowli w porównaniu z kontrolą, a także wykazał dużą skuteczność w indukcji syntezy furanochromonów (64). Zaobserwowano 5-krotny wzrost zawartości wisnaginy oraz ponad 2-krotne zwiększenie produkcji keliny w kulturze *A. visnaga*.

Oligomery β -1,3 glukanów są, jak się wydaje, bardziej uniwersalnymi elicytorami w przeciwieństwie do motywu β -1,6-1,3 heptaglukanu, którego aktywność jako elicytora w większości przypadków ogranicza się do roślin motylkowych (*Fabaceae*) (30).

2.2.1.4. Oligosacharydy pektyn

Pektyny są związkami wchodzącymi w skład ściany komórkowej, w której podstawową jednostką strukturalną jest kwas galaktouronowy. Zbudowane są z 3 głównych rodzajów struktur: ramnogalaktouronian I (RGI), ramnogalaktouronian II (RGII) oraz homogalaktouronian (HG) (kwas poligalaktouronowy) (65). Oligosacharydy pektyn uwalniane są z roślinnej ściany komórkowej przez obecne w komórce enzymy lub pod wpływem m.in. poligalaktouronaz i liaz pektyn wydzielanych przez patogeny (65). Do głównych i najlepiej do tej pory poznanych elicytorów pochodzących ze ściany komórkowej należą oligogalaktouronidy (OGA), które kontrolują procesy wzrostu i rozwoju komórki roślinnej. Indukują również odpowiedzi obronne takie jak zwiększoną syntezę PAL, syntazy chalkonowej, chitynaz, β -glukanaz oraz inhibitorów proteaz (31). W kulturze zawieszinowej *N. tabacum* oligogalaktouronidy o DP = 10 powodowały uwolnienie H_2O_2 , stymulowały aktywność PAL, COMT, LOX oraz syntezę SA. Nie zaobserwowano zmniejszenia żywotności komórek w kulturze ani akumulacji kapsidiolu (30).

Dörnenburg i Knorr (49) badali wpływ oligomerów kwasu galaktouronowego o różnej długości na produkcję antrachinonów w kulturze zawieszinowej komórek *Morinda citrifolia*. Właściwości elicytorów posiadały jedynie oligogalaktouronidy o DP > 5. Czynniki warunkującymi skuteczność elicytacji, jak się okazało, były również: źródło, z którego izolowano pektyny, stopień ich estryfikacji oraz wiek kultury. Podanie pektyn izolowanych ze ścian komórkowych powodowało wzrost

ilości produkowanych antrachinonów wraz z wydłużającym się czasem hodowli, co wskazuje na stopniową degradację polimerów przez zaindukowaną aktywność poligalaktouronazy (6). Po 2 tygodniach inkubacji z pektynami podanymi w stężeniu 100 mg/l ilość antrachinonów wzrosła 5,6-krotnie w porównaniu do kontroli (49).

2.2.2. Białka i peptydy

2.2.2.1. Harpiny

Harpiny są temperaturo-stabilnymi białkami izolowanymi z bakterii z rodzaju *Erwinia*, *Pseudomonas* i *Ralstonia*. Należą one do sytemu niespecyficznie rozpoznawanego przez komórki roślinne (28), natomiast decydują o patogeniczności bakterii tych gatunków w stosunku do roślin żywicielskich (8). Harpiny kodowane są w zespole genów kodujących elementy systemu sekrecyjnego typu III i wydzielane są na zewnątrz komórki bakterii (66). Harpina wyizolowana z *P. syringae* pv. *phaseolicola*, jest elicytorem odpowiedzi reakcji nadwrażliwości (*hypersensitive response*, HR) i nabytą odporność systemiczną (*systemic acquired resistance*, SAR) w tytoniu. Aktywuje ona również szlak sygnalizacji z udziałem kinazy MAP, niezależnie od zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} (67). Dowiedziono również, że białko to indukuje alkalizację pożywki w zawiesinie *N. tabacum*, a także uwalnianie jonów K^+ i Cl^- z komórki. Stwierdzono także istnienie niebiałkowego błonowego receptora dla tego elicytora w komórkach *N. tabacum* (67). Harpina wyizolowana z *E. amylovora* indukowała produkcję ROS oraz zmiany w przepływie jonów K^+ i H^+ przez błonę w zawiesinie komórek tytoniu (68).

2.2.2.2. Flagelina

Felix i in. (28) stwierdzili alkalizację pożywki w kulturze zawiesinowej komórek *L. esculentum* pod wpływem elicytacji preparatem z *P. syringae* pv. *tabaci*, bakteryjnego patogena tytoniu, nie infekującego roślin pomidora. Oczyścili oni peptyd wielkości 33 kDa, posiadający aktywność elicytorową, który jak się okazało był flageliną, białkiem zbudowanym z 282 aminokwasów. Stwierdzono, że komórki pomidora specyficznie rozpoznają N-terminalny fragment elicytora o m.cz. < 10 kDa i konserwatywnej ewolucyjnie sekwencji, wspólnej dla licznych gatunków *Eubacterii*. Zsyntetyzowano na tej podstawie 22-aminokwasowy fragment (flg 22) będący skutecznym elicytorem już w stężeniu ok. 1 fM i wywołującym oprócz alkalizacji pożywki i brązowienia kultury, także syntezę ROS i działającym za pośrednictwem fosfolipazy C (69). Usuając z N-końca kolejne aminokwasy stwierdzono, że najkrótszym peptydem wywołującym reakcję na podobnym co flg 22 poziomie, był flg 15. Zsynte-

tyzowano również analogi flg 15 występujące u innych bakterii takich jak: *Escherichia coli*, *Bordetella bronchoseptica*, *Proteus mirabilis*, które wykazały również wysoką aktywność elicytorową w stosunku do komórek *L. esculentum* (28). Okazało się ponadto, że zarówno oczyszczona flagelina, jak i flg 22 oraz flg 15 wywołują odpowiedź w komórkach *N. tabacum*, *Solanum tuberosum* oraz *Arabidopsis thaliana*, natomiast żaden z peptydów nie był skuteczny w elicytacji zawiesiny komórek *Oryza sativa*. Przeprowadzono także testy kompetycyjnego wiązania flg 15- Δ 4 oraz flg 15- Δ 7, peptydów nie posiadających aktywności elicytorowej, natomiast hamujących wiązanie aktywnych flg 22 i flg 15, z preparatami z różnych gatunków bakterii. Stwierdzono, że flagelina jest głównym, jeżeli nie jedynym, czynnikiem w procesie rozpoznawania bakterii (*E. carotovora*, różnych patowarów *P. syringae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *P. fluorescence*) przez komórki roślinne (28).

