



Wpływ egzogenego związku fenolowego – kwasu kawowego na organogenezę *Galanthus elwesii* Hook. w kulturach *in vitro*

Anna Bach¹, Bożena Pawłowska, Katarzyna Hura²

¹Katedra Roślin Ozdobnych, Uniwersytet Rolniczy, Kraków

²Katedra Fizjologii Roślin, Uniwersytet Rolniczy, Kraków

The effect of the exogenous phenolic compound, caffeic acid on organogenesis of *Galanthus elwesii* Hook. cultured *in vitro*

Summary

Caffeic acid is a simple phenolic compound, a phenylpropene derivative with two –OH groups, which inhibits IAA oxidase and, therefore, is considered to be an auxin cofactor. The aim of the present experiments was to determine the effect of exogenous caffeic acid (100-500 mg dm⁻³ in medium) on the organogenesis in giant snowdrop (*Galanthus elwesii*) in *in vitro* cultures. Exogenous caffeic acid at the supra optimal concentration (500 mg dm⁻³) inhibited shoots, leaves and roots formation, as well as reduced bulbs fresh mass and caused the explants browning. The lower dose of caffeic acid inhibited the rhizogenesis process. The analysis of the content of phenolic compounds in tissues and organs of giant snowdrop showed that exogenous caffeic acid reduced total content of endogenous phenolic compounds in regenerants.

Key words:

Galanthus elwesii, organogenesis, *in vitro*, phenolic compounds, caffeic acid.

Adres do korespondencji

Anna Bach,
Katedra Roślin
Ozdobnych,
Uniwersytet Rolniczy,
al. 29 Listopada 54,
31-425 Kraków.

biotechnologia

2 (89) 139–145 2010

1. Wstęp

Związki fenolowe należą do produktów wtórnych, o często nie wyjaśnionej funkcji w roślinach. Kwas kawowy jest prostym związkiem fenolowym o dwóch grupach –OH, pochodnym fenylpropanu, który inhibituje działanie oksydazy IAA i dlatego zali-

czany jest do kofaktorów auksyn. Jednocześnie stymuluje działanie oksydazy cytokininowej (1-3).

Pośród kilkunastu gatunków śnieżyczek (przebiśniegów), śnieżyczka Elwesa (*Galanthus elwesii* Hook.), pochodząca z południowo-wschodniej Europy, posiada najbardziej okazałe kwiaty i należy do najcenniejszych wiosennych roślin cebulowych. Ponadto może być wykorzystywana w przemyśle farmakologicznym, ponieważ zawiera cenne czynniki alkaloidalne: galantaminę, likorynę i niwalinę. Wegetatywny sposób rozmnażania śnieżyczek z cebul przybyszowych jest powolny, a rozmnażane z nasion nie powtarzają cech roślin matecznych. Na temat mikrorozmnażania śnieżyczek oraz działania egzogennych związków fenolowych w warunkach *in vitro* istnieją w literaturze tylko nieliczne dane (4-6).

W przeprowadzonych doświadczeniach badano wpływ egzogenego kwasu kawowego w pożywkach na organogenezę śnieżyczki Elwesa rozmnażanej techniką *in vitro*.

2. Materiały i metody

Eksplanty cebulowe, uzyskane z roślin rozmnażanych przez pąki przybyszowe, wykładano na pożywki Murashige i Skooga (7) zawierające 3% sacharozy, regulatory wzrostu BA i IAA (0,1-1,0 μM) w różnych kombinacjach oraz kwas kawowy w stężeniu 0, 100, 500 mg dm^{-3} . Kultury trzymano w ciemności w temperaturze 23/25°C. Co 4 tygodnie dokonywano pasażu materiału roślinnego na świeże pożywki (7 pasaży – 28 tygodni kultury).

