

687940

Halina Ekiert

**BADANIA NAD METABOLITAMI
HODOWLI TKANKOWEJ AMMI MAJUS L.**

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Botaniki Farmaceuty-
cznej Akademii Medycznej
im. M. Kopernika w Krakowie

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095953

Promotor:

Prof. dr hab. Stanisław Kohlmünzer

Kraków 1998

Szanownemu Panu Profesorowi
dr hab, Stanisławowi Kohlmünzerowi
składam serdeczne podziękowania
za wskazanie tematu, trud prowadze-
nia pracy oraz cenne rady i wskazówki
w czasie jej wykonywania

H. Głuch

SPIS TRESCI

	str.
I. WSTEP I CEL PRACY	1
II. CZESC TEORETYCZNA	4
1. Charakterystyka botaniczna rodzaju Ammi	4
1.1. Stanowisko systematyczne	4
1.2. Rozmieszczenie geograficzne	5
1.3. Opis morfologiczny Ammi majus L.	6
2. Furanokumaryny - wiadomości ogólne	8
2.1. Struktura chemiczna	8
2.2. Rozpowszechnienie w świecie roślin	9
2.3. Biosynteza	10
2.4. Właściwości biologiczne	12
2.5. Znaczenie farmakologiczne	17
3. Skład chemiczny Ammi majus L.	20
4. Zastosowanie terapeutyczne Ammi majus L.	26
5. Ogólne wiadomości o hodowlach tkankowych roślin	29
5.1. Rys historyczny	29
5.2. Metodyka badawcza	30
5.3. Możliwości praktycznego wykorzystania	32
6. Metabolity wtórne w kulturach tkankowych roślin	34
7. Gatunki rodzaju Ammi obiektem badań in vitro	39
8. Biosynteza i biotransformacje połączeń kumarynowych w roślinnych hodowlach tkankowych	40
III. CZESC DOSWIADCZALNA	44 ⁴
1. <u>Hodowla tkankowa Ammi majus L.</u>	44
1.1. <u>Materiał i metodyka badawcza</u>	44
1.1.1. Założenie hodowli	44
1.1.2. Podłoża hodowlane	45
1.1.3. Inne warunki hodowlane	50

1.1.4. Pomiary przyrostów masy tkankowej	str. 52
1.1.5. Badania morfologiczne i anatomiczne tkanek z hodowli in vitro	,55
1.2. Omówienie wyników hodowli	56
1.2.1. Inicjacja kalusowania	56
1.2.2. Hodowle agarowe prowadzone w obecności światła	,56
1.2.2.1. Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i auksyn	,56
1.2.2.2. Hodowle na podłożach z dodatkiem naturalnych kompleksów odżywczych i witamin	59
1.2.2.3. Hodowle na podłożach zawierających kompozycje kinetyny i auksyn	60
1.2.2.4. Hodowle na podłożach zawierających pojedyncze substancje wzrostowe	,62
1.2.3. Hodowle agarowe prowadzone bez dostępu światła	,65
1.2.4. Hodowle płynne stacjonarne	,67
1.2.5. Hodowle zawiesinowe	69
1.2.6. Wyniki badań anatomicznych tkanek pochodzących z kultur in vitro	70
2. Analiza fitochemiczna w zakresie połączeń kumary- nowych	,74
2.1. Materiał i metodyka badawcza	74
2.1.1. Materiał do badań	74
2.1.2. Przygotowanie ekstraktów	,75
2.1.3. Analiza chromatograficzna	76
2.1.3.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	,76
2.1.3.2. Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC)	78
2.1.4. Izolacja metabolitów	,79

	str.
2.1.5. Analiza spektralna	80
2.2. Omówienie wyników analizy fitochemicznej	81
2.2.1. Chromatograficzna analiza jakościowa	81
2.2.1.1. Rozdziały technika TLC	81
2.2.1.2. Rozdziały technika HPLC	83
2.2.2. Chromatograficzna analiza ilościowa	86
2.2.2.1. Analiza materiału tkankowego z hodowli aga- rowych prowadzonych w warunkach świetlnych	86
2.2.2.2. Analiza materiału tkankowego z hodowli aga- rowych prowadzonych bez dostępu światła	91
2.2.2.3. Analiza tkanek i pożywek z hodowli zawiesino- wych	93
2.2.2.4. Analiza tkanek i pożywek z hodowli zawiesino- wych prowadzonych z dodatkiem umbeliferonu	95
2.2.2.5. Analiza owoców i siewek Ammi majus L.	97
2.2.3. Badania strukturalne wyizolowanych metabolitów wtórnych	105
2.2.3.1. Charakterystyka chromatograficzna wyizolowa- nych związków	105
2.2.3.1.1. Rozdziały technika TLC	105
2.2.3.1.2. Rozdziały technika HPLC	107
2.2.3.2. Analiza spektralna wyizolowanych związków	110
2.2.3.2.1. Analiza spektralna związku A	110
2.2.3.2.2. Analiza spektralna związku B	111
2.2.3.2.3. Analiza spektralna związku C	112
2.2.3.2.4. Analiza spektralna związku D	114
2.2.3.2.5. Analiza spektralna związku E	116
IV. Dyskusja wyników	119
1. Wymagania hodowlane tkanek Ammi majus L. w warun-	

	str.
kach in vitro	119
2. Wybrane aspekty chromatograficznej analizy metabolitów hodowli	123
3. Wpływ niektórych warunków hodowlanych na biosyntezę metabolitów wtórnych	125
4. Porównanie możliwości biosyntetycznych hodowli tkankowej i rośliny macierzystej	129
V. WNIOSKI	134
Tematyczny wykaz tabel	136
Tematyczny wykaz rycin	137
ALBUM RYCIN	138
PISMIENNICTWO	168

I. WSTĘP I CEL PRACY

Ammi majus L. - Aminek większy (rodzina *Apiaceae*) jest subtropikalnym gatunkiem rosnącym głównie w basenie Morza Śródziemnego. W Polsce omawiany gatunek nie występuje w stanie naturalnym, prowadzone są natomiast jego eksperymentalne uprawy.

W latach chłodniejszych i mniej słonecznych, w naszych warunkach klimatycznych owoce roślin nie dojrzewają. Rośliny atakowane są często przez choroby.

W zasadzie wszystkie części rośliny, ale szczególnie jej owoce, gromadzą kilkanaście furanokumaryn o strukturze linearnej - tzw. psoraleny. Aminek większy uważany jest za najbogatsze źródło tych związków.

Właściwości fotosensybilizacyjne i antyproliferacyjne psoralenów, występujące szczególnie w obecności długiego promieniowania UV ($\lambda = 320 - 400$ nm), są wykorzystywane z dużym powodzeniem w fotochemoterapii licznych schorzeń dermatologicznych, m.in.: bielactwa (*vitiligo*), łuszczycy (*psoriasis*), ziarniniaka grzybiastego (*mycosis fungoides*), atopowego zapalenia skóry (*atopic eczema*), przyłuszczycy ostrej (*pityriasis lichenoides*), pokrzywki barwnikowej (*urticaria pigmentosa*), łysienia plackowatego (*alopecia areata*).

Zastosowanie owoców *Ammi majus* L. w leczeniu bielactwa ma wielowiekową tradycję.

Większość aktualnie stosowanych w praktyce dermatologicznej preparatów o właściwościach fotosensybilizacyjnych powstała w oparciu o omawiany surowiec. Są to m.in. preparaty: Meladinine, Oxsoralen, Ammifurin. Leki te są trudno dostępne na rynku krajowym.

Szczególnie terapeutycznie interesującymi psoralenami są ksantotoksyna i bergapten - metoksyłowe pochodne psoralenu. Mimo podejmowania prób, związki te nie zostały wprowadzone do lecznictwa w postaci preparatów krajowych.

Biorąc pod uwagę potrzeby lecznictwa, brak całkowitego powodzenia w aklimatyzacji Aminka większego oraz szerokie możliwości jakie stwarzają hodowle roślin in vitro, interesującym wydało się podjęcie próby hodowli tkankowej tego gatunku. Powodzenie takiej próby stwarzało szansę uniezależnienia się od warunków klimatycznych i chorób roślin oraz nadzieję uzyskania potencjalnie nowego źródła psoralenów.

Celem niniejszej pracy było:

- 1) założenie i utrzymanie ciągłej hodowli tkankowej *Ammi majus* L.
- 2) ustalenie optymalnych dla przyrostu masy tkankowej warunków hodowlanych ze szczególnym uwzględnieniem:
 - składu chemicznego podłoża hodowlanych
 - warunków świetlnych
 - rodzaju hodowli
- 3) analiza chemiczna charakterystycznych dla rośliny macierzystej furanokumaryn i ich biogenetycznego prekursora - umbeliferonu w materiale uzyskanym z hodowli in vitro:
 - ustalenie optymalnych warunków rozdziałów tych połączeń techniką chromatografii cienkwarstwowej (TLC)
 - ilościowe oszacowanie zawartości tych połączeń w wybranym materiale z hodowli in vitro techniką wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC)
 - izolacja metabolitów wtórnych gromadzonych w większych ilościach
 - badania strukturalne wyizolowanych związków - analiza chro-

matograficzna i spektralna (widma UV, IR oraz MS)

- 4) określenie wpływu warunków hodowli in vitro na biosyntezę furanokumaryn z uwzględnieniem:
 - substancji wzrostowych
 - światła
 - rodzaju hodowli
 - obecności egzogennie dodanego umbeliferonu
- 5) porównanie możliwości biosyntetycznych hodowli tkankowej i rośliny macierzystej.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka botaniczna rodzaju *Ammi*

1.1. Stanowisko systematyczne

Gromada	Spermatophyta	- Nasienne
Podgromada	Angiospermae	- Okrytonasienne
Klasa	Dicotyledoneae	- Dwuliścienne
Rząd	Araliales	- Araliowce
Rodzina	Apiaceae (Umbelliferae)	- Baldaszkowate
Podrodzina	Apioidae	
Plemię	Apiaceae (Ammieae)	
Podplemie	Apiinae (Corinae)	
Rodzaj	<i>Ammi</i>	- Aminek [59,65]

Rodzaj *Ammi* obejmuje 16 gatunków - *Ammi majus* L., *Ammi visnaga* (L.) Lam., *Ammi anethifolium* Lam., *Ammi crinitum* Guss., *Ammi erhenbergii* (H. Wolff) M. Hiroe, *Ammi Huntii* H.C. Wats., *Ammi indicum* Buch.-Ham., *Ammi minus* Griseb., *Ammi procerum* Lowe, *Ammi pumilum* D.C., *Ammi pyrenaicum* Lapeyr., *Ammi saxatile* Turcz. ex Bess., *Ammi seubertianum* Trel., *Ammi thracicum* Vel., *Ammi Topalii* Beauverd, *Ammi trifoliatum* Trel. [96,197].

Aminek większy - *Ammi majus* L. znany jest m.in. pod następującymi synonimami: *Ammi cicutaefolium* Willd. ex Roem., *Ammi Boeberi* Hellan. ex Hoffm., *Ammi Broussonetii* D.C., *Ammi elatum* Salisb., *Ammi glaucifolium* L., *Ammi intermedium* D.C., *Ammi pauciradiatum* Hochst. ex A. Rich., *Apium Ammi* Crantz, *Sison majus* Eaton ex Wright, *Visnaga vulgaris* Bub. [91,96].

1.2. Rozmieszczenie geograficzne

Ammi majus L. jest gatunkiem szeroko rozpowszechnionym w rejonie Morza Śródziemnego, od Wysp Kanaryjskich po Iran. Swoim zasięgiem obejmuje zarówno obszary Północnej Afryki - Maroko, Egipt, Etiopie, jak i wszystkie kraje Europy Południowej. Spotykany jest również na innych kontynentach, na obszarach o podobnym klimacie: w Argentynie, w południowych stanach USA, rzadziej w Australii i Nowej Zelandii [91,95,96,136,197].

W Polsce gatunek ten nie występuje w stanie naturalnym. Może być uprawiany dla potrzeb farmaceutycznych [112-114].

Podobny rozległy zasięg w rejonie śródziemnomorskim posiada *Ammi visnaga* (L.) Lam. Gatunek ten spotykany jest także w Europie Zachodniej i Środkowej oraz w Ameryce [91,95,96,136,197].

Szersze występowanie charakterystyczne jest również dla innych gatunków; dla *Ammi minus* Griseb. (Europa) oraz dla *Ammi anethifolium* Lam. i *Ammi saxatile* Turcz. ex Bess. (Europa Wschodnia i Azja) [96].

Występowanie pozostałych gatunków jest rzadkie i ograniczone. W różnych rejonach Europy Południowej spotyka się: *Ammi crinitum* Guss., *Ammi pumilum* D.C., *Ammi pyrenaicum* Lapeyr., *Ammi thracicum* Vel. i *Ammi Topalii* Beauverd. Niektóre gatunki występują tylko na wybranych archipelagach wysp Atlantyku: *Ammi Huntii* H.C. Wats., *Ammi seubertianum* Trel. i *Ammi trifoliatum* Trel. na Azorach, a *Ammi procerum* Lowe na Maderze [96,197].

Na kontynencie azjatyckim stwierdzono natomiast, ograniczone tylko do terenów Indii, występowanie *Ammi indicum* Buch.-Ham. oraz do Altaju *Ammi ehrenbergii* (H. Wolff) M. Hiroe [96].

1.3. Opis morfologiczny *Ammi majus* L. [67,91,95,136,144,196]

Ammi majus L. jest jednoroczną rośliną zielną osiagającą wysokość 50 - 100 cm (ryc. 1).

Posiada ona białawy, silnie rozwinięty korzeń główny, skierowany pionowo w dół, z kilkoma rozgałęzieniami korzeni bocznych.

Kodyga rośliny jest twarda, smukła, delikatnie żeberkowana, górą rozgałęziona.

Roślina posiada różnokształtne liście o zabarwieniu jasnozielonym, ułożone naprzemianlegle. Dolne liście są ogonkowe, zwykle 1-2-krotnie pierzastosieczne, względnie 3-dzielne, z podługowato eliptycznymi odcinkami, o ostro piłkowanym brzegu. Liście górne (kodygowe) krótkoogonkowe lub siedzące, pochwiaste, mają wydłużony kształt.

Kwiaty zgrupowane są w baldachach złożonych. Liczba promieni I-rzędowych waha się w granicach od 14 do 50. Są one sztywne i trwałe, o długości - 9 cm. Drobnobzłonkowe rozgałęzienia I-, jak II-rzędowe należą do luźno ułożonych. Pokrywy baldachów w ilości ok. 13 są przeważnie pierzastosieczne, a pokrywki baldaszków w liczbie ok. 8 sztywno. Kwiaty rośliny: drobne, promieniste lub grzbieciste, dwupłciowe, pięciokrotne, o kształcie gwiazdzistym posiadają białawe zabarwienie. Płatki korony mają głębokie wcięcia. Pręcików jest pięć. Słupek jest dolny, zbudowany z dwóch owocolistków.

Owoce są brązowo-czerwonymi rozłupkami o kształcie cylindrycznym lub owalnym, czasem nieco wydłużonymi i lekko spłaszczonymi na boku, o długości 2,0 - 2,5 mm i 1,5 mm średnicy (ryc. 2.). Owoce rozpadają się na niełupki. Posiadają delikatny, korzenny

zapach, który po roztarciu staje się intensywny. Smak roztartych owoców jest gorzki i mocno szczypiący.

2. Furanokumaryny - wiadomości ogólne

2.1. Struktura chemiczna

Furanokumaryny są podgrupą związków kumarynowych posiadającą rdzeń benzo- α -pyronowy (czyli kumarynowy) skondensowany z pierścieniem furanowym (ryc. 10). W zależności od miejsca przyłączenia pierścienia furanowego wyróżnia się furanokumaryny linearne (pozycja 6,7) lub angularne (pozycja 7,8). Podstawowym związkiem w grupie furanokumaryn linearnych jest psoralen, stąd też cała grupa pochodnych określana bywa często jako - psoraleny. Analogicznego terminu - angelicyny lub izopsoraleny, używa się w odniesieniu do struktur angularnych, które wywodzą się z macierzystego związku - angelicyny, czyli izopsoralenu [93,99,112,131,132,172,188].

Większość pochodnych psoralenu powstaje przez addycję grup alkoksylowych w pozycjach 5 i 8, rzadziej 3, 4 oraz 4' 5'. W przypadku pochodnych angelicyny, podstawniki występują najczęściej w pozycjach 5 i 6 [93,99,112,132,172,188].

Najprostsze i najczęściej spotykane w naturze linearne struktury, to metoksylowe pochodne psoralenu: ksantotoksyna (8-metoksypsoralen = 8-MOP), bergapten (5-metoksypsoralen = 5-MOP), izopimpineline (5,8-dimetoksypsoralen). Często występującymi związkami są także: imperatoryna, izoimperatoryna, marmezyna, marmezynina (por. tab. 1, rozdz. 3, cz. teoret.). Do najprostszych metoksylowych pochodnych angelicyny należą: izobergapten, sfondyna, pimpineline [93,99,112,131,132,172].

Furanokumaryny występują głównie jako wolne połączenia; znanych jest niewiele doniesień o istnieniu połączeń glikozydowych tych związków. Glikozydową strukturę posiadają m.in. marmezyni-

na, nodakenina, kolumbianina, glukozyd majuryny. Furanokumaryny występują często w formie estrów [93],

2.2. Rozpowszechnienie w świecie roślin

Proste kumaryny* występują bardzo powszechnie w świecie roślin. Obecność furanokumaryn ograniczona jest natomiast tylko do kilku rodzin botanicznych: Leguminosae, Moraceae, Rutaceae, Apiaceae i Orchidaceae [29,32,92,93,99,112],

W obrębie rodziny Apiaceae obecność tych związków stwierdzono przede wszystkim u przedstawicieli plemion Peucedaneae i Smyrnieae podrodziny Apioideae. Omawiane połączenia występują głównie w rodzajach: Angelica, Heracleum, Peucedanum, Pimpinella, Pastinaca, Petroselinum, Ammi [29,32,51,52,93,132].

Głównym źródłem furanokumaryn są owoce, nasiona i korzenie, także kwiaty; jednakże związki te w różnych ilościach mogą znajdować się we wszystkich organach roślin. Bardziej lotne połączenia mogą być składnikami olejków eterycznych charakterystycznych dla niektórych gatunków [32,52,93,112].

Furanokumaryny linearne są bardziej rozpowszechnione, niż angularne (por. rozdz.2.1.). W niektórych rodzajach tworzone są tylko psoraleny, w innych obok nich występują także angelicyny, jako związki towarzyszące [29,132].

W wielu wypadkach stwierdza się występowanie całej kompleksowej mieszaniny nawet kilkunastu różnych furanokumaryn w jednym gatunku. Kompleksom tym towarzyszą często proste hydroksykumary-

* Określenie - proste kumaryny w literaturze [m.in. 40,132,172,188] nie zawsze jest identycznie rozumiane. W niniejszej pracy określeniem tym objęto pochodne benzo- α -pyronu, posiadające wyłącznie pierścień benzenowy i laktonowy, w odróżnieniu głównie od furano- i piranokumaryn [40,188].

ny [52].

Uważa się, że furanokumaryny wytwarzane są przez niektóre gatunki roślin (m.in. *Apium graveolens*, *Pastinaca sativa* czy *Petroselinum sativum*) jako fitoaleksyny [21,23,99].

2.3. Biosynteza

Nie wszystkie etapy biogenetycznego szlaku prowadzącego do furanokumaryn zostały do dziś ustalone. Są one przedmiotem obszernych badań prowadzonych głównie przez dwa ośrodki - Dipartimento di Scienze Farmaceutiche Università di Padova oraz Department of Chemistry, Trent University w Peterborough.

Schemat biosyntezy omawianych związków przedstawia rycina 12. Pierwszy etap biosyntezy furanokumaryn pokrywa się z biosyntezą prostych kumaryn. Z kwasu p-kumarowego na drodze orto-hydroksylacji, poprzez katalizowaną światłem "trans"- "cis" izomeryzację, dochodzi do spontanicznego formowania pierścienia laktonowego 7-hydroksykumaryny, czyli umbeliferonu. Związek ten jest biosyntetycznym prekursorem wszystkich furanokumaryn, zarówno o strukturze linearnej, jak i angularnej. Także β -D-glukozyd umbeliferonu - skimina jest naturalnym prekursorem tych związków [40,41, 55,106,179,188].

Następnym etapem biosyntezy jest izoprenylacja umbeliferonu w pozycji "orto". W wyniku reakcji umbeliferonu z dimetyloallilopirofosforanem powstają różne związki, mianowicie: 6-dimetyloalliloumbeliferon, czyli demetylosuberozyna (DMS) lub 8-dimetyloalliloumbeliferon, czyli ostenol [41,179].

W tworzeniu DMS bierze udział specyficzna dimetyloallilotransferaza, której działanie uzależnione jest od obecności jonów

Mn²⁺ [40,64,188].

Na tym etapie biosyntezy następuje rozdzielenie biogenetycznych szlaków prowadzących do furanokumaryn linearnych i angularnych. Powstała 7-demetylosuberozyna jest fizjologicznym prekursorem psoralenów, a ostenol angelicyn [41,179].

W wyniku przemian, których natura jeszcze ciągle nie jest definitywnie ustalona, w następnym etapie biosyntezy dochodzi do powstania dihydrofuranowego pierścienia. Z DMS powstaje furanokumaryna o strukturze linearnej - marmezyna, a z ostenolu kolumbianetyna - furanokumaryna o strukturze angularnej. Oba związki są hydroksyizopropylodihydrofuranokumarynami [40,41,179,188].

Dopiero po etapie dihydrofuranokumaryn powstają najprostsze macierzyste związki furanokumarynowe - odpowiednio psoralen i angelicyna [181].

Mechanizm, który eliminuje izopropylowy boczny łańcuch z marmezyny i kolumbianetyny oraz wprowadza podwójne wiązanie tworząc strukturę psoralenu i angelicyny, także nie został ostatecznie wyjaśniony. Wyklucza się tutaj droga prowadząca poprzez dehydrogenację pierścienia dihydrofuranu [40,41,118,179,188].

W przypadku furanokumaryn oksigenacja pierścienia benzenowego występuje zwykle po utworzeniu struktury furanobenzo- α -pyronu [41,55]. Najprostsze pochodne psoralenu - ksantotoksyna i bergapten, powstają w wyniku jego hydroksylacji i kolejnej metylacji [41,56].

5,8-dimetoksylova pochodna psoralenu - izopimpinellina może powstawać z psoralenu poprzez jego 5,8-dihydroksylację i metylację oraz z ksantotoksyny lub bergaptenu, także w wyniku hydroksylacji i kolejnej O-alkilacji, odpowiednio w pozycji C-5 lub C-8 [15,41,42,97].

Przypuszczalnie analogiczne reakcje prowadzą do uformowania najprostszych alkoksyłowych pochodnych angelicyny [179].

W grupie psoralenów hydroksylacja prowadząca do alkoksyłowych pochodnych może występować także na etapie marmezyny, a nie psoralenu. Kolejnym etapem biosyntezy jest wtedy aromatyzacja pierścienia furanu i O-alkilacja [55,98].

Biosynteza furanokumaryn bardziej skomplikowanych struktur przebiega prawdopodobnie w analogiczny sposób do przedstawionego dla metoksyłowych pochodnych [41,179].

2.4. Właściwości biologiczne

Kompleksowe badania nad wyjaśnieniem fotochemicznych i fotobiologicznych właściwości furanokumaryn prowadzone są głównie przez ośrodek włoski - Dipartimento di Scienze Farmaceutiche Università di Padova.

Furanokumaryny są związkami uczulającymi na promieniowanie UV, wywołującymi hyperpigmentację zdrowej lub repigmentację odbarwionej skóry. Najczęściej efekt ten poprzedzony jest efektem fototoksycznym (powstaniem rumienia). Związki te wykazują właściwości antyproliferacyjne; wykazano bowiem, że mogą powodować śmierć bakterii i wirusów, inaktywację tumorów, inhibicję syntezy DNA, RNA i protein wewnątrz żywych komórek oraz inaktywację enzymów. Znane są także grzybo-, mięczako- i insektobójcze właściwości niektórych połączeń. Furanokumaryny mogą także wykazywać właściwości mutagenne, które stwierdzono zarówno w stosunku do komórek bakteryjnych, jak i komórek ssaków [24,29,99,153,155,172,188].

Bez wpływu światła zarówno psoraleny, jak i angelicyny nie są

aktywne. Przy absorpcji fotonu promieniowania UV (szczególnie tzw. UV-A o $\lambda = 320 - 400$ nm) cząsteczki furanokumaryn ulegają wzbudzeniu. Powrotowi do stanu podstawowego towarzyszą różne zjawiska fotofizyczne i fotochemiczne. Dotychczas stwierdzono:

- emisję fluorescencji i fosforescencji
- reakcje dimeryzacji
- addycje do innych połączeń, takich jak: FMN, DNA, RNA i proteiny oraz
- wytwarzanie tlenu singletowego i wolnych rodników [24,29,86, 111,139,153-155,198,199].

Psoraleny są łatwo fluoryzującymi połączeniami. Podobnie jak i proste kumaryny z łatwością ulegają dimeryzacji, przy czym powstające dimery nie wykazują biologicznej aktywności.

Możliwość tworzenia fotoadduktów z FMN, podobnie jak i mechanizm fotoaddycji z proteinami nie zostały dokładnie zbadane.

Powstawanie wolnych rodników, w wyniku oddziaływania promieniowania UV z furanokumarynami, a także reaktywność tych rodników i tlenu singletowego w żywym organizmie, też nie zostały do końca poznane [86,111,139,153,155,198,199].

Spośród wymienionych powyżej zjawisk towarzyszących wzbudzonym furanokumarynom, szczególne znaczenie ma dokładniej zbadana reakcja tych związków z kwasami nukleinowymi. Furanokumaryny znane są jako związki łatwo "wsuwające się" pomiędzy pary zasad pirymidynowych kwasów nukleinowych. Taka reakcja zachodzi bez wpływu światła (tzw. reakcja ciemna). Powstałe połączenie nie jest trwałe, może łatwo dysocjować. Natomiast pod wpływem promieniowania UV-A tworzą się kowalencyjne wiązania pomiędzy cząsteczkami furanokumaryn i zasad pirymidynowych kwasów nukleinowych, szczególnie z tymina (tzw. reakcja świetlna) [29].

Pierwsza fotochemiczna reakcja jest zwykle formowaniem cyklobutanowego połączenia pomiędzy podwójnym wiązaniem pierścienia furanu w pozycjach 4' 5' i wiązaniem podwójnym zasady pirymidynowej w pozycjach 5, 6, co prowadzi do powstania tzw. monofunkcyjnego adduktu. Kolejna absorpcja drugiego fotonu przez monoaddukt prowadzi do formowania dodatkowego kowalencyjnego połączenia pomiędzy wiązaniem podwójnym zasady pirymidynowej (pozycja 5,6) drugiego łańcucha kwasu nukleinowego, co doprowadza do powstania krzyżowego połączenia dwóch łańcuchów DNA. Powstający biaddukt (określany jako bifunkcyjny addukt) jest połączeniem jednej cząsteczki furanokumaryny z dwoma różnymi zasadami pirymidynowymi dwóch komplementarnych łańcuchów DNA [24,29,129,130,140,155,156;200]. Wzór biadduktu psoralenu z tymina wg Beyricha [29] przedstawia rycina 11

Furanokumaryny posiadające tylko możliwość tworzenia monoadduktów, są określane jako tzw. monofunkcyjne furanokumaryny, w przeciwieństwie do furanokumaryn wykazujących także zdolność tworzenia biadduktów, nazywanych bifunkcyjnymi furanokumarynami [57,153,156].

Psoraleny teoretycznie mogą tworzyć zarówno mono-, jak i biaddukty, przy czym monoaddukty formowane są w większym stopniu, np. dla 8-MOP w stosunku 9:1 [57,156].

Monofunkcyjnymi wśród furanokumaryn linearnych są połączenia, w których możliwość fotoreakcji jednego z dwóch aktywnych miejsc (wiązania w pozycjach 3,4 lub 4',5') jest zlikwidowana lub ograniczona. Należą tutaj np. 4',5'-dihydropsoraleny oraz syntetyczne 3-karboksylopsoraleny [156].

Angularna budowa angelicyn uniemożliwia tym związkom ze względów geometrycznych tworzenie biadduktów [57,153,155,156].