2.2.2.3. Elicytyny

Elicytyny są rodziną niewielkich białek wydzielanych przez gatunki z rodzaju *Phytophthora* i *Pythium*. Wykazują wysoki stopień homologii (ponad 60%) oraz zdolność do indukcji reakcji HR w roślinach z rodzaju *Nicotiana* i *Brassica* (70). W kulturze zawiesinowej tytoniu indukują gwałtowną fosforylację białek, napływ Ca^{2+} do komórki, syntezę ROS, alkalizację pożywki oraz indukcję ekspresji genów i modyfikację ściany komórkowej (70). Wszystkie znane elicytyny posiadają konserwatywną sekwencję 98 aminokwasów. W zależności od struktury pierwszorzędowej wyróżnia się 5 grup tych białek. Elicytyny klasy I-A (α -elicytyny) o kwasowym pI oraz klasy I-B (β -elicytyny) o pI zasadowym, zbudowane są z 98 aminokwasów i są grupą najlepiej poznaną. Ponadto występują elicytyny klasy II, kwasowe białka zawierające oprócz fragmentu 98 aminokwasów kilka dodatkowych reszt na końcu C-terminalnym. Do klasy III zalicza się elicytyny o długim fragmencie C-terminalnym (65-101 aminokwasów) i posiadające potencjalne miejsca glikozylacji, natomiast elicytyny z *Pythium* spp. klasyfikowane są jako oddzielna, IV grupa lub jako podklasa I-C (70). W zależności od całkowitego ładunku cząsteczki, elicytyny klasy I dzielone są na: kwaśne i zasadowe. Klasyfikacja ta koreluje z ich właściwościami elicytorowymi zarówno w stosunku do roślin jak i kultury zawiesinowej *N. tabacum* (70-71). Badane elicytyny zasadowe: kryptogeina i cynamomina efektywniej indukowały wzrost pH pożywki w zawiesinie, niż elicytyny kwaśne (parazytyceina i kapsyceina) (70). Wszystkie elicytyny powodowały napływ Ca^{2+} do komórki, natomiast najintensywniejszą odpowiedź wywoływała kryptogenina (70). Kryptogeina okazała się skuteczniejsza w wywoływaniu nekroz w liściach tytoniu niż kapsyceina, działała w 10-krotnie mniejszym stężeniu i wywoływała maksymalną produkcję ROS w kulturach zawiesinowych *N. tabacum* var. *xanthi* i *N. rustica*. Natomiast produkcja kapsidiolu w kulturze elicytowanej kryptogeniną była mniejsza niż po dodaniu kapsyceiny (71).

Z *Phytophthora megasperma* izolowane są α - i β - megasperminy należące także do klasy I elicytyn. β -magaspermina jest zasadowym białkiem, które indukuje nekrozy tkanek w liściach oraz śmierć komórek w kulturze zawiesinowej *N. tabacum*. Elicytor ten ma także zdolność stymulacji produkcji kapsidiolu, typowej fitoaleksyny tytoniu (30). Dowiedziono także, że elicytacja zawiesiny komórek *N. tabacum* β -megasperminą w stężeniu 50 nM, powoduje gwałtowny wzrost poziomu glukozylotransferazy fenylopropanoidów (TOGT), enzymu zaangażowanego w przemiany m.in. kwasu hydroksycynamonowego i hydroksykumaryn zaangażowanych w dezaktywację ROS (72). Dorey i in. (73) stwierdzili, że α -megaspermina (kwaśne białko) i β -megaspermina w równym stopniu indukowały odpowiedź HR w liściach tytoniu, objawiającą się nekrozą liści. Jednak elicytory te, podane do kultury zawiesinowej *N. tabacum*, różniły się wywoływaną reakcją. Zarówno α - jak i β -megaspermina indukowały silnie aktywność PAL oraz syntezę SA, jednak tylko ta ostatnia powodowała śmierć komórek i gwałtowną syntezę H_2O_2 (73).

2.2.2.4. Enzymy

Patogeny roślinne wydzielają szeroką gamę enzymów hydrolizujących ściany komórkowe, co umożliwia im wniknięcie do organizmu gospodarza. W toku ewolucji rośliny wykształciły system percepcji i reagowania na produkty degradacji ścian oraz najprawdopodobniej także na same cząsteczki enzymów (74).

Ksylanazy są enzymami produkowanymi przez grzyby, bakterie, glony, pierwotniaki i stawonogi. Grzyby i bakterie wydzielają ksylanazy i odżywiają się produktami rozpadu ksylanów, które są głównym składnikiem hemiceluloz w roślinnej ścianie komórkowej (75). Wyizolowano i scharakteryzowano endo- β -1,4-ksylanazy z różnych gatunków grzybów i stwierdzono właściwości elicytorowe kilku z nich. Najlepiej poznanym enzymem z tej rodziny jest ksylanaza wyizolowana z grzyba *Trichoderma viridae* (74). Ksylanaza ta okazała się aktywnym elicytorem w stosunku do komórek pomidora (36) i tytoniu (76). Enzym powodował dość trwałą (2 h) alkalizację pożywki w kulturze zawiesinowej pomidora, której towarzyszyły zmiany w fosforylacji białek. Ksylanaza stymulowała także syntezę etylenu oraz aktywność PAL w komórkach pomidora (36). Dokładny mechanizm elicytacji ksylanazą nie jest znany, ale przypuszczalnie enzym ten posiada właściwości elicytora, natomiast nie są nimi produkty rozpadu ksylanów ściany komórkowej. Wykazano, że aktywność enzymatyczna ksylanazy nie jest konieczna do jej aktywności elicytorowej (74). Grzybowa ksylanaza prawdopodobnie zmienia funkcjonowanie błony komórkowej (76).

