BADANIA NAD KULTURAMI *IN VITRO* WYBRANYCH GATUNKÓW ROŚLIN Z RODZAJU *RUTA* W DWÓCH TYPACH BIOREAKTORÓW: PLANTFORM® I RITA®

SZEWCZYK AGNIESZKA[1], CHOJNACKA ALEKSANDRA[1], ZYCH DOMINIKA[2], EKIERT HALINA[1]

[1]KATEDRA I ZAKŁAD BOTANIKI FARMACEUTYCZNEJ UJ CM, UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW, E-MAIL agnieszka.szewczyk@uj.edu.pl
[2]STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE PRZY KATEDRZE BOTANIKI FARMACEUTYCZNEJ UJ CM, UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW



WSTĘP

Roślinne kultury *in vitro* są alternatywą dla tradycyjnych upraw. Ponieważ wymagają specjalistycznego laboratorium i dużych nakładów finansowych, wykorzystuje się je głównie w celu mikrorozmnażania. Kultury *in vitro* są również wykorzystywane do pozyskiwania cennych pod względem farmakologicznym metabolitów wtórnych. Wyższą produkcję metabolitów wtórnych obserwuje się w kulturach o wyższym stopniu zróżnicowania (np. w kulturach pędów). Prowadzenie takiego rodzaju kultur na większą skalę było wcześniej bardzo trudne. Ostatnio pojawiła się nowa metoda prowadzenia kultur *in vitro* w bioreaktorach okresowo-zalewowych typu Plantform® i Rita®. Pozwalają one na uzyskanie większej ilości biomasy, na skalę półprzemysłową. W niniejszej pracy przetestowano dwa typy bioreaktorów do prowadzenia kultur wybranych gatunków ruty: *Ruta chalepensis, R. corsica, R. graveolens, R. macrophylla* oraz *R. montana.*

METODYKA

KULTURY *IN VITRO*

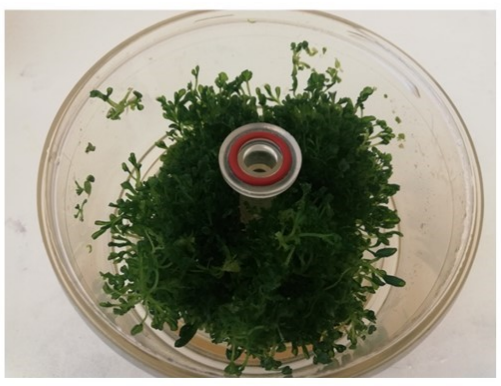
- Hodowle prowadzono w bioreaktorach typu Plantform® i Rita® na podłożu wg Linsmaier-Skoog (LS).
- Zastosowane roślinne regulatory wzrostu i rozwoju: auksyna NAA i cytokinina BAP w następujących stężeniach: 1/1, 0,5/1, 0,5/0,5, 0,1/0,1, 0,1/0,5 mg/L
- Czas zalewania podłożem (2 i 5 minut)
- Okres prowadzenia kultur: 4-7 tygodni

ANALIZY HPLC

Analizę ekstraktów metanolowych z suchej biomasy prowadzono na aparacie Merck Hitachi (detektor DAD L-2455, kolumna Purospher RP-18e, długość fali: λ= 254 nm) w systemie gradientowym (A - MeOH ; B - MeOH: O,5 % kwas octowy1:4): 100 % B 0 - 20 min; 100 – 80 % B 20 - 35 min; 80 – 60 % B 35 – 55 min; 60 – 0 % B 55 – 70 min; 0 % B 70 - 75 min; 0 - 100 % B 75 – 80 min; 100 % B 80 - 90 min

PRZYKŁADOWE KULTURY BIOREAKTOROWE





Bioreaktory typu RITA®

Kultury *Ruta chalepensis* (LS NAA/BAP 0,1/0,1 mg/l, 5 tydzień hodowli, okres zalewania podłożem 5 minut).





Bioreaktory typu Plantform®

Kultury *Ruta chalepensis* (LS NAA/BAP 0,5/0,5 mg/l, 5 tydzień hodowli, okres zalewania podłożem 5 minut

