

Wpływ temperatury na biosyntezę alkaloidów Amaryllidaceae w kulturach in vitro *Leucojum aestivum* L.



Agata Ptak¹, Marzena Warchoń², Emilia Morańska³, Alicja Błażejczak¹,
Dominique Laurain-Mattar⁴, François Dupire⁵, Rosella Spina⁴, Magdalena Simlat¹

¹Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

²Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN w Krakowie

³Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

⁴Université de Lorraine, INRAE, LAE, F-54000 Nancy, France

⁵Université de Lorraine, CNRS, L2CM, F-54000 Nancy, France

WSTĘP

Śnieżyca letnia (*Leucojum aestivum* L.) jest ważną rośliną leczniczą ze względu na obecność alkaloidów Amaryllidaceae, m.in. galantaminy i likoryny (Ryc. 1, 2). Galantamina wykorzystywana jest w leczeniu choroby Alzheimera. Natomiast likoryna objęta jest badaniami klinicznymi pod kątem zwalczania nowotworów. Istnieją dwa podstawowe źródła galantaminy: synteza chemiczna oraz ekstrakcja z materiału roślinnego. Jednak ze względu na wysokie koszty produkcji i pozyskiwania galantaminy, poszukuje się nowych sposobów otrzymywania tego alkaloidu. Alternatywą mogą być metody biotechnologiczne z wykorzystaniem kultur in vitro. Intensywność biosyntezy metabolitów wtórnych w warunkach in vitro, a w efekcie ich akumulacja, może być regulowana przez elicytory abiotyczne, np. temperaturę.

CEL PRACY

Celem badań jest określenie wpływu temperatury na biosyntezę galantaminy i likoryny w kulturach *Leucojum aestivum*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny:

rośliny *Leucojum aestivum* otrzymane na drodze somatycznej embriogenezy (Ryc. 3).

Warunki prowadzenia kultur:

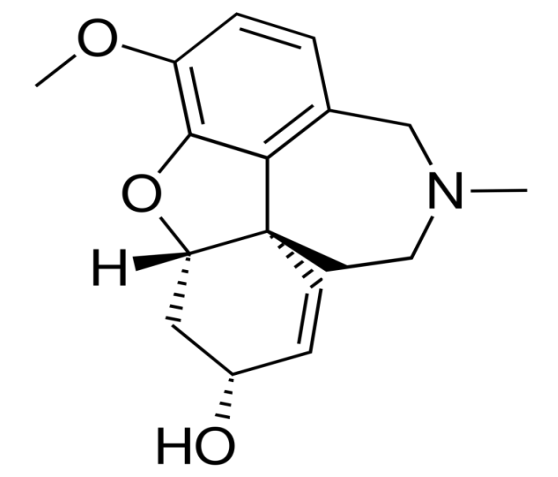
- skład pożywki: makro- i mikroelementy wg Murashige i Skoog'a (1962), zeatyna (5 μ M) (Ptak i in. 2019)
- warunki fizyczne kultury: pożywka stała, światło fluorescencyjne białe, 60 μ mol m⁻² s⁻¹, 16-godzinny fotoperiod, wilgotność 70%, **temperatura: 15, 20, 25 i 30 °C**
- czas trwania kultury: 4 tygodnie

Analizy fitochemiczne:

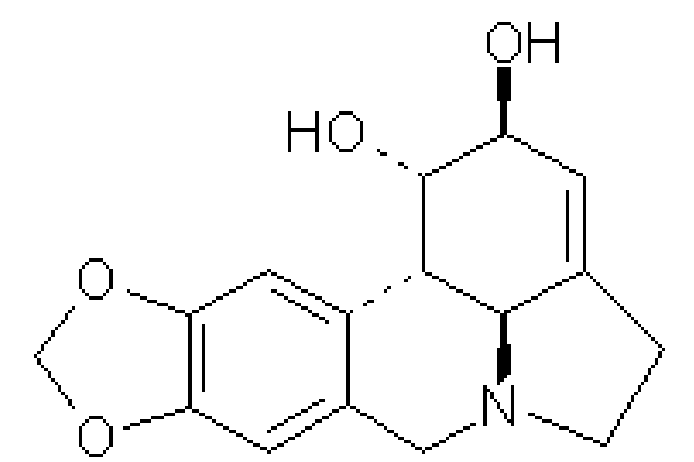
ocena zawartości galantaminy i likoryny w materiale roślinnym przy użyciu LC-MS (Saliba i in. 2016)

Analizy molekularne:

analizy real-time PCR dla wybranych genów zaangażowanych w szlak biosyntezy alkaloidów Amaryllidaceae