Pektynazy są mieszaniną enzymów m.in. poligalakturonaz, metyloesteraz, liaz kwasu poligalaktouronowego i liaz pektyn. Są one produkowane przez komórki roślinne i biorą udział w dojrzewaniu owoców, a także są wydzielane przez patogeny roślinne (np. *E. carotovora*), umożliwiając degradację roślinnej ściany komórkowej i wnikanie do jej wnętrza bakterii (65). Maceraza (Calbiochem) jest mieszaniną enzy-

mów otrzymaną z *Rhizopus* sp., zawierającą w swoim składzie różne pektynazy. Tong i in. (77) badali wpływ macerazy oraz fragmentów powstałych w wyniku trawienia ścian komórkowych na komórki gruszy. W obu przypadkach zaobserwowano wzrost poziomu syntazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego oraz indukcję syntezy etylenu. Odpowiedź była silniejsza w przypadku produktów trawienia macerazą niż pojedynczych enzymów, co sugeruje, że działa ona na komórki za pośrednictwem elicytorów uwalnianych ze ścian komórkowych (77).

Mieszanina celulaz z *T. viridae* – Cellulysin (Sigma) wywoływała, za pośrednictwem szlaku oktadekanoidowego, produkcję etylenu w liściach kukurydzy, fasoli i tytoniu (78). Celulaza powodowała gwałtowną akumulację seskwiterpenoidów, a także dwóch innych, nie zidentyfikowanych fitoaleksyn oraz produkcję acetosyringonu w kulturze zawiesinowej komórek *N. tabacum*. Dodatek elicytora silnie hamował wzrost kultury (79).

2.2.2.5. Peptydy

Zidentyfikowano 13-merowy oligopeptyd z *P. megasperma* f. sp. *glicinea* (Pep-13), będący fragmentem glikoproteiny ze ściany tego patogena o m.cz. 42-kDa (80). Pep-13 indukował zmiany przepływu jonów przez błonę, syntezę ROS, ekspresję genów związanych z patogenezą, a także akumulację fitoaleksyn w kulturze zawiesinowej *P. crispum*. Stwierdzono także, że receptorem dla Pep-13 w błonie komórkowej komórek pietruszki jest białko o m. cz. 91 kDa. Nie wykryto jego homologów na powierzchni komórek *A. thaliana*, a także w plazmolemie *Daucus carota* (80).

Fellbrich i in. (81) wyizolowali Pep-25, białko będące fragmentem białka (42 kDa), występującego w ścianie *P. sojae*. Dowiedziono że elicytor ten, w stężeniu 300 nM, indukuje alkalizację podłoża, wzrost stężenia cytozolowego Ca^{2+} oraz zmiany przepuszczalności błony komórkowej: zwiększony napływ Ca^{2+} i H^+ oraz odpływ jonów K^+ i Cl^- z komórek w kulturze zawiesinowej *P. crispum*. W kulturze protoplastów *P. crispum* elicytor powodował stymulację syntezy furanokumarynu (81).

2.2.3. Sterole

Granado i in. (25) badali proces elicytacji kultury zawiesinowej *L. esculentum* za pomocą spor patogennego grzyba *Cladosporium fulvum*. Czynnikiem odpowiedzialnym za właściwości elicytora, jak się okazało, był ergosterol – związek występujący w grzybni większości grzybów wyższych, niewytwarzany natomiast w komórkach roślinnych. Czysty ergosterol posiadał właściwości elicytora już w stężeniach subnanomolarnych. Indukował on przejściową alkalizację podłoża zależną, jak w przypadku innych elicytorów (42), od działania białkowych kinaz. Za pomocą pomiaru wzrostu pH pożywki autorzy określili także aktywność elicytorową steroli

i steroidów pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego w kulturze zawiesinowej *L. esculentum*.

System percepcji steroli jest zarówno niezwykle czuły jak i bardzo selektywny. Jedynym związkiem, który posiadał zbliżoną aktywność do ergosterolu był dehydroergosterol. Inne sterole (steroidowe hormony zwierzęce oraz sterole roślinne) nie wykazywały takich właściwości, z wyjątkiem preparatów witaminy D₂, stigmasterolu i 7-dehydrocholesterolu, które jednak do aktywności potrzebowały dawki co najmniej 100 000 razy większej niż ergosterol (25).

3. Czynniki wpływające na skuteczność elicytacji biotycznej w kulturach *in vitro*

Oprócz rodzaju elicytora, na wynik procesu elicytacji wpływ ma szereg innych czynników. Warunki hodowli, gatunek rośliny, rodzaj kultury, linia komórkowa lub stężenie elicytora decydują zarówno o rodzaju i ilości produkowanych metabolitów, żywotności komórek hodowli jak i o ilości metabolitów wtórnych uwalnianych do podłoża (82).

3.1. Rodzaj kultury

W zależności od rodzaju kultury (kalus, zawiesina komórkowa, kultury roślin, pędów i korzeni) inne są zarówno poziom organizacji komórkowej, odporność na stres, zawartość hormonów wzrostu jak i zawartość i rodzaj konstytutywnie produkowanych metabolitów wtórnych. Czynniki te w znacznym stopniu wpływają na podatność komórek na elicytację biotyczną.

Staniszewska i in. (7) stosowali autoklawowany lizat *E. sakazaki* do elicytacji zawiesiny komórkowej, kalusa i korzeni włośnikowatych *A. majus*. W przypadku kultury zawiesinowej oraz korzeni włośnikowatych zaobserwowano zwiększenie produkcji występującego w hodowli kontrolnej umbeliferonu. W kulturze kalusa jego ilość spadła poniżej poziomu wykrywalności, natomiast produkowane były znaczne ilości skopoletyny (12 mg% s.m.), której nie wykryto w zawieszynie i korzeniach włośnikowatych. Korzenie włośnikowate *A. majus* syntetyzowały pod wpływem elicytora niewielkie ilości bergaptenu (0,3 mg% s.m.), furanokumaryny niewystępującej zarówno w kulturach kontrolnych jak i w elicytowanej zawieszynie i kalusie (7).

Zaobserwowano różnice w odpowiedzi na elicytor drożdżowy między kulturą korzeni włośnikowatych a hodowlą tumorowych narośli *S. miltiorrhiza* (21). Dodatek ekstraktu z *S. cerevisiae* stymulował wzrost biomasy i indukował produkcję naftochinonów i kwasu rozmarynowego (RA) w kulturze korzeni transformowanych. Natomiast w przypadku kultur narośli tumorowych przyrost suchej masy oraz synteza RA uległy ograniczeniu po dodaniu elicytora, a poziom naftochinonów w kulturze był

wyższy niż w kontroli. Autorzy przypuszczają, że różnice w odpowiedzi na elicytor wynikają z różnej zawartości endogennych cytokinin w obu kulturach (w komórkach korzeni włośnikowatych stwierdzono dużo niższy poziom niż w hodowli tumoru) (21).