Zdolność furanokumaryn do tworzenia fotoadduktów jest bardzo zróżnicowana. Z badań nad licznymi naturalnymi i syntetycznymi furanokumarynami wynika, że istnieje odrębna korelacja w zdolności do tworzenia mono- i biadduktów [29].

Spośród trzech naturalnych furanokumaryn: psoralenu, bergaptenu i ksantotoksyny, psoralen wykazuje największą zdolność tworzenia zarówno mono-, jak i bifunkcyjnych adduktów, bergapten natomiast najmniejszą. Niektóre syntetyczne alkilowe pochodne psoralenu posiadają większą zdolność tworzenia monoadduktów, niż sam psoralen, niekiedy także biadduktów [29,156].

Powstawanie mono- i bifunkcyjnych adduktów warunkuje różne biologiczne właściwości furanokumaryn. Działanie bakteriobójcze, inaktywacja tumorów, tworzenie rumienia na skórze i aktywność mutagenna są wyraźnie skorelowane z tworzeniem krzyżowych połączeń z DNA. Hamowanie biosyntezy kwasów nukleinowych związane jest zarówno z tworzeniem mono-, jak i biadduktów [29,153,156].

Klasyczne furanokumaryny stosowane w leczeniu dermatologicznym: 5-MOP, 8-MOP, TMP (4,8,5'-trimetylopsoralen), tworzące zarówno mono-, jak i biaddukty, wykazują silne właściwości antyproliferacyjne, równocześnie wywołują efekt fototoksyczny i w wysokim stopniu pigmentację skóry, mają także właściwości mutagenne [153].

W wyniku szeroko prowadzonych badań nad biologiczną aktywnością syntetycznych furanokumaryn, uzyskano monofunkcyjne połączenia bardzo korzystnych właściwościach, które wykazują antyproliferacyjny i hyperpigmentacyjny efekt, przy równoczesnym braku fototoksyczności i mniejszych właściwościach mutagennych (głównie metylowe pochodne angelicyny). Zsyntetyzowano także związek, który jest w stanie wywołać jedynie efekt antyprolife-

racyjny; jest nim 3-karboetoksypsoralen. Związek ten oraz wspomniane metylowe pochodne angelicyny, są potencjalnymi substancjami leczniczymi, w których wyeliminowane zostały niepożądane właściwości większości furanokumaryn. Niektóre z tych związków znajdują się w badaniach klinicznych, np. 4',5'-dimetyloangelicyna [157,158,153,156,201].

Istnieje też grupa nieaktywnych połączeń, które nie wykazują żadnego efektu fotobiologicznego, np. 4',5'-dihydro-8-metoksypsoralen, 8-hydroksypsoralen i wiele innych [140].

Przedstawione powyżej zróżnicowane właściwości biologiczne furanokumaryn pozwalają sądzić, że różne fotobiologiczne efekty wywoływane przez te związki są niezależne od siebie i prawdopodobnie każdy efekt ma odrębny mechanizm [153,155].

W powstawaniu efektu fototoksycznego stwierdza się wyraźną korelację z formowaniem krzyżowych połączeń z DNA. Rozważa się także rolę tlenu singletowego i oksyrodników wytwarzanych przez wzbudzone furanokumaryny w wywoływaniu tego efektu [139,153,155].

Wykorzystywana od setek lat zdolność furanokumaryn do wywoływania pigmentacji skóry posiada niewyjaśniony do dziś mechanizm. Wiele współczesnych prac bierze również pod uwagę udział tlenu singletowego oraz wolnych rodników wytwarzanych przez furanokumaryny w zwiększonej melanizacji melanosomów. Pod wpływem psoralenowej terapii obserwuje się także zwiększenie populacji czynnych melanocytów oraz wzrost produkcji melanosomów. Mechanizm repigmentacji i hyperpigmentacji jest więc złożony [140,153].

W antyproliferacyjnym efekcie wywoływanym przez omawiane związki, głównym mechanizmem jest kowalencyjne łączenie się ich z zasadami pirymidynowymi DNA. Bierze się także pod uwagę współudział tlenu singletowego (głównie poprzez inaktywację enzymów)

w powstawaniu tego efektu [139,155].

Właściwości antyproliferacyjne furanokumaryn są podstawą dla stosowania tych związków w chorobach hyperproliferacyjnych (np. łuszczyca, ziarniniak grzybiasty) [24,140].

W mutagennym efekcie wywoływanym przez furanokumaryny fundamentalne znaczenie ma tworzenie połączeń z DNA [155].

Uwzględniając ponadto wymienione powyżej niedokładnie zbadane zjawiska fotofizyczne i fotochemiczne, wywoływane w wyniku oddziaływanie promieniowania UV-A z furanokumarynami, pełny obraz mechanizmu biologicznego działania tych związków staje się coraz bardziej skomplikowany.

2.5. Znaczenie farmakologiczne

Psoraleny są związkami, których właściwości biologiczne są wykorzystywane z dużym powodzeniem w fotochemoterapii licznych schorzeń dermatologicznych.

Do chorób leczonych za pomocą omawianych związków należą przede wszystkim:

- bielactwo nabyte (vitiligo) [28,101,116,134,140,159]
 - łuszczyca (psoriasis) [24,88,101,116,120,140,195,203],
- a także:
- ziarniniak grzybiasty (mycosis fungoides) [24,101,140,157]
 - atopowe zapalenie skóry (atopic eczema) [24,140]
 - liszaj płaski (lichen planus) [24,140]
 - przyłuszczyca ostra (pityriasis lichenoides) [24]
 - przyłuszczyca plackowata (parapsoriasis en plaques) [101]
 - pokrzywka barwnikowa (urticaria pigmentosa) [24,101,140,142]
 - wielopostaciowe osutki świetlne (polymorphic light eruption)

[24,140,142]

- łysienie plackowate (alopecia areata) [24,116,134]
oraz krostkowe bakterydy Andrewsa (persistent palmoplantar
pustulosis [10] i inne,

Psoraleny znalazły też zastosowanie w produkcji preparatów
kosmetycznych przyspieszających opalanie [25].

Wykorzystywanie furanokumaryn w leczeniu bielactwa ma wielo-
wiekową tradycję (por. rozdz. 4, cz. teoret.). Natomiast w przy-
padku łuszczycy i większości w/w jednostek chorobowych, leczenie
oparte na psoralenach zostało wprowadzone w połowie lat 70-tych
obecnego stulecia, a w przypadku niektórych schorzeń zaledwie
kilka lat temu [10,24,140,142,157].

W leczeniu tych chorób z dużym powodzeniem stosuje się foto-
chemoterapeutyczną metode określaną jako PUVA (psoraleny + pro-
mieniowanie UV-A), w której wykorzystuje się farmakologiczne
działanie psoralenów występujące szczególnie w obecności długie-
go promieniowania UV, określanego jako UV-A ($\lambda = 320 - 400 \text{ nm}$)
[10,24,78,88,101,120,140,142,159,195].

PUVA jest zwykle doustną terapia. Często zaleca się jednak
równoczesne doustne i miejscowe, ewentualnie tylko miejscowe
stosowanie psoralenów, przy czym zdania dermatologów praktyków
dotyczące metod terapeutycznych w poszczególnych jednostkach
chorobowych są podzielone [28,88,101,116,140,159,195].

W leczeniu w/w chorób wykorzystuje się głównie efekt pigmen-
tacyjny i antyproliferacyjny terapii PUVA [10].

Furanokumaryny nie są jednak związkami bezpiecznymi w stoso-
waniu. Fototoksyczność większości połączeń z tej grupy przeja-
wiająca się powstawaniem rumienia, świądu skóry, a nawet peche-
rzy jest potwierdzona. Z tego powodu w terapii PUVA dawki zarów-

no psoralenów, jak i promieniowania UV są ściśle kontrolowane [88,101,116,140,159].

Furanokumaryny wykazujące efekt mutagenny, mogą być czynnikami kancerogennymi. Jednak doniesienia ich rakotwórczych właściwościach nie są do końca wyjaśnione.

W niektórych badaniach toksyczności długotrwałej (ponad 5-letniej) terapii PUVA zanotowano wzrost ryzyka nowotworów skóry. Wyniki tych badań wskazują jednak wyraźnie na promieniowanie UV oraz na wcześniejszą ekspozycję pacjentów na kancerogeny (np. arsen, dziegcie, promieniowanie jonizujące), jako główne czynniki odpowiedzialne za możliwość powstawania nowotworów [78,99,140].

3. Skład chemiczny Ammi majus L.

Ammi majus L. jest gatunkiem, którego metabolizm wtórny nastawiony jest wybiórczo na produkcję licznych furanokumaryn o strukturze linearnej. Związki te gromadzone są szczególnie w owocach aminka (ok. 1%). W surowcach różnego pochodzenia stwierdzono do dziś obecność blisko 20 różnych pochodnych psoralenu, tak więc w pełni uzasadnionym jest fakt, że owoce Ammi majus L. uważane są za najbogatsze źródło tych połączeń.

Istnieją tylko pojedyncze doniesienia o występowaniu w omawianym gatunku innych metabolitów wtórnych m.in.: prostych kumaryn, furanokumaryn o strukturze angularnej, flawonoidów.

Badania składu chemicznego Aminka większego rozpoczęły się dopiero w latach 40-tych XX wieku. Większość badań prowadzona była przez 2 ośrodki egipskie - National Research Centre w Kairze i Pharmacognosy Department Faculty of Pharmacy, Cairo University.

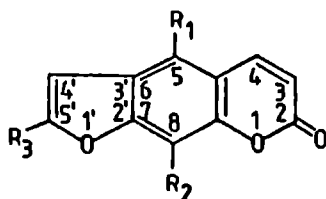
Budowę dotychczas poznanych połączeń kumarynowych występujących w Ammi majus L. przedstawia tabela 1

Pierwszymi krystalicznymi połączeniami wyizolowanymi w latach 1947-48 z owoców aminka pochodzenia egipskiego były kolejno: amoidyna (0,5%), amidyna (0,3%) i majudyna (0,04%) [67-69].

Dalsze badania wykazały identyczność amoidyny z ksantotoksyną, amidyny z imperatoryną, a majudyny z bergaptenem [68,163,164].

Do dziś, z surowca pochodzenia egipskiego wyizolowano kilka kolejnych psoralenów - marmezynę i jej glukozyd marmezyninę [2,9,18,177], izopimpineline [1] i izoimperatorynę [3], alloimperatorynę [8] i amiryne [7].

Tab.1. Budowa połączeń kumarynowych występujących w Ammi majus L.



A - psoraleny

L.p.	nazwa związku ⁺	R ₁	R ₂	R ₃
1.	ksantotoksyna	-	-OCH ₃	-
2.	bergapten	-OCH ₃	-	-
3.	izopimpinelina	-OCH ₃	-OCH ₃	-
4.	imperatoryna	-	-OCH ₂ -CH=C/CH ₃ / ₂	-
5.	izoimperatoryna	-OCH ₂ -CH=C/CH ₃ / ₂	-	-
6.	alloimperatoryna	-CH ₂ -CH=C/CH ₃ / ₂	-OH	-
7.	oksypeucedanina	-OCH ₂ -CH-C/CH ₃ / ₂ O	-	-
8.	hydrat oksy- peucedaniny	-OCH ₂ -CH-C/CH ₃ / ₂ OH OH	-	-
9.	heraklenina	-	-OCH ₂ -CH-C/CH ₃ / ₂ O	-
10.	pabulenol	-OCH ₂ -CH-C-CH ₃ OH CH ₂	-	-
11.	saksalina	-OCH ₂ -CH-C/CH ₃ / ₂ OH Cl	-	-
12.	5-[2-/3-metylobuty- ryloksy/-3-hydroksy- -3-metylobutoksy]- -psoralen	-OCH ₂ -CH-C/CH ₃ / ₂ OH OCO-CH ₂ CH/CH ₃ / ₂	-	-
13.	8-[2-/3-metylobuty- ryloksy/-3-hydroksy- -3-metylobutoksy]- -psoralen	-	-OCH ₂ -CH-C/CH ₃ / ₂ OH OCO-CH ₂ CH/CH ₃ / ₂	-
14.	5-[2-/acetoksy/-3- hydroksy-3-metylo- butoksy]-psoralen	-OCH ₂ -CH-C/CH ₃ / ₂ OH OCO-CH ₃	-	-

W surowcu pochodzenia amerykańskiego wykazano obecność innych 8 furanokumaryn o strukturze linearnej: oksypeucedaniny, herakleniny, hydratu oksypeucedaniny, pabulenolu, saksaliny, 5-[2-(3-metylobutyryloksy)-3-hydroksy-3-metylobutoksy]-psoralenu, 8-[2-(3-metylobutyryloksy)-3-hydroksy-3-metylobutoksy]-psoralenu i 5-[2-(acetoksy)-3-hydroksy-3-metylobutoksy]-psoralenu [100].

Owoce Ammi majus L. gromadzą także furanokumaryny o strukturze angularnej: izobergapten [44], majurynę [6] oraz 4'-eto-ksy-5'-izopropyl-4',5'-dihydroangelicyne [70].

Spośród prostych kumaryn stwierdzono w owocach Ammi majus L. obecność umbelipreniny [5], a w liściach umbeliferonu [52].

Za najbardziej wartościowy uważa się surowiec pochodzenia egipskiego, gdyż jego dominującym składnikiem jest terapeutycznie wykorzystywana ksantotoksyna (0,5%) [67,68].

Analiza surowców innego pochodzenia wskazuje na wyraźne jakościowe i ilościowe różnice w składzie frakcji furanokumaryn [11,60,113-115,133,189-191,193].

Wysoką zawartością furanokumaryn charakteryzują się oprócz owoców także kwiaty i osie baldachów. Zdecydowanie mniejsze ilości tych połączeń występują w liściach i łodydze, najmniejsze w korzeniu. W związku z tym, rozważa się zastosowanie ziela lub szczytowych części ziela zbieranych na etapie niedojrzałych owoców, ewentualnie baldachów zbieranych łącznie z owocami, jako surowców farmaceutycznych równocennych z dojrzałymi owocami. Ten fakt może mieć szczególne znaczenie dla krajów, w których dojrzałe owoce nie zawsze mogą się rozwinąć ze względów klimatycznych [31,33,34,77,108,191].

Przy zbiorze samych owoców jako surowca, istotny jest sto-

pień ich dojrzałości. Według większości autorów, młode, zielone owoce *Ammi majus* L. wykazują największą zawartość furanokumaryn [16,34,36,176].

Odmienne od powyższych rezultaty ilościowych analiz uzyskali Kibalczyk i in. [108]. Wynika z nich, że dojrzałe owoce są zdecydowanie bogatsze w furanokumaryny niż owoce zielone (odpowiednio 3,45% i 1,64%).

Z terapeutycznego punktu widzenia, ważna jest nie tylko całkowita zawartość frakcji furanokumaryn w surowcu, ale ogromnie istotny jest w niej procentowy udział poszczególnych związków różniących się działaniem biologicznym.

Dystrybucja poszczególnych furanokumaryn zmienia się bardzo w przebiegu wegetacji rośliny. Stosunkowo dużą stabilność jakościowego składu frakcji furanokumaryn stwierdza się w owocach i kwiatach omawianego gatunku, zdecydowanie mniejszą w korzeniu i łodydze [4,16,33,34].

Prócz połączeń kumarynowych w *Ammi* większym stwierdzono obecność związków flawonoidowych, zarówno pochodnych flawonolowych, które występują pospolicie w rodzinie *Apiaceae* oraz pochodnych flawonu, które spotykane są rzadziej [51,52,89,127].

W owocach omawianego gatunku wykazano obecność izokwercetyny oraz 7-O-glukozydu kemferolu i kwercetyny [127]. W oparciu o wyniki wstępnej analizy chromatograficznej Harborne i Williams [89] stwierdzili w owocach obecność nieokreślonych bliżej glikozydów kwercetyny i luteoliny.

W liściach *Ammi majus* L. chromatograficznie wykazano obecność wolnej kwercetyny [52].

W ziele chromatograficznie określono dwa glikozydy jako pochodne luteoliny, a dwa pozostałe, uznano za pochodne kwercety-

ny. Zawartość tych związków oszacowano jako najniższą (0,05%) spośród przebadanych 12 gatunków rodziny Apiaceae (średnio 0,3-0,6%). Na podstawie charakterystyki chromatograficznej tych związków, można przypuszczać, że glikozydy występujące w ziele mogą należeć do triglikozydów flawonoidowych stosunkowo rzadko spotykanych w stanie naturalnym [51].

W owocach *Ammi majus* L. gromadzony jest olejek eteryczny, podobnie jak u licznych przedstawicieli rodziny Apiaceae [11,14]. Zawartość jego jest mała, bardzo zmienna, uzależniona od warunków klimatycznych (0,03-0,26%) [11].

Jak wynika z analizy olejku uzyskanego z hodowanych doświadczalnie w Pakistanie roślin, zawiera on głównie mieszaninę furanokumaryn. Stanowi ona 65% wszystkich składników występujących w olejku. W mieszaninie tej dominującym ilościowo połączeniem jest ksantotoksyna (ok. 15%). Składnikami olejku są także piperiton (10%), niezidentyfikowane bliżej węglowodory nienasycone (1,34%) i nienasycony cykliczny terpenowy alkohol [14].

Owoce zawierają ponadto 12,9% oleju tłustego, ok. 13,8% protein, 0,45% garbników, 0,2% glukozy oraz hemicelulozy, gumy, substancje śluzowe i szczawian wapnia [67,95].

W wyniku analizy chromatograficznej frakcji fosfolipidowej owoców, wykazano w niej obecność kwasu olejowego i palmitynowego [71].

W omawianym gatunku stwierdzono również obecność mannitolu [93].

4. Zastosowanie terapeutyczne Ammi majus L.

Zastosowanie terapeutyczne omawianego gatunku wiąże się nie-
rozzerwalnie z wykorzystywaniem biologicznego działania zawartych
w nim psoralenów.

Lecznicze właściwości Aminka większego były znane i wykorzy-
stywane już w starożytnym Egipcie, przede wszystkim w leczeniu
bielactwa oraz jako spasmolyticum przy kolce nerkowej i skur-
czach moczowodu [67]. Pierwsze informacje dotyczące stosowania
owoców Ammi majus L. przez Egipcjan w leczeniu bielactwa pocho-
dzą z papiirusu Ebersa (ok. 1550 rok p.n.e.).

W czasach nowożytnych dokładny przepis i skuteczność leczeni-
czego stosowania Aminka większego przedstawił, żyjący na przeło-
mie XII i XIII wieku, wybitny botanik i lekarz arabski - Ibn al
Baitar w swych najsłynniejszych dziełach: "Al-Mughui al Kabir"
oraz "Mophradat El Adwaia" [67,145].

Stosowany leczniczo proszek z owoców aminka znany był w Egi-
pcie pod nazwami "Aatrillal", "Gazar El Shaytan" i "Regl-El-Sho-
rab" [67].

Obserwacje o leczniczym wykorzystywaniu omawianego gatunku
potwierdził w XVI wieku Daoud al Antaki w swojej księdze "Taz-
kerah Oli al Albab" [145].

W Europie pierwsze wzmianki o stosowaniu i znaczeniu terapeu-
tycznym aminka pochodzą od Galena (II w. n.e.), który określał
roślinę jako "Ami" [67].

W średniowiecznej Europie omawiany gatunek był uprawiany
w celach leczniczych w czasach Karola Wielkiego. W kapitularku
Ludwika Pobożnego (VIII/IX w.) figuruje jako "Amenon" zalecany
do uprawy [136].

Jest on wymieniany w spisach roślin aptekarza i lekarza niemieckiego - Valeriusa Cordusa (XVI w.) [67].

W 1610 r. Rostius z Lund wymienia go w "Herbarium" jako "Ginghiton egipsacum" [136].

Dopiero w latach 40-tych XX wieku badania Fahmy i Abu-Shady, jak również Schönberga i Sina [68,69,163] prowadzone w Kairze wykazały, że za korzystne efekty w leczeniu bielactwa odpowiedzialne są psoraleny zawarte w owocach omawianego gatunku.

Od czasu tego odkrycia rozpoczęło się duże zainteresowanie możliwościami zastosowania tego surowca w oficjalnej terapii bielactwa. Pierwsze zachęcające wyniki leczenia ekstraktami z owoców Ammi majus L. opublikowali na przełomie lat 40-tych i 50-tych egipscy lekarze (m.in. El Mofty), później francuscy (m.in. Sidi) oraz amerykańscy (Lerner i Fitzpatrick) [159].

Obecnie owoce Aminka większego służą jako surowiec do otrzymywania preparatów stosowanych nadal z powodzeniem w leczeniu bielactwa nabytego [24,101,116,138,140,153] oraz wielu innych dermatologicznych jednostek chorobowych wymienionych w rozdziale 2.5.

Do najważniejszych preparatów otrzymywanych w oparciu o omawiany surowiec należą:

- Meladinine (Memphis Chemical Co., Egipt)
- Meladinine (Promedica, Francja)
- Meladinine (Basotherm, RFN)
- Meladinine (Pharma - Medica, Dania)
- Oxsoralen (Elder, USA)
- Oxsoralen (Gerot, Austria)
- Ammifurin (Medexport, ZSRR) [138,143,203].

Na rynku farmaceutycznym pojawiają się także preparaty pozy-

skiwane z innych konkurencyjnych surowców roślinnych, np. z *Fa-
stinaca sativa* (preparat Beroxan), z *Peucedanum ruthenicum* (pre-
parat Peucedanin), z *Psoralea drupacea* (preparat Psoralen) [138]
lub na drodze wyłącznie chemicznej syntezy [195,203].

Działającymi składnikami tych preparatów są najczęściej 8-MDP
lub 5-MDP [28,29,101,134,159,195,203]. Oba związki posiadają
bardzo korzystną farmakokinetyczną charakterystykę [29,101,203].

Powszechnie stosowanym związkiem jest też pozyskiwany synte-
tycznie TMP (4,8,5'-trimetylopsoralen) [101,195,203].

5. Ogólne wiadomości o hodowlach tkankowych roślin

5.1. Rys historyczny

Pierwsze próby wzrostu i podziałów pojedynczych komórek roślinnych w roztworach odżywczych przeprowadził Haberlandt. Oparte były one na sformułowanej przez tego badacza w 1902 roku hipotezie o nieograniczonym wzroście i rozwoju komórek. Próby te zakończyły się jednak niepowodzeniem, głównie z powodu używania w eksperymentach pojedynczych, wysoko wyspecjalizowanych komórek roślinnych [30,152,175,207].

W dwadzieścia lat później Robbins i Kotte, niezależnie od siebie uzyskali hodowle wierzchołków korzeni storczyków na sztucznym podłożu [30,152,207]. Hodowli tych jednak nie udało się utrzymać przy życiu, przypuszczalnie z powodu nieodpowiedniego składu chemicznego stosowanych podłoży [207].

Pierwszą trwałą hodowlę założył w 1934 roku White. Były to hodowle korzeni *Lycopersicon esculentum* [30,152,207].

W 1939 rok udało się uzyskać nieograniczony wzrost tkanki roślinnej. Sukces należał do badaczy - do White'a, który otrzymał tkankę kalusową z fragmentów prokambium łodyg mieszanka tytoniu - *Nicotiana langsdorfii* *Nicotiana glauca* oraz do Gauthiereta i Nobécourta, którzy niezależnie od siebie, uzyskali hodowle z fragmentów korzeni *Daucus carota* zawierających kambium. Powodzenie tych eksperymentów było możliwe m.in. dzięki zastosowaniu odkrytego w 1934 r. przez Kögla naturalnego hormonu roślinnego, kwasu β -indoliloctowego (IAA) [30,152,175,207].

Od tego okresu rozpoczął się gwałtowny rozwój badań nad roślinnymi kulturami tkankowymi.

Metoda hodowli tkanek roślinnych *in vitro* została wprowadzona

i rozpropagowana w Polsce przez prof. J. Czosnowskiego i jego współpracowników. Pierwsze prace z tej dziedziny autorstwa prof. J. Czosnowskiego ukazały się na przełomie lat 40-tych i 50-tych [2071].

5.2. Metodyka badawcza

Przez kultury roślin *in vitro* określa się prowadzone w warunkach sterylnych hodowle całych roślin, ich fragmentów, organów, tkanek i pojedynczych komórek, a ostatnio także hodowle protoplastów [30,2071].

Hodowle te prowadzone są na sztucznym podłożu zawierającym niezbędne do rozwoju komórek substancje: wodę z rozpuszczonymi w niej makro- (N, S, P, K, Na, Mg, Ca, Cl) i mikroelementami (B, Cu, Mn, Mo, Zn, Co, J, Al, Ni), źródło węgla (najczęściej sacharoza lub glukoza), witaminy, substancje wzrostowe. Spośród substancji wzrostowych stosuje się przede wszystkim auksyny i cytokininy, rzadziej gibereliny [30,152,2071].

Pożywki wzbogaca się często dodatkiem aminokwasów, kwasów nukleinowych, samej adeniny, oraz naturalnych kompleksów odżywczych, takich jak: odbiałczone mleczko kokosowe, mleczko kukurydziane, ekstrakt drożdżowy lub słodowy, maczka bananowa, hydrolyzat kazeiny, sok pomidorowy, produkty pszczele itp. Te naturalne ekstrakty, których skład chemiczny w większości nie został w pełni ustalony, są dodatkowym źródłem regulatorów wzrostu, witamin, aminokwasów, węglowodanów i tłuszczów [30,152].

Wymagania kultur pochodzących z różnych gatunków roślin są bardzo zróżnicowane. Dla optymalnego wzrostu tkanek należy dobrać m.in. odpowiedni skład podłoża, jego kwasowość, konsysten-

cje (podłoże płynne lub zestalone agarem), także właściwa temperatura, oświetlenie i wilgotność [30,152,207].

W pierwszym okresie rozwoju roślinnych kultur tkankowych pracowano z mało zróżnicowanymi tkankami o dużych zdolnościach proliferacji (tkanki merystematyczne i tumorowe). Opracowanie składu chemicznego licznych podłoży hodowlanych (m.in. pożywki White'a, Hellera, Gauthiereta, Wooda, Murashigé'a-Skooga, Linsmaiera-Skooga, Gamborga, Nitscha-Nitscha), pozwoliło na uzyskanie różnych rodzajów hodowli nieomal z wszystkich fragmentów roślin i tkanek [30,90,107,122,128,152,207].

Do najczęściej stosowanych w badaniach kultur tkankowych należą kultury kalusa. Tkanka kalusowa jest zespołem niezróżnicowanych komórek parenchymatycznych, mającym wygląd bezpostaciowej masy. W naturze występuje ona jako tkanka przyranna. Z kultur kalusowych można wyprowadzić inne rodzaje kultur in vitro, takie jak: kultury zawieszinowe komórek lub ich agregatów, kultury protoplastów, a także po doprowadzeniu do regeneracji organów lub całych roślin, prowadzić ich hodowlę. Kultury kalusowe prowadzone są głównie jako powierzchniowe kultury agarowe [204,205,207].

Biotechnologicznym wymogiem jest homogenność kultur komórkowych. Wymóg ten w mniejszym lub większym stopniu spełniają kultury zawieszinowe. Na większą skalę hodowle te prowadzone są w fermentorach o dużych pojemnościach (kilkaset dm³), stanowiąc źródło dla półprzemysłowego lub przemysłowego wykorzystania ich do produkcji masy tkankowej i metabolitów wtórnych [94,109,125,146,183,207].

5.3. Możliwości praktycznego wykorzystania

W okresie od pionierskich udanych eksperymentów White'a, Gauthereta i Nobécourta do dziś, nastąpił ogromny postęp w badaniach nad możliwościami praktycznego zastosowania kultur roślin wyższych *in vitro*. Opierają się one przede wszystkim na wykorzystaniu morfologicznej totipotencji komórek pochodzących z hodowli. Mniejsze są jak dotąd sukcesy związane z możliwościami wykorzystania biochemicznej totipotencji tych komórek.