Ryc. 1. Galantamina



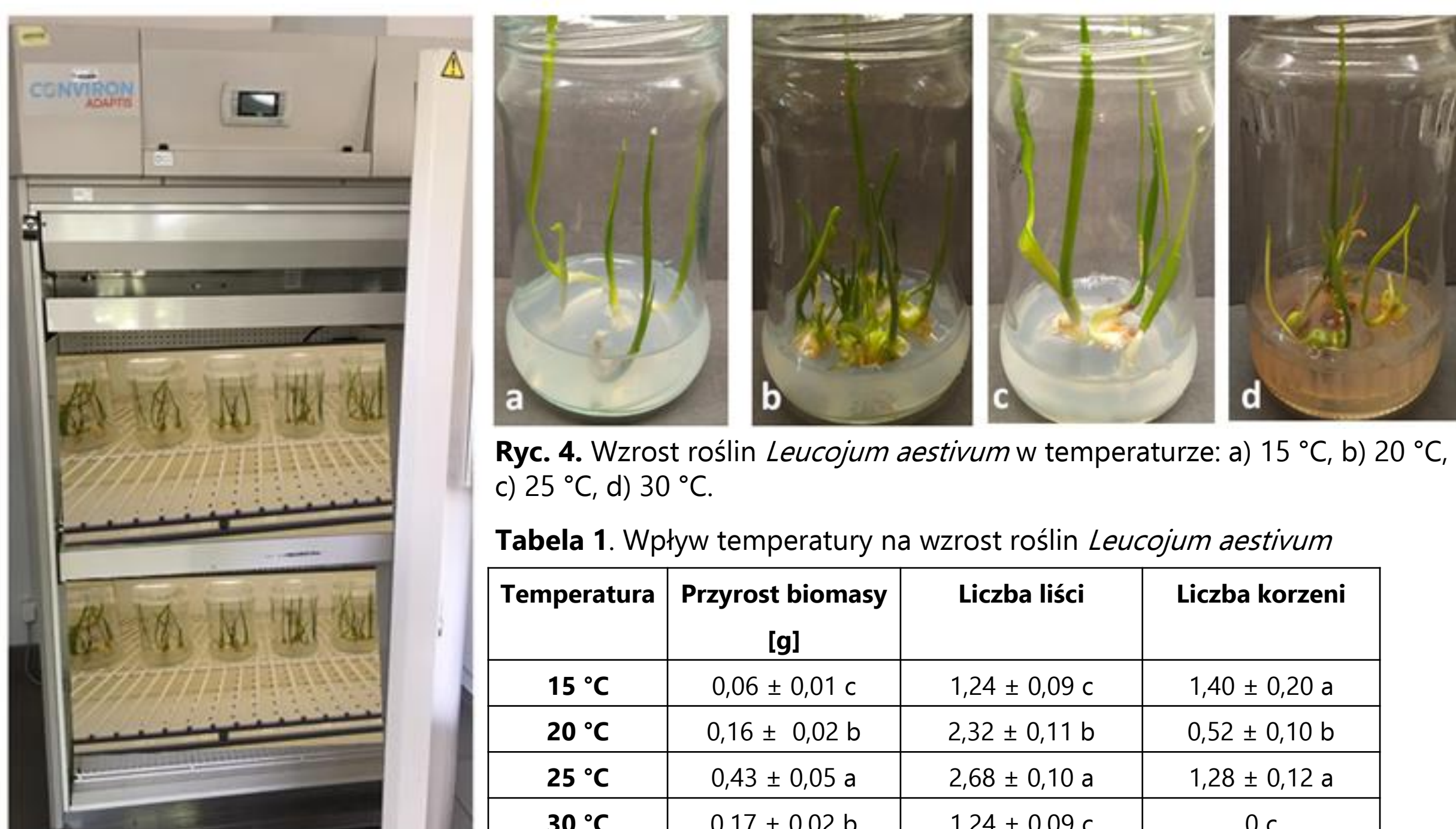
Ryc. 2. Likoryna



Ryc. 3. Materiał wyjściowy – rośliny *Leucojum aestivum*

WYNIKI

Przeprowadzone badania wykazały, iż wzrost i rozwój roślin *Leucojum aestivum* w warunkach in vitro uzależniony jest od temperatury. Temperatura 25 °C działa pozytywnie na przyrost biomasy, liczbę uformowanych liści oraz korzeni (Ryc. 4, Tabela 1).



Ryc. 4. Wzrost roślin *Leucojum aestivum* w temperaturze: a) 15 °C, b) 20 °C, c) 25 °C, d) 30 °C.

Tabela 1. Wpływ temperatury na wzrost roślin *Leucojum aestivum*

Temperatura	Przyrost biomasy [g]	Liczba liści	Liczba korzeni
15 °C	0,06 ± 0,01 c	1,24 ± 0,09 c	1,40 ± 0,20 a
20 °C	0,16 ± 0,02 b	2,32 ± 0,11 b	0,52 ± 0,10 b
25 °C	0,43 ± 0,05 a	2,68 ± 0,10 a	1,28 ± 0,12 a
30 °C	0,17 ± 0,02 b	1,24 ± 0,09 c	0 c

a-c – grupy jednorodnie według testu Duncana, p<0,05

Analizy ekspresji wykazały, iż najoptymalniejsza dla biosyntezy galantaminy i likoryny temperatura 30 °C miała istotny wpływ na zwiększenie akumulacji transkryptów genu *CYP96T1* oraz genu *N4OMT*. Z kolei optymalna tylko dla biosyntezy likoryny temperatura 15 °C zwiększała akumulację transkryptów genu *CYP96T1*, choć prawdopodobnie był to inny wariant niż w przypadku temperatury 30 °C (Ryc. 5).