Po zakończeniu doświadczenia zregenerowany na testowanych pożywkach materiał roślinny poddano analizie chemicznej na zawartość związków fenolowych w tkankach. Uzyskane cebule były dzielone na piętke oraz łuski: zewnętrzną i wewnętrzną. Zawartość związków fenolowych określono także w otrzymanych *in vitro* liściach, pąkach przybyszowych oraz w kalusie. Kontrolę stanowiły fragmenty roślin rosnących w gruncie (liście, piętka, łuski cebulowe). W celu przeprowadzenia analizy zawartości związków fenolowych 250 mg tkanki roślinnej homogenizowano w 3 cm^3 80% etanolu, a otrzymany ekstrakt wirowano przy $3000 \times \text{g}$ przez 20 minut. Otrzymany supernatant dodawano do roztworu pomiarowego zawierającego 25% Na_2CO_3 i odczynnik Folin-Ciocalteu i mierzono absorbancję przy długości fali 760 nm (8). Całkowitą zawartość fenoli obliczono z krzywej kalibracyjnej sporządzonej na bazie roztworów kwasu chlorogenowego i przeliczano na zawartość fenoli w świeżej masie tkanki ($\mu\text{g/g}$ świeżej masy).

Wszystkie uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Zastosowano metodę statystyczną kombinowaną w układzie niezależnym dwuczynnikowym, z uwzględnieniem poziomu istotności $\alpha = 0,05$, a przy porządkowaniu danych korzystano z testu Duncana.

3. Wyniki i ich omówienie

Wyłożone na pożywki eksplanty (cebule) regenerowały, formując pąki, cebule i korzenie przybyszowe, a także liście oraz kalus. Tkanka kalusowa o szarej barwie i drobnoziarnistej strukturze występowała u podstawy eksplantów na pożywkach zawierających proporcjonalnie więcej auksyny niż cytokininy i dodatek 100 mg dm⁻³ kwasu kawowego.

Obserwacje procesu regeneracji śnieżyczek wykazały, że jego przebieg zależał od stężenia kwasu kawowego oraz od proporcji zawartości auksyn i cytokin w pożywce (tab. 1). Analizując proces organogenezy zachodzący na pożywkach kontrolnych, bez dodatku kwasu kawowego, zaobserwowano, że więcej korzeni przybyszowych i liści formowało się na podłożu zawierającym 1 μM IAA i 0,1 μM BA, w porównaniu do pożywki z odwrotną proporcją tych regulatorów wzrostu. Uzyskane wyniki potwierdzają rezultaty badań Tilly – Mandy i in. (6) nad wpływem substancji wzrostowych na regenerację śnieżyczek *in vitro*. Natomiast liczba uformowanych na tych pożywkach cebul przybyszowych pozostawała na podobnym poziomie. Przy czym cebule uformowane na pożywce kontrolnej z przewagą cytokininy nad auksyną (1 μM BA i 0,1 μM IAA) były większe w porównaniu do cebul powstałych na pożywce z niewielką zawartością BA (tab. 1).

Tabela 1

Wpływ egzogenego kwasu kawowego na regenerację śnieżyczki Elwesa

Pożywka	[%] regenerujących	Liczba organów przybyszowych/1 regenerujący eksplant			Masa eksplantu [mg]
		cebule	korzenie	liście	
Cytokininina > Auksyna					
1 μM BA + 0,1 μM IAA					
kontrola – bez kwasu kawowego	96,0 g*	2,3 d	0,4 ab	1,1 d	400 f
100 mg dm ⁻³ kwasu kawowego	78,8 de	1,4 bc	0,4 ab	0,7 c	200 cd
500 mg dm ⁻³ kwasu kawowego	79,4 de	1,9 cd	0,3 ab	0,7 c	200 cd
Auksyna > Cytokininina					
1 μM IAA + 0,1 μM BA					
kontrola – bez kwasu kawowego	98,8 g	2,1 d	1,3 c	1,3 e	300 e
100 mg dm ⁻³ kwasu kawowego	85,7 ef	2,2 d	0,5 ab	0,7 c	200 cd
500 mg dm ⁻³ kwasu kawowego	48,5 a	0,7 a	0,3 ab	0,4 b	80 a

*Średnie w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą istotnie, przy $\alpha = 0,05$.