Potencjalne korzyści jakie niesie ze sobą rozwijana i doskonalona ciągle technika roślinnych kultur *in vitro* są znaczne; oto niektóre z nich:

- szybkie wegetatywne rozmnażanie roślin użytkowych, ozdobnych, leczniczych
- pozyskiwanie materiału roślinnego niezależnie od pory roku i warunków klimatycznych, z ominięciem często długiego cyklu rozwojowego
- otrzymywanie roślin haploidalnych, homozygotycznych, diploidalnych, poliploidalnych
- odwirusowywanie roślin
- uzyskiwanie drogą selekcji bardziej wydajnych i odpornych na różne stresowe czynniki odmian
- fuzje protoplastów i uzyskiwanie w ich wyniku homo- lub heterokarionów (szansa produkcji mieszańców, jakich nie można otrzymać w normalnych warunkach płciowego rozmnażania)
- przeprowadzanie korzystnej transgenozy do protoplastów i do zregenerowanych z nich roślin
- magazynowanie plazmy zarodkowej
- wykorzystywanie biochemicznego potencjału hodowli jako nowego

źródła środków żywności, leków, środków zapachowych, barwników itp.

- pozyskiwanie nowych, nieznanych dotychczas w przyrodzie metabolitów wtórnych
- przeprowadzanie biotransformacyjnych reakcji dających możliwość uzyskania pożądaných metabolitów
- wykorzystywanie hodowli jako dogodnego materiału doświadczalnego dla badań podstawowych w zakresie cytologii, fizjologii, genetyki, biochemii roślin i in.

Większość przedstawionych powyżej możliwości wykorzystania kultur roślin wyższych *in vitro* nie znalazła jednak jeszcze na aktualnym etapie badań, szerokiego praktycznego zastosowania [12, 13, 19, 20, 30, 35, 45-48, 54, 72, 76, 102, 117, 126, 135, 137, 146-148, 158, 162, 174, 175, 184, 186, 202].

6. Metabolity wtórne w kulturach tkankowych roślin

Z farmaceutycznego punktu widzenia, z wymienionych powyżej możliwości praktycznego wykorzystania hodowli roślin *in vitro*, jedną z najistotniejszych jest produkcja związków biologicznie aktywnych.

Zagadnienie to było przedmiotem licznych opracowań. W różnych rodzajach roślinnych hodowli stwierdzono m.in. obecność: alkaloidów, glikozydów nasercowych, saponin, diantronów, benzo-, antra- i naftochinonów, flawonoidów, kumaryn, fitosteroli, terpenów, enzymów [12,13,20,35,45,47,48,54,72,117,125,126,137,146-148,174,186,192].

Interesujące farmakologicznie i handlowo metabolity wtórne, jeśli w ogóle znajdowane są w materiale tkankowym uzyskanym *in vitro*, to z reguły ich ilościowa zawartość jest mniejsza, w porównaniu z zawartością w roślinie macierzystej.

W kulturach tkankowych charakteryzujących się brakiem produkcji metabolitów wtórnych została potwierdzona obecność genów odpowiedzialnych za ich biosyntezę. Za przyczynę nieproduktywności lub niskiej produkcji aktualnie uważa się brak ekspresji genu, związanego ze specyficznymi enzymami wtórnego metabolizmu [35].

W warunkach hodowli *in vitro*, w większości przypadków stwierdza się, że morfologiczne zróżnicowanie tkanek sprzyja akumulacji metabolitów wtórnych. Ważność morfologicznego zróżnicowania dla normalnego funkcjonowania wtórnego metabolizmu tłumaczy się istotnym znaczeniem m.in. takich cech, jak: wzajemny przestrzenny układ enzymów, wzajemne rozmieszczenie substratów, enzymów i produktów czy też obecność specyficznych organeli, w których

możliwe jest gromadzenie metabolitów [35,45].

W hodowlach *in vitro* wykazano także zależność pomiędzy tempem wzrostu kultur, a stopniem akumulacji metabolitów wtórnych. Najczęściej szybkiemu wzrostowi tkanek towarzyszy zmniejszenie poziomu biosyntezy tych metabolitów. W szybko rosnących kulturach nie jest możliwe uzyskanie odpowiedniego stopnia agregacji komórek dla produkcji metabolitów wtórnych. W takich warunkach także drogi "pierwotnego" i "wtórnego" metabolizmu konkurują ze sobą, obserwuje się zmiany w aktywności pewnych enzymów, czego wynikiem jest realizacja głównie programu biosyntezy metabolitów podstawowych - źródła budulca dla nowo powstających komórek [121].

Warunki środowiska hodowlanego, takie jak m.in. światło, temperatura, podstawowy skład pożywek hodowlanych, specjalne kompozycje fitohormonów, obecność prekursorów, elicitorów czy długość cyklu hodowlanego mają także istotny wpływ na biosyntezę wtórnych metabolitów [35,72,117,121,125,174,186].

Nie jest łatwe rozstrzygnięcie czy oddziaływanie tych czynników na przebieg metabolizmu jest bezpośrednie czy wynika z ich wpływu na tempo wzrostu i morfologiczne zróżnicowanie tkanek [45].

Akumulacja wtórnych metabolitów na każdym etapie hodowli jest efektem dynamicznej równowagi pomiędzy procesami biosyntezy, biotransformacji i biodegradacji [35,125].

Pomimo zdecydowanej większości przykładów niskiego stopnia biosyntezy metabolitów wtórnych w hodowlach *in vitro*, istnieje pewna grupa połączeń produkowanych w ilościach dorównujących ich poziomowi w roślinach macierzystych, a nawet przewyższających ten poziom kilka- lub kilkunastokrotnie. Do 1982 roku było zna-

nych ok. 30 takich połączeń [175]. Pierwszymi metabolitami, których wysoką zawartość stwierdzono w warunkach hodowli *in vitro* były barwniki roślinne: antocyjany w kulturach *Haplopappus gracilis* i *Daucus carota*, betalainy w *Beta vulgaris*, antrachinony w *Morinda citrifolia*, *Cassia tora* i *Galium sp.* oraz naftochinony w kulturach *Lithospermum erythrorhizon*.

Kolejnymi ważnymi farmakologicznie metabolitami produkowanymi w dużych ilościach były m.in. ginseozydy uzyskane z hodowli *Panax ginseng*, diosgenina z *Dioscorea deltoidea*, *Dioscorea sylvatica*, *Momordica charantia* oraz *Trigonella foenum-graecum*, rezerpina z kultur *Rauwolfia serpentina*, ajmalicyna i serpentyna z *Catharanthus roseus*, nikotyna i ubichinon-10 z *Nicotiana tabacum*, wisnagina z *Ammi visnaga*, glicyryzyna z *Glycyrrhiza glabra*, kofeina z *Coffea arabica* oraz L-DOPA z kultur *Mucuna pruriens* [13,20,35,45,48,54,72,117,126,174,186].

Najbardziej imponującym przykładem wysokiej produkcji metabolitu wtórnego jest biosynteza kwasu rozmarynowego w ilości 15% w hodowlach *Coleus blumei*. W warunkach hodowli *in vitro* nie stwierdzono wyższego stężenia dla pojedynczego wtórnego metabolitu [13,35,54].

Możliwość uzyskania niektórych z w/w połączeń z kultur *in vitro* jest przedmiotem licznych patentów, szczególnie japońskich [126].

Hodowlane sukcesy wykorzystywane są już handlowo np. Mitsui Petrochemical Industries w Tokio produkuje od 1980 r. na skale przemysłową w fermentorach o pojemności 750 dm³ szikoninę - związek o właściwościach przeciwzapalnych i przeciwbakteryjnych, barwnik jedwabiu i kosmetyków, akumulowany w dużych ilościach przez hodowle zawieszinowe *Lithospermum erythrorhizon*. Sukces tej

hodowli jest tym większy, że *in vivo* dopiero 5-7-letnie rośliny mogą stanowić źródło pozyskiwania barwnika.

Inna japońska spółka - Nitto Denko Electric Company i radziecka Swoboda-Company, wykorzystują handlowo hodowlę *Panax ginseng* [12,175].

Tylko część z w/w hodowli charakteryzujących się wysokim poziomem biosyntezy metabolitów wtórnych, to niewyselekcjonowane, głównie kalusowe, sporadycznie zawieszinowe hodowle roślin. Większość pozytywnych wyników uzyskano po zastosowaniu metody selekcji "wysoko produkcyjnych" linii komórkowych [20,35,206].

Z reguły zespół wtórnych metabolitów występujących w kulturach roślin jest porównywalny pod względem jakościowym z kompozycją odpowiednich wtórnych metabolitów rośliny macierzystej.

Często stwierdza się jednak zmiany w ilościowej zawartości poszczególnych metabolitów. W kulturach *in vitro* pojawiają się ponadto związki, które nie występują w roślinach macierzystych, a nawet niespotykane w świecie roślin nowe połączenia. Do 1985 roku wyizolowano ponad 50 takich połączeń [12].

Do najbardziej znanych należą panikulidy A, B, C - laktony seskwiterpenowe z kultur tkankowych *Andrographis paniculata*, rutakultyna z *Ruta graveolens*, 19-epi-ajmalicyna z *Catharanthus roseus*, homodeoksyharringtonina z *Cephalotaxus harringtoni*, nor-sankwinaryna z *Papaver somniferum*, nowe putrescynowe pochodne z *Nicotiana sp.*, armoryna z *Stephania cepharantha*, czy perycyna z *Picralima nitida* [12,20,35,45,54,174].

Kilka spółek np. Kyovo Hakko (Japonia), Synthelabo (Francja), Nattermann (RFN), wykorzystuje techniki kultur *in vitro* w celu izolacji nowych roślinnych składników z interesującą biologiczną aktywnością [12].

Przyczyny pojawiania się w warunkach hodowli in vitro nowych związków, mogą być generalnie wyjaśnione zmienioną lokalizacją substratów i enzymów, albo transformacją akumulowanych intermedii do nowych wtórnych połączeń, w związku z uruchomieniem "milczących genów", które mogą kodować proteiny enzymów zdolnych do katalizy innych reakcji chemicznych [35,72].

Kultury tkankowe prócz zdolności do endogennej biosyntezy metabolitów wtórnych, posiadają także duży biologiczny potencjał do biotransformacji egzogennie dodanych naturalnych lub syntetycznych połączeń organicznych (z użyciem całych komórek lub izolowanych z nich enzymów). Głównymi typami obserwowanych in vitro reakcji są: oksydacja, redukcja, hydroksylacja, hydroliza, metylacja, demetylacja, izomeryzacja, epoksydacja i glikozydacja [12,20,54,72,117,137,148,186].

Spośród procesów interesujących ze względów farmaceutycznych, w ostatnich latach prowadzono intensywne badania nad glikozydacją aglikonów oraz różnymi typami biotransformacyjnych przemian m.in. steroidów i kardenolidów [12,13,20].

Wśród omawianych reakcji, hydroksylacja β -metylodigitoksyny w pozycji C-12, przez komórki hodowli zawiesinowych *Digitalis lanata*, prowadząca do powstania β -metylodigoksyny, ma szczególne znaczenie. Proces ten ma bliską perspektywę przemysłowego zastosowania [12,13].

7. Gatunki rodzaju *Ammi* obiektem badań *in vitro*

W literaturze można znaleźć kilka prac eksperymentalnych dotyczących hodowli *in vitro* *Ammi visnaga* [50,104,105,180,185].

Obiektem szczególnego zainteresowania w hodowlach tkankowych tego gatunku była możliwość biosyntezy związków farmakologicznie czynnych, pochodnych furanochromonu - keliny i wisnaginy [50,104,105,185].

Bardzo ubogie są natomiast informacje dotyczące hodowli tkankowych *Ammi majus* L. [50,84,165]. Dwie prace traktują o próbach indukcji poliembryonów i regeneracji roślin w hodowlach tkankowych *Ammi majus* L. (wyprowadzonych z zawiązków lub hypokotyli), jako potencjalnej możliwości mikrorozmnażania tego gatunku [84,165].

Jedną lakoniczną wzmianką dotyczy możliwości metabolizowania ^{14}C wisnaginy przez hodowle tkankowe *Ammi majus* L. i *Ammi visnaga*. W badaniach tych stwierdzono, że wisnagina była metabolizowana do nieokreślonych bliżej produktów charakteryzujących się większą polarnością niż substrat. Hodowle *Ammi majus* L., podobnie jak i hodowle *Ammi visnaga*, nie wykazywały oczekiwanej zdolności do biotransformacji wisnaginy w kelinę [50].

W literaturze nie znaleziono jednak żadnego opracowania warunków hodowli tkankowej *Ammi majus* L. ani też informacji dotyczących możliwości biosyntezy charakterystycznych dla rośliny macierzystej metabolitów wtórnych - furanokumaryn w hodowli *in vitro*.

8. Biosynteza i biotransformacje połączeń kumarynowych w roślinnych hodowlach tkankowych

Ze względu na ścisłe biogenetyczne powiązanie furanokumaryn z prostymi kumarynami uznano za celowe przedstawienie, oprócz prac dotyczących biosyntezy furanokumaryn w hodowlach roślin *in vitro*, także przykładów prac związanych z biosyntezą prostych kumaryn.

Liczne prace dotyczące możliwości produkcji prostych kumaryn prowadzono z różnymi gatunkami rodzaju *Nicotiana*.

W hodowlach tkankowych *Nicotiana tabacum* stwierdzono obecność kumaryny, umbeliferonu, eskuletyny, skopoletyny i różnych jej glikozydowych połączeń oraz bergaptenu [43,73,146,160,161,168]. Oprócz β -glukozydu skopoletyny, czyli skopoliny występuje w hodowlach *Nicotiana tabacum* także jej β -prymwerozyd, czyli fabiatryna i β -gencjobiozyd oraz czwarty niezidentyfikowany glikozyd [161].

W hodowlach *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica* stwierdzono głównie wysoką zawartość skopoliny, hodowle innych gatunków: *Nicotiana sanderae*, *Nicotiana glauca* i *Nicotiana affinis* produkowały głównie dorównujące poziomowi w roślinach macierzystych ilości skopoletyny [73,146,194]. W przypadku *Nicotiana affinis* dowiedziono, że biosynteza skopoletyny związana jest wyraźnie ze stopniem zróżnicowania tkanek [194].

Bardzo bogatym źródłem połączeń kumarynowych okazały się też kultury tkankowe *Ruta graveolens*. Wykazano w nich obecność kilkunastu różnych związków: bergaptenu, ksantotoksyny, psoralenu [37,119,149,151,178], rutamaryny, izopimpinliny [37,149,178], rutaretyny [149,151], chalepenzyny, 3-(1',1'-dimetyloallilo)-

herniaryny [37,149], eteru dimetylowego 3-(1',1'-dimetyloallilo)-dąfnetyny [37], 3-(1',1'-dimetyloallilo)-7,8-dimetoksykumaryny [119,149], herniaryny [151], skopoletyny i umbeliferonu [151,178].

Reinhard i in. [149] stwierdzili ponadto w hodowlach tego gatunku obecność innych związków, których struktura nie została do końca ustalona lub też potwierdzona całkowicie: dimetoksychalepenzyny, metoksychalepenzyny i hydroksyrutakultyny (gdzie położenie odpowiednio grupy $-OCH_3$ i $-OH$ jest sprawą otwartą), eteru metylowego graweliferonu i dąfnoretyny. Do grupy tych metabolitów dołączyć należy jeszcze 3 inne połączenia kumarynowe, których nie udało się zidentyfikować Kuzowkinie i in. [119] w korzeniowej kulturze *Ruta graveolens*.

W hodowlach *Ruta graveolens* stwierdzono ponadto obecność 3-(1',1'-dimetyloallilo)-skopoletyny, metabolitu który nie był znanym związkiem w rodzinie Rutaceae [37] oraz obecność nowego naturalnego związku 6,7-dimetoksy-3-(1,1-dimetyloallilo)-kumaryny, dla którego zaproponowano nazwę - rutakultyna [37,149,178].

Zawartość wymienionych połączeń kumarynowych w tkankach *Ruta graveolens* waha się w zakresie od setnych części mg do 220 mg/kg świeżej masy tkankowej [151,178].

Skromny w porównaniu z przedstawionym dla *Ruta graveolens* zespół kumarynowych połączeń stwierdzono w kalusie *Petroselinum sativum* pochodzenia korzeniowego, złożony z umbeliferonu, skopoletyny i bergaptenu [146].

Jakościowa i ilościowa zawartość poszczególnych kumarynowych metabolitów w kulturach tkankowych różnych gatunków roślin jest uzależniona od szeroko pojętych warunków hodowli, takich jak: skład pożywki, oświetlenie, temperatura, czas trwania hodowli

[73,149-151,160,168,185].

Prócz możliwości endogennej biosyntezy połączeń kumarynowych w warunkach hodowli *in vitro*, przedmiotem zainteresowania były także próby ustalenia dróg biosyntezy poszczególnych związków, z użyciem egzogennie podanych, najczęściej znakowanych izotopami prekursorów.

W wyniku badań z hodowlami *Nicotiana tabacum* zaproponowano główną drogę biosyntezy skopoletyny i jej β -glukozydu, rozpoczynającą się od fenyloalaniny, w której proces metylacji poprzedza cyklizację pierścienia laktonowego, a powstanie aglikonu reakcją β -glukozydacji. Kolejność tych reakcji jest bardzo istotnym problemem rozważanym przy ustalaniu dróg biosyntezy prostych kumaryn [74,123].

W eksperymentach z hodowlami *Ruta graveolens* stwierdzono, że bardzo dobrymi prekursorami czterech podstawowych furanokumaryn: psoralenu, ksantotoksyny, bergaptenu i izopimpineline były umbeliferon, 7-demetylosuberozyna i marmezyna. Psoralen był dobrym prekursorem bergaptenu i ksantotoksyny, ale nie izopimpineline [15]. Natomiast bardzo efektywnym prekursorem izopimpineline okazała się ksantotoksyna [42].

W innych eksperymentach z kulturami *Ruta graveolens*, umbeliferon był transformowany w herniarynę, 7-demetylosuberozynę, marmezynę i psoralen. Podane w roli substratów 4-metylo- i 8-metylo- pochodne umbeliferonu ulegały dokładnie analogicznym przemianom [180].

Z kultur zawiesinowych ruty wyodrębniono specyficzną dimetyloallilotransferazę. W obecności tego enzymu oraz jonów Mn^{+2} umbeliferon był transformowany wybiórczo w 7-demetylosuberozynę [64].

W eksperymentach z tkankami Ruty ogrodowej, 5-¹⁴C-kwas mewalonowy był tylko w minimalnym stopniu wbudowywany w furanokumaryny [15]. Odmienne rezultaty uzyskano w przypadku hodowli *Thamnosma montana*. Kwas ten okazał się specyficznym prekursorem pierścienia furanu i alkilowego oraz alkoksylowego bocznego łańcucha wyizolowanych trzech furanokumaryn: izopimpinliny, izoimperatoryny oraz eteru metylowego alloimperatoryny [118].

Ciekawym zagadnieniem było także porównywanie możliwości biotransformacji połączeń kumarynowych przez hodowle tkankowe różnych gatunków roślin [49,187].

Kumaryna podana jako substrat, była wybiórczo hydroksylowana przez komórki hodowli *Catharanthus roseus* i *Conium maculatum* w pozycji C-7, dając jako produkt biotransformacji umbeliferon. Hodowla *Apocynum cannabinum* nie wykazywała tej zdolności [49].

Podobnie hodowla *Lithospermum erythrorhizon* była jedyną spośród wielu przetestowanych hodowli, której komórki wykazywały zdolność wybiórczej glukozydacji 6,7-dihydroksykumaryny w pozycji C-6, dając z 60% wydajnością eskulinę, przy czym izomeryczny 7-glukozyd (cykoryna) nie był formowany [187].

III. CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

1. Hodowla tkankowa *Ammi majus* L.

1.1. Materiał i metodyka badawcza

Wszystkie czynności związane zarówno z założeniem hodowli *Ammi majus* L. in vitro, jak i z pasażowaniem tkanek wykonywano w warunkach sterylnych, w komorze z poziomym laminarnym nawiewem jałowego powietrza (komora f-my Mikroelektronik, NRD), używając wysterylizowanych roztworów i szkła.

1.1.1. Założenie hodowli

Hodowlę tkankową *Ammi majus* L. wyprowadzono z owoców otrzymanych z ogrodu botanicznego w Giessen (Botanischer Garten der J. Liebig Universität).

Owoce aminka poddawano chemicznej sterylizacji 70% roztworem etanolu przez kilka minut, a następnie 7% roztworem podchlorynu sodu przez okres 40 minut.

Wysterylizowane owoce wysiewano na jałowe szalki Petri'ego z krawkami bibuły filtracyjnej nawilżonymi roztworami kinetyny (Chemapol) i kwasu giberelinowego (Koch Light Lab.) w równych stężeniach (w zakresie 10^{-4} - 10^{-7} g/dm³), woda wodociągowa lub destylowana.

Wysiane owoce poddawane były działaniu niskiej temperatury (+4°C) przez 5-7 dni. Następnie przenoszono je do cieplarki, gdzie w temp. 26°C kiełkowały w okresie 2-6 tygodni w ok. 90%, co świadczyło o ich dużej energii i sile kiełkowania (ryc. 2).

Uzyskane delikatne siewki długości 3-4 cm, pocięto w warunkach sterylnych na fragmenty, które następnie przenoszono na

różne wersje pożywek inicjujących kalusowanie (por. tab. 2).

Na wybranych wersjach pożywek Linsmaiera-Skooga [122], fragmenty siewek kalusowały, szczególnie w części hypokotylowej (ryc. 3). Powstała tkanka kalusowa pochodzenia hypokotylowego udało się utrzymać przy życiu, uzyskując ciągła hodowle tkankowa Ammi majus L. Hodowle tę prowadzono przez okres ponad 3 lat, pasażując tkanki w odstępach 4-tygodniowych (ryc. 4, 5a, 5b).

1.1.2. Podłoża hodowlane

W celu zainicjowania kalusowania posłużono się wybranymi wersjami pożywek Linsmaiera-Skooga (L-S), zmodyfikowanej Murashige'a-Skooga [107,128] oraz Wooda [90] - por. tab. 2.

Wersje podłoża L-S okazały się korzystne dla założenia hodowli, jak i dla podtrzymania wzrostu tkanek.

Uzyskując dobry wzrost tkanek Ammi majus L. na wersjach podłoża L-S inicjujących kalusowanie, w dalszych pasażach zdecydowano się na przetestowanie licznych wersji tego podłoża, różniących się przede wszystkim jakościową i ilościową kompozycją substancji wzrostowych. Wersje te testowano zmieniając także inne warunki hodowlane; rodzaj hodowli i oświetlenie. Opisywane badania prowadzono w celu ustalenia optymalnych dla przyrostów masy tkankowej warunków hodowli Ammi majus L. in vitro.

Pożywki modyfikowano dodatkiem cytokinin: 6-benzyloaminopuryny (BAP)-Chemapol lub 6-furfuryloaminopuryny (kinetyna) oraz auksyn: kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D)-Fluka, kwasu β -indoliloctowego (IAA)-BDH, kwasu β -indolilo- γ -masłowego (IBA)-Merck lub kwasu α -naftylooctowego (NAA)-Fluka, w ilościach 0,1; 1,0; 5,0; 10,0 mg/dm³ pożywki.

W przypadku niektórych wersji stosowano dodatek specjalnych kompleksów odżywczych: mlecza kukurydzianego (prod. własna), wody kokosowej (Gibco Bio Cult), hydrolizatu kazeiny (BDH), ponadto kompleksu witamin (Polfa, zestaw witamin wg zmodyfikowanej pożywki Murashige'a-Skooga, por. tab. 2).

Hodowle prowadzono głównie na pożywkach agarowych, a następnie na pożywkach płynnych, zapewniających lepszą infiltrację składników odżywczych.

W różnych warunkach hodowlanych przetestowano łącznie 91 wersji pożywki L-S. Wersje przetestowanych podłoży hodowlanych przedstawia tab. Dwie wersje pożywek (wersje 21), zawierające kompleks witamin wg zmodyfikowanej pożywki Murashige'a-Skooga, w celu ułatwienia omawiania wyników potraktowano w niniejszej pracy, jako wzbogacone w witaminy modyfikacje pożywki L-S (por. tab. 2).

Hodowle agarowe (stałe)

Uzyskując bardzo korzystne wstępne wyniki w warunkach hodowli agarowych, przetestowano w nich największą liczbę wersji podłoży. Hodowle prowadzono na 40 wersjach pożywek zawierających kompozycje BAP z 2,4-D, IAA, IBA i NAA (tab. wersje 1-10). Dwanaście spośród tych wersji podłoży (tab. 3, wersje 2,5,6) przetestowano zarówno w warunkach świetlnych, jak i przy braku dostępu światła.

Osiem dodatkowych wersji podłoży uzyskano wzbogacając wersje 5, zawierające kompozycje BAP i IAA oraz BAP i IBA, na których obserwowano niskie stosunkowo przyrosty biomasy, w wyżej wymienione naturalne kompleksy odżywcze i witaminy (tab. 3, wersje 18-21).

Tab.2. Skład podłoży stosowanych w hodowli *Ammi majus* L. in vitro.

		Podłoża hodowlane			
		Linsmaiera - Skooga	Murashige a-Skooga zmodyfikowana	Wooda	
zawartość składników	mg/dm ³	sole mineralne	KNO ₃ - 19000,00	sole mineralne jak w pożywie Linsmaiera - Skooga	NaNO ₃ - 1800,00
			NH ₄ NO ₃ - 1650,00		KCl - 910,00
			CaCl ₂ ·2H ₂ O - 440,00		/NH ₄ / ₂ SO ₄ - 790,00
			MgSO ₄ ·7H ₂ O - 370,00		MgSO ₄ ·7H ₂ O - 737,00
			KH ₂ PO ₄ - 170,00		NaH ₂ PO ₄ - 316,50
			Na ₂ EDTA - 37,30		CaNO ₃ ·4H ₂ O - 288,00
			FeSO ₄ ·7H ₂ O - 27,80		Na ₂ SO ₄ - 200,00
			MnSO ₄ ·4H ₂ O - 22,30		KNO ₃ - 80,00
			ZnSO ₄ ·4H ₂ O - 8,60		NaFeEDTA - 55,50
			H ₃ BO ₃ - 6,20		MnSO ₄ ·H ₂ O - 5,00
			KJ - 0,83		ZnSO ₄ ·7H ₂ O - 2,70
			Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O - 0,25		H ₃ BO ₃ - 1,50
			CoCl ₂ ·6H ₂ O - 0,025		KJ - 0,75
			CuSO ₄ ·5H ₂ O - 0,025		
			węglowodany		sacharoza - 30000,00
mezo-inozytol-100,00	mezo-inozytol-100,00 ⁺	mezo-inozytol-100,00			
	amid kwasu nikotynowego - 2,00				
aktywniki organiczne	witaminy		biotyna - 1,00		
			cholina chlorek - 1,00		
			panotenan wapnia - 1,00	kwas nikotynowy - 0,50	
		tiamina·HCl - 1,00 ⁺	pirydoksyna fosforan - 1,00	pirydoksyna·HCl - 0,10	
			tiamina·HCl - 1,00	tiamina·HCl - 0,10	
			kwas foliowy - 0,50		
			ryboflawina - 0,50		
			cyjano-kobalamina - 0,0015		
				glikokol - 3,00	
aktywniki kininy	kompozycje inicjujace kalusowanie	1/ BAP - 0,4	1/ BAP - 1,0	1/ kinetyna - 0,5	
		2,4-D - 5,0	2,4-D - 5,0	NAA - 2,0	
		2/ kinetyna - 1,0	2/ kinetyna - 1,0	2/ kinetyna - 1,0	
		2,4-D - 5,0	2,4-D - 5,0	NAA - 2,0	
	kompozycje podtrzymujace wzrost	3/ BAP - 1,0	3/ 2,4-D - 1,0		
		NAA - 1,0			
		4/ BAP - 2,0	4/ BAP - 0,4		
		NAA - 2,0	2,4-D - 5,0		
		89 wersji, por. tab.3	1/++ BAP - 0,1		
			IBA - 0,1		
			2/++ BAP - 0,1		
			IAA - 0,1		

+ własne modyfikacje ilości składników

++ wersja 21 wg tab.3.

producenti: sole mineralne, sacharoza, glikokol - POCh,
mezo-inozytol - Merck, pozostali producenti w tekście.