WYNIKI

- Największy przyrost biomasy w kultur *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach typu Plantform® stwierdzono odpowiednio dla:
- *Ruta chalepensis*: hodowla 7 tygodniowa, prowadzona na podłożu LS 0,5/1 NAA/BAP mg/l, w której czas zalewania wynosił 5 minut (**12,4 krotny przyrost**),
  - *Ruta graveolens*: hodowla 5 tygodniowa, prowadzona na podłożu LS 0,1/0,5 NAA/BAP mg/l, w której czas zalewania wynosił 5 minut (**10,1 krotny przyrost**),
  - *Ruta macrophylla*: hodowla 5 tygodniowa, prowadzona na podłożu LS 0,5/1 NAA/BAP mg/l, w której czas zalewania wynosił 5 minut (**13,2 krotny przyrost**),
  - *Ruta montana*: hodowla 6 tygodniowa, prowadzona na podłożu LS 1/1 NAA/BAP mg/l, w której czas zalewania wynosił 5 minut (**16,1 krotny przyrost**).
- Największy przyrost biomasy kultur *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach typu Rita® stwierdzono odpowiednio dla:
- *Ruta chalepensis*: hodowla 4 tygodniowa, prowadzona na podłożu LS 0,5/1 NAA/BAP mg/l, w której czas zalewania wynosił 5 minu (**13,2 krotny przyrost**),
- *Ruta corsica*: hodowla 5 tygodniowa, prowadzona na podłożu LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l, w której czas zalewania wynosił 5 minut (**8,6 krotny przyrost**),
- *Ruta graveolens*: hodowla 6 tygodnioowa, prowadzona na /odłożu LS 0,1/0,5 NAA/BAP mg/l, w której czas zalewania wynosił 5 minut (**23,5 krotny przyrost**),
- *Ruta macrophylla*: hodowla 5 tygodniowa, prowadzona na podłożu LS 1/1 NAA/BAP mg/l, w której czas zalewania wynosił 5 minut (**11,4 krotny przyrost**),
- *Ruta montana*: hodowla 5 tygodniowa, prowadzona na podłożu LS NAA/BAP 0,5/1 mg/l, w której czas zalewania wynosił 5 minut (**38,6 krotny przyrost**).
- We wszystkich ekstraktach metanolowych z suchej biomasy uzyskanej z kultur *in vitro* ruty stwierdzono obecność następujących związków: katechiny, psoralenu, ksantotoksyny, izopimpineliny, bergaptenu, γ-fagaryny, izoimperatoryny, ostolu, γ-fagaryny oraz 7-izopentyloksy-γ-fagaryny.
- Dominującymi związkami we wszystkich badanych kulturach ruty były kumaryny, a wśród nich ksantotoksyna i psoralen.
- Maksymalna zawartość ksantotoksyny wynosiła:
  - dla kultur *Ruta chalepensis* - 579,04 mg/100 g s.m. (podłoże LS 1/1 NAA/BAP mg/l, 6 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®),
  - dla kultur *Ruta corsica* - 429,33 mg/100 g s.m. (podłoże LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l, 4 tydzień, 5 minut, bioreaktor Rita®),
  - dla kultur *Ruta graveolens* - 635,95 mg/100 g s.m. (podłoże LS 0,5/1 NAA/BAP mg/l, 6 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®),
  - dla kultur *Ruta macrophylla* - 596,92 mg/100 g s.m. (podłoże LS 1/1 NAA/BAP mg/l, 6 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®),
  - dla kultur *Ruta montana* - 744,68 mg/100 g s.m. (podłoże LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l, 5 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®).

  Maksymalna zawartość psoralenu wynosiła:

  - dla kultur *Ruta chalepensis* - 537,3 mg/100 g s.m. (podłoże LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l, 6 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform ®),
  - dla kultur *Ruta corsica* - 360,28 mg/100 g s.m. (podłoże LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l, 4tydzień, 5 minut, bioreaktor Rita®),
  - dla kultur *Ruta graveolens* - 346,25 mg/100 g s.m. (podłoże LS 0,5/0,1 NAA/BAP mg/l, 5 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®),
  - dla kultur *Ruta macrophylla* - 356,9 mg/100 g s.m. (podłoże LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l, 5 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®),
  - dla kultur *Ruta Montana* - 310,79 mg/100 g s.m. (podłoże LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l, 5 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®).
- Wysoką zawartość katechiny stwierdzono we wszystkich badanych kulturach. Najwyższą zawartość - 2325,72 mg/100 g s.m. oznaczono w kulturach *Ruta montana* prowadzonych na podłożu LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l (5 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®).
- Wśród alkaloidów wyższą zawartością charakteryzowała się γ-fagaryna. Najwyższą zawartość - 295,75 mg 100 g s.m. oznaczono w kulturach *Ruta graveolens* prowadzonych na podłożu LS 0,5/1 NAA/BAP mg/l (5 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®).

WNIOSKI

1. Kultury bioreaktorowe *R. chalepensis*, *R. corsica, R. graveolens, R. macrophylla* oraz *R. montana* akumulują wysokie ilości metabolitów wtórnych z grup katechin i kumaryn.
2. Dominującą grupą metabolitów wtórnych we wszystkich badanych kulturach były kumaryny, wśród których związkiem akumulowanym w największej ilości była ksantotoksyna.
3. Kolejnym metabolitem akumulowanym w dużej ilości była katechina.
4. Kultury bioreaktorowe badanych gatunków ruty, a w szczególności *R. chalepensis, R. graveolens i R. montana* można zaproponować jako biotechnologiczne źródło kumaryn, zwłaszcza ksantotoksyny oraz psoralenu. Maksymalną zawartość ksantotoksyny - 579,04 mg/100 g s.m. oznaczono dla kultur *Ruta chalepensis* prowadzonych na podłożu LS 1/1 NAA/BAP mg/l (6 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®), natomiast maksymalną zawartość psoralenu - 537,3 mg/100 g s.m. stwierdzono dla kultur *Ruta chalepensis* prowadzonych na podłożu LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l (6 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform ®).
5. *R. montana* można zaproponować jako biotechnologiczne źródło katechin, zwłaszcza katechiny. Maksymalną zawartość – 2325,72 mg/100 g. s.m. stwierdzono w kulturach *Ruta montana* prowadzonych na podłożu LS 0,1/0,1 NAA/BAP mg/l (5 tydzień, 5 minut, bioreaktor Plantform®).