3.2. Wiek hodowli

Elicytacja przeprowadzana na różnych etapach rozwoju hodowli komórkowej, podczas których zmienia się stan fizjologiczny komórek, prowadzi do różnych odpowiedzi obronnych. Zmianie może podlegać zarówno całkowita produkcja jak i profil produkowanych metabolitów (17). W przypadku hodowli zawiesiny komórkowej wyróżniamy 4 fazy wzrostu komórek: spoczynkowego, wykładniczego, liniowego i zwolnionego. W większości przypadków, najbardziej optymalnym okresem do elicytacji, jak się okazało, był czas, w którym kultura znajdowała się w fazie wzrostu logarytmicznego, a komórki były najbardziej podatne na elicytację (83). Istnieją także doniesienia o skutecznej elicytacji w początkowej fazie stacjonarnej (17). Zhao i in. (14) badali produkcję alkaloidów indolowych w komórkach *C. roseus* w zależności od wieku kultury zawiesinowej, którą elicytowano homogenatem grzybni *U. verens*. Maksymalną zawartość produktu zanotowano w elicytowanej 7-dniowej kulturze, w tym czasie hodowla była w fazie wzrostu logarytmicznego. Także kultury zawiesinowe *Gossypium hirsutum* elicytowane preparatem grzybowym w siódmym dniu hodowli, znajdowały się w fazie logarytmicznego wzrostu i wykazywały największą produkcję fitoaleksyn w porównaniu do kultur elicytowanych w fazie spoczynkowej lub w fazie wzrostu zwolnionego (83).

Wiek elicytowanej kultury miał duże znaczenie w przypadku elicytacji korzeni włośnikowatych *A. annua* preparatem z *Colletotrichum* sp. (16). Największą zawartość artemizyny stwierdzono w kulturze elicytowanej w 23 dniu hodowli (późna faza logarytmicznego wzrostu), podczas gdy korzenie znajdujące się w innych stadiach wzrostu produkowały znacznie mniejsze jej ilości. Wiek kultury, którą traktowano elicytorem wpływał także na tempo wzrostu hodowli (16).

3.3. Regulatory wzrostu

Roślinne regulatory wzrostu mają szeroki zakres oddziaływania na fizjologię komórek w hodowli *in vitro*, zależny od stężenia i współdziałania z innymi związkami endo- i egzogennymi. Dowiedziono, że rodzaj regulatorów wzrostu dodawanych do pożywki może determinować wynik elicytacji biotycznej w danej kulturze.

Rodzaj i poziom stosowanych regulatorów wzrostu miał znaczący wpływ na metabolizm fenylopropanoidów w kulturze zawiesinowej *V. planifolia* elicytowanej chitozanem (46). W kulturze hodowanej na pożywce Murashige-Skoog (MS) z dodat-

kiem kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) poziom związków fenolowych był dużo niższy niż w hodowli kontrolnej bez dodatku auksyny. Zahamowanie produkcji mogło być częściowo odwrócone przez dodanie cytokininy (6-benzyladeniny – BA). Wówczas gdy 2,4-D został zastąpiony kwasem 3-naftylooctowym (NAA), zanotowano znaczny wzrost zawartości ekstrahowalnych fenylopropanoidów. Kultury rosnące na podłożu zawierającym cytokininy (BA lub kinetynę – KIN) produkowały znaczne ilości lignin. Najbardziej optymalnym wariantem, jak się okazało, była pożywka z dodatkiem 1,0 mg/l NAA, w której komórki produkowały duże ilości wolnych fenylopropanoidów i niewiele lignin (46). Inną zależność stwierdzono w kulturze zawieszinowej *M. piperita* elicytowanej chitozanem. Wyższą zawartość mentolu zanotowano na podłożu Linsmaier i Skoog z dodatkiem 2,0 mg/l 2,4-D, w porównaniu do pożywek zawierających 2,0 mg/l NAA lub 2,0 mg/l KIN (52).

Udowodniono, że w niektórych przypadkach prowadzenie hodowli na pożywce pozbawionej regulatorów wzrostu, może przyczynić się do znacznego wzrostu produkcji metabolitów wtórnych. Kultura komórek *Papaver bracteatum* hodowana na podłożu MS bez hormonów produkowała 7-krotnie więcej alkaloidu – sanguinaryny, niż ta sama kultura na pożywce z dodatkiem 0,1 mg/l 2,4-D i 0,5 mg/l BAP. Kiedy oba rodzaje kultur elicytowano autoklawowaną zawiesiną z *Dendryphon penicillatum*, ilość sanguinaryny produkowanej przez zawiesinę na pożywkach z hormonami lub bez, była porównywalna. Natomiast, gdy do elicytacji zawiesiny *P. bracteatum* użyto *Verticillium dahliae*, poziom sanguinaryny w kulturze hodowanej bez regulatorów wzrostu osiągnął 500-krotnie wyższy poziom od zanotowanego w hodowli z hormonami (15).

3.4. Stężenie elicytora biotycznego

Wzrostowi stężenia elicytora w kulturze towarzyszy nasilenie odpowiedzi komórkowej. Efektem jest rosnąca akumulacja metabolitów wtórnych w początkowej fazie wzrostu kultury. Związki te mogą być toksyczne dla produkujących je komórek. Ponadto uruchamiane są mechanizmy obronne, które po przekroczeniu pewnego progu stymulacji, prowadzą do reakcji nadwrażliwości i śmierci komórek (24). Brodelius i in. (45) wykazali, że wraz ze wzrostem stężenia chitozanu, którym traktowano zawiesiny komórek *E. californica* i *N. tabacum*, następowała redukcja suchej masy komórek, obniżenie aktywności PAL, a także całkowitej zawartości alkaloidów: chelerytryny i makarpiny w kulturach *E. californica*. Autorzy opisują metodę monitorowania stężenia chitozanu przez pomiar przewodnictwa pożywki, którego gwałtowny wzrost pokrywa się ze spadkiem żywotności komórek, obniżeniem aktywności PAL oraz zmniejszeniem całkowitej zawartości alkaloidów w kulturze. Autorzy sugerują, że zbyt wysokie stężenie elicytora prowadzi do całkowitej permeabilizacji błon, wycieku jonów i metabolitów komórkowych do pożywki, a w efekcie do spadku żywotności komórek. Chitozan stosowany w mniejszych stężeniach po-

wodował ponad 6-krotną stymulację aktywności PAL w komórkach *N. tabacum* oraz 3-krotny wzrost zawartości alkaloidów w kulturze *E. californica* (45).