Tab.3. Wersje podłoża Linsmaiera-Skooga testowane w hodowli tkankowej Ammi majus L.

nr wersji pożywki	zawartość składników /mg/dm ³ /		
	auksyny	kininy	inne składniki
	2,4-D, IAA, IBA, NAA	BAP, kinetyna	
1.	1,0	10,0	
2.	5,0	5,0	
3.	10,0	1,0	
4.	1,0	1,0	
5.	0,1	0,1	
6.	5,0	1,0	
7.	1,0	5,0	
8.	10,0	10,0	
9.	10,0	5,0	
10.	5,0	10,0	
11.	1,0	-	
12.	5,0	-	
13.	10,0	-	
14.	-	1,0	
15.	-	5,0	
16.	-	10,0	
17.	-	-	
18.	0,1	0,1	woda kokosowa -10000,0
19.	0,1	0,1	mleczko kukurydziane-10000,0
20.	0,1	0,1	hydrolizat kazeiny - 100,0
21.	0,1	0,1	kompleks witamin ⁺
22.	0,1	0,1	umbeliferon - 25,0
23.	0,1	0,1	umbeliferon - 50,0
24.	0,1	0,1	umbeliferon - 100,0
25.	0,1	0,1	umbeliferon - 200,0

Objaśnienia: wersje 18-21 - komp. IAA z BAP oraz IBA z BAP,
wersje 22-25 - komp. IBA z BAP,
⁺skład wg zmodyfikowanej poź. Murashige'a -
Skooga, por. tab.2.

Przetestowano także 20 wersji podłoży zawierających kompozycje kinetyny z dwoma auksynami - z IAA i IBA (tab. 3, wersje 1-10).

Obserwowano ponadto przyrosty masy tkankowej na 18 wersjach pożywek zawierających różne stężenia (1,0; 5,0; 10,0 mg/dm³) pojedynczych substancji wzrostowych (tab. 3, wersje 11-16) oraz na pożywce pozbawionej auksyn i cytokinin (tab. 3, wersja 17).

Hodowle płynne stacjonarne

Hodowle płynne stacjonarne prowadzono na wybranych wersjach podłoży hodowlanych, spośród przetestowanych w hodowlach agarowych. Były to wersje pożywek zawierające kompozycje BAP z wszystkimi czterema auksynami (wersje 1-8) oraz wersja 17, bez dodatku substancji wzrostowych (por. tab. 3).

Hodowle zawiesinowe

Z powodu umiarkowanie korzystnych wstępnych rezultatów w przyrostach biomasy w warunkach hodowli zawiesinowych, obserwowano wzrost tkanek na czterech wersjach podłoży. Podłoża te zawierały kompozycje BAP i IAA (wersje 2, 3) oraz BAP i IBA (wersje 5,6) - por. tab. 3.

Do hodowli zawiesinowych w celu stymulacji biosyntezy furanokumaryn, dodawano biogenetycznego prekursora tych związków - umbeliferonu (Fluka) w ilościach 25,0; 50,0; 100,0 i 200,0 mg/dm³ pożywki. Hodowle te stanowiły 4 nowe, specyficzne wersje podłoży (tab. wersje 22-25).

Przy sporządzaniu pożywek korzystano z przygotowanych uprzednio sterylnych roztworów zapasowych soli mineralnych, kinin,

auksyn, kompleksu witamin, tiaminy oraz mlecza kukurydzianego przechowywanych w temp. +4°C.

Jedynie w przypadku wody kokosowej stosowano gotowy sterylizowany produkt firmowy. Do zestalenia pożywek używano 0,8% agaru (Difco).

Po połączeniu wszystkich składników pożywek, ustalano ich pH w granicach 5,6 - 5,8, a następnie sterylizowano w autoklawie Mini A-10 pod ciśnieniem 0,1 MPa przez 20 minut.

Kompleks witamin, mleczo kukurydziane oraz wodę kokosową, dodawano w warunkach aseptycznych do wysterylizowanych uprzednio pożywek.

W przypadku hodowli zawieszonych prowadzonych z umbeliferonem, dodawano jego roztworów w trakcie trwania hodowli, używając sterylnych sączków membranowych Synpor-Membranfilter 0,23 µm (Chemapol).

1.1.3. Inne warunki hodowlane

W celu optymalizacji warunków hodowli in vitro badanego gatunku, prowadzono obserwacje wzrostu tkanek w rodzajach hodowli: w hodowlach agarowych (stałych), płynnych stacjonarnych i zawieszonych.

W pierwszym etapie prowadzono hodowlę agarową, później płynną stacjonarną. Te ostatnie stanowiły najczęściej materiał wyjściowy do założenia hodowli zawieszonych.

Badano także wpływ warunków świetlnych na przyrosty masy tkankowej *Ammi majus* L.

Hodowle agarowe

Hodowle agarowe prowadzono w szalkach Petri'ego o średnicy 8 cm (ryc. 4,5a), w szafach hodowlanych, w temp. $26 \pm 2^\circ\text{C}$ w warunkach ciągłego oświetlenia pochodzącego z lamp jarzeniowych (typ LF-LL, 40 W, Polamp), o natężeniu ok. 900 lx.

Część hodowli agrowych, w celu zbadania wpływu światła na przyrosty masy tkankowej prowadzono w ciemności, w identycznej temperaturze, jak hodowle z warunków świetlnych (12 wersji podłoża L-S, por. rozdz. 1.1.2).

Hodowle płynne stacjonarne

Hodowle płynne stacjonarne prowadzono w szalkach Petri'ego o średnicy 10 cm, zawierających szklane rurki w kształcie litery "U" owinięte bibułą filtracyjną, ułatwiające utrzymanie się tkanek na powierzchni pożywki, której objętość wynosiła ok. 20 cm³ (ryc.5b).

Omaiwane hodowle prowadzono w szafach hodowlanych w identycznych warunkach temperaturowych i świetlnych, jak "świetlne" hodowle agarowe.

Hodowle zawieszinowe

Hodowle zawieszinowe prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 300 cm³ zawierających po 50 cm³ pożywki, w warunkach temperatury i oświetlenia opisanych dla "świetlnych" hodowli agarowych. Kolby hodowlane wytrząsano na wstrząsarkach (typ 357, Unipan) z częstotliwością ok. 100 obr./min.

Hodowle zawieszinowe z dodatkiem umbeliferonu

Po 7-dniowym okresie wzrostu tkanek w warunkach opisanych dla

hodowli zawieszinowych, do kolb hodowlanych dodawano 1% roztworu umbeliferonu w 96% etanolu, w ilościach odpowiadających 25,0; 50,0; 100,0 i 200,0 mg prekursora w 1 dm³ pożywki.

Równocześnie z właściwymi hodowlami eksperymentalnymi prowadzono hodowle kontrolne. Stanowiły je hodowle zawieszinowe rosna- ce na pożywce nie zawierającej umbeliferonu.

Celem wykluczenia ewentualnych reakcji prekursora ze składni- kami pożywki, same pożywki (bez tkanek) wytrząsano z roztworami umbeliferonu dodanymi w ilościach analogicznych, jak w przypadku właściwych hodowli eksperymentalnych

Hodowle eksperymentalne oraz hodowle kontrolne likwidowano po 21 dniach od dnia podania umbeliferonu.

1.1.4. Pomiary przyrostów masy tkankowej

W celu ustalenia optymalnych dla przyrostów masy tkankowej warunków hodowli *Ammi majus* L. in vitro, w kolejnych pasażach określano przyrosty masy na testowanych wersjach podłoża L-S.

Hodowle agarowe i płynne stacjonarne

Zarówno w przypadku hodowli agarowych, jak i płynnych stacjo- narnych pobierano do pasażowania po 2 g tkanek (masa wyjściowa). Dokładnie po upływie 4 tygodni wyznaczano świeżą masę przyro- słych tkanek (masa końcowa). W oparciu o nią obliczano, spośród przedstawionych przez Stabę [173] możliwości wyrażania wzrostu tkanek kalusowych, wskaźniki przyrostu (growth increments). War- tości wskaźników przyrostu liczone wg wzoru podanego przez Kleina [110]:

$$\text{wskaźnik przyrostu /Wp/} = \frac{\text{masa końcowa (g)} - \text{masa wyjściowa (g)}}{\text{masa wyjściowa (g)}} \cdot 100$$

Wskaźnik przyrostu określa ile powiększy się masa 100 g tkanki, po danym okresie wzrostu. Wielkość ta została wprowadzona przez Kleina w 1963 r.; jest ona dość często używana do pomiaru wzrostu kalusa.

Obliczone wartości wskaźników przyrostu tkanek na testowanych wersjach pożywek są średnimi arytmetycznymi uzyskanymi przeciętnie z 30-40 pomiarów pochodzących z 3-4 pasaży (pasaże 9-13), por. tab. 4-7

Część zważonych tkanek stanowiła materiał wyjściowy do kolejnych pasaży, część z nich suszono w temp. 100°C przez 1 h, a następnie w temp. 70-80°C, do uzyskania stałej masy (ok. 24 h).

Wysuszone tkanki po zważeniu wykorzystywano do określenia stopnia wilgotności tkanek rosnących w różnych warunkach hodowlanych. Obliczone procentowe zawartości wody w tkankach są także średnimi arytmetycznymi uzyskanymi przeciętnie z 30-40 pomiarów pochodzących z 3-4 pasaży (pasaże 9-13), por. tab. 4-7

W następnym etapie wysuszone tkanki stanowiły materiał do analizy fitochemicznej

Hodowle zawiesinowa

W przypadku hodowli zawiesinowych przyrosty biomasy określano wybierając dwie spośród stosowanych metod: pomiar liczby komórek metodą wg Henshaw i in. [94] oraz obliczając procent suchej masy.

W celu pomiaru liczby komórek, z hodowlanych kolb pobierano sterylnie za pomocą strzykawki 2 cm³ zawiesiny i wprowadzano ją do kolbek o poj. 100 cm³. Po dodaniu do kolbek 10 cm³ 8% trój-

tlenku chromu, ogrzewano je na łaźni wodnej o temp. 70°C przez 15 min. Ogrzewanie z kwasem chromowym powodowało macerację tkanek, co ułatwiało liczenie komórek.

Następnie kolbki wytrząsano przez ok. 10-15 min, na wstrząsarce, co powodowało rozbitcie agregatów. Potem zawartość kolbek rozcieńczano wodą do odpowiedniej objętości (25-100 cm³).

Komórki liczone w komorze Fuchs-Rosenthala (Fein-Optik, NRD). Siatka komory składa się z 16 dużych kwadratów łącznej objętości 3,2 mm³. Zawiesinę oglądano przy 120-krotnym powiększeniu mikroskopowym. Liczone komórki wewnątrz kwadratów siatki nie dotykające żadnego boku i wszystkie, które dotykały prawego i dolnego boku (ryc. 8).

Dla każdej próby wykonywano 10 preparatów, z których obliczono średnią liczbę komórek (x) w 1 cm³ zawiesiny wg wzoru:

$$x = y \frac{d}{0,0032} \quad \text{gdzie:}$$

y - średnia liczba komórek w komorze

$$d = \frac{\text{końcowa objętość próby (25 - 100 cm}^3 \text{)}}{\text{objętość pobranej zawiesiny (2 cm}^3 \text{)}}$$

0,0032 - objętość komory w cm³

Liczbę komórek obliczano co 2-3 dni, rozpoczynając od pierwszego dnia hodowli, a kończąc na 28 dniu (por. ryc. 21).

Pomiary liczby komórek prowadzono także w serii hodowli z dodatkiem umbeliferonu.

Po zakończeniu cyklu hodowlanego, tkanki z kolb hodowlanych oddzielano od pożywek, odsączając je na lejkach Büchnera wyłożonych wysuszonymi i zważonymi sączkami. Następnie sączi z tkan-

kami suszono do stałej masy w temp. 70-80°C (ok. 24 h), z której obliczano procent suchej masy.

Obliczanie procentu suchej masy w celu oceny wzrostu kultur zawieszinowych jest wskazane, gdyż jej wzrost nie zawsze odpowiada wzrostowi liczby komórek [94].

1.1.5. Badania morfologiczne i anatomiczne tkanek z hodowli *in vitro*

W przypadku wszystkich zastosowanych warunków hodowlanych, prowadzono w trakcie kolejnych pasażów obserwacje makroskopowego wyglądu tkanek, zwracając szczególną uwagę na ich konsystencję, kolor, stopień wilgotności oraz zdolność do morfogenezy. Wybiórczo prowadzono także anatomiczne obserwacje, sporządzając preparaty rozmazowe z materiału tkankowego pochodzącego z różnych warunków hodowlanych. Preparaty barwiono w celu stwierdzenia obecności elementów zdrewniałych oraz zawartości materiałów zapasowych (skrobi i tłuszczów) następującymi odczynnikami [38]:

- 1) roztworem floroglucynolu z kwasem siarkowym
- 2) płynem Lugola
- 3) Sudanem III.



1.2. Omówienie wyników hodowli

1.2.1. Inicjacja kalusowania

Spośród przetestowanych wersji pożywek Linsmaiera-Skooga, zmodyfikowanej Murashige'a-Skooga oraz Wooda (łącznie 10 wersji, por. tab. 2), inicjujących kalusowanie w przypadku innych gatunków roślin, jedynie wybrane wersje pożywek L-S sprzyjały kalusowaniu fragmentów siewek *Ammi majus* L. [61,62]. Były to wersje pożywek z kompozycjami BAP i NAA, szczególnie wersja zawierająca po 2,0 mg/dm³ każdej z tych substancji wzrostowych (ryc. 3).

1.2.2. Hodowle agarowe prowadzone w obecności światła

1.2.2.1. Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP

i auksyn

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i 2,4-D

Na testowanych podłożach uzyskano niezróżnicowaną tkankę kalusową zielonej barwy, z tendencją do szarzenia przy wyższych stężeniach substancji wzrostowych (wersje 9,10), o bardziej lub mniej zwartej konsystencji i stosunkowo małej wilgotności (94,5% - 96,4%, tab. 4). Jedynie na podłożu zawierającym najmniejsze testowane ilości obu substancji wzrostowych, po 0,1 mg/dm³ (wersja 5), obserwowano niekiedy tendencje do morfogenezy.

Średnie wartości Wp uzyskane dla tkanek rosnących na tych wersjach podłoży wynosiły od 148,8 do 415,0 (tab. 4, ryc. 13).

Wyższe wartości Wp stwierdzono w przypadku pożywek zawierających jednakowe ilości obu substancji wzrostowych w zakresie 0,1 - 1,0 mg/dm³ (wersje 5,4), a także w przypadku 5-krotnie

większego stężenia kininy w stosunku do auksyny (wersja 7). Maksymalny przyrost biomasy zanotowano w przypadku jednakowych, najniższych testowanych stężeń BAP i 2,4-D (wersja 5).

Najmniejsze przyrosty obserwowano na pożywkach z wysokimi stężeniami (po 10,0 mg/dm³) kininy i auksyny (wersja 8), a także w przypadku 10- i 2-krotnej różnicy stężeń pomiędzy substancjami wzrostowymi (wersje 1,3,9,10).

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i IAA

W hodowlach tych uzyskano chlorofilową tkankę kalusową o różnym stopniu wilgotności (94,5 - 97,1%, tab. 4), o zmieniającej się strukturze od puszystej i luźnej (wersje 2,7) do grudkowej i zwartej (wersje 5,6,9,10).

Tkanka rosnąca na podłożu zawierającym po 0,1 mg/dm³ kininy i auksyny (wersja 5) wyróżniała się żywo zieloną barwą oraz nieznaczną zdolnością do morfogenezy.

Większość uzyskanych wartości Wp dla tkanek rosnących na tych wersjach podłoży hodowlanych należała do bardzo wysokich (powyżej 500,0), jakkolwiek wahały się one w szerokich granicach od 252,4 do 650,8 (tab. 4, ryc. 14).

Wysokie wartości Wp stwierdzono w przypadku jednakowych, wysokich stężeń (5,0 i 10,0 mg/dm³) obu substancji wzrostowych (wersje 2,8), a także w przypadku 10- i 5-krotnie większego stężenia auksyny w stosunku do kininy (wersje 3,6).

Ekstremalnie niską wartość Wp uzyskano w przypadku wersji zawierającej najmniejsze testowane stężenia (po 0,1 mg/dm³) BAP i IAA (wersja 5).

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i IBA

Rosnące na tych podłożach niezróżnicowane tkanki kalusowe, zmieniającym się zabarwieniu od biało-zielonego (wersje 1,2,8, 10), poprzez zielone do intensywnie zielonego (wersje 4,5,6,7), posiadały najczęściej puszystą, mało zwartą konsystencję; wyjątkowo tylko strukturę małych, twardych grudek (wersja 5).

Jedynie na podłożu zawierającym 0,1 mg/dm³ BAP i 0,1 mg/dm³ IBA obserwowano sporadycznie procesy różnicowania tkanek (ryc. 9a,9b). Wilgotność tkanek wahała się w granicach od 95,7% do 97,2% (tab. 4).

Na przetestowanych wersjach podłoży uzyskano wartości Wp dla tkanek w zakresie od 265,9 do 663,3 (tab. 4, ryc. 15).

Maksymalny przyrost biomasy zanotowano w przypadku jednakowo niskich stężeń (po 1,0 mg/dm³) kininy i auksyny.

Nieco niższe wartości uzyskano na pożywkach z 5-krotnie większą ilością jednej z substancji wzrostowych w stosunku do drugiej (wersje 6,7), a także w przypadku jednakowo wysokich stężeń kininy i auksyny, po 10,0 mg/dm³ (wersja 8).

Jedne z najmniejszych wartości Wp zanotowano w przypadku podłoży z 2-krotną różnicą poziomu stężeń pomiędzy obu substancjami wzrostowymi (wersje 9,10).

Ekstremalnie niski przyrost biomasy charakterystyczny był dla tkanek z pożywki zawierającej najmniejsze spośród stosowanych stężenia kininy i auksyny (wersja 5).

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i NAA

Testując kompozycje BAP i NAA, uzyskano tkankę kalusową o puszystej i sypkiej (wersje 2,3,9,10), zbitej i twardej (wersje 1, 6) lub gródkowej strukturze (wersja 5), o zabarwieniu biało-zie-

lonym (wersje 9,10), zielonym (większość wersji) lub intensywnie zielonym (wersja 5).

Różnicowanie tkanek obserwowano jedynie na podłożu zawierającym po 0,1 mg/dm³ BAP i NAA (wersja 5). Wilgotność tkanek była bardzo zmienna i wahała się w granicach 92,5 - 97,0% (tab. 4).

W tej serii przetestowanych pożywek, tylko dla jednej wersji zawierającej po 1,0 mg/dm³ BAP i NAA (wersja 4) zanotowano wartość Wp przekraczającą 600,0 (651,9). Pozostałe wartości Wp były zdecydowanie mniejsze i wahały się w szerokich granicach od 101,8 do 533,3 (tab. 4, ryc. 16). Wysokie przyrosty biomasy notowano przy 10- i 5-krotnie większym stężeniu NAA w stosunku do BAP w podłożu hodowlanym. (wersje 3,6; ryc. 4,5a).

Jedną z najmniejszych wartości Wp uzyskano dla wersji zawierającej najniższe stężenia (po 0,1 mg/dm³, wersja 5) obu substancji wzrostowych (Wp=324,0). Zdecydowanie najniższe wartości Wp stwierdzono w przypadku wysokiego stężenia BAP (10,0 mg/dm³) w kompozycji z 10,0 mg/dm³ i 1,0 mg/dm³ NAA (wersje 8,1).

1.2.2.2. Hodowle na podłożach z dodatkiem naturalnych kompleksów odżywczych i witamin

Na podłożach z dodatkiem wody kokosowej uzyskano zielony, zwarty kalus, o średniej wilgotności (96,5 i 97,3%), z niewielką tendencją do różnicowania.

W przypadku mlecza kukurydzianego uzyskano średnio wilgotny (96,7%), powierzchniowo zielony lecz od spodu żółknięjący, a w przypadku hydrolizatu kazeiny wilgotny (97,2 i 97,3%), zielony kalus o strukturze drobnych, twardych grudek, wykazujący sporadycznie tendencje do różnicowania.

Dodatek kompleksu witamin stymulował różnicowanie się mało wilgotnego (94,6 i 95,1%) grudkowego kalusa, lecz równocześnie powodował jego brunatnienie (tab. 5).

Podłoża hodowlane wzbogacone w naturalne kompleksy odżywcze wpłynęły korzystnie na przyrosty biomasy (wartości Wp w zakresie 442,9 - 544,9; por. tab. 5, ryc. 20).

Najlepsze efekty, w postaci 1,8 - 2,2-krotnego wzrostu wartości Wp w porównaniu z pożywkami podstawowymi ("kontrola"), obserwowano na podłożach zawierających wodę kokosową. Wpływ mlecza kukurydzianego oraz hydrolizatu kazeiny na przyrosty tkanek był mniejszy (1,1 - 1,8-krotnie większe wartości Wp).

Stymulujący wpływ użytych kompleksów odżywczych na przyrost masy tkankowej był zdecydowanie większy w przypadku wersji pożywek zawierających kompozycje BAP i IAA (1,8 - 2,2-krotnie większe wartości Wp), w porównaniu z kompozycjami BAP i IBA (1,1 - 1,2-krotnie większe wartości Wp) - por. ryc. 20.

Dodatek kompleksu witamin wyraźnie hamował przyrosty biomasy, a nawet powodował obumieranie tkanek.

1.2.2.3. Hodowle na podłożach zawierających kompozycje kinetyny i auksyn

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje kinetyny i IAA

Rosnąca na tych podłożach tkanka kalusowa posiadała zielone zabarwienie, strukturę twardych, drobnych grudek, wilgotność zmieniającą się w szerokim zakresie od 92,5% do 96,5% (tab. 4). Zdolność do morfogenezy obserwowano sporadycznie (wersje 2,9).

Uzyskane na tych podłożach wartości Wp wahały się w granicach od 103,3 do 491,0 (tab. 4, ryc. 17).

Wysokie wartości Wp zanotowano w przypadku jednakowych stężeń kininy i auksyny w zakresie 1,0 - 5,0 mg/dm³ (wersje 4,2), a także dla podłoża z 5- i 2-krotnie większym stężeniem IAA w stosunku do stężenia kinetyny (wersje 6,9).

Wśród wersji pożywek zawierających większe stężenia kinetyny w porównaniu z auksyną, jedynie w przypadku 2-krotnej jego przewagi uzyskano wysoką wartość Wp (wersja 10).

Na wersjach z 5- i szczególnie z 10-krotnie większym stężeniem kinetyny, w porównaniu ze stężeniem IAA, przyrosty tkanek były bardzo niskie (wersje 7,1).

Bardzo niski przyrost biomasy był charakterystyczny także dla podłoża zawierającego po 0,1 mg/dm³ kinetyny i IAA (wersja 5) oraz dla podłoża z 1,0 mg kinetyny i 10,0 mg IAA w 1 dm³ (wersja 3).

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje kinetyny i IBA

Na tych wersjach podłoży uzyskano tkankę o zabarwieniu biało-żółto-zielonym (wersje 1,2,7), zielonym (wersje 3,4,6,8,9,10) lub żywo zielonym (wersja 5), o strukturze małych grudek, o zróżnicowanej wilgotności (94,9 - 97,3%, tab. 4), ze sporadyczną tendencją do morfogenezy (wersje 2,4,5).

Na 10 przetestowanych wersjach pożywek zanotowano wartości Wp w szerokich granicach, od 182,7 do 589,6 (tab. 4, ryc. 18).

Wyższe przyrosty biomasy (Wp > 400,0) notowano na pożywkach z 2-, 5- i 10-krotną ilościową przewagą stężenia kininy nad stężeniem auksyny (wersje 10,7,1).

Ekstremalnie wysokie przyrosty masy tkankowej obserwowano na podłożu zawierającym 10,0 mg/dm³ kinetyny i 5,0 mg/dm³ IBA (wersja 10, Wp=589,6);

Najmniejsze wartości Wp uzyskano w przypadku pożywek zawierających jednakowe stężenia kininy i auksyny, po 0,1; 5,0 i 10,0 mg/dm³ (wersje 5,2,8), szczególnie niskie przy stężeniach obu substancji wzrostowych wynoszących 0,1 mg i 10,0 mg/dm³ pożywki.

1.2.2.4. Hodowle na podłożach zawierających pojedyncze substancje wzrostowe

Podłoża zawierające BAP

Tkanki kalusowe z tych podłoży posiadały dość dużą wilgotność (96,3 - 97,5%, tab. 6), zwartą, twardą strukturę. Przy wyższych stężeniach BAP (głównie 5,0 mg/dm³) obserwowano sporadycznie procesy morfogenezy.

Wzrostowi stężenia kininy w podłożu towarzyszyła zmiana barwy tkanek z żywo zielonej, poprzez biało-zieloną do zielono-żółto-brunatnej.

Na podłożach z BAP uzyskano wysokie wartości Wp, od 328,0 do 552,0 (tab. 6). Najwyższe przyrosty masy tkankowej obserwowano przy stężeniu BAP równym 5,0 mg/dm³, zdecydowanie niższe przy ekstremalnych testowanych stężeniach (1,0 i 10,0 mg/dm³).

Podłoża zawierające kinetyne

Na omawianych wersjach pożywek otrzymano tkanki kalusowe o strukturze małych grudek i wzrastającym wraz ze wzrostem stężenia kininy stopniu twardości. Tkanki te, o małej wilgotności (92,8 - 95,1%, tab. 6), posiadały zmieniające się wraz ze wzrostem stężenia kinetyny zabarwienie, od żywo zielonego (1,0 mg/dm³) do żółto-zielonego (5,0 i 10,0 mg/dm³).

W przyrostach biomasy obserwowano 10-krotny spadek wartości

Wp wraz ze wzrostem jej stężenia w podłożu, od wartości 292,0 (przy 1,0 mg/dm³) do wartości 28,8 (przy 10,0 mg/dm³). Wyraźny (4-krotny) spadek wartości Wp był widoczny już przy wzroście stężenia kinetyny w podłożu z 1,0 mg do 5,0 mg/dm³ - tab. 6.

Podłoża zawierające 2,4-D

Nieźródnicowane, zwarte tkanki kalusowe rosnące na tych podłożach posiadały niską wilgotność (92,9 - 93,5%, tab. 6) i zabarwienie zmieniające się wraz ze wzrostem stężenia auksyny, od zielono-żółtego, poprzez zielono-szare aż do brunatnego.

Na podłożach zawierających 2,4-D uzyskano bardzo niskie przyrosty biomasy (wartości Wp w zakresie 30,0 - 93,5), należące do najniższych spośród uzyskanych na wszystkich 91 testowanych podłożach (tab. 6). Wraz ze wzrostem stężenia tej auksyny w podłożu hodowlanym obserwowano stopniowy spadek przyrostów biomasy.

Podłoża zawierające IAA

Na tych wersjach podłoży uzyskano kalus w kolorze żywo zielonym, o strukturze małych grudek, łatwo oddzielających się od siebie, ze zdolnością do morfogenezy malejąca wyraźnie wraz ze wzrostem stężenia auksyny. Wilgotność uzyskanych tkanek wahała się w granicach 94,5 - 96,3% (tab. 6).

Na pożywkach zawierających tę auksynę uzyskano wartości Wp w zakresie 272,5 - 349,9. Wartości Wp malały stopniowo wraz ze wzrostem stężenia IAA w podłożu (tab. 6).

Podłoża zawierające IBA

W przypadku wszystkich testowanych stężeń IBA uzyskano zielony, kruchy kalus, o wilgotności w granicach 94,9 - 95,5 %

(tab. 6), posiadający strukturę małych grudek, wykazujący zdolności do różnicowania.

Dodatek tej auksyny w podłożach hodowlanych powodował przyrosty biomasy na poziomie uzyskanym dla IAA ($W_p = 208,5 - 382,2$; tab. 6).

Maksymalne przyrosty tkanek notowano przy najniższym testowanym stężeniu auksyny ($1,0 \text{ mg/dm}^3$, wersja 11), najmniejsze w przypadku podłoża zawierającego $5,0 \text{ mg/dm}^3$ IBA (wersja 12).

Podłoża zawierające NAA

Rosnące na tych podłożach tkanki kalusowe zielonej barwy, o zawartości wody od 95,4 do 96,5% (tab. 6) posiadały strukturę małych, zwartych grudek łatwo oddzielających się od siebie. Tkanki te wykazywały zdolność do morfologicznego różnicowania przy wyższych stężeniach auksyny ($10,0 \text{ mg/dm}^3$).

Przy wszystkich stężeniach NAA uzyskano wartości W_p wyższe od 300,0 (tab. 6).