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Ptak A., Simlat M., Morańska E., Skrzypek E., Warchoń M., Tarakemeh A., Laurain-Mattar D. 2019. Exogenous melatonin stimulated Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis in in vitro cultures of *Leucojum aestivum* L. *Industrial Crops and Products* 138, 111458.

Saliba S., Ptak A., Boisbrun M., Spina R., Dupire F., Laurain-Mattar D. 2016. Stimulating effect of both 4'-O-methylnorbelladine feeding and temporary immersion conditions on galanthamine and lycorine production by *Leucojum aestivum* L. bulblets. *Eng Life Sci* 00, 1-9

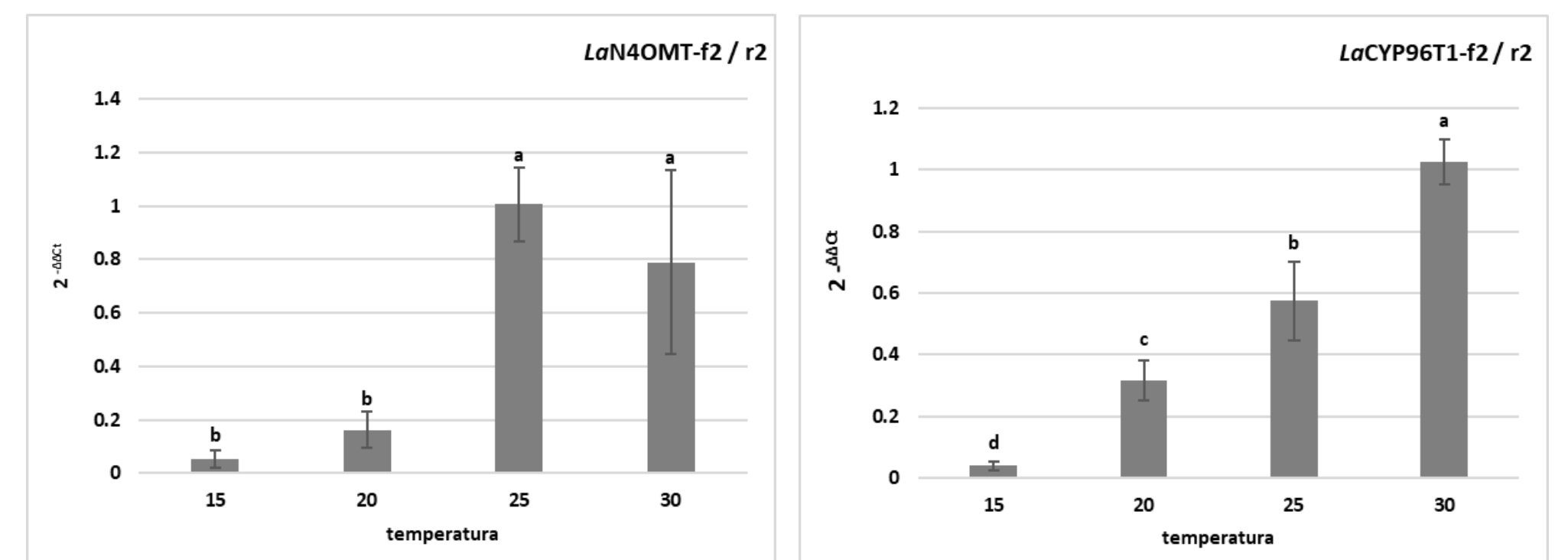
Badania były finansowane z Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich na lata 2014–2020, Działanie 16 „Współpraca”.

Na podstawie analizy LC-MS stwierdzono, że zawartość galantaminy i likoryny w roślinach *Leucojum aestivum* różni się w zależności od zastosowanej temperatury (Tabela 2). Największą ilość galantaminy odnotowano w roślinach rosnących w temperaturze 30 °C i 20 °C. Natomiast temperatury: 30 °C i 15 °C stymulowały biosyntezę likoryny.

Tabela 2. Wpływ temperatury na zawartość galantaminy i likoryny w roślinach *Leucojum aestivum*

Temperatura	Galantamina [μ g/g s.m.]	Likoryna [μ g/g s.m.]
15 °C	5,81 ± 0,001 b	269,50 ± 0,013 a
20 °C	107,38 ± 0,02 a	178,53 ± 0,006 b
25 °C	35,27 ± 0,016 b	209,43 ± 0,016 b
30 °C	104,09 ± 0,012 a	268,75 ± 0,002 a

a-b – grupy jednorodnie według testu Duncana, p<0,05



Ryc. 5. Akumulacja transkryptów wybranych genów biosyntezy alkaloidów Amaryllidaceae.

a-d – grupy jednorodnie według testu Duncana, p<0,05