Dodatek kwasu kawowego do pożywek, niezależnie od użytego stężenia, powodował obniżenie zdolności regeneracji śnieżyczki Elwesa. Egzogeny kwas kawowy

podany w stężeniu ponad optymalnym (500 mg dm^{-3}) hamował regenerację cebul, liści i korzeni przez istotne obniżenie liczby formujących się organów i ich brunatnienie. Ograniczał także przyrost świeżej masy cebul (tab. 1). Ponadto powodował obniżenie procentu regenerujących eksplantów o ponad 50% na pożywkach zawierających więcej auksyny niż cytokininy w porównaniu do pożywki kontrolnej. Na pożywce zawierającej odwrotne do wymienionych proporcje substancji wzrostowych, to jest $BA > IAA$, procent śnieżyczek regenerujących pod wpływem dodatku kwasu kawowego ($100\text{-}500 \text{ mg dm}^{-3}$) był podobny i nie zależał od jego stężenia. Prawdopodobnie, stosunkowo wysoka zawartość egzogennej cytokininy w pożywce niwelowała stymulujące właściwości kwasu kawowego w stosunku do oksydazy cytokininowej i działała ochronnie na różnicujące się tkanki. Ten wynik znalazł potwierdzenie w badaniach Wang i Letham (1), którzy wykazali, że dodatek egzogennej cytokininy znosił stymulujące działanie kwasu kawowego w odniesieniu do procesu ryzogenezu u *jojoby* (*Simmondsia* sp.), wywoływane przez inhibicję oksydazy IAA.

W prezentowanym obecnie doświadczeniu niższa dawka kwasu kawowego w pożywce (100 mg dm^{-3}) inhibitowała proces wydłużania korzeni przybyszowych u śnieżyczek (dane nie zamieszczone) i powodowała brunatnienie ich nasady oraz formowanie tkanki kalusowej. Przypuszczalnie, zastosowana ilość kwasu kawowego była zbyt wysoka dla wywołania prawidłowego ukorzenia u tej rośliny i stymulowała formowanie tylko kalusa. Wykazano bowiem, że działanie kwasu kawowego jako kofaktora auksyn w procesie ukorzenia zależy od gatunku rośliny i sposobu zastosowania. Tak też, w kulturach *in vitro* oliwek kwas kawowy był nieaktywny pod tym względem w przeciwieństwie do kwasu chlorogenowego. Natomiast działał podobnie do IAA, gdy był stosowany wraz z kwasem chinowym i dopiero wówczas jego efekt był zbliżony do wymienionego kwasu chlorogenowego (4).

W dostępnej literaturze naukowej jest niewiele danych dotyczących zawartości endogennych związków fenolowych u roślin cebulowych i zazwyczaj odnoszą się one do cebul konsumpcyjnych z rodzaju *Allium* (9,10). Analizując zawartość związków fenolowych w tkankach i organach śnieżyczki Elwesa stwierdzono, że ich ilość była zróżnicowana i zależała od stadium rozwojowego i warunków reprodukcji (tab. 2 i 3).

Tabela 2

Zawartość związków fenolowych u śnieżyczki Elwesa *in situ*

Pochodzenie, rodzaj organów	Zawartość związków fenolowych ($\mu\text{g/g}$ św.m.)
piętka cebuli – pąk	1723 c
łuski wewnętrzne	180 a
łuski zewnętrzne	110 a
liść	460 b

Tabela 3

Zawartość związków fenolowych w wybranych organach i tkankach śnieżyczki Elwesa *in vitro*

Pochodzenie, rodzaj organów i tkanek	Zawartość związków fenolowych ($\mu\text{g/g}$ św.m.)
liście <i>in vitro</i>	180 e
Cytokinina > Auksyna – kontrola – bez kwasu kawowego	
luski wewnętrzne	120 b
luski zewnętrzne	90 c
Cytokinina > Auksyna + 100 mg dm⁻³ kwasu kawowego	
luski zewnętrzne	30 a
Cytokinina > Auksyna + 500 mg dm⁻³ kwasu kawowego	
luski wewnętrzne	70 bc
pąki przybyszowe-piętka cebuli	150 de
Auksyna > Cytokinina – kontrola – bez kwasu kawowego	
luski wewnętrzne	130 d
luski zewnętrzne	150 de
Auksyna > Cytokinina + 100 mg dm⁻³ kwasu kawowego	
luski wewnętrzne	50 abc
luski zewnętrzne	80 c
szary kalus	70 bc
Auksyna > Cytokinina + 500 mg dm⁻³ kwasu kawowego	
luski wewnętrzne	40 ab