Stwierdzono praktycznie jednakowy wpływ tej auksyny na przyrosty biomasy, niezależny od jej stężenia w podłożu hodowlanym.

Podłoże bez substancji wzrostowych

Na podłożu pozbawionym substancji wzrostowych uzyskano tkankę o intensywnie zielonym zabarwieniu, posiadającą strukturę twardych, drobnych grudek o dość dużej wilgotności (96,1%), ze sporadyczną tendencją do różnicowania.

Dla tkanek rosnących na tym podłożu otrzymano wartość W_p równą 222,7

1.2.3. Hodowle agarowe prowadzone bez dostępu światła

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i 2,4-D

W tych hodowlach otrzymano niezróżnicowany kalus o zabarwieniu zielono-żółtym (wersja 5) lub zielono-szarym (wersje 2,6), którego wilgotność wahała się w granicach 95,5 - 96,2% (tab. 7).

Uzyskane wartości Wp w zakresie od 151,4 do 171,0 (tab. 7) okazały się w przypadku wszystkich testowanych wersji zdecydowanie mniejsze, w porównaniu z odnośnymi wartościami Wp uzyskanymi w kulturach prowadzonych w warunkach świetlnych (ryc. 19).

Największą różnicę w przyrostach biomasy (2,7-krotne mniejszą wartość Wp) obserwowano w przypadku podłoża zawierającego po 0,1 mg/dm³ obu substancji wzrostowych - wersja 5.

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i IAA

Rosnące w tych warunkach tkanki kalusowe posiadały zabarwienie żółto-zielone (wersja 5) lub żółte (wersje 2,6), luźną strukturę, zróżnicowaną wilgotność w zakresie 96,1 - 97,1% (tab. 7).

Wartości Wp na przetestowanych wersjach podłoża hodowlanych były zróżnicowane od 404,0 do 684,5 (tab. 7).

Brak dostępu światła sprzyjał przyrostom biomasy na pożywkach z jednakową ilościowo zawartością kininy i auksyny (wersje 2,5). Wpływ ten był szczególnie wyraźny w przypadku podłoża zawierającego po 0,1 mg/dm³ obu substancji wzrostowych (wersja 5), na którym notowano 1,6-krotnie większe wartości Wp, w porównaniu z ich odpowiednikami z hodowli prowadzonych w warunkach świetlnych.

Na podłożu z 5-krotnie większym stężeniem IAA w stosunku do BAP (wersja 6), obserwowano hamujący wpływ braku światła na

przyrosty biomasy (ryc. 19).

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i IBA

Nieźródnicowane tkanki kalusowe uzyskane na tych podłożach, o zabarwieniu żółtym (wersja 5) lub szaro-żółtym (wersje 2,6), charakteryzowały się zwartą strukturą i dużą wilgotnością (97,1-97,3%, tab. 7).

Na testowanych podłożach uzyskano wartości Wp w granicach od 455,0 do 561,0 (tab. 7).

W przypadku pożywek zawierających po 5,0 mg/dm³ IBA i 5,0 lub 1,0 mg/dm³ BAP (wersje 2,6), zmiana warunków świetlnych nie wpłynęła na przyrosty biomasy. Jedynie w przypadku jednakowo niskich stężeń kininy i auksyny (po 0,1 mg/dm³, wersja 5), stwierdzono 1,3-krotnie większe wartości Wp w hodowlach z ciemności, w porównaniu z wartościami Wp dla tkanek z hodowli prowadzonych w warunkach świetlnych (ryc. 19).

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i NAA

Tkanki kalusowe z tych podłoży posiadały zabarwienie żółto-zielone (wersja 5) lub żółte (wersje 2,6), zwartą strukturę i zawartość wody w granicach 96,7 - 97,2% (tab. 7).

Na podłożach zawierających po 5,0 mg/dm³ NAA i 5,0 lub 1,0 mg/dm³ BAP (wersje 2,6), uzyskane przyrosty biomasy kształtowały się na takim samym poziomie, jak w warunkach świetlnych (tab. 7). Jedynie na podłożu z 0,1 mg/dm³ kininy i auksyny (wersja 5) zauważalny był stymulujący wpływ braku światła na przyrosty tkanek (1,6-krotnie większe wartości Wp, w porównaniu z wartościami Wp dla tkanek z hodowli prowadzonych w warunkach świetlnych, ryc. 19).

1.2.4. Hodowle płynne stacjonarne

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i 2,4-D

W hodowlach tych uzyskano tkanki kalusowe o zabarwieniu zielono-szarym na większości wersji pożywek, o zróżnicowanej wilgotności (93,8 - 97,6%, tab. 4) i o zwartej strukturze twardych grudek.

Na przetestowanych wersjach podłoży uzyskano wartości Wp kształtujące się na jednakowym poziomie, w zakresie 300,0-400,0 (tab. 4). Jedynie w przypadku podłoży zawierających wysokie stężenia 2,4-D (po 10,0 mg/dm³ - wersje 3,8) obserwowano kilkakrotnie niższe przyrosty masy tkankowej (Wp<100,0).

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i IAA

Rosnące na tych wersjach pożywek niezróżnicowane morfologicznie tkanki kalusowe posiadały zabarwienie zmieniające się od żywo zielonego (wersje 3-6), poprzez żółto-zielone (wersje 2,7) do szaro-zielonego (wersje 1,8), strukturę twardych grudek, zróżnicowaną wilgotność (95,7 - 97,8%, tab. 4), jak i przyrosty biomasy (wartości Wp od 281,6 do 617,5, tab. 4). Dla większości testowanych podłoży wartości Wp były większe od 500,0.

Największe przyrosty tkanek stwierdzono na podłożu zawierającym 1,0 mg/dm³ BAP i 5,0 mg/dm³ IAA (wersja 6), a najmniejsze odnotowano na podłożu zawierającym po 0,1 mg/dm³ obu substancji wzrostowych (wersja 5).

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i IBA

Na testowanych podłożach otrzymano tkanki o zabarwieniu żywo zielonym (wersje 3-6), zielonym (wersje 1,7) lub szaro-białym

(wersje 2,8,), o stosunkowo dużej wilgotności (96,1 - 97,6%, tab. 4) i o luźnej strukturze. Tkanki z omawianych wersji pożywek nie wykazywały tendencji do morfogenezy.

Na podłożach tych stwierdzono także bardzo duże zróżnicowanie wartości Wp od 218,0 do 736,0 (tab. 4) Dla większości wersji pożywek wartości Wp oscylowały wokół liczby 600,0.

Ekstremalnie wysoki przyrost biomasy był charakterystyczny dla pożywki zawierającej 5,0 mg/dm³ kininy i 1,0 mg/dm³ auksyny (wersja 7). Najmniejsze przyrosty odnotowano w przypadku jednakowo niskich (po 0,1 mg/dm³) stężeń obu substancji wzrostowych (wersja 5).

Hodowle na podłożach zawierających kompozycje BAP i NAA

W hodowlach tych uzyskano tkankę kalusową o bardzo zróżnicowanym stopniu wilgotności (94,6 - 97,8%, tab. 4), zmieniającym się zabarwieniu od intensywnie zielonego (wersje 3-6), poprzez zielone (wersje 2,7) do szaro-zielonego (wersje 1,8), o średnio twardej, grudkowej strukturze, bez morfologicznego zróżnicowania.

Podłoża te okazały się także korzystne dla wzrostu tkanek. Dla większości wersji pożywek wartości Wp uzyskane dla tkanek przekraczały liczbę 500,0 i utrzymywały poziom zbliżony do tej wartości (tab. 4, ryc. 5b).

Maksymalnie wysoka wartość Wp, równa 649,0 uzyskano na podłożu zawierającym po 5,0 mg/dm³ kininy i auksyny (wersja 2), a ekstremalnie niską, równą 157,0 przy jednakowych, niskich stężeniach obu substancji wzrostowych (po 0,1 mg/dm³, wersja 5).

Hodowla na podłożu bez substancji wzrostowych

Na podłożu pozbawionym substancji wzrostowych uzyskano tkankę

kalusowa o zabarwieniu zielonym, o strukturze twardych, drobnych grudek, charakteryzującą się niskimi przyrostami ($W_p=62,0$) oraz niskim stopniem wilgotności (94,3% wody).

1.2.5. Hodowle zawieszinowe .

W przypadku wszystkich testowanych wersji pożywek w warunkach hodowli zawieszinowych, uzyskano mniej lub bardziej homogenną zawieszinę zielonych agregatów komórkowych o różnej wielkości z niewielką tendencją do morfogenezy, jedynie na podłożu zawierającym po $0,1 \text{ mg/dm}^3$ BAP i IBA (wersja 5, ryc. 7,8).

Na przetestowanych wersjach pożywek uzyskano zadowalające przyrosty masy tkankowej

Do założenia kultur zawieszinowych stosowano różne wyjściowe gęstości komórek, wahające się w granicach od $5 \cdot 10^4$ do $3,5 \cdot 10^6$ komórek/ cm^3 . Przekraczały one zawsze gęstość krytyczną, czyli najmniejszą liczbę komórek, która po przeszczepieniu gwarantuje wzrost zawiesziny. Liczba ta była wyznaczona przez Henshaw i in. [194] i wynosiła $4 \cdot 10^3$ komórek/ cm^3 . Przetestowane gęstości okazały się korzystne dla zapoczątkowania kultur zawieszinowych Ammi majus L.

Uzyskiwane w toku hodowli maksymalne gęstości komórek wynosiły od $2,0 \cdot 10^6$ do $8,0 \cdot 10^6$ komórek/ cm^3 zawiesziny.

Największe różnice w liczbie komórek notowano zwykle między szóstym, a jedenastym dniem trwania hodowli.

Zależność liczby komórek w 1 cm^3 zawiesziny od czasu trwania hodowli dla wybranych podłoży hodowlanych przedstawia ryc. 21.

Wzrost hodowli zawieszinowych wyrażano wyznaczając równocześnie procent suchej masy. Dla pięciu przetestowanych wersji po-

żywek uzyskano wartości w zakresie 0,24 - 0,4% (tab. 8).

W przypadku hodowli prowadzonych z dodatkiem umbeliferonu obserwowano jedynie niewielki, stopniowy spadek przyrostu suchej masy wraz ze wzrostem stężenia prekursora w podłożu hodowlanym (tab. 8). W hodowlach tych nie obserwowano natomiast znaczących różnic we wzroście liczby komórek w toku cykli hodowlanych.

1.2.6. Wyniki badań anatomicznych tkanek pochodzących z kultur in vitro

Z przeprowadzonych wybiórczo anatomicznych obserwacji tkanek rosnących w różnych warunkach hodowlanych wynikało, że zbudowane były one w większości z niezróżnicowanych komórek parenchymatycznych (ryc. 6a,8). Często spotykano jednak wśród takich komórek, występujące pojedynczo lub też tworzące całe skupiska, elementy trachealne (ryc. 6b). Elementy te nie posiadały jeszcze z lignifikowanych ścian komórkowych (ujemna reakcja z floroglucynolem i H_2SO_4). Procesy waskularyzacji charakterystyczne były dla tkanek rosnących w różnych warunkach hodowlanych.

Obserwowane dla tkanek *Ammi majus* L., z niektórych podłoży hodowlanych (szczególnie wersje zawierające po 0,1 mg/dm³ obu substancji wzrostowych), początkowe stadia morfogenezy przedstawiają ryciny 9a i 9b.

W przebadanych tkankach stwierdzano sporadycznie obecność skrobi zapasowej.

Tab.4. Wpływ kompozycji substancji wzrostowych na wartości wskaźników przyrostu /Wp/ oraz wilgotności tkanek /% H₂O/ Ammi majus L. w hodowlach agarowych i płynnych stacjonarnych. Podkłoże podstawowe I - S.

+ Tętno temp. pH	stężenie /mg/dm ³ /		a u k s y z y																																			
	auks. kinin.	/mg/dm ³ /	2,4-D		IAA		IBA		NAA		IAA		IBA		2,4-D		IAA		IBA		NAA																	
			Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O														
1.	1,0	10,0	148,8	95,6	443,9	95,8	456,4	96,9	101,8	92,5	109,1	93,8	422,2	97,1	395,0	97,0	545,5	97,0	535,3	97,6	521,8	97,5																
2.	5,0	5,0	236,5	96,4	613,8	97,1	461,5	96,7	353,6	96,2	458,3	96,5	280,9	96,5	335,0	97,6	539,5	97,6	616,6	97,6	648,5	97,8																
3.	10,0	1,0	199,3	94,5	650,8	96,8	549,5	96,7	533,3	96,6	173,0	94,5	297,5	96,6	75,0	93,8	556,5	97,6	635,6	97,6	521,3	97,4																
4.	1,0	1,0	294,0	95,8	520,5	96,5	663,3	96,7	651,9	97,0	491,0	96,4	357,2	97,0	381,0	96,7	593,5	97,6	595,5	97,3	479,4	97,2																
5.	0,1	0,1	415,0	96,1	252,4	94,5	409,5	95,7	324,0	94,9	103,3	92,5	207,7	94,9	371,0	96,3	281,6	95,7	218,3	96,1	156,9	94,6																
6.	5,0	1,0	233,6	95,0	593,0	96,8	587,1	96,7	453,3	96,5	416,3	96,1	358,6	97,3	358,0	97,8	617,5	97,8	582,1	97,5	540,0	97,6																
7.	1,0	5,0	347,8	95,7	531,3	96,9	604,0	96,5	411,3	95,7	206,3	95,0	446,7	97,3	327,0	96,6	438,0	96,8	736,0	97,5	544,8	97,2																
8.	10,0	10,0	182,1	95,1	569,0	97,1	615,7	97,2	228,0	94,8	353,3	96,3	182,7	96,0	40,6	94,3	485,5	97,2	592,0	97,6	408,5	96,9																
9.	10,0	5,0	167,0	95,6	448,5	96,8	429,5	96,7	432,5	96,9	398,1	96,0	395,0	96,4																								
10.	5,0	10,0	152,5	95,4	506,4	96,4	265,9	95,9	318,5	96,5	400,0	95,8	589,6	97,0																								
			kompozycje z BAP												kompozycje z kinetyną												kompozycje z BAP											
			hodowle												hodowle												hodowle											
			stacjonarne												stacjonarne												stacjonarne											

* wersje patrz tab.3.

Tab.5. Wpływ kompleksów odżywczych na wartości wskaźników przyrostu /Wp/ i wilgotności tkanek /%H₂O/ Ammi majus L. na wybranych wersjach agarowych pożywek I - S.

nr wersji pożywki ⁺	stężenie subst. wzrost. /mg/dm ³ /		kompleksy odżywcze ⁺⁺	kompozycje subst. wzrostowych	
	auksyny	BAP		IAA i BAP Wp	IBA i BAP Wp
18.	0,1	0,1	woda kokosowa	544,9	96,5
19.	0,1	0,1	mleczko kukurydziane	453,2	96,7
20.	0,1	0,1	hydrolizat kazeiny	442,9	97,2
21.	0,1	0,1	kompleks witamin	176,1	95,1
5.	0,1	0,1	brak - "kontrola"	252,4	94,5

+ wersje wg tab.3. ++ ilości por. tab.3.

Tab.6. Wartości wskaźników przyrostu /Wp/ i wilgotności tkanek (%H₂O/ Ammi majus L. uzyskane na agarowych podłożach I - S zawierających pojedyncze auksyny lub kininy.

stężenie subst. wzrost. /mg/dm ³ /	nr wersji pożywki ⁺	2,4-D		IAA		IBA		NAA		nr wersji pożywki ⁺	BAP		kinetyna	
		Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O		Wp	%H ₂ O		
1,0	11.	93,8	92,9	349,9	94,9	382,2	97,0	311,0	95,5	14.	360,0	96,3	292,0	95,1
5,0	12.	66,0	93,0	290,8	96,3	208,5	94,9	314,2	96,5	15.	552,5	97,1	71,1	94,3
10,0	13.	30,0	93,5	272,5	94,5	286,3	95,5	309,0	95,4	16.	327,5	97,5	28,8	92,8

+ wersje wg tab.3.

Tab.7. Wartości wskaźników przyrostu /Wp/ oraz wilgotności /%H₂O/ uzyskane dla tkanek Ammi majus L. hodowanych w warunkach całkowitej ciemności na wybranych wersjach agarowych podłoży L - S.

nr wersji pożywki ⁺	stężenie subst. wzrost./mg/dm ³ /		a u k s y n y							
	auksyny	BAP	2,4-D		IAA		IBA		NAA	
			Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O	Wp	%H ₂ O
5.	0,1	0,1	151,4	95,5	404,0	96,1	541,3	97,2	528,8	96,7
2.	5,0	5,0	171,0	96,2	664,5	97,1	455,0	97,1	376,7	97,2
6.	5,0	1,0	164,5	95,6	500,4	97,0	561,0	97,3	458,3	97,0

⁺ wersje wg tab.3.

Tab.8. Procent suchej masy tkankowej uzyskiwany w hodowlach zawieszinowych Ammi majus L. na wybranych wersjach podłoży L - S.

nr wersji pożywki ⁺	zawartość składników w podłożach / mg/dm ³ /			% suchej masy /g/100 cm ³ /
	auksyny	BAP	umbeliferon	
2.	IAA-5,0	5,0	-	0,24
3.	IAA-10,0	1,0	-	0,25
6.	IBA-5,0	1,0	-	0,40
5.	IBA-0,1	0,1	-	0,37
22.	IBA-0,1	0,1	25,0	0,36
23.	IBA-0,1	0,1	50,0	0,34
24.	IBA-0,1	0,1	100,0	0,30
25.	IBA-0,1	0,1	200,0	0,26

⁺ wersje wg tab.3.

2. Analiza fitochemiczna w zakresie połączeń kumarynowych

2.1. Materiał i metodyka badawcza

2.1.1. Materiał do badań

Analizie fitochemicznej w zakresie charakterystycznych dla metabolizmu wtórnego *Ammi majus* L. połączeń kumarynowych poddano:

- 1) materiał tkankowy pochodzący z hodowli agarowych prowadzonych w warunkach świetlnych, z 32 wersji podłoża L-S zawierających kompozycje BAP z 2,4-D, IAA, IBA oraz NAA (wersje 1-8, tab.3), pasażę 9-13;
ponadto z 2 wersji podłoża L-S zawierających BAP i IBA (wersja 5) oraz BAP i IAA (wersja 2), pasażę 23-25
- 2) materiał tkankowy pochodzący z hodowli agarowych (pasaże 9-13) prowadzonych bez dostępu światła, z 12 wersji podłoży hodowlanych zawierających kompozycje BAP z wszystkimi stosowanymi w pracy auksynami (wersje 2,5,6, tab. 3)
- 3) materiał tkankowy uzyskany z hodowli zawieszinowych (pasaże 9-13), prowadzonych na 3 wersjach podłoża L-S zawierających kompozycje BAP i IAA (wersje 2,3) oraz BAP i IBA (wersja 5), por. tab. 3
- 4) pożywki pochodzące z hodowli zawieszinowych wymienionych w pkt.
- 5) materiał tkankowy z hodowli zawieszinowych prowadzonych z dodatkiem umbeliferonu (pasaże 10-12) na wersjach podłoża L-S zawierających po 0,1 mg/dm³ BAP i IBA (wersje 22-25, tab. 3)
- 6) pożywki z hodowli zawieszinowych wymienionych w pkt. 5.

Jako materiał porównawczy, analizie poddano:

- 7) owoce *Ammi majus* L. otrzymane z uniwersyteckiego ogrodu bota-

nicznego w Giessen, z których wyprowadzono hodowlę tkankową,
8) siewki uzyskane z tych owoców w warunkach sterylnych.

2.1.2. Przygotowanie ekstraktów

Warunki ekstrakcji oznaczanych połączeń kumarynowych z materiału roślinnego ustalono tak, aby w końcowym etapie uzyskać roztwory etanolowe, nadające się do bezpośredniej analizy techniką HPLC z fazami odwróconymi (por. rozdz. 2.1.3.2.).

Wysuszony sproszkowany materiał tkankowy uzyskany w wymienionych w rozdz. 2.1.1, warunkach hodowlanych, w ilości 2,0 g poddawano wyczerpującej ekstrakcji dwoma porcjami po 50cm³ 96% etanolu. Ekstrakcje prowadzono w aparacie Soxhleta przez 18 godzin.

Uzyskane etanolowe ekstrakty łączono, a następnie zagęszczano w temperaturze 60°C do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczano ilościowo w 1,0 cm³ 96% etanolu.

Analogiczny tok postępowania przyjęto przygotowując ekstrakty z wysuszonych i rozdrobnionych siewek oraz z owoców aminka.

Pożywki ekstrahowano w stosunku 1:1 trzema porcjami chloroformu (cz.d.a. POCh Gliwice). Połączone ekstrakty chloroformowe odparowywano na wyparce próżniowej (typ 350, Unipan). Suchą pozostałość rozpuszczano ilościowo w 1,0; 2,0 lub 3,0 cm³ 96% etanolu, w zależności od objętości analizowanej pożywki.

Przedstawione warunki pozwoliły uzyskać całkowitą ekstrakcję badanych związków, co stwierdzano techniką chromatografii cienkowsarstwowej.

Tak przygotowane ekstrakty wykorzystywano w jakościowej i ilościowej analizie chromatograficznej w zakresie połączeń kumarynowych.

2.1.3. Analiza chromatograficzna

Analizę chromatograficzną prowadzono techniką chromatografii cienkowsarstwowej (TLC) i wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Obiektem analiz było 5 połączeń furanokumarynowych: bergapten, ksantotoksyna, izopimpinellina, imperatoryna, marmezyna oraz biogenetycznie związany z nimi umbeliferon, związki będące głównymi składnikami *Ammi majus* L., których obecności spodziewano się także w uzyskanym materiale z hodowli *in vitro*. Optymalizację warunków rozdzielania tych związków prowadzono w obu technikach chromatograficznych dla wzorcowych substancji *. Jej wyniki wykorzystano później w analizie ekstraktów z materiału hodowlanego.

Obiektem analiz chromatograficznych techniką TLC były ponadto wyizolowane z materiału tkankowego połączenia, oznaczone w pracy jako związki A, B, C, D i E (por. rozdz. 2.2.3.1.).

2.1.3.1. Chromatografia cienkowsarstwowa (TLC)

W celu uzyskania optymalnych rozdzielania w/w substancji wzorcowych zbadano selektywność blisko 30 układów chromatograficznych, głównie adsorpcyjnych oraz z adsorbentem niepolarnym związanym chemicznie (czyli z tzw. fazami odwróconymi) [85,171].

Dla określenia selektywności układów adsorpcyjnych oparto się na teorii Soczewińskiego [82,169,170]. Rozdziały wzorcowych związków przeprowadzono w dwuskładnikowych układach izokraty-

* wzorcowe furanokumaryny uzyskano dzięki uprzejmości:
prof. S. Browná - Department of Chemistry, Trent University w Peterborough,
prof. G. Rodigiero - Dipartimento di Scienze Farmaceutiche Università di Padova i dr B. Rozkrutowej - Instytut Farmakologii PAN w Krakowie;
wzorzec umbeliferonu - Fluka,

cznych typu rozpuszczalnik polarny (zdolny do tworzenia wiązań wodorowych) rozcieńczony n-heptanem (rozpuszczalnikiem nieaktywnym, niezdolnym do tworzenia wiązań wodorowych). Fazą stacjonarną był zawsze żel krzemionkowy (płytki chromatograficzne DC-Alu-folien, Kieselgel 60, F₂₅₄, Merck, art. nr 5554). Składnikami aktywnymi fazy ruchomej były rozpuszczalniki z różnych klas wg podziału Pimentela i McClellana [141]: chloroform z klasy A - jako rozpuszczalnik protonodonorowy, aceton i octan etylu z klasy B - jako rozpuszczalniki elektronodonorowe oraz izopropanol z klasy AB - jako jednocześnie protono- i elektronodonorowy rozpuszczalnik.

Przebadano 22 układy adsorpcyjne w następujących zakresach stężeń aktywnego rozpuszczalnika:

- 1) n-heptan:chloroform, w zakresie stężeń 60, 70, 80 i 90 % v/v chloroformu i w nierozcieńczonym chloroformie
- 2) n-heptan:aceton, w zakresie stężeń 10, 30, 40, 50, 60, 70 % v/v acetonu
- 3) n-heptan:octan etylu, w zakresie stężeń 10, 30, 50, 65, 80 % v/v octanu etylu
- 4) n-heptan:izopropanol, w zakresie stężeń 10, 20, 30, 50, 70, 90 % v/v izopropanolu.

Zbadano ponadto rozdziały na adsorbencie z oktadecylową fazą niepolarną związaną chemicznie (HPTLC Fertigplatten RP-18, F₂₅₄, Merck, art. nr 13724) w 5 układach:

- 5) woda:metanol, w zakresie 65, 70, 80, 90 i 95 % v/v metanolu.

W rozdziałach związków A, B, C, D i E zbadano selektywność układów:

- 1) n-heptan:chloroform oraz
- 2) woda:metanol,

w zakresach stężeń oraz z użyciem faz stacjonarnych opisanych powyżej, dla rozdziałów wzorcowych połączeń kumarynowych.

Do wszystkich badań chromatograficznych użyto rozpuszczalników w stopniu czystości cz.d.ą. (prod. POCh Gliwice) i nie poddawano ich dodatkowemu oczyszczaniu.

2.1.3.2. Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC)

Rozdziály bergaptenu, ksantotoksyny, izopimpinliny, imperatoryny, marmezyny i umbeliferonu techniką HPLC prowadzono przy zastosowaniu osiemnastowęglowej fazy stacjonarnej związanej chemicznie i fazy ruchomej, woda:metanol w różnych zakresach stężeń metanolu (60 - 90% v/v metanolu w układzie).

Warunki rozdziałów *:

Pompa Liquochrom DE 307 (Labor MIM, Budapest)

Detektor UV, $\lambda = 253,7$ nm, typ KB 5301 (Kabid, Warszawa)

Rejestrator typ K 101 (Carl Zeiss, Jena)

Kolumna (Labor MIM, Budapest), $\varnothing 4,6/250$ mm, Chromsil C-18, $10\mu\text{m}$,

$V_M = 2,7$ cm^3

Faza ruchoma - woda:metanol

Przepływ: $1,1$ $\text{cm}^3/\text{min.}$, temperatura: 20°C

Objętość dozowania: $0,001 - 0,02$ cm^3

Czułość: $0 - 0,002$ AUFS

Wykrywalność dla badanych związków rzędu 10^{-6}g .

Technikę HPLC wykorzystano zarówno do jakościowych rozdziałów, jak i do ilościowego oszacowania zawartości poszczególnych sześciu wym. powyżej związków, w materiale uzyskanym z hodowli

* Autorka niniejszej pracy składa serdeczne podziękowanie swojemu mężowi, dr L. Ekiertowi, pracownikowi Katedry Chemii Organicznej AM w Krakowie, za pomoc w opracowaniu warunków analiz techniką HPLC i ich przeprowadzeniu.

in vitro [39,83,87].

Na uzyskiwanych tą techniką chromatogramach, pola powierzchni pod pikami są proporcjonalne do zawartości oznaczanych substancji. Spośród możliwych metod pomiaru pola powierzchni pod pikiem wybrano najczęściej stosowaną - iloczyn jego wysokości oraz szerokości w połowie wysokości [39], dający pole powierzchni trójkąta proporcjonalne do pola powierzchni pod pikiem.

W celu sprawdzenia proporcjonalności pomiędzy polem powierzchni pod pikami, a ilością oznaczanych substancji, наносzono na kolumnę wzrastające ilości od 0,001 do 0,02 cm³ 0,01% etanolowych roztworów substancji wzorcowych i obliczano powierzchnie pól trójkątów pod uzyskanymi pikami.

Obliczenia ilościowej zawartości poszczególnych substancji, w analizowanym materiale prowadzono, porównując pola powierzchni pod pikami rozdzielanych składników, z polami powierzchni obliczonymi dla ilościowo naniesionych na kolumnę wzorców.

2.1.4. Izolacja metabolitów

Pięć metabolitów obecnych w większych ilościach w analizowanych ekstraktach z materiału hodowlanego wyizolowano preparatywnie techniką TLC. Związki te oznaczono jako A, B, C, D i E.

