

Otrzymywanie oraz dynamika wzrostu tkanki kalusowej rozwaru wielkokwiatowego – *Platycodon grandiflorum* Jacq. A. DC**

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Grzegorz Szychalski

OBTAINING OF PLATYCODON GRANDIFLORUM JACQ. A. DC CALLUS TISSUE AND ITS GROWTH DYNAMIC

SUMMARY

Balloon flower (*Platycodon grandiflorum* Jacq. A. DC) is a perennial plant (Campanulaceae family) originated from North-East Asia, traditionally used in bronchitis, asthma and cough. The roots of plant contain triterpenoids saponins – main active compounds with wide spectrum of pharmacology activities: expectorant, anti-inflammatory, hepatoprotective, anti-hyperlipidemic, cholesterol-lowering, and anticancer too. Studies on *Platycodon grandiflorum* in vitro cultures were limited so far to hairy root cultures, biotransformation and micropropagation protocols. The aim of the study was to obtain and determine growth parameters of callus tissue. Callus cultures were initiated from explants derived from sterile seedlings on solidified MS and LS medium supplemented with 2,4-D, NAA, BA and adenine chloride. Callus tissue obtained from root explants (line K) and cultured on MS medium with BA (2.0 mg/l), NAA (2.0 mg/l) and adenine chloride (1.0 mg/l) was chosen as material for growth experiments. Measurement of growth parameters (fresh and dried weight, content of dry weight and growth index) was performed in duplicate for 24 and 27 passages. Results indicated an intense growth of callus up to the 15th day of culture, after which time tissue was growing slowly. The differences in increase of biomass between passages were noted. Callus (passage 24) was able to increase biomass (fresh weight) up to 7-fold, while passage 27 – 2-fold only. The results showed that callus tissue is characterized by good growth parameters and can provide adequate source of material for suspension culture and further research.

KEY WORDS: BALLOON FLOWER – CALLUS TISSUE – FRESH AND DRY WEIGHT – GROWTH INDEX

Wstęp

Rozwar wielkokwiatowy (*Platycodon grandiflorum* Jacq. A. DC) to bylina z rodziny Dzwonkowatych (Campanulaceae) pochodząca z północno-wschodniej Azji. Korzenie tego gatunku stosowane są w tradycyjnej medycynie chińskiej w chorobach górnych dróg

oddechowych i kaszlu. Głównymi związkami czynnymi surowca (*Platycodi radix*) są saponiny triterpenowe: kwas polygalowy, platykodigenina, platykodyna A, C, D i Z (1-3). Ponadto w surowcu tym występują także poliacyetyleny, inulina, witaminy z grupy B i śladowe ilości alkaloidów. Rozwar wielkokwiatowy stanowi cenne źródło saponin o działaniu wykrztuśnym (4). Przypisuje się im również działanie przeciwzapalne (5-7), hepatochronne (8), obniżające stężenie triacylogliceroli i cholesterolu we krwi (9), a także przeciwnowotworowe (10).

Piśmiennictwo dotyczące badań tego gatunku w hodowlach *in vitro* jest skąpe, a większość prac publikowana jest w języku chińskim lub koreańskim. Dotychczasowe publikacje wskazują, że prowadzone badania ograniczały się do mikrorozmnażania (11), hodowli kalusa w bioreaktorze i biokonwersji związków taksanowych do nowych taksanoidów (12) oraz otrzymywania korzeni transformowanych (13-14).

Cel pracy

Celem prowadzonych badań było otrzymanie tkanki kalusowej oraz określenie jej podstawowych parametrów wzrostu.

Materiał i metody

Hodowle kalusowe zainicjowano z eksplantatów pobranych ze sterylnych siewek. Nasiona pochodziły z wyselekcjonowanych roślin o białych kwiatach, wyhodowanych w Ogrodzie Roślin Leczniczych Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich. Nasiona sterylizowano wg schematu: 70% etanol w czasie 2 min, ACE® zawierający 5% podchloryn sodu z dodatkiem kilku kropel Tweenu 20 (Sigma) w czasie 20 min. Nasiona płukano pięciokrotnie w sterylnej wodzie podwójnie destylowanej i wykładano na szalki