Najwyższą zawartość związków fenolowych stwierdzono w kontrolnej cebuli pochodzącej z uprawy polowej: w piętkce i pąkach na niej osadzonych (1723 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy) i liściach (460 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy) (tab. 2). Natomiast pozostałe składowe cebuli śnieżyczek z uprawy polowej mają istotnie niższy poziom fenoli. Jest to zgodne z badaniami Afzalpurkar i Lakshminarayana (11), którzy stwierdzili zmienny poziom związków fenolowych (kwasu chlorogenowego, kawowego oraz chinowego) w zależności od fazy dojrzałości nasion słonecznika. W naszych wcześniejszych pracach nad kulturami płynnymi śnieżyczek z 2003 i 2009 r. (12,13), stwierdzono wyższą zawartość związków fenolowych w pąkach i w merystemach, czyli w organach i tkance charakteryzujących się dużą aktywnością podziałów komórkowych, w porównaniu do nieaktywnych tkanek. Podobne wyniki uzyskali Zobel i Brown (14), którzy wykazali, że zawartość związków fenolowych w liściach *Heracleum lanatum* zależy od ich stadium morfologicznego. Zazwyczaj w młodych, mięsistych liściach poziom związków fenolowych jest wyższy niż w liściach starszych. Także w tkankach *Ranunculus asiaticus* charakteryzujących się wysoką aktywnością mitotyczną stwierdzono wysoki poziom fenoli (15).

Natomiast w badaniach nad zawartością związków fenolowych w suchych łuskach okrywających u cebul różnych, dzikich gatunków *Allium* (10) wykazano bardzo wysoki poziom tych związków w łuskach zewnętrznych, zwłaszcza barwy czerwonej i żółtej. Cebule o białej łusce zewnętrznej zawierały śladowe ilości związków fenolowych. U *Galanthus elwesii* w warunkach *in vitro* suche łuski nie formują się, a *in situ* mają barwę białą (12,13).

Na procesy biosyntezy związków fenolowych korzystnie wpływa światło, dlatego części nadziemne różnych gatunków roślin zwykle zawierają ich więcej niż części podziemne, z wyjątkiem cebuli jadalnej i innych warzyw cebulowych z rodzaju *Allium* (2). Tak jak udowodniono w przeprowadzonym doświadczeniu śnieżyczki nie są tu wyjątkiem. W liściach śnieżyczek *in situ* było około czterokrotnie mniej związków fenolowych niż w piętce cebuli, ale 2-3-krotnie więcej w porównaniu do łusek cebulowych. Nie stwierdzono różnic pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną łuską cebuli. Podobny wynik zanotowano dla liści powstałych w warunkach *in vitro* (tab. 3).

Oceniając zawartość związków fenolowych w zregenerowanych w warunkach *in vitro* śnieżyczkach stwierdzono, że zależała ona od warunków środowiska (tab. 2 i 3). Na podstawie testu Duncana dla prób niezależnych określono, że liście pochodzące z cebuli rosnącej w warunkach *in vitro* mają istotnie mniejszą zawartość fenoli niż liście roślin rosnących w warunkach *in situ*. Podobnie cebule uformowane *in vitro*, które reprodukowano na pożywkach kontrolnych zawierających 1 μM BA i 0,1 μM IAA charakteryzowały się względnie wysoką, choć niższą niż u cebul z gruntu zawartością związków fenolowych, kumulowanych w mięsistych łuskach wewnętrznych i w pąku (150 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy). Zazwyczaj w kulturach *in vitro* natężenia światła jest znacznie niższe niż w uprawach polowych i dlatego zawartość ogółem związków fenolowych w tkankach śnieżyczek uzyskanych w kulturach *in vitro* była niższa niż u roślin w uprawie polowej. Analogiczne rezultaty, wykazujące wyższą zawartość związków fenolowych w uprawach polowych niektórych warzyw cebulowych, uprawianych na zbiór pęczkowy (szczypior, łądoga rzekoma) uzyskały Mysiak i Tendaj (9), co tłumaczyły korzystnym wpływem większej ilości światła na procesy biosyntezy flawonoli w uprawie polowej, w porównaniu do upraw szklarniowych.