W celu izolacji tych związków, wykorzystywano ekstrakty pozostałe po przeprowadzeniu ilościowych analiz. Ekstrakty te łączono, zagęszczano, a następnie наносzono pasmowo na płytki chromatograficzne (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60, F₂₅₄ mit Konzentrierungszone 0,25 mm, Merck, art. nr 11846). Po rozwinięciu chromatogramów w układzie n-heptan:octan etylu (7:3 v/v) i wysuszeniu, wykorzystując charakterystyczną fluorescencję rozdzielanych

związków w UV ($\lambda=362$ nm, por. tab. 17), obrysowywano pasma odpowiadające poszczególnym związkom i zeszkrobywano je, a zaadsorbowane na żelu związki eluowano 96% etanolem. Uzyskane eluaty odparowywano do sucha na wyparce rotacyjnej w temp. ok. 60°C.

Wyizolowane metabolity uzyskano w formie bezpostaciowej. Związki te rechromatografowano w celu sprawdzenia ich czystości chemicznej.

W następnym etapie wyizolowane metabolity poddano analizie chromatograficznej techniką TLC i analizie spektralnej.

2.1.5. Analiza spektralna

Analizę spektralną wyizolowanych pięciu metabolitów (związki A,B,C,D,E) przeprowadzono wykonując widma UV, IR oraz MS [26, 167]*.

Analizie spektralnej (widma UV i IR) poddano także wzorcowe substancje - umbeliferon i bergapten, ponieważ związki A i B wykazywały duże podobieństwo właściwości chromatograficznych do wymienionych substancji.

Widma UV w 96% etanolu (spektrofotometr Specord UV-VIS, VEB Carl Zeiss, Jena) oraz widma IR w oleju parafinowym (spektrofotometr Specord 75-IR, VEB, Carl Zeiss, Jena) wykonano w Zakładzie Chemii Organicznej AM w Krakowie.

Widma MS przy 15 i 70 eV w temp. w zakresie 50-250°C (spektrofotometr masowy LKB-2091, Szwecja) zostały wykonane w Środowiskowym Laboratorium Fizyko-Chemicznych Badań Związków Organicznych i Polimerów CBMiM w Łodzi.

* Autorka niniejszej pracy składa serdeczne podziękowanie dr H. Bartoniowi i dr hab. J. Mokroszowi, pracownikom Katedry Chemii Organicznej AM w Krakowie, za pomoc w interpretacji widm wyizolowanych związków.

2.2. Omówienie wyników analizy fitochemicznej

2.2.1. Chromatograficzna analiza jakościowa

2.2.1.1. Rozdziały techniką TLC

Selektywność poszczególnych układów chromatograficznych przedstawiono w tabeli 9, podając wartość R_f dla rozdzielanych połączeń oraz graficznie, jako zależności wartości R_M od stężenia rozpuszczalników aktywnych (%S) w chromatografii adsorpcyjnej i od stężenia rozpuszczalnika organicznego (%S) w chromatografii z fazami odwróconymi (ryc. 22-26).

$$R_M = f(\%S), \text{ gdzie } R_M = \lg \frac{1 - R_f}{R_f} \quad [171].$$

Rozdziały w układach adsorpcyjnych

Układy n-heptan:chloroform

W przypadku bergaptenu, ksantotoksyny, izopimpineliny oraz imperatoryny układy n-heptan:chloroform dopiero przy stężeniach chloroformu powyżej 50% powodowały wypieranie tych związków z linii startu.

Omawiane układy okazały się selektywne dla rozdziału wymienionych związków w zakresie stężeń chloroformu od 60 do 90%, przy których obserwowano znaczne różnice wartości R_f (tab. 9, ryc. 22). Najbardziej zbliżone wartości R_f notowano dla ksantotoksyny i izopimpineliny. W układach tych z powodzeniem rozdzielały się izomeryczne związki - bergapten i ksantotoksyna.

Badane układy okazały się zbyt mało aktywne, by wyprzeć pozostałe związki z linii startu - marmezynę i umbeliferon. Dopiero przy wysokim stężeniu chloroformu (90%) obserwowano niewielki wzrost wartości R_f , równy 0,02 dla obu tych związków.

Chloroform okazał się rozpuszczalnikiem małej sile elucyjnej. Dobre rozdziały uzyskano stosując także chloroform nierozcieńczony n-heptanem.

Układy n-heptan:aceton

W przebadanym zakresie stężeń aktywnego rozpuszczalnika stwierdzono bardzo małą selektywność zastosowanych układów. Dla bergaptenu, ksantotoksyny, izopimpinliny i imperatoryny uzyskiwano bardzo zbliżone wartości R_f (tab. 9, ryc. 23).

Dla marmezyny wartości te były zdecydowanie niższe, ale z kolei bardzo zbliżone do wartości R_f uzyskiwanych dla umbeliferonu.

W tych układach rozdziały izomerycznych pochodnych psoralenu były możliwe, szczególnie przy 30-50% acetonu, ale dla izopimpinliny uzyskiwano w tych warunkach prawie identyczne wartości R_f , jak dla ksantotoksyny.

Układy n-heptan:octan etylu

W układach zawierających octan etylu dla 4 furanokumaryny: bergaptenu, ksantotoksyny, izopimpinliny, imperatoryny uzyskiwano podobne wartości R_f . Natomiast marmezyna i umbeliferon były wyraźnie odseparowane od wymienionych związków (tab. 9, ryc. 24). Dla tych dwóch związków układy z octanem etylu okazały się układami selektywnymi w zakresie stężeń 30-80% rozpuszczalnika aktywnego. Największą różnicę wartości R_f (równa 0,05) pomiędzy bergaptenem i ksantotoksyną notowano jedynie przy 50% octanu etylu, ale w układzie tym nie można było rozdzielić izopimpinliny od ksantotoksyny.

Układy n-heptan:izopropanol

Selektywność układów zawierających izopropanol okazała się niewystarczająca dla osiągnięcia dobrych rozdzielności badanych związków (tab. 9, ryc. 25). Dla wszystkich związków uzyskano bardzo zbliżone wartości R_f , z wyjątkiem marmezyny, która wyraźnie oddzielała się od pozostałych rozdzielanych połączeń, szczególnie przy stężeniu izopropanolu wynoszącym 10-30%.

W większym zakresie stężeń izopropanolu (70-90%), obserwowano wyraźne odseparowanie umbeliferonu od pozostałych związków.

Rozdzielały w układach z fazami odwróconymi

Układy woda:metanol w całym zakresie stężeń metanolu (60-95%) okazały się bardzo selektywne dla wszystkich sześciu rozdzielanych związków (tab. 9, ryc. 26). W układach tych uzyskiwano optymalne rozdzielanie równocześnie wszystkich składników mieszaniny wzorców.

Dla izomerycznych związków - bergaptenu i ksantotoksyny uzyskiwano duże różnice w wartościach R_f (równe 0,14), szczególnie przy stężeniach metanolu wynoszących 70 i 80%.

Za najbardziej korzystne uznano układy w zakresie 65-80% metanolu w układzie.

2.2.1.2. Rozdzielały techniką HPLC

W wyniku licznych prób ustalono za najbardziej optymalny dla rozdzielanej mieszaniny związków układ woda:metanol w stosunku objętościowym 3:7. W warunkach przedstawionych w rozdz. 2.1.3.2. i przy zastosowaniu tego układu, uzyskano dla poszczególnych związków następujące wartości czasów retencji [t_R]:

- 2,0 min. - dla umbeliferonu
- 2,7 min. - dla marmezyny
- 4,0 min. - dla ksantotoksyny
- 5,2 min. - dla izopimpinelininy
- 5,9 min. - dla bergaptenu
- 11,0 min. - dla imperatoryny.

Rozdział mieszaniny 0,1% etanolowych roztworów substancji wzorcowych w opisanych warunkach przedstawia rycina 27

Wykreślone krzywe kalibracyjne dla substancji wzorcowych wykazały proporcjonalność wzrostu pól powierzchni pod pikami wraz ze wzrostem ilości nanoszonych na kolumnę substancji (ryc. 28).

Tab.9. Uzyskane wartości R_f x 100 dla wzorcowych połączeń kumarynowych w układach adsorpcyjnych: żel krzemionkowy, n-heptan - rozpuszczalnik polarny oraz w układach z fazami odwróconymi: RP-18, woda - metanol.

rodczielane związki	barwa [†] UV /362 nm/	układy adsorpcyjne															układy z fazami odwróconymi												
		% chloroformu					% acetonu					% octanu etylu					% izopropanolu			% metanolu									
		60	70	80	90	100	10	30	40	50	60	70	10	30	50	65	80	10	20	30	50	70	90	60	65	70	80	90	95
bersepten	ż	8	18	26	38	43	12	25	37	49	67	88	7	27	58	73	81	27	43	56	67	70	70	5	25	33	47	61	68
ksantotoksyna	ż	5	10	16	24	25	8	21	33	45	64	86	5	29	53	70	79	22	39	53	70	70	70	12	38	47	61	70	76
izopimpineline	b-ż	3	9	14	23	25	8	21	33	47	66	87	5	22	52	70	80	23	40	52	67	68	68	9	32	40	53	66	73
imperatoryna	p-ż	6	13	19	28	31	10	24	37	48	67	90	7	28	62	77	84	24	44	57	74	73	72	3	15	23	41	59	68
carnezyna	f	0	1	1	2	2	3	12	25	38	58	83	0	5	20	40	55	8	25	40	64	67	69	20	50	59	71	78	84
umbelliferon	n	0	1	1	2	2	3	13	28	40	63	84	2	13	44	66	77	22	48	63	76	80	79	47	68	72	79	85	87

Objaśnienie: † ż - żółta, b-ż - brudnożółta, p-ż - pomarańczowożółta, f - fioletowa, n - niebieska.

2.2.2. Chromatograficzna analiza ilościowa

Wyniki ilościowego oszacowania zawartości oznaczanych połączeń kumarynowych techniką HPLC wyrażono w mg substancji na 100 g suchej masy tkankowej (mg%) lub w mg/100 cm³ pożywki (tab. 10-16). Zawartość metabolitów w zakresie 0,001-0,009 mg w 100 g suchej masy tkankowej lub w 100 cm³ pożywki określono przy omawianiu wyników jako ilości śladowe. Ilości poniżej progu wykrywalności (10⁻⁶g) oznaczono w tabelach znakiem "-" Wyniki analiz są średnimi arytmetycznymi z pomiarów,

2.2.2.1. Analiza materiału tkankowego z hodowli agarowych prowadzonych w warunkach świetlnych

Analiza materiału tkankowego z podłoży zawierających kompozycje BAP i 2,4-D

W analizowanym materiale tkankowym pochodzącym z wszystkich testowanych wersji pożywek zawierających kompozycje BAP z 2,4-D stwierdzono obecność sześciu oznaczanych metabolitów wtórnych: umbeliferonu, marmezyny, ksantotoksyny, izopimpinliny, bergaptenu i imperatoryny (tab. 10a).

Jedynie bergapten był metabolitem charakterystycznym dla tkanek uzyskanych z wszystkich wersji pożywek. Obecność pozostałych analizowanych połączeń stwierdzono tylko w materiale tkankowym pochodzącym z wybranych podłoży.

W materiale tkankowym z różnych podłoży hodowlanych stwierdzono ogromne zróżnicowanie poziomu całkowitej zawartości oznaczanych metabolitów, od śladowych ilości (wersja 2) do ok. 114,00 mg% (wersja 8).

Ilościowa zawartość poszczególnych związków wahała się także w szerokich granicach dla analizowanych tkanek, od śladowych ilości do: 22,00 mg% dla bergaptenu; 6,67 mg% dla ksantotoksyny; 28,57 mg% dla izopimpineliney; 22,11 mg% dla imperatoryny; 34,48 mg% dla marmezyny. Najmniejsza i najmniej zróżnicowana zawartość zanotowano dla umbeliferonu, od śladowych ilości do 3,50 mg%.

Najbogatszą w oznaczane metabolity wtórne okazała się tkanka pochodząca z podłoża zawierającego po 10,0 mg/dm³ BAP i 2,4-D (wersja 8). Uzyskano dla niej ekstremalnie wysokie w tej grupie podłoża zawartości poszczególnych oznaczanych furanokumaryn (ryc. 29C).

Oprócz analizowanych metabolitów, w tkankach z wszystkich wersji pożywek stwierdzono obecność innych związków, o czasach retencji (w ustalonych warunkach rozdzielów technika HPLC, por. rozdz. 2.2.1.2.) krótszych niż dla umbeliferonu i wynoszących 1,7; 1,8 i 1,85 min. Metabolity te oznaczono odpowiednio jako związki C, D i E.

Analiza materiału tkankowego z podłoża zawierających kompozycje BAP i IAA

Passaże 9-13

Dla tkanek pochodzących z wszystkich testowanych wersji pożywek zawierających kompozycje BAP i IAA charakterystyczna była obecność umbeliferonu i bergaptenu. W tkankach pochodzących z niektórych wersji podłoża stwierdzono także obecność ksantotoksyny. Pozostałe analizowane metabolity nie występowały w badanym materiale (izopimpineline, marmezyna) lub też stwierdzano jedynie śladowe ich ilości (imperatoryna) - por. tab. 10b.

Zawartość poszczególnych analizowanych metabolitów w tkankach pochodzących z różnych podłoży hodowlanych była bardzo zróżnicowana. W większych ilościach gromadzony był umbeliferon i bergapten. Zawartość umbeliferonu wahała się w granicach od 3,36 do 34,90 mg%, bergaptenu od 0,69 do 8,60 mg%, ksantotoksyny od śladowych ilości do 1,15 mg%.

Zdecydowanie mniejsze różnice stwierdzono w całkowitej zawartości oznaczanych metabolitów, od 5,71 mg% (wersja 4) do 36,75 mg% (wersja 5).

Największą zawartość umbeliferonu obserwowano w tkankach Ammi majus L. rosnących na pożywce zawierającej najmniejsze spośród testowanych, jednakowe ilości kininy i auksyny (po 0,1 mg/dm³, wersja 5).

Ekstremalnie wysoką zawartość interesującego terapeutycznie bergaptenu stwierdzono w tkankach rosnących na pożywce zawierającej 1,0 mg/dm³ BAP i 5,0 mg/dm³ IAA (wersja 6).

Największą zawartość ksantotoksyny była charakterystyczna dla tkanek z podłoża zawierającego jednakowo wysokie stężenia substancji wzrostowych, po 10 mg/dm³ (wersja 8).

W tkankach pochodzących z wszystkich wersji pożywek obecne były ponadto inne metabolity - opisane powyżej związki C, D i E.
Pasaże 23-25

W materiale tkankowym z ok. 2-letniej hodowli (pasaże 23-25), z podłoża zawierającego po 5,0 mg/dm³ BAP i IAA (wersja 2), stwierdzono większe ilości jedynie dwóch, spośród sześciu analizowanych metabolitów: umbeliferonu (21,52 mg%) oraz bergaptenu (4,51 mg%). Ksantotoksyna, związki C, D i E występowały jedynie śladowych ilościach. W materiale tym nie stwierdzono natomiast obecności marmezyny, izopimpinliny i imperatoryny.

Analiza materiału tkankowego z podłoży zawierających kompozycje BAP i IBA

Passaże 9-13

W analizowanym materiale tkankowym pochodzącym z hodowli in vitro, z podłoży zawierających kompozycje BAP i IBA, stwierdzono obecność pięciu charakterystycznych dla metabolizmu Ammi majus L. furanokumaryn; marmezyny, ksantotoksyny, izopimpineliney, bergaptenu, i imperatoryny oraz ich biogenetycznego prekursora; umbeliferonu (tab. 10c).

Spośród oznaczanych związków, tylko bergapten był obecny w materiale tkankowym pochodzącym z wszystkich wersji podłoża. Jego zawartość wahała się od 0,60 do 9,76 mg%. Najwyższą zawartość tego związku stwierdzono w materiale tkankowym z podłoża zawierającego wysokie, jednakowe ilości BAP i IBA, po 10,0 mg/dm³ (wersja 8).

Pozostałe analizowane metabolity wtórne występowały w materiale z wybranych wersji pożywek. Ich ilościowa zawartość była bardzo zmienna, od śladowych ilości do: 4,09 mg% umbeliferonu; 2,72 mg% marmezyny; 0,28 mg% ksantotoksyny; 2,47 mg% izopimpineliney; 2,36 mg% imperatoryny.

Najbogatszą w te metabolity okazała się tkanka z pożywki zawierającej 1,0 mg/dm³ BAP i 10,0 mg/dm³ IBA (wersja 3), dla której zanotowano najwyższą, spośród uzyskanych dla tkanek z omawianych wersji pożywek, zawartość marmezyny, ksantotoksyny, izopimpineliney i imperatoryny oraz wysoką zawartość bergaptenu i umbeliferonu (ryc. 29D). Uzyskana całkowita zawartość oznaczanych furanokumaryn i umbeliferonu dla tkanek z tego podłoża wynosiła 18,21 mg% i była ok. 30-krotnie wyższa od najmniejszej globalnej zawartości metabolitów otrzymanej dla materiału tkan-

kowego z testowanej serii podłoży, równej 0,60 mg% (wersja 4).

Dla tkanek z wszystkich wersji pożywek charakterystyczna była obecność związków C, D i E, podobnie jak w przypadku materiału tkankowego pochodzącego z pożywek zawierających kompozycje BAP z 2,4-D i IAA. W materiale tkankowym z niektórych wersji pożywek (wersje 1,3,5,7,8) stwierdzono ponadto obecność kolejnego nowego związku o wartości $t_R=8,0$ min. w stosowanych warunkach rozdzielów techniką HPLC (pik pomiędzy pikiem bergaptenu i imperatoryny), który oznaczano jako związek G.

Pasaże 23-25

W wyniku analizy materiału tkankowego uzyskanego z ok. 2-letniej hodowli (pasaże 23 - 25) z podłoża zawierającego po 0,1 mg/dm³ BAP i IBA (wersja 5) stwierdzono śladowe ilości umbeliferonu, marmezyny, ksantotoksyny oraz związków C, D i E, natomiast wysoką zawartość bergaptenu (10,65 mg%). W analizowanym materiale nie stwierdzono obecności izopimpinliny i imperatoryny.

Analiza materiału tkankowego z podłoży zawierających kompozycje BAP i NAA

W analizowanym materiale tkankowym uzyskanym na podłożach zawierających kompozycje BAP i NAA stwierdzono obecność wszystkich sześciu charakterystycznych dla metabolizmu rośliny połączeń kumarynowych: umbeliferonu, marmezyny, ksantotoksyny, izopimpinliny, bergaptenu i imperatoryny. Całkowita zawartość tych metabolitów w materiale tkankowym z różnych wersji podłoży wynosiła od 1,62 mg% (wersja 8) do 17,24 mg% (wersja 6) - por. tab. 10d.

W większych ilościach, w tkankach z niektórych podłoży hodowlanych, występowały jedynie 3 metabolity: bergapten, umbelife-

ron i marmezyna. Dla bergaptenu uzyskano zawartość od śladowych ilości do 5,60 mg%. Zawartość tego związku powyżej 5,0 mg% stwierdzono w materiale pochodzącym z wersji pożywek zawierających jednakowe stężenia kininy i auksyny, po 0,1 mg/dm³ i po 1,0 mg/dm³ (wersje 5,4) oraz z pożywki zawierającej 5-krotnie większe ilości BAP w stosunku do NAA (wersja 7).

Uzyskane zawartości umbeliferonu wahały się od śladowych ilości do 7,84 mg%.

Zawartość marmezyny była mniej zróżnicowana, uzyskano wyniki w zakresie od 2,69 do 8,30 mg%.

Obecność ksantotoksyny, izopimpineliny i imperatoryny stwierdzono w tkankach pochodzących z większości zastosowanych wersji podłoża hodowlanych. Ilości tych metabolitów nie przekraczały jednakże 0,5 mg%.

Dla materiału tkankowego z wszystkich wersji podłoża charakterystyczna była obecność związków C, D i E (por. str. 87).

2.2.2.2. Analiza materiału tkankowego z hodowli agarowych prowadzonych bez dostępu światła

W materiale tkankowym, pochodzącym z hodowli in vitro prowadzonych bez dostępu światła na 12 wersjach podłoża hodowlanych zawierających kompozycje 4 auksyn: 2,4-D, IAA, IBA oraz NAA z BAP, stwierdzono spośród charakterystycznych dla rośliny macierzystej metabolitów wtórnych obecność: bergaptenu, ksantotoksyny i umbeliferonu. Pozostałe metabolity - marmezyna i imperatoryna występowały jedynie sporadycznie i to w śladowych ilościach, a obecności izopimpineliny nie wykazano w żadnej z analizowanych prób materiału tkankowego (tab. 11).

W analizowanym materiale tkankowym z różnych podłoży stwierdzono ponad 30-krotną różnicę w globalnej zawartości metabolitów, uzyskano bowiem zawartość w granicach od 1,90 do 60,99 mg%.

Dla tkanek z wszystkich testowanych wersji pożywek była charakterystyczna obecność bergaptenu. Zawartość tego metabolitu dla większości analizowanych prób przekraczała 5,0 mg%, w trzech przypadkach była większa od 20,0 mg%. Najwyższe zawartości bergaptenu uzyskano dla tkanek pochodzących z pożywki zawierającej jednakowe, po 5,0 mg/dm³ stężenia BAP i NAA (wersja 2) oraz z pożywek zawierających najmniejsze spośród testowanych (po 0,1 mg/dm³) jednakowe ilości BAP i 2,4-D, a także BAP i IAA (wersje 5).

Obecność ksantotoksyny i umbeliferonu stwierdzono tylko w materiale z wybranych podłoży hodowlanych. Ilościowa zawartość ksantotoksyny w badanych tkankach wahała się w granicach od śladowych ilości do 3,90 mg%, a umbeliferonu od śladowych ilości do 35,83 mg%.

Najwyższe zawartości ksantotoksyny zanotowano dla tkanek z podłoża zawierającego jednakowe, po 5,0 mg/dm³ stężenia BAP i 2,4-D (wersja 2) oraz z pożywki zawierającej kompozycję NAA i BAP, z 5-krotną ilościową przewagą stężenia auksyny nad stężeniem kininy (wersja 6).

Ekstremalnie wysoką zawartością umbeliferonu charakteryzował się materiał tkankowy z podłoża zawierającego po 5,0 mg/dm³ BAP i NAA (wersja 2), dla którego uzyskano także najwyższą zawartość bergaptenu.

Dla tkanek z wszystkich testowanych podłoży charakterystyczna była obecność związków C, D i E, a dla tkanek z niektórych tylko wersji podłoży (głównie wersja 6) także związku G, połączeń

których występowanie opisano powyżej dla materiału tkankowego uzyskanego z hodowli prowadzonych w warunkach świetlnych.

W analizowanym materiale tkankowym z wybranych wersji podłoży (głównie wersje 2 oraz 5) stwierdzono ponadto obecność kolejnego nowego metabolitu o wartości $t_R = 4,5$ min, w stosowanych warunkach rozdzielów techniką HPLC (pik pomiędzy pikiem ksantotoksyny i izopimpineliny), który oznaczono jako związek F - por. tab. 11.

2.2.2.3. Analiza tkanek i pożywek z hodowli zawieszinowych

Analiza tkanek

W materiale tkankowym pochodzącym z hodowli zawieszinowych stwierdzono obecność wszystkich sześciu analizowanych połączeń kumarynowych. Tylko dwa spośród tych metabolitów - bergapten i umbeliferon były obecne w tkankach pochodzących z wszystkich testowanych podłoży hodowlanych. Pozostałe analizowane związki występowały w materiale tkankowym tylko z wybranych wersji pożywek (tab. 12, ryc. 29E).

W badanym materiale różnego pochodzenia stwierdzono duże różnice w globalnej zawartości oznaczanych metabolitów - od 2,70 do 70,70 mg%.

Zdecydowanie najuboższy w metabolity był materiał tkankowy pochodzący z pożywki zawierającej po 0,1 mg/dm³ BAP i IBA (wersja 5), w którym obok śladowych ilości umbeliferonu stwierdzono tylko obecność bergaptenu.

W analizowanym materiale pochodzącym z wszystkich testowanych podłoży, ilościowa zawartość ksantotoksyny, izopimpineliny, bergaptenu i imperatoryny utrzymywała się na wyrównanym poziomie, rzędu ok. 2 - 8 mg%. Dla pozostałych metabolitów odnotowano bar-

dziej zróżnicowane zawartości, od śladowych ilości do: 23,70 mg% dla umbeliferonu i 28,09 mg% dla marmezyny.

Stopień kumulacji poszczególnych metabolitów we frakcjach tkanek był bardzo zmienny: od 17,4 do 65,3 % dla umbeliferonu, od 0,0 do 25,3 % dla marmezyny, od 0,0 do 42,1 % dla izopimpinelineiny i od 28,4 do 66,0 % dla bergaptenu.

Jedynie w przypadku imperatoryny i ksantotoksyny obserwowano prawie całkowite gromadzenie się tych metabolitów we frakcjach tkanek (tab. 13).

W materiale tkankowym pochodzącym z wszystkich podłoży stwierdzono także obecność związków C, D, E, F i G, metabolitów które opisano dla tkanek pochodzących z podłoży testowanych w hodowlach agarowych (por. rozdz. 2,2,2.1 i 2,2,2.2.).

Analiza pożywek

W analizowanych frakcjach pożywek z hodowli zawiesinowych stwierdzono obecność umbeliferonu, marmezyny, izopimpinelineiny i bergaptenu. Ksantotoksyna i imperatoryna występowały w tym materiale jedynie w śladowych ilościach (tab. 12).

Analogicznie jak w przypadku frakcji tkanek, tylko bergapten i umbeliferon występowały we wszystkich analizowanych podłożach hodowlanych. Obecność pozostałych oznaczanych związków stwierdzono jedynie w wybranych pożywkach.

Globalna zawartość metabolitów w analizowanych pożywkach wynosiła od 0,02 do 0,35 mg/100 cm³. Uzyskana ilościowa zawartość poszczególnych metabolitów kształtowała się na wyrównanym poziomie: od 0,03 do 0,18 mg/100cm³ dla umbeliferonu, od 0,13 do 0,19 mg/100cm³ dla marmezyny, 0,01 mg/100cm³ dla izopimpinelineiny i od 0,02 do 0,04 mg/100cm³ dla bergaptenu.

Uboga w wymienione metabolity była pożywka zawierająca po 0,1 mg/dm³ BAP i IBA (wersja 5). W dwóch pozostałych analizowanych podłożach stwierdzono większą liczbę metabolitów.

Procentowy udział (stopień kumulacji) poszczególnych metabolitów we frakcjach różnych podłoży hodowlanych był bardzo zmienny i wynosił: od 34,7 do 82,5% dla umbeliferonu, od 34,0 do 71,6% dla bergaptenu, od 57,9 do 100,0% dla izopimpinliny i od 74,7 do 100,0% dla marmezyny (tab. 13).

We wszystkich podłożach stwierdzono obecność nieznanymi metabolitów, identycznych z obecnymi w analizowanych frakcjach tkanek (związki C, D, E, F i G).

2.2.2.4. Analiza tkanek i pożywek z hodowli zawieszinowych prowadzonych z dodatkiem umbeliferonu

Jak wynikało z analizy frakcji tkanek i pożywek z hodowli zawieszinowych przedstawionej w rozdziale 2.2.2.3., najbardziej ubogą zawartość metabolitów w obu frakcjach uzyskano w przypadku podłoża zawierającego po 0,1 mg/dm³ BAP i IBA (wersja 5). Zarówno we frakcji tkanek, jak i pożywek stwierdzono ograniczoną jedynie do bergaptenu produkcję oznaczanych furanokumaryn oraz śladowe ilości prekursora tych związków - umbeliferonu. Także związki C, D, E, F i G obecne były w obu frakcjach w śladowych ilościach (por. tab. 12).

Interesującym wydawało się więc zbadanie wpływu egzogenicznie dodanego umbeliferonu, do podłoża o tym właśnie składzie (wersje 22-25), na produkcję furanokumaryn.

Analiza tkanek

We frakcjach tkanek pochodzących z podłoża zawierających wszystkie stosowane stężenia prekursora (25,0 - 200,0 mg/dm³, wersje 22-25), stwierdzono obecność jedynie dwóch metabolitów: bergaptenu i umbeliferonu (tab. 14). W tkankach obserwowano wzrastającą kumulację umbeliferonu wraz ze wzrostem stężenia tego związku w podłożach hodowlanych.