**Badania finansowano w ramach grantu MNiSW, nr N 405 219 539.

Petrieego z wilgotną bibułą. Nasiona kiełkowały na świetle w ciągu 1-2 tygodni. Uzyskane siewki w wieku 2-3 tygodni cięto na eksplantaty. Korzenie, liścienie, hypokotyle lub epikotyle o wielkości około 0,5-1,0 cm wykładano na podłoża MS lub LS (wg Murashige-Skoog'a lub Linsmayera-Skoog'a) (15) z dodatkiem regulatorów wzrostu: kwasu dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), kwasu naftylooctowego (NAA), 6-benzyloaminopuryny (BA) lub chlorku adeniny. Regulatory wzrostu zastosowano w stężeniach: 1,0-2,0 mg/l (2,4-D), 2,0 mg/l (NAA i BA), i 1,0 mg/l (chlorek adeniny). Doświadczenia prowadzono na świetle (ok. $150 \text{ E} \cdot \mu\text{Mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) z zastosowaniem zmiennego oświetlenia (16 godzin naświetlenia i 8 godzin ciemności) lub w ciemności w temperaturze $23(\pm 2)^\circ\text{C}$. Otrzymane hodowle kalusowe pasażowano na świeżej pożywki co 3-4 tygodnie.

Dla kalusa otrzymanego z eksplantatów korzeniowych (linia K) przeprowadzono badanie dynamiki wzrostu. Pomiary dokonywano w odstępach 5-dniowych przez okres 20 dni, określając masę świeżą i suchą tkanki, zawartość suchej masy, przyrost świeżej i suchej masy oraz współczynnik przyrostu masy suchej. Współczynnik przyrostu masy obliczono wg następującego wzoru:

$$\text{Współczynnik przyrostu masy} = \frac{\text{przyrost masy}}{\text{masa początkowa}};$$

gdzie:

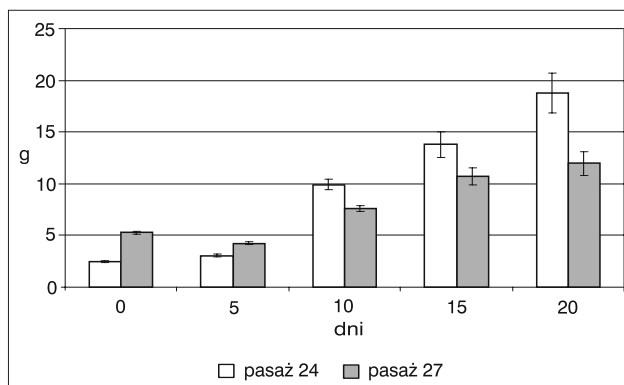
masa początkowa oznacza masę tkanki w tygodniu 0 (w dniu pasażu).

Pomiary i suszenie kalusa przeprowadzono na wagoszarkach (HR-73 Mettler Toledo) w temperaturze 105°C . Wielkość próby wynosiła 10 hodowli (szalek). Badania wykonano w dwóch powtórzeniach dla pasażu 24 i 27.

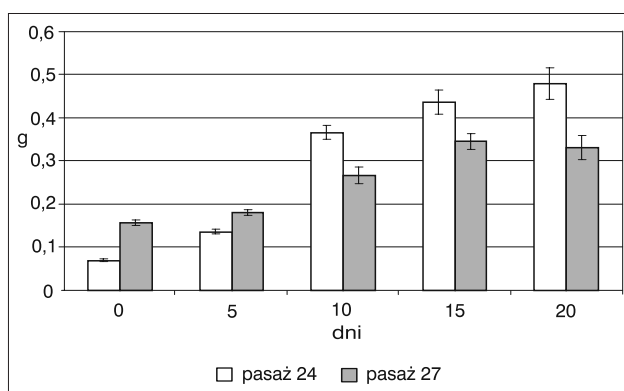
Wyniki

Otrzymano 18 linii kalusa rozwaru wielkokwiatowego z eksplantatów korzeniowych, liścieni i epikotyli. Z linii kalusów pierwotnych wybrano jedną linię pochodzącą z korzenia siewki (linia K) do badań dynamiki wzrostu (ryc. 1-3, tab. 1). Tkanka linii K hodowana była na podłożu wg Murashige-Skoog'a z dodatkiem BA (2 mg/l), NAA (2 mg/l) i chlorku adeniny (1 mg/l).