Również wpływ złożonych elicytorów grzybowych na poziom metabolitów jest zależny od ich stężenia w kulturze. W kulturze korzeni włośnikowatych *A. annua* elicytowanych preparatem z endofitycznego grzyba *Colletotrichum* sp. wraz ze wzrostem stężenia elicytora następowało obniżenie suchej masy hodowli. Jednocześnie wzrastała zawartość artemizyny osiągając maksymalny poziom przy stężeniu elicytora wynoszącym 0,4 mg/ml. Większe ilości preparatu powodowały spadek zawartości artemizyny (16). Podobną zależność zaobserwowano w elicytowanej kulturze zawieszinowej *C. roseus*. Wraz z dodatkiem homogenatu grzybni *U. verens* w stężeniu równym 10 mg/ml zanotowano najwyższą akumulację produktu w komórkach, natomiast dodatek elicytora w ilości 20 mg/ml spowodował uwolnienie większej części alkaloidów do podłoża oraz ich maksymalną całkowitą produkcję (14).

Produkcja sanguinaryny w kulturze zawieszinowej *Papaver bracteatum* rosła wraz ze zwiększającym się stężeniem homogenatu grzybni *Dendryphion penicillatum* i osiągnęła maksimum, gdy stężenie elicytora wynosiło 1,7 mg ś.m./ml kultury. Ilości elicytora poniżej tej wartości nie powodowały znacznego spadku świeżej masy kultury, jednak efektem podania stężeń wyższych od wymienionych był spadek produkcji, brązowienie kultury oraz drastyczne zahamowanie wzrostu hodowli (15).

Preparat glikoprotein drożdżowych podany w ilości ≤ 2 g/l nie powodował redukcji wzrostu kultury zawieszinowej *E. californica*, natomiast przy stężeniu 5 g/l zanotowano zaledwie 15% spadek intensywności wzrostu. Maksymalną zawartość alkaloidów w hodowli zanotowano przy podaniu elicytora w ilości 1 g/l (24).

3.5. Czas elicytacji

Czas oddziaływania elicytora na komórki decyduje o poziomie stresu biotycznego, który z kolei determinuje odpowiedź komórkową i wynik elicytacji. Po przekroczeniu pewnego progu stymulacji (zbyt długi okres elicytacji) następuje śmierć komórek w wyniku reakcji HR.

Korzenie włośnikowate *A. annua* elicytowane preparatem z *Colletotrichum* sp. wykazywały najwyższy poziom artemizyny, gdy hodowano je w obecności elicytora przez 4 dni. Po tym czasie ilość produktu malała (16). Podobną zależność zaobserwowano w kulturze zawieszinowej *C. roseus* elicytowanej homogenatem grzybni *U. verens*. Najwyższą zawartość ajmalicyny i katarantyny zaobserwowano po 4 dniach elicytacji (14). Zawartość kwasu ursolowego i oleanolowego w kulturze zawieszinowej *Scutellaria baicalensis* osiągnęła maksimum po 40 h od podania elicytora drożdżowego. Po tym czasie poziom triterpenoidów w kulturze zaczął gwałtownie spadać (19).

Optymalny czas inkubacji zależy od rodzaju stosowanego elicytora. Kultury zawieszinowe *P. rosea* traktowano dawkami elicytorów powodującymi największą produkcję plumbaginy. Optymalny czas elicytacji wyniósł: 48 h dla chitozanu i prepara-

tu z *Aspergillus niger*, 24 h dla homogenatu z *B. subtilis* oraz 60 h dla ekstraktu drożdżowego oraz elicytorów izolowanych z *P. aeruginosa* i *Rhizopus oryzae* (17). Różnice w szybkości wywoływanych reakcji mogą być spowodowane różną dyfuzją elicytorów przez ścianę komórkową jak i szybkością aktywacji przez nie szlaków przekazywania sygnału prowadzących do syntezy metabolitów wtórnych.

4. Możliwości regulacji działania elicytorów biotycznych przez inne czynniki

4.1. Elicytacja złożona (dodatek tzw. *combined elicitors*)

W celu zwiększenia produkcji cennych metabolitów prowadzi się badania nad zastosowaniem biotycznych elicytorów w kombinacji z innymi procedurami stymulującymi metabolizm wtórny i syntezę pożądaných związków w roślinnych kulturach *in vitro*. Skuteczne okazało się łączenie elicytorów biotycznych z prekursorami, a także elicytorami abiotycznymi. Wykazano, że wymienione czynniki stosowane w różnych kombinacjach działają synergistycznie i pozwalają na uzyskanie wielokrotnie wyższego poziomu syntetyzowanych metabolitów niż, wtedy gdy stosowane są pojedynczo. Takie podejście może okazać się skuteczne także przy zwiększaniu skali produkcji (14). Zhang i in. (57) zastosowali łączoną elicytację w kulturze zawiesinowej *T. chinesis*. Dodatek 50 mg/l chitozanu, 60 μ M estru metylowego kwasu jasmonowego (MJ) i 30 μ M soli srebra spowodował ponad 40-krotny wzrost produkcji paklitakselu w porównaniu z kontrolą. Syntetyzowana ilość (25 mg/l) była większa niż w kulturach traktowanych każdym ze związków oddzielnie. Dodatkowo zwiększono produkcję paklitakselu łącząc elicytację chitozanem, JM oraz jonami Ag^+ z ekstrakcją *in situ*, otrzymując 48 mg/l tego związku (58). Kombinacja synchronizacji wzrostu kultury zawiesinowej *T. chinesis* z równoczesną elicytacją preparatem z endofitycznego grzyba *A. niger* (50g/l) oraz MJ (60 μ M) umożliwiła stabilną produkcję paklitakselu zarówno na małą skalę (stężenie produktu: 27 mg/l) jak i w bioreaktorze o objętości 10 l (24 mg/l) (84).