Najbardziej interesującą obserwacją było stopniowo wzrastające stężenie bergaptenu od 2,70 mg% (podłoże kontrolne bez prekursora) do 8,84 mg% (przy 200,0 mg prekursora w 1 dm³ pożywki), świadczące o wykorzystywaniu egzogennie dodanego umbeliferonu w biosyntezie tego metabolitu. Nie obserwowano jednak we frakcjach tkanek oczekiwanej obecności innych oznaczanych furanokumaryn. W tkankach obecne były ponadto niezidentyfikowane metabolity - związki C, D, E, F i G (por. rozdz. 2.2.2.3.). Zawartość tych związków utrzymywała się na stałym poziomie, niezależnym od wzrostu stężenia prekursora w podłożu hodowlanym.

Analiza pożywek

We frakcjach analizowanych podłoża (wersje 22-25) obserwowano bogatszą jakościowo zawartość metabolitów, w porównaniu z frakcjami tkanek. Oprócz bergaptenu i umbeliferonu stwierdzono także obecność ksantotoksyny i marmezyny (tab. 14).

Wraz ze wzrostem stężenia egzogennie dodanego prekursora (od 25,0 do 200,0 mg/dm³) obserwowano charakterystyczny wzrost stężenia bergaptenu w podłożu, od 0,03 do 0,06 mg/100 cm³.

Przy wyższych stężeniach prekursora w podłożu (począwszy od 50,0 mg/dm³) charakterystyczne było pojawienie się ksantotoksyny wśród oznaczanych metabolitów. Zawartość tego związku utrzymywa-

ła się na stałym prawie poziomie (ok. 0,02 mg/100 cm³), niezależnie od wzrostu stężenia umbeliferonu w pożywce.

Przy najwyższym stężeniu prekursora, stwierdzono także obecność marmezyny, w ilości 0,18 mg/100 cm³ podłoża. Obserwowano wtedy równoczesne zmniejszenie zawartości ksantotoksyny i utrzymywanie się stałego poziomu bergaptenu, pomimo wzrostu stężenia prekursora w podłożu hodowlanym.

Wysoka zawartość umbeliferonu we frakcjach pożywek świadczyła tym, że podany prekursor był tylko częściowo wykorzystywany przez tkanki *Ammi majus* L. w produkcji oznaczanych furanokumaryn

Spośród niezidentyfikowanych metabolitów występowały w badanym materiale w małych ilościach, niezależnych od stężenia prekursora, związki C, D, E oraz F i G.

2.2.2.5. Analiza owoców i siewek *Ammi majus* L.

W wyniku przeprowadzonej analizy fitochemicznej ekstraktów z owoców *Ammi majus* L. pochodzących z uniwersyteckiego ogrodu botanicznego w Giessen wykazano, że przeważającym ilościowo składnikiem tego surowca była marmezyna (610,69 mg%). W owocach tych stwierdzono także duże ilości ksantotoksyny - 172,06 mg%. Bergapten, izopimpinelina oraz umbeliferon występowały w badanym surowcu w zdecydowanie mniejszych ilościach, odpowiednio: 43,30; 29,67 oraz 40,30mg%. W szczególnie małych ilościach gromadzona była w tych owocach imperatoryna (10,90 mg%) - por. ryc. 29A. Całkowita zawartość wszystkich połączeń kumarynowych w analizowanym surowcu wynosiła 906,96 mg% (tab. 16).

W siewkach uzyskanych w warunkach sterylnych z owoców otrzymanych z Giessen, stwierdzono zupełnie odmienną ilościową za-

wartość poszczególnych połączeń kumarynowych, w porównaniu z zawartością tych związków w owocach (por. ryc. 29B i 29A),

Dominującymi ilościowo składnikami ekstraktów z siewek były izopimpinelina (17,18 mg%) oraz bergapten (10,90 mg%). W mniejszych ilościach występował w nich umbeliferon (8,40 mg%). Ekstrakty z siewek były ubogie w ksantotoksyne (2,90 mg%). Stwierdzono w nich także jedynie śladowe ilości imperatoryny oraz marmezyny (ryc. 29B),

Globalna zawartość połączeń kumarynowych w siewkach wynosiła ok. 39 mg% i była ponad 20-krotnie niższa, w porównaniu z całkowitą zawartością tych związków w dojrzałych owocach (tab. 16),

Tab.10. Wpływ wzajemnego stężenia euksyn i BAP w podłożach hodowlanych na zawartość metabolitów wtórnych w materiale tkankowym z hodowli stałych prowadzonych w warunkach świetlnych.
a/ Wpływ wzajemnego stężenia 2,4-D i BAP.

Hodowla pożytki	stężenie subst. wzrost./mg/dm ³		zawartość oznaczanych związków /mg% /							inne metabolity
	2,4-D	BAP	umbelliferon	marmezyna	ksantotoksyna	izopimpinina	bergapten	imperatoryna	całkowita zawartość	
1.	1,0	10,0	ślady	-	0,26	0,32	1,05	-	1,63	C,D,E
2.	5,0	5,0	ślady	-	-	-	ślady	-	ślady	C,D,E-ślady
3.	10,0	1,0	-	-	ślady	ślady	1,37	0,46	1,83	C,D,E
4.	1,0	1,0	3,49	9,05	0,71	1,21	3,00	-	17,46	C,D,E
5.	0,1	0,1	-	-	-	ślady	2,05	-	2,05	C,D,E
6.	5,0	1,0	-	-	0,02	ślady	2,12	-	2,14	C,D,E
7.	1,0	5,0	-	-	0,48	-	2,77	-	3,25	C,D,E
8.	10,0	10,0	ślady	34,48	6,67	28,57	22,00	22,11	113,83	C,D,E

b/ Wpływ wzajemnego stężenia IAA i BAP.

Hodowla pożytki	stężenie subst. wzrost./mg/dm ³		zawartość oznaczanych związków /mg% /							inne metabolity
	IAA	BAP	umbelliferon	marmezyna	ksantotoksyna	izopimpinina	bergapten	imperatoryna	całkowita zawartość	
1.	1,0	10,0	8,50	-	0,77	-	1,20	ślady	10,47	C,D,E
2.	5,0	5,0	23,30	-	ślady	-	4,70	-	28,00	C,D,E
3.	10,0	1,0	14,10	-	ślady	-	0,69	-	14,79	C,D,E
4.	1,0	1,0	4,03	-	-	-	1,68	-	5,71	C,D,E
5.	0,1	0,1	34,90	-	0,30	-	1,55	ślady	36,75	C,D,E
6.	5,0	1,0	3,36	-	ślady	-	8,60	-	11,96	C,D,E
7.	1,0	5,0	16,80	-	0,22	-	3,60	-	20,62	C,D,E
8.	10,0	10,0	6,70	-	1,15	-	0,88	-	8,73	C,D,E

Tab. 10. od. c/ Wpływ wzajemnego stężenia IBA i BAP.

Lp. próby	stężenie subst. wzrost./mg/dm ³		zawartość oznaczonych związków /mg% /								inne metabolity
	IBA	BAP	umbeliferon	marmezyna	ksantotokyna	izopimpine- lina	bergapten	imperatryna	całkowita zawartość		
1.	1,0	10,0	ślady	2,37	0,04	0,40	2,93	-	5,74	C,D,E,G	
2.	5,0	5,0	ślady	-	ślady	0,09	1,54	-	1,63	C,D,E	
3.	10,0	1,0	3,30	3,80	0,28	2,47	6,00	2,36	18,21	C,D,E,G	
4.	1,0	1,0	-	-	ślady	ślady	0,60	-	0,60	C,D,E	
5.	0,1	0,1	-	1,81	ślady	0,28	1,63	0,32	4,04	C,D,E,G	
6.	5,0	1,0	0,34	2,72	-	ślady	0,73	0,11	3,90	C,D,E	
7.	1,0	5,0	4,09	-	0,04	0,28	2,19	-	6,60	C,D,E,G	
8.	10,0	10,0	ślady	-	0,23	ślady	9,76	0,25	10,24	C,D,E,G	

d/ Wpływ wzajemnego stężenia NAA i BAP.

Lp. próby	stężenie subst. wzrost./mg/dm ³		zawartość oznaczonych związków /mg% /								inne metabolity
	NAA	BAP	umbeliferon	marmezyna	ksantotokyna	izopimpine- lina	bergapten	imperatryna	całkowita zawartość		
1.	1,0	10,0	-	4,27	0,07	ślady	ślady	-	4,34	C,D,E	
2.	5,0	5,0	2,15	-	0,03	0,22	1,30	0,25	3,95	C,D,E	
3.	10,0	1,0	0,56	-	ślady	0,07	1,68	0,22	2,53	C,D,E	
4.	1,0	1,0	-	-	-	0,23	5,21	0,10	5,54	C,D,E	
5.	0,1	0,1	0,62	-	0,02	0,38	5,00	0,24	6,26	C,D,E	
6.	5,0	1,0	7,84	8,30	ślady	0,13	0,98	-	17,25	C,D,E	
7.	1,0	5,0	3,84	2,69	0,03	0,35	5,64	1,12	13,67	C,D,E	
8.	10,0	10,0	ślady	-	0,19	0,25	0,68	0,50	1,62	C,D,E	

Tab. 11. Wpływ braku światła na zawartość metabolitów wtórnych w materiale tkankowym z podłożu hodowlanych o różnym składzie. Hodowle stałe.

Wersja z	Wersja z	Wersja z	Wersja z	zawartość oznaczanych związków /mg% /										inne: metabolity
				stężenie subst. wzrost./mg/dm ³ /	auksyny	BAP	umbeliferon	marmezyna	ksantotoksyna	izopimpine- lina	bersapten	imperato- ryna	całkowita zawartość	
2.	2,4-D	2.	5,0	5,0	ślady	-	3,88	-	11,12	-	15,00	C,D,E,F		
5.	IAA	5.	0,1	0,1	10,08	-	-	-	24,44	-	34,52	C,D,E,F		
6.	IAA	6.	5,0	1,0	-	-	1,90	-	ślady	-	1,90	C,D,E,G		
2.	IAA	2.	5,0	5,0	21,08	-	ślady	-	5,09	ślady	26,17	C,D,E,F		
5.	IAA	5.	0,1	0,1	ślady	-	-	-	20,23	-	20,23	C,D,E		
6.	IAA	6.	5,0	1,0	ślady	ślady	ślady	-	11,96	-	11,96	C,D,E,G		
2.	IBA	2.	5,0	5,0	6,32	-	-	-	0,59	-	6,91	C,D,E,F,G		
5.	IBA	5.	0,1	0,1	ślady	ślady	ślady	-	10,75	-	10,75	C,D,E,F		
6.	IBA	6.	5,0	1,0	-	-	0,05	-	5,96	-	6,01	C,D,E,G		
2.	NAA	2.	5,0	5,0	35,83	-	-	-	25,16	-	60,99	C,D,E,F		
5.	NAA	5.	0,1	0,1	ślady	-	-	-	15,28	-	15,28	C,D,E		
6.	NAA	6.	5,0	1,0	-	-	3,90	-	8,22	-	12,12	C,D,E,G		

Tab.12. Zawartość badanych metabolitów wtórnych we frakcjach tkanek i pożywek hodowli zawiesinowych.

+ wersja i H	kompozycje substancji wzrostowych	zawartość oznaczonych związków												inne metabolity		
		umbeliferon		marmezyna		ksantoksyna		izopimpinina		bergapten		imperatoryna			całkowita zawartość	
		t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p		t	p
2.	IAA BAP	23,70	0,18	28,09	0,13	4,08	ślady	3,54	0,01	8,40	0,03	2,89	ślady	70,70	0,35	C,D,E,F,G
3.	IAA BAP	14,40	0,03	-	0,19	2,27	ślady	-	0,01	3,90	0,04	1,88	ślady	22,45	0,27	C,D,E,F,G
5.	IBA BAP	ślady	ślady	-	-	-	-	-	-	2,70	0,02	-	-	2,70	0,02	C,D,E,F,G

+ wersje - patrz tab.3. t⁺⁺ - frakcja tkanek, mg% p⁺⁺⁺ - frakcja pożywek, mg/100 cm³

Tab.13. Porównanie stopnia kumulacji oznaczonych związków /% zawartości/ we frakcjach tkanek i pożywek hodowli zawiesinowych.

+ wersja i H	kompozycje substancji wzrostowych	% zawartości oznaczonych związków we frakcjach tkanek i pożywek											
		umbeliferon		marmezyna		ksantoksyna		izopimpinina		bergapten		imperatoryna	
		t ⁺⁺	p ⁺⁺⁺	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
2.	IAA BAP	17,4	82,5	25,3	74,7	100,0	-	42,1	57,9	31,8	68,2	100,0	-
3.	IAA BAP	65,3	34,7	-	100,0	100,0	-	-	100,0	28,4	71,6	100,0	-
5.	IBA BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	66,0	34,0	-	-

Objaśnienia - patrz tab.12.

Tab.14. Wpływ obecności umbeliferonu w podkożach hodowlanych na zawartość metabolitów we frakcjach tkanek i pożywek hodowli zawieszinowych.

+ T K S H O D	zawartość umbeliferonu w podkożu mg / 100 cm ³	zawartość oznaczanych związków ⁺⁺⁺						inne metabolity			
		umbeliferon		marmezyna		ksantotoksyna		bergapten		t	p
		t ⁺⁺	p ⁺⁺⁺	t	p	t	p	t	p		
5.	0 /	ślady	ślady	-	-	-	-	2,70	0,02	C, D, E, F, G	C, D, E, F, G
22.	2,5	8,58	ślady	-	-	-	-	3,30	0,03	C, D, E, F, G	C, D, E, F, G
23.	5,0	35,60	1,44	-	-	-	0,02	4,20	0,04	C, D, E, F, G	C, D, E, F, G
24.	10,0	62,70	3,61	-	-	-	0,02	4,36	0,06	C, D, E, F, G	C, D, E, F, G
25.	20,0	100,04	4,92	-	0,18	-	0,01	8,84	0,06	C, D, E, F, G	C, D, E, F, G

++++ w badanym materiale nie stwierdzono obecności izopimpinelininy i imperatoryny
 Pozostałe objaśnienia - patrz tab.12,

Tab. 15. Wpływ rodzaju hodowli na zawartość metabolitów wtórnych w materiale tkankowym.

rodzaj hodowli	zawartość oznaczonych związków /mg% /							inne metabolity
	umbeliferon	marmezyna	ksantotoksyna	izopimpinina	bergapten	imperatoryna	całkowita zawartość	
hodowla stała	23,30	-	ślady	-	4,70	-	28,00	C,D,E
hodowla zawieszona	23,70	28,09	4,08	3,54	8,40	2,89	70,70	C,D,E,F,G
hodowla stała	14,10	-	ślady	-	0,69	-	14,79	C,D,E
hodowla zawieszona	14,40	-	2,27	-	3,90	1,88	22,45	C,D,E,F,G
hodowla stała	-	1,81	ślady	0,28	1,63	0,32	4,04	C,D,E,G
hodowla zawieszona	ślady	-	-	-	2,70	-	2,70	C,D,E,F,G

Tab. 16. Zawartość oznaczonych metabolitów w owocach Ammi majus L., siewkach oraz maksymalne ich zawartości uzyskane w hodowli in vitro.

analizowany materiał	zawartość oznaczonych związków /mg% /							całkowita zawartość
	umbeliferon	marmezyna	ksantotoksyna	izopimpinina	bergapten	imperatoryna	całkowita zawartość	
owoce	40,30	610,69	172,06	29,67	43,30	10,90	906,96	
siewki	8,40	ślady	2,90	17,18	10,90	ślady	39,38	
materiał tkankowy *	25,83	34,48	6,67	28,57	25,16	22,11	113,83	

* Materiał tkankowy z różnych warunków hodowlanych.

2.2.3. Badania strukturalne wyizolowanych metabolitów wtórnych

Jak wynikało z przedstawionej analizy chromatograficznej materiału z hodowli in vitro, do metabolitów wtórnych gromadzonych w większych ilościach we wszystkich warunkach hodowlanych należał: umbeliferon (związek A), bergapten (związek B) oraz związki C, D i E o nieznannej strukturze. Związki te wyizolowano i poddano badaniom strukturalnym.

2.2.3.1. Charakterystyka chromatograficzna wyizolowanych związków

2.2.3.1.1. Rozdziały techniką TLC

Selektywność badanych układów przedstawiono podając wartości R_f dla rozdzielanych związków (tab. 17) oraz na wykresach zależności $R_m=f(\%S)$, gdzie $\%S$ oznacza stężenie aktywnego rozpuszczalnika w chromatografii adsorpcyjnej, a w chromatografii z fazami odwróconymi stężenie rozpuszczalnika organicznego (ryc. 30,31).

Rozdziały w układach adsorpcyjnych n-heptan:chloroform

W przypadku związków B, D i E dopiero układy zawierające powyżej 50%, a w przypadku związku C powyżej 60% chloroformu w układzie, powodowały wypieranie tych związków z linii startu. Dla związku A, dopiero przy wysokim stężeniu aktywnego składnika fazy ruchomej (90% chloroformu), stwierdzono niewielki wzrost wartości R_f równy 0,02 (tab. 17, ryc. 30).

Układy n-heptan:chloroform okazały się selektywne dla roz-

działu wyizolowanych związków. W całym zakresie przebadanych stężeń chloroformu (60 - 100%) obserwowano zróżnicowane wartości R_f dla pięciu wyizolowanych związków. Biorąc pod uwagę niskie wartości R_f dla związków A i C uzyskiwane przy niższych stężeniach chloroformu, za optymalne dla rozdziału wszystkich wyizolowanych połączeń należy uznać układy zawierające powyżej 80% chloroformu oraz nierozcieńczony heptanem chloroform.

Uzyskane dla związku A wartości R_f , we wszystkich przebadanych układach chromatograficznych, są identyczne z odpowiednimi ich wartościami dla wzorcowego umbeliferonu, a wartości R_f dla związku B są identyczne z ich odpowiednikami dla wzorcowego bergaptenu (por. tab. 9 i 17, ryc. 22 i 30).

W przypadku związków C, D i E stwierdzono odmienne ich chromatograficzne właściwości, w porównaniu ze stosowanymi w badaniach wzorcowymi połączeniami kumarynowymi.

Dla związku D stwierdzono zbliżone wartości współczynników R_f do odpowiednich wartości R_f uzyskanych dla wzorcowej imperatoryny, a dla związku D podobieństwo chromatograficznych właściwości z wzorcową ksantotoksyną i izopimpineliną (por. tab. 9).

Biorąc jednakże pod uwagę zupełnie różną fluorescencję porównywanych związków w świetle UV ($\lambda=362$ nm) należy stwierdzić, że jest możliwy równoczesny zadowalający rozdział zarówno wyizolowanych związków, jak i wzorcowych substancji, w przebadanych układach adsorpcyjnych.

Rozdziały w układach z fazami odwróconymi woda:metanol

Układy woda:metanol, w badanym zakresie stężeń metanolu (60 - 95%), okazały się selektywne dla rozdziału wszystkich pięciu wyizolowanych substancji, szczególnie dla związków B, D i E. Jedy-

nie dla związków A i C, w przypadku niektórych układów (70 i 80% metanolu w układzie), obserwowano zbliżone wartości współczynników R_f (tab. 17, ryc. 31).

Uzyskane wartości współczynników R_f dla związku A, w całym zakresie przebadanych stężeń metanolu, okazały się identyczne z odpowiednimi wartościami tych współczynników dla wzorcowego umbeliferonu. Analogiczną sytuację stwierdzono porównując wartości R_f związku B i wzorcowego bergaptenu we wszystkich przebadanych układach rozwijających (por. tab. 9 i 17, ryc. 26 i 31).

W przypadku pozostałych wyizolowanych związków (związki C, D, E) stwierdzono ich odmienne chromatograficzne właściwości, w porównaniu ze stosowanymi w badaniach wzorcowymi substancjami, w większości stosowanych układów rozwijających. Wyjątkowo tylko, w układzie zawierającym 80% metanolu stwierdzono identyczne wartości współczynników R_f dla związków C, A i wzorcowego umbeliferonu oraz dla związku E i imperatoryny.

We wszystkich pozostałych układach uzyskiwano zadowalające równoczesne rozdziały 5 wyizolowanych związków i 6 wzorcowych substancji (łącznie 9 różnych połączeń) - por. tab. 9, ryc. 26.

2.2.3.1.2. Rozdziały technika HPLC

W ustalonych powyżej optymalnych warunkach rozdziału wzorcowych połączeń kumarynowych technika HPLC (por. rozdz. 2.2.1.2.), wyizolowane związki A i B posiadały czasy retencji równe odpowiednio czasom retencji dla wzorcowego umbeliferonu i bergaptenu.

Uzyskane czasy retencji dla trzech pozostałych wyizolowanych związków były krótsze od czasów retencji dla wszystkich rozdzie-

lanych substancji wzorcowych i wynosiły odpowiednio dla związku C - 1,7 min., dla związku D - 1,8 min., a dla związku E - 1,85 min.

Tab. 17. Uzyskane wartości R_f x 100 dla wyizolowanych substancji A, B, C, D, E.

wyizolowane związki	barwa UV / 362 nm/	układy rozwijające										
		n-heptan : chloroform v/v ⁺					woda : metanol v/v ⁺⁺					
		4:6	3:7	2:8	1:9	0:10	4:6	3,5:6,5	3:7	2:8	1:9	0,5:9,5
związek A	niebieska	0	1	1	2	2	47	68	72	79	85	87
związek B	żółta	8	18	26	38	43	5	25	33	47	61	68
związek C	niebieska	0	3	5	10	14	67	71	73	79	83	85
związek D	fioletowa	5	13	20	29	37	4	7	10	22	38	49
związek E	fioletowa	2	8	15	25	29	14	21	26	41	55	59

Objaśnienia: + żel krzemionkowy, ++ RP - 18

2.2.3.2. Analiza spektralna wyizolowanych związków

2.2.3.2.1. Analiza spektralna związku A

Wyizolowany związek wykazuje niebieską fluorescencję w nadfiolecie ($\lambda=362$ nm). Jego chromatograficzne parametry - R_f we wszystkich badanych układach chromatograficznych i t_R , są zgodne z odpowiednimi ich wartościami dla wzorcowego umbeliferonu (por. tab. 9 i 17).

Widmo UV badanego związku (ryc. 32) wykazuje zgodność przebiegu linii absorpcji z widmem wzorcowego umbeliferonu, z maksimum absorpcji przy $\lambda=323$ nm i przegięciem przy 251 nm [131].

W widmie IR wyizolowanego związku oraz wzorcowego umbeliferonu (ryc. 33) widoczne są pasma drgań rozciągających wiązań C=C układu aromatycznego w zakresie $1620 - 1560$ cm^{-1} oraz drgań deformacyjnych aromatycznych grup C-H przy 830 i 770 cm^{-1} . W widmach obu związków występuje charakterystyczne dla nienasyconego ugrupowania α, β -laktonowego pasmo drgań rozciągających grupy C=O przy 1720 cm^{-1} , potwierdzające ich strukturę kumarynową oraz szerokie pasmo drgań rozciągających grupy OH związanej wiązaniem wodorowym, pomiędzy $3100 - 3200$ cm^{-1} . Ponadto w zakresie $1125 - 1090$ cm^{-1} widoczne są pasma drgań rozciągających wiązań C-O [131,167].

W widmie MS (70 eV) wyizolowanego związku (ryc. 34,35) widoczny jest pik jonu molekularnego przy m/z 162 stosunkowo znacznej intensywności (22,2%). Obecność jonu fragmentacyjnego przy wartości m/z 134 (57,1%) wynika z charakterystycznego dla cyklicznych ketonów i laktonów rozpadu z uwolnieniem cząsteczki CO. Dalsza fragmentacja tego jonu, jego rozpad w obszarze wiązania eterowego i fenolowego, polega na oderwaniu grupy CHO i pow-

staniu jonu przy m/z 105 (21,6%), co potwierdzone jest również obecnością dodatnio zjonizowanej grupy CHO (m/z 29 - 31,1%) [26,131,167].

Charakterystyczny jest także pik jonu podstawowego przy m/z 43 (100%) istniejącego prawdopodobnie w formie dwóch struktur (ryc. 35).

Na podstawie przedstawionej powyżej charakterystyki spektralnej oraz chromatograficznych właściwości wyizolowanego związku A, można sądzić, że związek ten jest umbeliferonem.

2.2.3.2.2 Analiza spektralna związku B

Wyizolowany związek B, we wszystkich badanych układach chromatograficznych (por. tab. 9 i 17), wykazuje identyczne z wzorcowym bergaptenem wartości R_f w TLC i t_R w HPLC oraz charakterystyczną dla bergaptenu żółtą fluorescencję w nadfiolecie ($\lambda=362$ nm).

W widmie UV wyizolowanego związku (ryc. 36) widoczne są maksima absorpcji przy $\lambda = 249, 260, 268$ i 310 nm, identyczne pod względem położenia pasm oraz porównywalne pod względem wysokości z widmem wzorca bergaptenu [131].

Widmo IR badanego związku jest także porównywalne z widmem wzorca bergaptenu (ryc. 37). W widmach obu związków występuje charakterystyczne pasmo drgań rozciągających ugrupowania C=O przy 1720 cm^{-1} które odpowiada α,β -nienasyconemu ugrupowaniu laktonowemu występującemu w strukturze furanokumaryn.

W obu widmach widoczne są pasma drgań rozciągających wiązań C=C układu aromatycznego oraz wiązań C=C układu furanowego w zakresie $1620 - 1560$ cm^{-1} , a także pasma drgań deformacyjnych

aromatycznych grup C-H przy 830 i 770 cm^{-1} . Widma obu związków ujawniają obecność silnych pasm drgań rozciągających ugrupowania eterowego C-O przy 1120 cm^{-1} oraz drgań rozciągających przy 1050, 1250 i 1280 cm^{-1} przypisywanych ugrupowaniu metoksyłowemu furanokumaryn [131,167].

W widmie MS (70 eV) wyizolowanego związku (ryc. 38,39) widoczny jest pik jonu molekularnego przy wartości m/z 216 (22,4%) oraz charakterystyczne dla rozpadu metoksyłowych pochodnych psoralenu, jony fragmentacyjne przy wartościach m/z : 201 ($M^+ - \text{CH}_3$; 9,0%), 188 ($M^+ - \text{CO}$; 4,9%) i 173 ($M^+ - \text{CO}, \text{CH}_3$; 15,2%) [131].

W obszarze niskich wartości m/z można zauważyć intensywne piki ugrupowania CO przy m/z 28 (36,8%) i CHO przy m/z 29 (22,7%), świadczące o rozpadzie układu laktonowego [26,131,167].

Fragmentacja ta nie wyjaśnia jednak drogi prowadzącej do powstania jonu podstawowego przy m/z 149, którego strukturę zaproponowano na ryc. 39. Wzory jonów przy m/z 201, 188 i 173 podano na ryc. 39 wg Nielseña [131].

Przedstawiona powyżej charakterystyka widm w UV, IR oraz MS wyizolowanego związku B, potwierdza wstępne przypuszczenia oparte na danych chromatograficznych, że związek ten jest bergapternem.

2.2.3.2.3. Analiza spektralna związku C

Związek C wykazuje niebieską fluorescencję w nadfiolecie (362 nm). Jego chromatograficzne właściwości w przebadanych układach rozwijających nie odpowiadają żadnej ze stosowanych substancji wzorcowych (por. tab. 9 i 17).

Widmo UV związku zawiera dwa maksima, przy $\lambda=230$ i 295 nm

oraz słabo widoczne przegięcie przy ok. 240 nm (ryc. 40). Intensywność tych pasm wskazuje na obecność w związku sprzężonych, aromatycznych układów wiązań podwójnych [167]. Przebieg krzywej absorpcji zgodny jest z danymi literaturowymi dla furanokumaryn i jednocześnie wyklucza obecność struktury kumaryny (brak maksimum absorpcji przy ok. 320 nm [131]).

Widmo IR badanego związku (ryc. 41) posiada dwa pasma w obszarze drgań rozciągających grupy C=O, przy 1750 cm^{-1} oraz w położeniu laktonowym przy ok. 1715 cm^{-1} [131,167].

Obecność pasma drgań rozciągających przy 1125 cm^{-1} sugeruje obecność ugrupowania eterowego [167]. Pasma przy 1050 cm^{-1} oraz 1250 i 1300 cm^{-1} wskazywać mogą na obecność ugrupowania metoksyłowego w układzie furanokumarynowym [131].