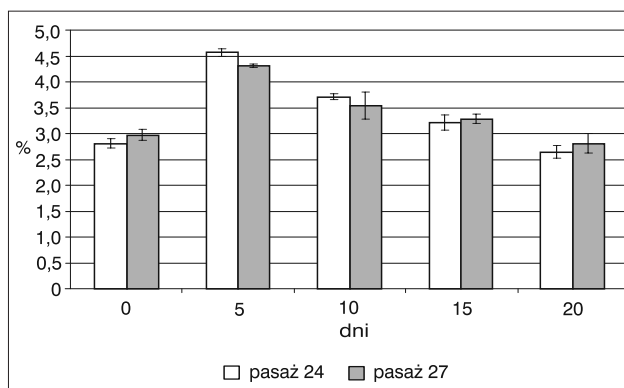
Badania dynamiki wzrostu tkanki kalusowej wskazują na intensywny przyrost świeżej i suchej masy tkanki do 15 dnia hodowli; po tym terminie tkanka rosła wolniej. Największy przyrost suchej i świeżej



Ryc. 1. Zmiany masy świeżej kalusa (linii K) rozwaru wielkokwiatowego w trakcie określania dynamiki wzrostu. Doświadczenie wykonano dla pasażu 24 i 27.



Ryc. 2. Zmiany masy suchej kalusa (linii K) rozwaru wielkokwiatowego w trakcie określania dynamiki wzrostu. Doświadczenie wykonano dla pasażu 24 i 27.



Ryc. 3. Zmiany procentowej zawartości masy suchej kalusa (linii K) rozwaru wielkokwiatowego w trakcie określania dynamiki wzrostu. Doświadczenie wykonano dla pasażu 24 i 27.

masy odnotowano między 5 a 10 dniem hodowli (tab. 1). Około 5 dnia cyklu odnotowano największą procentową zawartość masy suchej – powyżej 4%. Od tego dnia zawartość masy suchej systematycznie spadała do 2,8 i 2,3%. Maksymalną wartość masy świeżej tkanka kalusowa osiągała około 20 dnia dla

Tabela 1. Przyrost masy suchej i współczynnik przyrostu masy suchej kalusa (linia K) rozwaru wielkokwiatowego w ciągu 20 dni.

Hodowla (dni)	Przyrost masy suchej [g]		Współczynnik przyrostu masy suchej [g]	
	24 pasaż	27 pasaż	24 pasaż	27 pasaż
5	0,0666	0,0242	0,96	0,15
10	0,2969	0,11	4,28	0,70
15	0,3672	0,1887	5,29	1,20
20	0,4099	0,1742	5,91	1,11

obu pasaży. W przypadku masy suchej, maksimum dla pasażu 27 przypadało około 15 dnia, a dla pasażu 24 – 20 dnia hodowli. Wartości maksymalne masy suchej, jak i świeżej dla obu pasaży (24 i 27), różniły się i wynosiły odpowiednio 18,75 i 11,98 g dla masy świeżej i 0,48 g i 0,35 g dla masy suchej.

Stwierdzono, że w trakcie doświadczenia tkanka kalusowa (pasaż 24) zwiększyła swoją masę suchą niemal siedmiokrotnie, a masę świeżą ponad 7 razy (tab. 1 i 2). Pasaż 27 charakteryzował się dużo mniejszym przyrostem – odnotowano tylko dwukrotny przyrost masy świeżej i suchej w ostatnim dniu doświadczenia.

Tabela 2. Wielokrotność przyrostu masy świeżej i suchej kalusa rozwaru wielkokwiatowego w ciągu 20 dni.

Hodowla (dni)	Wielokrotność przyrostu			
	masy świeżej		masy suchej	
	24 pasaż	27 pasaż	24 pasaż	27 pasaż
5	1,23	0,8	1,96	1,15
10	4,0	1,43	5,28	1,7
15	5,56	2,02	6,29	2,2
20	7,56	2,27	6,91	2,12

Dyskusja

Pomimo różnic wartości masy suchej i świeżej oraz współczynników przyrostu masy między pasażami, dynamika wzrostu tkanki kalusowej jest podobna. W fazie początkowej wzrostu (między 0 a 5 dniem) komórki przygotowują się do podziałów, następuje intensywne produkcja białek, w tym enzymów niezbędnych do podziałów komórkowych, stąd najwyż-

szą procentową zawartość masy suchej. Następną fazą wzrostu – ekspotencjalna, trwa od 5 do około 15 dnia, gdzie komórki intensywnie się dzielą i rosną. Po 15 dniach następuje spowolnienie tempa podziałów komórkowych i wzrostu. Tkanka kalusowa przechodzi w stacjonarną fazę wzrostu między 15 a 20 dniem. Osiąga wtedy maksymalne wartości masy świeżej i suchej. Kolejny etap to powolne starzenie się i obumieranie tkanek.