Zhang i Wu (85) badali wpływ abiotycznych elicytorów będących jednocześnie inhibitorami syntezy etylenu i szlaków aktywowanych przez etylen na kultury zawiesinowe *T. chinesis*, *T. chinesis* var. *mairei* i *T. yunnanensis* elicytowane ekstraktem z grzybni *A. niger* (100 mg/l). Dodatek jonów Co^{2+} (20 μ M) i Ag^+ (30 μ M) wpływał korzystnie na biomasę kultury, a także zwiększał akumulację paklitakselu o 100% w przypadku *T. yunnanensis* i o około 50% w pozostałych hodowlach (85).

Nie wszystkie kombinacje elicytorów biotycznych i abiotycznych wpływają korzystnie na produkcję danego metabolitu. Elicytacja kultur zawiesinowych *C. roseus* homogenatem z *A. niger* (20 μ g/ml) oraz bromkiem tetrametyloamonowym (100 mg/l) spowodowała znaczny wzrost produkcji ajmalicyny oraz katarantyny

w hodowli. Jednak preparat grzybowy i malonian nie wykazywał takiego synergistycznego efektu. Produkcja alkaloidów indolowych wywołana podaniem obu elicytorów była dużo słabsza, niż po traktowaniu każdym z nich oddzielnie (14).

4.2. Niskocząsteczkowe związki organiczne

Elicytacja kultur roślinnych preparatami grzybowymi prowadzi do inicjacji odpowiedzi nadwrażliwości i gwałtownej redukcji biomasy kultury w wyniku nekrotycznej śmierci komórek. Eliminacja tego negatywnego zjawiska jest niezbędna do zastosowania biotycznej elicytacji w stymulacji produkcji metabolitów wtórnych w hodowlach na dużą skalę. Zmniejszenie dawki elicytora redukuje spowolnienie wzrostu, ale powoduje także obniżenie produkcji pożądaných metabolitów wtórnych. Rozwiązaniem może być kontrola procesów przekazywania sygnału elicytacji w komórkach i „kierowanie” odpowiedzi w kierunku syntezy pożądaných metabolitów.

Zaobserwowano, że pewne związki o niewielkiej masie cząsteczkowej (np. szczawian, cytrynian, kwas salicylowy) wpływają na indukcję syntezy metabolitów wtórnych w obecności niewielkich dawek elicytora. Szczawian i salicylan mają zdolność do aktywacji SAR w roślinach, natomiast cytrynian hamuje działanie elicytora (83). Szczawian (0,2-2 mM) dodany wraz z preparatem z grzybowego patogena *V. dahliae* (0,66 µg/ml hodowli) do kultury zawiesinowej *G. hirsutum* stymulował syntezę fitoaleksyn (hemigospolu i pochodnych) powodując 6-krotny wzrost ich produkcji względem kontroli. Ponadto niwelował on negatywny wpływ elicytora na tempo wzrostu hodowli, a także obniżał dawkę preparatu z *V. dahliae* niezbędną do efektywnej elicytacji (83). Sam szczawiooocetan nie posiadał zdolności do indukcji syntezy metabolitów, podobnie jak elicytor, który podany oddzielnie w takim samym (niskim) stężeniu, nie powodował stymulacji produkcji fitoaleksyn. Aby osiągnąć optymalny rezultat, dodatek szczawiooocetanu musiał nastąpić w przeciągu 30 minut od podania preparatu grzybowego, co może świadczyć o tym, że związek ten, działa przez modyfikację oddziaływania elicytora ze ścianą komórkową (83). Działanie hamujące na proces uwalniania aktywnych rodników tlenowych okazało się niezależne od rodzaju aplikowanego elicytora i obserwowano je zarówno w kulturach elicytowanych harpiną z *E. amylovora*, oligogalaktouronidami jak i elicytorem z *Verticillium* sp., natomiast stopień inhibicji był różny w zależności od elicytora. Słabsze zahamowanie syntezy ROS w kulturze elicytowanej harpiną może świadczyć o istnieniu drugiej drogi transmisji sygnału, na którą szczawian nie ma wpływu (86).

Wydaje się, że zastosowanie szczawiooocetanu i innych substancji hamujących wywołowaną przez elicytację biotyczną reakcję HR (niekorzystną, z punktu widzenia produkcji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*), a aktywujących dodatkowo szlaki syntezy metabolitów wtórnych, może okazać się korzystnym rozwiązaniem umożliwiającym zwiększenie produkcji tych substancji na dużą skalę.

4.3. Kokultury

Jedną ze stosunkowo nowych metod wykorzystywanych do podniesienia wydajności produkcji metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* są hodowle kokultur dwóch rodzajów tkanek roślinnych (pochodzących z tego samego gatunku jak również należących do różnych gatunków, a nawet rodzajów) w jednym naczyniu hodowlanym. Zakładając, że komórki jednego gatunku roślin produkują związki będące prekursorami metabolitów wytworzonych przez komórki drugiego gatunku, prowadzi się kokultury w celu uzyskania wysokiego poziomu pożądanego produktu. Przykładem zastosowania takiego systemu jest hodowla korzeni włośnikowatych *A. majus* (*Umbelliferae*) uzyskanych w wyniku transformacji bakterią *Agrobacterium rhizogenes* oraz pędów *Ruta graveolens* (*Rutaceae*) w jednym naczyniu hodowlanym w celu uzyskania farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych z grupy furanokumaryny (87). Założono, że produkowane w tkankach *A. majus* kumaryny (umbeliferon), będą wykorzystane przez tkanki *R. graveolens* jako substrat do syntezy furanokumaryny: psolarenu, bergaptenu i ksantotoksyny. W wymienionym systemie wykazano, że w warunkach kokultury akumulacja metabolitów wtórnych z grupy furanokumaryny w tkankach *R. graveolens* jest wyższa niż w przypadku pędów tego gatunku pochodzących z monokultur (akumulacja bergaptenu wzrosła około półtorakrotnie, a ksantotoksyny trzykrotnie) (87).