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano ponadto, że egzogeny kwas kawowy stosowany w dawce 100-500 mg dm^{-3} działał hamująco na ogólną zawartość endogennych związków fenolowych w regenerantach śnieżyczek pochodzących z kultur *in vitro*, niezależnie od poziomu cytokininy lub auksyny w pożywce (tab. 4). Powodował istotne zmniejszenie zawartości związków fenolowych zarówno w łuskach zewnętrznych jak i wewnętrznych (tab. 3). Wyjaśnienie tego faktu może opierać się na znanym działaniu kwasu kawowego, który stymuluje aktywność oksydazy cytokininowej, co może inhibować proces regeneracji, a w konsekwencji prowadzić do obniżenia poziomu endogennych związków fenolowych. Przemawiają za tym cytowane już wyniki badań Wang i Letham (1), którzy stwierdzili, że aktywność oksydazy cytokininowej w soku tytoniu wzrastała dwukrotnie pod wpływem egzogenego kwasu kawowego.

Tabela 4

Wpływ pożywki na zawartość związków fenolowych w tkankach regenerantów

Pożywka	Zawartość związków fenolowych ($\mu\text{g/g}$ św.m.)
Cytokininina > Auksyna (1 μM BA + 0,1 μM IAA)	
+ 0 mg dm^{-3} kwasu kawowego	180 c
+ 100 mg dm^{-3} kwasu kawowego	30 a
+ 500 mg dm^{-3} kwasu kawowego	100 b
Auksyna > Cytokininina (1 μM IAA + 0,1 μM BA)	
+ 0 mg dm^{-3} kwasu kawowego	140 b
+ 100 mg dm^{-3} kwasu kawowego	70 a
+ 500 mg dm^{-3} kwasu kawowego	60 a

W podsumowaniu wyników doświadczeń przeprowadzonych nad wpływem egzogenego kwasu kawowego na proces regeneracji śnieżyczek stwierdza się różny poziom stężenia endogennych związków fenolowych w zależności od aktywności merystatycznej oraz warunków reprodukcji *in vitro* tkanek i organów śnieżyczki Elwesa. Przeprowadzone badania dostarczyły także nowych danych na istnienie zależności między działaniem substancji wzrostowych, auksyn i cytokinin (IAA, BA) i egzogenym związkiem fenolowym, kwasem kawowym w procesie organogenezy *in vitro*.

Literatura

1. Wang J., Letham D. S., (1995), *Plant Science*, 112, 161-166.
2. Horbowicz M., (2000), *Postępy Nauk Rolniczych*, 2, 3-18.
3. Bors W., Michel C., Stettmaier K., Lu Y., Foo L. Y., (2004), *Biological Research*, 37, 301-311.
4. Lavee S., Harshemesh H., Avidan N., (1985), *Acta Horticulturae*, 179, 317-328.
5. Tipirdamaz R., Ellialtioglu S., Cakirlar H., (2000), *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23, 823-839.
6. Tilly-Mandy A., Jambor-Benczur E., Szabo J., (2006), *Acta Horticulturae*, 725, 439-444.
7. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
8. Singelton V. S., Rossi J. A. Jr., (1965), *Amer. Journal Enol. Viticul.*, 16, 144-157.
9. Horbowicz M., Kotlińska T., (1998), *Zeszyty Problemowe Postępu Nauk Rolniczych*, 463, 529-537.
10. Mysiak B., Tendaj M., (2008), *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 7(4), 57-62.
11. Afzalpurkar A. B., Lakshminarayana G., (1981), *J. Agric. Food Chem.*, 29, 203-204.
12. Bach A., Warchoł M., Pawłowska B., (2003), *Folia Horticulturae. Supplement*, 2, 19-21.
13. Bach A., Pawłowska B., Hura K., (2009), *Zeszyty Problemowe Postępu Nauk Rolniczych*, 534, 13-21.
14. Zobel A. M., Brown S. A., (1990), *J. Chem. Ecol.*, 16, 1623-1634.
15. Beruto M., Curir P., Debergh P., (1996), *In Vitro Cell Dev Biol.- Plant*, 32, 154-160.