Dynamika wzrostu kalusa rozwaru wielkokwiatowego odzwierciedla typową krzywą wzrostu charakterystyczną dla wielu hodowli kalusowych. Stwierdzone różnice w osiągniętych wartościach przyrostu biomasy między pasażami mogą wynikać z różnicy w aktywności rozwoju pasażowanej tkanki (wraz ze wzrostem liczby pasaży aktywność rozwoju tkanki maleje) oraz początkowego *inokulum*. Zbyt duże *inokulum*, może przyczyniać się do szybszego starzenia się tkanki, ze względu na ograniczoną (niewystarczającą) przestrzeń naczynia hodowlanego i wyczerpujące się zasoby podłoża.

Wnioski

1. Przeprowadzone pomiary dynamiki wzrostu wykazały, że pożywka wg Murashige-Skoog'a z dodatkiem BA (2 mg/l), NAA (2 mg/l) i chlorku adeniny (1 mg/l) jest odpowiednią pożywką do wzrostu tkanki kalusowej rozwaru wielkokwiatowego.
2. Właściwym terminem pasażowania kalusa jest przełom trzeciego i czwartego tygodnia hodowli, kiedy kalus osiąga stacjonarną fazę wzrostu.
3. Tkanka kalusowa linii K charakteryzuje się dobrymi parametrami wzrostu i może stanowić źródło odpowiedniego materiału tkankowego do założenia hodowli suspensyjnej i prowadzenia dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Ishii H, Tori K, Toyzo T i wsp. Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 2. Isolation and structure of new triterpene glycosides. J Chem Soc 1984; 1:661-8.
2. Nikaido T, Koike K, Mitsunaga K i wsp. Two new triterpenoid saponins from *Platycodon grandiflorum*. Chem Pharm Bull 1999; 47:903-4.
3. Ha YW, Na Y, Seo J i wsp. Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in *Platycodi radix* by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. J Chromatogr A 2006; 1135:27-35.
4. Shin CY, Lee WJ, Lee EB i wsp. Platycodin D and D₃ increase airway mucin release *in vivo* and *in vitro* in rats and hamsters. Planta Med 2002; 68(3):221-5.
5. Kim YP, Lee EB, Kim SY i wsp. Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. Planta Med 2001; 67:362-4.
6. Ahn KS, Noh EJ, Zhao HL i wsp. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor-κB activation in RAW 264.7 cells. Life Sci 2005; 76(20):2315-2328.
7. Kim HG, Hien TT, Han EH i wsp. Molecular mechanism of endothelial nitric-oxide synthase activation by *Platycodon grandiflorum* root-derived saponins. Toxicol Lett 2010; 195:106-13.
8. Khanom T, Choi JH, Hwang YP i wsp. Saponins isolated from the root of *Platycodon*

grandiflorum protect against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 2009; 47:530-35. **9.** Kim KS, Azeki O, Ikemoto S i wsp. Effects of *Platycodon grandiflorum* feeding on serum and liver lipid concentrations in rats with diet-induced hyperlipidemia. *J Nutr Sci Vitaminol* 1995; 41:485-491. **10.** Kim JY, Park KW, Moon KD i wsp. Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by crude saponin from *Platycodi radix*. *Food Chem Toxicol* 2008; 48(12):3753-8. **11.** Kim SW, Liu JR. Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo cultures of balloon flower. *Plant Cell Tiss Org* 1999; 58:227-30. **12.** Dai JG,

Guo HZ, Ye M i wsp. Biotransformation of 4(20),11-taxadienes by cell suspension cultures of *Platycodon grandiflorum*. *J Asian Nat Prod Res* 2003; 5(1):5-10. **13.** Ahn JC, Hwang B, Tada H i wsp. Polyacetylenes in hairy roots of *Platycodon grandiflorum*. *Phytochem* 1996; 42:69-72. **14.** Park NI, Tuan PA, Li X i wsp. An efficient protocol for genetic transformation of *Platycodon grandiflorum* with *Agrobacterium rhizogenes*. *Mol Biol Rep* 2011; 38:2307-13. **15.** Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962; 15:473-97.

otrzymano/received: 03.01.2014
zaakceptowano/accepted: 14.01.2014

Adres/address:
*dr Mariola Dreger
Zakład Biotechnologii
Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
ul. Wojska Polskiego 71b, 60-630 Poznań
tel.: +48 (61) 845-58-19
e-mail: mariola.dreger@iwnirz.pl