5. Podsumowanie

Roślinne metabolity wtórne znajdują ciągle nowe zastosowania w wielu dziedzinach życia człowieka i aby sprostać ciągle rosnącemu zapotrzebowaniu na te substancje, istotne jest opracowanie technologii pozwalających na ich produkcję w kulturach roślinnych *in vitro*. Jedną z możliwości podnoszenia wydajności syntezy metabolitów wtórnych jest zastosowanie elicytorów biotycznych. Metoda biotycznej elicytacji okazała się niezwykle skuteczna w stymulacji produkcji metabolitów wtórnych w kulturach wielu gatunków roślin. Z przeglądu literatury oraz wyników badań własnych wynika, że elicytory biotyczne wykazują zróżnicowaną aktywność w stosunku do tkanek roślinnych. Ponadto efekt działania elicytorów może być wspomagany bądź osłabiany przez inne czynniki takie jak: faza wzrostu i wiek kultury oraz rodzaj i stężenie stosowanych związków abiotycznych.

Prowadzone obecnie intensywne badania nad mechanizmami molekularnymi warunkującymi działanie elicytorów powinny w dalszej perspektywie zaowocować opracowaniem ulepszonych procedur elicytacji. Celem tych badań jest identyfikacja bardziej skutecznych, uniwersalnych, najprostszych i najtańszych elicytorów metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*.

Praca finansowana z projektu KBN 092/P05/2003 i KBN 0430/P04/2004/26.

Autorzy dziękują prof. Ewie Łojkowskiej za cenne uwagi w trakcie przygotowywania manuskryptu.

Literatura

1. Theis N., Lerdau M., (2003), *Int. J. Plant Sci.*, 164, 93-102.
2. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., (2001), *Plant Sci.*, 161, 839-851.
3. Verpoorte R., van der Heijden R., ten Hoopen H. J. G., Memelink J., (1999), *Biotechnol. Lett.*, 21, 467-479.
4. Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T., (2003), *Biotechnol. Prog.*, 18, 282-289.
5. Pitta-Alvarez S. I., Spollansky T. C., Giulietti A. M., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 252-258.
6. Dörnenburg H., Knorr D., (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 674-684.
7. Staniszevska I., Króllicka A., Maliński E., Łojkowska E., Szafranek J., (2003), *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 565-568.
8. Jankiewicz L. S., Sobiczewski P., (1997), *Fitoaleksyny i inne substancje związane z odpornością roślin przeciwko patogenom*, w: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, t. 1, red. Jankiewicz L. S., Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 251-273.
9. Benhamou N., (1996), *Trends Plant Sci.*, 1, 233-240.
10. Sharan M., Taguchi G., Gonda K., Jouke T., Shimosaka M., Hayashida N., Okazaki M., (1998), *Plant Sci.*, 132, 13-19.
11. Moreno P. R. H., Poulsen C., van der Heijden R., Verpoorte R., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 99-107.
12. Bais H. P., Govindaswamy S., Ravishankar G. A., (2000), *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 648-653.
13. Rojas R., Alba J., Magaña-Plaza I., Cruz F., Ramos-Valdivia A. C., (1999), *Biotechnol. Lett.*, 21, 907-911.
14. Zhao J., Zhu W. H., Hu Q., (2001), *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 666-672.
15. Cline S. D., Coscia C. J., (1988), *Plant. Physiol.*, 86, 161-165.
16. Wang J. W., Zhang Z., Tan R. X., (2001), *Biotechnol. Lett.*, 23, 857-860.
17. Komaraiah P., Amrutha R. N., Kavi Kishor P. B., Rhamakrishna S. V., (2002), *Enzyme Microb. Technol.*, 31, 634-639.
18. Bais H. P., Walker T. S., Schweizer H., Vivanco J. M., (2002), *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 983-995.
19. Yoon H. J., Kim H. K., Ma C. J., Huh H., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 1071-1075.
20. Menke F. L. H., Parchmann S., Mueller M. J., Kijne J. W., Memelink J., (1999), *Plant Physiol.*, 119, 1289-1296.
21. Chen H., Chen F., Chiu FCK, Lo CMY, (2001), *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 100-105.
22. Hahn M. G., Albersheim P., (1978), *Plant Physiol.*, 62, 107-111.
23. Yamaguchi T., Yamada A., Hong N., Ogawa T., Ishii T., Shibuya N., (2000b), *Plant Cell*, 12, 817-826.
24. Roos W., Evers S., Hieke M., Tschöpe M., Schumann B., (1998), *Plant Physiol.*, 118, 349-364.
25. Granado J., Felix G., Boller T., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 485-490.
26. Jung H. Y., Kanga S. M., Kanga Y. M., Kanga M. J., Yun D. J., Bahk J. D., Yang J. K., Choi M. S., (2003), *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 987-990.
27. Króllicka A., Łojkowska E., (2000), *Biotechnologia*, 4, 112-117.
28. Felix G., Duran J. D., Volko S., Boller T., (1999), *Plant J.*, 18, 265-276.
29. Aguilar-Uscanga B., François J. M., (2003), *Let. Applied Microbiol.*, 37, 268-274.
30. Klarzyński O., Plesse B., Joubert J. M., Yvin J. C., Kopp M., Kloereg B., Fritig B., (2000), *Plant Physiol.*, 124, 1027-1037.
31. John M., Röhrig H., Schmidt J., Walden R., Schell J., (1997), *Trends Plant Sci.*, 2, 111-115.
32. Baureithel K., Felix G., Boller T., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 17931-17938.
33. Spaink H. P., Sheeley D. M., van Brussel A. A. N., Glushka J., York W. S., Tak T., Geiger O., Kennedy E. P., Reinhold V. N., Lugtenberg B. J. J., (1991), *Nature*, 354, 125-130.
34. van der Holst P. P. G., Schlaman H. R. M., Spaink H. P., (2001), *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11, 608-616.

35. Vander P., Vårum K. M., Domard A., El Gueddari N. E., Moerschbacher B. M., (1998), *Plant Physiol.*, 118, 1353-1359.
36. Felix G., Regenass M., Boller T., (1993), *Plant J.*, 4, 307-316.
37. Kikuyama M., Kuchitsu K., Shibuya N., (1997), *Plant Cell Physiol.*, 38, 902-909.
38. Ebel J., (1998), *Bioessays*, 20, 569-576.
39. Yamaguchi T., Ito Y., Shibuya N., (2000a), *Trends Glycosci. Glycotech.*, 12, 113-120.
40. Day R. B., Okada M., Ito Y., Tsukada, Zaghouni H., Shibuya N., Stacey G., (2001), *Plant Physiol.*, 126, 1162-1173.
41. Ito Y., Kaku H., Shibuya N., (1997), *Plant J.*, 12, 347-356.
42. Felix G., Baureithel K., Boller T., (1998), *Plant Physiol.*, 117, 643-650.
43. Muranaka T., Miyata M., Ito K., Tachibana S., (1998), *Phytochem.*, 49, 491-496.
44. Chenite A., Buschmann M., Wang D., Chaput C., Kandani N., (2001), *Carbohydr. Polym.*, 46, 39-47.
45. Brodelius P., Funk C., Häner A., Villegas M., (1989), *Phytochemistry*, 28, 2651-2654.
46. Funk C., Brodelius P., (1990), *Phytochemistry*, 29, 845-848.
47. Vasconsuelo A., Giuletti A. M., Picotto G., Rodriguez-Talou J., Boland R., (2003), *Plant Sci.*, 165, 429-436.
48. Hadwiger L. A., Beckman J. M., (1980), *Plant Physiol.*, 66, 205-211.
49. Dörnenburg H., Knorr D., (1994), *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1048-1052.
50. Vasconsuelo A., Giuletti A. M., Boland R., (2004), *Plant Sci.*, 166, 405-413.
51. Barber M. S., Ride J. P., (1988), *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 32, 185-197.
52. Chang J. H., Shin J. H., Chung I. S., Lee H. J., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 1097-1099.
53. Kim J. H., Shin J. H., Lee H. J., Chung I. S., Lee H. J., (1997), *J. Ferment Bioeng.*, 83, 206-208.
54. Sevón N., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K. M., (1992), *Pharmac. Pharmacol. Lett.*, 2, 96-99.
55. Palazón J., Cusidó R. M., Bonfill M., Mallol A., Moyano E., Morales C., Piñol M. T., (2003), *Plant Physiol. Biochem.*, 41, 1019-1025.
56. Furmanowa M., Olędzka H., Sykłowska-Baranek K., Józefowicz J., Gieracka S., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 1449-1452.
57. Zhang C. H., Mei X. G., Liu L., Yu L. J., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 1561-1564.
58. Zhang C. H., Xu H. B., (2001), *Biotechnol. Lett.*, 23, 189-193.
59. Sharp J. K., McNeil M., Albersheim P., (1984a), *J. Biol. Chem.*, 259, 11321-11336.
60. Sharp J. K., Valent B., Albersheim P., (1984b), *J. Biol. Chem.*, 259, 11312-11320.
61. Umemoto N., Kakitani M., Iwamatsu A., Yoshikawa M., Yamaoka N., Ishida I., (1997), *PNAS*, 94, 1029-1034.
62. Mueller M., Brodschelm J. W., Spannagl E., Zenk M. H., (1993), *PNAS*, 90, 7490-7494.
63. Kobayashi A., Tai A., Kanzaki H., Kawazu K., (1993), *Z Naturforsch.*, 48, 575-579.
64. Królicka A., Staniszewska I., Malinski E., Szafranek J., Łojkowska E., (2003), *Pharmazie*, 58, 590-592.
65. Dumville J. C., Fry S. C., (2000), *Plant Physiol. Biochem.*, 38, 125-140.
66. Hueck C. J., (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 379-433.
67. Lee J., Klessig D. F., Nürnberger T., (2001), *Plant Cell*, 13, 1079-1093.
68. Baker C. J., Orlandi E. W., Mock N. M., (1993), *Plant Physiol.*, 102, 1341-1344.
69. van der Luit A. H., Piatti T., van Doorn A., Musgrave A., Felix G., Boller T., Munnik T., (2000), *Plant Physiol.*, 123, 1507-1515.
70. Bourque S., Ponchet M., Binet M. N., Ricci P., Pugin A., Lebrun-Garcia A., (1998), *Plant Physiol.*, 118, 1317-1326.
71. Rustérucci C., Stallaert V., Milat M. L., Pugin A., Ricci P., Blein J. P., (1996), *Plant Physiol.*, 111, 885-891.
72. Chong J., Baltz R., Fritig B., Saindrenan P., (1999), *FEBS Lett.*, 458, 204-208.
73. Dorey S., Kopp M., Geoffroy P., Fritig B., Kauffmann S., (1999), *Plant Physiol.*, 21, 163-172.
74. Enkerli J., Felix G., Boller T., (1999), *Plant Physiol.*, 121, 391-397.
75. Kulkarni N., Shendye A., Ramachandra Rao M., (1999), *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 411-456.
76. Bailey B. A., Korcak R. F., Anderson J. D., (1992), *Plant Physiol.*, 100, 749-755.
77. Tong C. B., Labavitch J. M., Yang S. F., (1986), *Plant Physiol.*, 81, 929-930.

78. Piel J., Atzorn R., Gäbler R., Kühnemann F., Boland W., (1997), *FEBS Lett.*, 416, 143-148.
79. Threlfall D. R., Whitehead I. M., (1988), *Phytochemistry*, 27, 2567-2580.
80. Nürnberger T., Nennstiel D., Hahlbrock K., Scheel D., (1995), *PNAS*, 92, 2338-2342.
81. Fellbrich G., Blume B., Brunner F., Hirt H., Kroj T., Ligterink W., Romanski A., Nürnberger T., (2000), *Plant Cell Physiol.*, 41, 692-701.
82. Bhagwath S. G., Hjortsø M. A., (2000), *J Biotechnol.*, 80, 159-167.
83. Davis D. A., Tsao D., Seo J. H., Emery A., Low P. S., Heinstejn P., (1992), *Phytochemistry*, 31, 1603-1607.
84. Yu L. J., Lan W. Z., Qin W. M., Xu H. B., (2002), *Process Biochem.*, 38, 207-210.
85. Zhang C. H., Wu J. Y., (2003), *Enzyme Microb. Technol.*, 32, 71-77.
86. Cessna S.,G., Sears V. E., Dickman M. B., Low P. S., (2000), *Plant Cell*, 12, 2191-2200.
87. Sidwa-Gorycka M., Królicka A., Kozyra M., Głowniak K., Bourgaud F., Łojkowska E., (2003), *Plant Sci.*, 165, 1315-1319.