Pasmo przy ok. 3200 cm^{-1} może pochodzić od drgań rozciągających grupy fenolowej, związanej wiązaniami wodorowymi [167].

Pasma w zakresie 900 – 700 cm^{-1} związane z drganiami deformacyjnymi ugrupowań C-H w układach aromatycznych i nienasyconych, dowodzą obecności tych ugrupowań w badanym związku. Potwierdzają to także widoczne w widmie pasma drgań rozciągających aromatycznych wiązań C=C w zakresie 1590 – 1620 cm^{-1} sugerujące możliwość istnienia struktury furanu w badanym związku [131,167].

Widmo MS (15 eV) związku C (ryc. 42) charakteryzuje się obecnością silnych pików jonów fragmentacyjnych w obszarze niskich wartości m/z.

Pik cząsteczki CO (m/z 28-32,5%) potwierdza obecność ugrupowania karbonyłowego, a w powiązaniu z pikami CHO (m/z 29-9,6%) oraz z CO₂ (m/z 44-44,6%), dowodzi on obecności ugrupowania laktonowego w badanym związku [26,131,167].

Obecność pików przy m/z 149 (31,8%) może potwierdzać strukturę

furanokumarynową z ugrupowaniem metoksylovym, podobnie jak w bergaptenie, gdzie jon taki powstawał przez oderwanie pierścienia furanowego (por. ryc. 39).

W widmie zwraca uwagę obecność peków pików węglowodorowych o m/z będących wielokrotnością liczby 14($n \cdot \text{CH}_2$), aż do wartości m/z 135 - 140 (fragment o ok. 10 atomach węgla) [26].

Brak intensywnych pików jonów fragmentacyjnych przy wysokich wartościach m/z pozwala jedynie na zaproponowanie obecności jonu molekularnego przy m/z 386 [26,167].

Z przedstawionej powyżej charakterystyki widm wynika, że związek C posiada prawdopodobnie strukturę furanokumaryny z wolną grupą fenolową, z grupą metoksylovą w pierścieniu benzenowym i inną grupą alkoksylovą o większej masie cząsteczkowej.

Można przypuszczać, że masa cząsteczkowa związku wynosi 386.

2.2.3.2.4. Analiza spektralna związku D

Związek D wykazuje w przebadanych układach chromatograficznych odmienne wartości R_f i t_R niż stosowane wzorcowe połączenia kumarynowe (por. tab. 9 i 17). Dla wyizolowanego związku charakterystyczna jest intensywna fioletowa fluorescencja w nadfiolecie ($\lambda=362$ nm).

Widmo UV tego związku (ryc. 43) posiada maksimum absorpcji przy 227 i 294 nm oraz słabe przegięcie przy ok. 240 nm. Pasma te sugerują obecność układów aromatycznych w badanym związku [167]. Obecność tych pasm oraz brak maksimum absorpcji przy ok. 320 nm, charakterystycznego dla prostych kumaryn, może wskazywać na furanokumarynową strukturę związku D [131].

Widmo IR związku D (ryc. 44) wykazuje obecność dwóch inten-

sywnych pasm w zakresie karbonylowym przy 1710 i 1735 cm^{-1} . Pasma te mogą być kojarzone z ugrupowaniem laktonowym. Pasma przy 1735 cm^{-1} może sugerować obecność drugiej grupy ketonowej lub ugrupowania estrowego [131,167].

Obecność pasma drgań rozciągających przy 1130 cm^{-1} wskazuje na istnienie ugrupowania eterowego w badanym związku [167], a pasma przy 1050, 1270 i 1290 cm^{-1} mogą świadczyć o obecności grupy metoksylovej w układzie furanokumarynowym [131].

Szerokie pasmo przy ok. 3150 cm^{-1} może pochodzić od drgań rozciągających fenolowej grupy OH [167].

Słabe pasma przy 1600 cm^{-1} oraz między 700 - 900 cm^{-1} potwierdzają obecność ugrupowania aromatycznego w wyizolowanym związku, a pasmo drgań rozciągających C=C przy ok. 1640 cm^{-1} może sugerować obecność pierścienia furanowego w związku D [131,167].

Widmo MS (15 eV) pozwala zauważyć podobieństwo z obszarem niskich wartości m/z widma masowego związku C tj. fragmentacje węglowodorowa w postaci pęków pików różniących się o CH_2 (29, 43, 71, 85 m/z), w tym jon podstawowy C_4H_9 przy m/z 57 (ryc. 45,46) [26].

Obecność pików przy m/z 149 (49,2%) opisanego dla fragmentacji masowej bergaptenu i związku C może sugerować, że analizowany związek jest furanokumaryna.

Za jon molekularny można uważać jon przy m/z 256 o względnie dużej intensywności (26,3%), jednakże trudno dla niego znaleźć strukturę, z której wg reguł fragmentacji masowej mógłby powstawać jon przy m/z 149. Natomiast biorąc pod uwagę obecność względnie mało intensywnego (4,6%) jonu molekularnego przy m/z 314, można zaproponować schemat fragmentacji masowej polegający na

przejściu jonu molekularnego do trwałej aromatycznej struktury przy m/z 256 oraz na innej drodze do jonu przy m/z 149 [26, 167].

Proponowane w strukturze jonu molekularnego podstawniki (ryc. 46), grupa OH oraz grupa ketonowa w łańcuchu bocznym, wynikają z sugestii widma IR [167].

Uzyskane dane z analizy spektralnej wskazują, że badany związek należy do furanokumaryn. Posiada on grupę metoksyłową związaną z pierścieniem benzenowym oraz związaną z częścią furanową wolną grupę fenolową i łańcuch boczny zawierający ugrupowanie karbonyłowe. Przepuszczalna masa cząsteczkowa związku wynosi 314.

2.2.3.2.5. Analiza spektralna związku E

Związek E wykazuje odmienne właściwości chromatograficzne niż wzorcowe substancje, którymi dysponowano (por. tab. 9 i 17).

Charakterystyczna dla tego związku jest fioletowa fluorescencja w nadfiolecie ($\lambda=362$ nm).

Widmo UV badanego związku wykazuje maksimum przy 220 i 272 nm oraz zauważalne przegięcie przy ok. 312 nm (ryc. 47). Rozkład pasm absorpcji sugeruje obecność w badanym związku sprzężonych aromatycznych układów wiązań podwójnych [167]. Pasmo przy 272 nm występujące w widmie związku jest szczególnie charakterystyczne dla furanokumaryn o strukturze linearnej. Brak maksimum absorpcji przy ok. 320 nm potwierdza, że związek nie jest prostą kumaryną [131].

W widmie IR badanego związku (ryc. 48) dadzą się wyróżnić pasma w obszarze drgań rozciągających grupy alkoholowej (OH) przy ok. 3100 - 3400 cm^{-1} oraz słabe pasmo drgań rozciągających gru-

py karbonylowej w zakresie laktonowym (ok. 1730 cm^{-1}). Widoczne są słabe pasma przy ok. 1600 cm^{-1} związane z drganiami rozciągającymi wiązań C=C układu aromatycznego oraz pasmo drgań rozciągających wiązania C-O grupy eterowej przy 1140 cm^{-1} ponadto inne pasma w tym obszarze przy 1070 , 1240 i 1300 cm^{-1} mogące świadczyć o obecności ugrupowania metoksyłowego w układzie furanokumaryny [131,167].

W widmie MS (15 eV) badanego związku (ryc. 49,50) brak jest charakterystycznej fragmentacji węglowodorowej obecnej w widmach MS związków C i D. Można tu natomiast zauważyć dwa intensywne piki - przy m/z 28 (100%), odpowiadający cząsteczce CO oraz przy m/z 44 (86,3%), odpowiadający CO_2 . Ich obecność może świadczyć o strukturze laktonowej badanego związku [26].

Charakterystyczny dla układu furanokumaryn jon przy m/z 149 występuje tu w niewielkiej intensywności - ok. 1%. Obecny natomiast w pobliskim obszarze jon przy m/z 207 (46,6%) może sugerować, że struktura jonu przy m/z 149, charakterystycznego dla widm związków B, C i D, jest wzbogacona o dodatkowy podstawnik (ryc. 50). Proponowaną strukturę jonu przy m/z 207 można powiązać z hipotetyczną strukturą jonu macierzystego przy m/z 342 (3,8%), którego jednoczesny rozpad z wydzieleniem CO_2 z układu laktonowego i grupy -OH z ugrupowania alkoholowego prowadziłyby do powstania jonu o trwałej aromatycznej strukturze przy m/z 281 (14,7%). Strukturę jonu molekularnego potwierdza również pik przy m/z 309 (5,31%) powstały na skutek odsczczenia grupy $-\text{CH}_3$ i H_2O ($\text{M}^+ - 33$) charakterystycznego dla alkoholi rozgałęzionych oraz jon przy m/z 283 (4,37%) powstały po oderwaniu całego ugrupowania ($\text{M}^+ - 59$) [26,167].

Analiza widmowa wskazuje na obecność w badanym związku układu

furanokumaryny z grupą metoksyłową w pierścieniu benzenowym, z grupą alkoholową w rozgałęzionym układzie alifatycznym usytuowanym w pierścieniu benzo- α -pyronu oraz z podstawnikiem o masie 69 w pierścieniu furanowym.

Przypuszczalna masa cząsteczkowa związku E wynosi 342.

IV. Dyskusja wyników

1. Wymagania hodowlane tkanek *Ammi majus* L. w warunkach *in vitro*

W literaturze nie znaleziono żadnego szczegółowego opracowania dotyczącego inicjacji i optymalizacji warunków hodowli tkankowej *Ammi majus* L., podjęto więc takie zadanie w niniejszej pracy (por. rozdz. 7).

Najlepszym inicjującym kalusowanie podłożem hodowlanym, spośród 10 przetestowanych, okazało się podłoże Linsmaiera-Skooga zawierające 2,0 mg/dm³ BAP i 2,0 mg/dm³ NAA. Podłoże takim składzie było również dobre (jak wynika z doświadczeń autora niniejszej pracy) dla inicjacji kalusowania fragmentów siewek *Scrophularia Scopolii* Hoppe [53].

Podawane w literaturze pożywki sprzyjające kalusowaniu w przypadku *Ammi visnaga* [104,105,185] okazały się niekorzystne dla *Ammi majus* L. Był to kolejny przykład wielokrotnie stwierdzanego w hodowlach *in vitro* zindywidualizowania wymagań roślin, należących nawet do tego samego taksonu, w stosunku do składu podłoży hodowlanych [30,152,207].

Dla podtrzymania wzrostu uzyskanej *in vitro* hodowli *Ammi majus* L. okazało się bardzo korzystne także podłoże Linsmaiera-Skooga [61,62]. Podłoże to było opracowane dla kultur tkankowych *Nicotiana tabacum* [122] i jest często stosowane z powodzeniem w hodowlach *in vitro* różnych gatunków roślin wyższych [30,152,207].

W niniejszej pracy prowadzono badania zmierzające do ustalenia hodowlanych wymagań tkanek *Ammi majus* L. w warunkach *in vitro*, ze szczególnym uwzględnieniem składu podłoży hodowlanych, rodzaju hodowli i warunków świetlnych.

Z przeprowadzonych badań nad wpływem kompozycji substancji wzrostowych w podłożach hodowlanych na przyrosty masy tkankowej wynikało, że tkanki *Ammi majus* L. rosną bardzo dobrze na większości przetestowanych wersji podłoża L-S, jakkolwiek uzyskano na nich wartości wskaźników przyrostu w bardzo szerokich granicach od 28,8 do 736,0. Na większości stosowanych wersji pożywek wartości te przekraczały liczbę 400,0.

Spośród najszerzej przetestowanych podłoży hodowlanych zawierających kompozycje BAP z 2,4-D, IAA, IBA lub NAA, najlepsze przyrosty świeżej masy tkankowej (średnie przyrosty z 10 wersji podłoży) notowano na podłożach z kompozycjami BAP i IAA oraz BAP i IBA, nieco gorsze w przypadku wersji pożywek zawierających kompozycje BAP i NAA. Zdecydowanie najmniej korzystne dla wzrostu tkanek okazały się podłoża z kompozycjami BAP z 2,4-D [61].

Identyczny efekt w/w kompozycji BAP i auksyn na przyrosty biomasy obserwowano zarówno w hodowlach agarowych, jak i płynnych stacjonarnych prowadzonych w warunkach świetlnych, a także w hodowlach agarowych prowadzonych bez dostępu światła. Wpływ tych kompozycji substancji wzrostowych na przyrosty masy tkanek *Ammi majus* L. wydaje się więc być mało zależnym od zmiany pozostałych warunków hodowlanych, zarówno od rodzaju hodowli, jak i od warunków świetlnych.

Przebadane wersje pożywek agarowych, zawierające kompozycje kinetyny z IAA lub IBA, okazały się zdecydowanie gorsze dla przyrostów masy tkankowej, w porównaniu z podłożami agarowymi zawierającymi identycznie ilościowo kompozycje BAP z tymi auksynami.

Hodowane *in vitro* tkanki *Ammi majus* L. wykazywały w dalszych pasażach także zdolności do wzrostu na podłożach agarowych za-

wierających pojedyncze kininy lub auksyny, a także na podłożu L-S pozbawionym substancji wzrostowych.

Zjawisko anergizacji w stosunku do auksyn lub do cytokinin jest znane dla niektórych hodowli tkankowych, m.in. *Nicotiana tabacum*, *Vitis vinifera*, *Scorzonera hispanica*, *Citrus aurantiifolia*, *Dianthus* sp. Natomiast równoczesne uniezależnienie się hodowanych in vitro tkanek od auksyn i cytokinin, stwierdzone w przypadku *Ammi majus* L., obserwuje się rzadko (np. u *Daucus carota*) prawdopodobnie dlatego, że zjawiska te nie są związane ze sobą przyczynowo [207].

Z przeprowadzonych orientacyjnych badań nad wpływem obecności naturalnych kompleksów odżywczych oraz witamin w podłożach hodowlanych wynikał różny ich efekt na przyrosty biomasy oraz makroskopowy wygląd tkanek.

Obserwowano wyraźnie korzystne działanie cytokinin zawartych w wodzie kokosowej oraz mieszaniny aminokwasów hydrolizatu kazeiny na przyrosty masy tkanek bez równoczesnej niekorzystnej zmiany ich wyglądu, co było charakterystyczne w przypadku podłoży zawierających mleczo kukurydziane.

Z przeprowadzonych obserwacji wynikały także ograniczone wymagania tkanek *Ammi majus* L. w stosunku do zawartości witamin w podłożu hodowlanym. Tkanki *Ammi majus* L. rosły zdecydowanie lepiej w obecności samego chlorowodoru tiaminy, niż całego kompleksu witamin, stosowanego często w hodowlach tkankowych innych roślin w celu stymulacji ich wzrostu. Obserwacja ta jest równoznaczna z małą przydatnością zmodyfikowanego podłoża Murashige'a-Skooga [107,128] w hodowli Aminka większego.

Z powyższych obserwacji wynikało, że stosowane w testowanych wersjach podłoża L-S, podwyższone wg własnej modyfikacji stęże-

nie chlorowodoru tiaminy (równe 1,0 mg/dm³), witaminy powodującej aktywację zarówno procesów oddychania, jak i fotosyntezy zaspokaja zupełnie witaminowe zapotrzebowanie tkanek *Ammi majus* L. hodowanych *in vitro*.

W badaniach nad wpływem rodzaju hodowli na proces wzrostu tkanek *Ammi majus* L., obserwowano korzystne przyrosty biomasy zarówno w warunkach hodowli agarowych, płynnych stacjonarnych, jak i zawieszinowych. Porównując wartości wskaźników przyrostu uzyskane dla tkanek w hodowlach agarowych oraz płynnych stacjonarnych (na podłożach identycznym składzie i w identycznych warunkach świetlnych), stwierdzono taki sam poziom przyrostów biomasy.

W hodowlach zawieszinowych otrzymywano przeciętnie uzyskiwane w tych warunkach przyrosty liczby komórek w toku cyklu hodowlanego oraz wartości procentu suchej masy [94]. Nie stwierdzono znaczącego wpływu obecności egzogennie dodanego umbeliferonu w podłożach hodowlanych na zmianę tych wartości.

Z przeprowadzonych obserwacji dotyczących znaczenia warunków świetlnych dla wzrostu tkanek kalusowych *Ammi majus* L. wynikało, że tkanki omawianego gatunku dobrze rosną w warunkach ciągłego oświetlenia o natężeniu ok. 900 lx, jak i w absolutnej ciemności. Uzyskiwane wartości wskaźników przyrostu tkanek w tych drastycznie różnych warunkach świetlnych posiadały wyrównany poziom i wynosiły odpowiednio od 233,6 do 613,8 przy 900 lx oraz od 151,4 do 684,5 w ciemności.

Z porównania wartości wskaźników przyrostu tkanek rosnących w różnych warunkach świetlnych, wynikał różny efekt oświetlenia na przyrosty biomasy związany z zawartością substancji wzrostowych w podłożach hodowlanych.

W przypadku wersji pożywek zawierających kompozycje BAP i 2,4-D obserwowano wyraźnie stymulujący wpływ oświetlenia na przyrosty tkanek. Brak dostępu światła sprzyjał natomiast nieznacznie przyrostom masy tkankowej na wersjach podłoża z kompozycjami BAP i NAA. Dla tkanek z wersji pożywek zawierających kompozycje BAP z IAA lub z IBA wpływ warunków świetlnych był zmienny, zależny od wzajemnych stężeń kininy i auksyny w podłożu.

Obserwowany różny efekt światła na przyrosty tkanek *Ammi majus* L., związany z jakościowym i ilościowym składem substancji wzrostowych w podłożu hodowlanym, jest zapewne wypadkową równoczesnego wpływu obu tych czynników na proces wzrostu tkanek.

Z przedstawionego przeglądu hodowlanych wymagań tkanek *Ammi majus* L. w kulturach *in vitro* wynikało, że wysokie wydajności wzrostu tkanek uzyskiwane były w przypadku większości zbadanych w ramach niniejszej pracy warunków hodowlanych. Istniała więc potencjalna możliwość praktycznego wykorzystania tej hodowli m.in. w badaniach nad biosyntezą metabolitów wtórnych.

2. Wybrane aspekty chromatograficznej analizy metabolitów hodowli

W niniejszej pracy podjęto próby ustalenia optymalnych warunków rozdzielów chromatograficznych połączeń kumarynowych charakterystycznych dla metabolizmu *Ammi majus* L. techniką TLC i HPLC.

Spośród przebadanych w technice TLC układów chromatograficznych, najbardziej selektywne dla równoczesnego rozdzielu sześciu analizowanych połączeń: umbeliferonu, marmezyny, bergaptenu, izopimpinliny i imperatoryny okazały się układy z fazami od-

wróconymi (RP-18), w zakresie stężeń metanolu 65 - 80% [63].

W chromatografii cienkowarstwowej wykazano równocześnie małą przydatność układów adsorbcyjnych w rozdzielaniu analizowanych połączeń. W żadnym z przebadanych układów chromatograficznych tego typu nie był możliwy równoczesny rozdział wszystkich w/w związków.

Dla wzajemnego rozdziału nieznanych, wyizolowanych w toku niniejszej pracy połączeń furanokumarynowych (związki C, D i E) bardzo korzystne okazały się zarówno układy z fazami odwróconymi (RP-18, woda:metanol) w całym stosowanym zakresie stężeń metanolu (65 - 95%) oraz układy adsorpcyjne n-heptan:chloroform (9 : 1 v/v) i nierozcieńczony heptanem chloroform.

W układach z fazami odwróconymi, przy stężeniu metanolu 65, 70 i 90%, możliwe były korzystne równoczesne rozdziały 9 połączeń - 6 wzorcowych substancji oraz 3 wyizolowanych związków.

W niniejszej pracy wykazano też wysoką przydatność układów z fazami odwróconymi do rozdzielania analizowanych metabolitów techniką HPLC (RP-18, woda:metanol - 3:7 v/v) [63].

Rozdziały na fazach niepolarnych związanych chemicznie pozwalają uzyskać zróżnicowane wartości współczynników R_f i t_R dla strukturalnie bardzo podobnych związków. Wartości tych współczynników pozostają w ścisłej zależności od właściwości hydrofobowych cząsteczki związku, związanych z rodzajem i wielkością podstawników oraz ich usytuowaniem względem hydrofilnych centrów cząsteczki [85]. Z takimi zależnościami można spotkać się w grupie furanokumaryn. Z tego też powodu techniki chromatograficzne z fazami odwróconymi zyskują coraz większe zastosowanie w rozdzielaniu furanokumaryn i innych połączeń kumarynowych [25,63,66,79,80,81]. Pomimo dużego zainteresowania tymi technikami, nie

znaleziono w literaturze danych o równoczesnych rozdzielach analizowanych w materiale pochodzącym z hodowli *Ammi majus* L. połączeniach.

W niniejszej pracy wykazano możliwość zastosowania metody HPLC do oszacowania ilościowej zawartości poszczególnych furanokumaryn i umbeliferonu w materiale uzyskanym z kultur *in vitro*.

Większość klasycznych metod oznaczeń ilościowych furanokumaryn sprowadza się do oznaczeń globalnej zawartości tych związków w badanym materiale, ewentualnie poszczególnych substancji, po ich uprzedniej elucji z chromatogramów, co jest bardzo czasochłonne i obniża znacznie dokładność analiz [17,27,103,124,166]. Technika HPLC umożliwia natomiast równoczesne rozdzielenie związków oraz ich ilościowe oszacowanie [22,25,39,66,79-81,87,182]. Między innymi te możliwości metody oraz stosunkowo krótki czas poszczególnych analiz (ok. 15 min. w ustalonych w niniejszej pracy warunkach rozdzielów) zadecydowały o jej wykorzystaniu, pomimo że dokładność metody jest stosunkowo niska [83].

3. Wpływ niektórych warunków hodowlanych na biosynteze metabolitów wtórnych

W badaniach nad wpływem kompozycji substancji wzrostowych na biosynteze metabolitów obserwowano bardzo duże jakościowe i ilościowe zróżnicowanie ich zawartości w analizowanym materiale tkankowym. Z badań tych wynikał głównie wyraźny wpływ kompozycji BAP i IAA na zawartość poszczególnych metabolitów. Stymulujący wpływ wszystkich testowanych kompozycji BAP i IAA obserwowano w przypadku umbeliferonu. Wybrane kompozycje BAP i IAA wpływały także stymulująco na akumulację ksantotoksyny. Odwrotny efekt

stwierdzano w stosunku do marmezyny, izopimpineliney i imperatoryny.

Wpływ pozostałych testowanych kompozycji substancji wzrostowych był mniej wyraźny. Kompozycje BAP i 2,4-D nieznacznie stymulowały produkcję ksantotoksyny, kompozycje BAP i NAA izopimpineliney i imperatoryny, a wersje pożywek z BAP i IBA sprzyjały biosyntezie związku G.

Spośród analizowanych połączeń kumarynowych, bergapten był jedynym metabolitem obecnym w materiale tkankowym uzyskanym z wszystkich wersji analizowanych podłoży zawierających kompozycje BAP z auksynami. Analogiczną sytuację obserwowano w przypadku biosyntezy związków C, D i E.

Podobnie jak w przypadku kultur tkankowych *Ammi majus* L., stymulujący wpływ IAA na biosyntezę połączeń kumarynowych - skopoletyny i skopoliny, obserwowano także w hodowlach kalusa *Nicotiana tabacum* var. Bright Yellow. Obecność 2,4-D w podłożu hodowlanym powodowała natomiast wyraźną supresję biosyntezy tych związków [75].

Porównując uzyskane wartości Wp dla tkanek *Ammi majus* L. pochodzących z podłoży hodowlanych o różnym składzie substancji wzrostowych oraz uzyskaną w tych tkankach ilościową zawartość furanokumaryn i umbeliferonu, nie stwierdzono jednoznacznej zależności pomiędzy tempem wzrostu tkanek, a poziomem biosyntezy oznaczanych metabolitów.

W toku analizy materiału tkankowego uzyskanego z podłoży zawierających najmniejsze testowane stężenia (po 0,1 mg/dm³) kinin i auksyn (wersje 5), na których obserwowano zdolności morfogenetyczne tkanek, nie stwierdzono wyższego poziomu metabolitów, przypuszczalnie z powodu małego stopnia zaawansowania procesów

różnicowania.

W badaniach dotyczących wpływu warunków świetlnych na biosyntezę metabolitów stwierdzono różne efekty; w przypadku bergaptenu wyraźną aktywację, a w przypadku marmezyny, izopimpinliny i imperatoryny wyraźną supresję ich biosyntezy w ciemności. Brak światła sprzyjał także biosyntezie związków F i G (w hodowlach agarowych związek F pojawiał się jedynie w warunkach braku światła).

W stosunku do umbeliferonu i ksantotoksyny obserwowano zmiennej wpływ oświetlenia na ich biosyntezę.

Wpływ warunków świetlnych na ilościową zawartość połączeń kumarynowych był obserwowany w hodowlach *Ruta graveolens* [149]. W hodowlach tego gatunku stwierdzono, podobnie jak w niniejszej pracy, stymulację biosyntezy bergaptenu w ciemności, oraz przeciwnie niż w hodowli *Ammi majus* L., aktywację biosyntezy izopimpinliny i ksantotoksyny także przy braku dostępu światła.

W wyniku prób określenia wpływu rodzaju hodowli na akumulację metabolitów uzyskano rozbieżne obserwacje. W przypadku wersji pożywek zawierających kompozycje BAP i IAA (wersje 2,3) uzyskano we frakcji tkanek bogatszy jakościowo w ksantotoksynę i imperatorynę oraz ilościowo zespół furanokumaryn, w porównaniu z hodowlami prowadzonymi na identycznych podłożach agarowych. W przypadku podłoża zawierającego BAP i IBA (wersja 5) zespół metabolitów był uboższy (tab. 15). Dla wszystkich jednak hodowli zawieszinowych wspólną była obserwacja, że warunki tej hodowli sprzyjały akumulacji bergaptenu. We frakcjach tkanek tych hodowli uzyskano średnio ok. 1,7 - 5,6-krotnie wyższe zawartości tego metabolitu, w porównaniu z odnośnymi hodowlami agarowymi.

Warunki hodowli zawieszinowych sprzyjały także biosyntezie

związków F₁ i G.

Analizowane metabolity wydzielane były do pożywek lecz w bardzo różnym stopniu. Wysoki udział w tej frakcji odnotowano dla marmezyny i izopimpineliney (57,9 - 100%), natomiast bardzo zmienny dla umbeliferonu i bergaptenu (w zakresie 34,0 - 82,5%). Związki C, D, E, F i G kumulowały się w obu frakcjach.

We frakcjach pożywek nie stwierdzono obecności imperatoryny i ksantotoksyny. Podobnie w przypadku hodowli *Nicotiana tabacum*, nigdy nie stwierdzono obecności skopoliny we frakcji pożywek, lecz zawsze wybiórcze jej kumulowanie się we frakcji tkanek [73, 150, 160, 168].

W hodowlach zawieszinowych prowadzonych z umbeliferonem obserwowano wyraźne jego wbudowywanie w bergapten. Stwierdzono bowiem wzrastającą zawartość tej furanokumaryny zarówno we frakcjach tkanek, jak i pożywek wraz ze wzrostem stężenia prekursora w podłożach hodowlanych. Wśród metabolitów frakcji pożywek obserwowano także pojawienie się ksantotoksyny i marmezyny.

Prowadzenie hodowli tkankowych z egzogennie dodanymi prekursorami wtórnych metabolitów jest bardzo często stosowane jako metoda stymulacji ich biosyntezy. Umbeliferon był z powodzeniem wykorzystywany przez hodowle *Ruta graveolens* w produkcji psoralenu, bergaptenu, ksantotoksyny i izopimpineliney [15]. W niniejszej pracy wykazano mały stopień wykorzystania tego prekursora przez badane tkanki w biosyntezie furanokumaryn.

We frakcjach pożywek stwierdzono duży procent niewykorzystanego prekursora.

Być może inny prekursor, stanowiący bardziej zaawansowany etap biosyntezy furanokumaryn (wg dróg ustalonych *in vivo*, por. rozdz. 2,3.) np. DMS, marmezyna czy psoralen okazałyby się bar-

dzień korzystne i byłyby wykorzystane w większym stopniu w biosyntezie tych związków przez tkanki Ammi majus L.

W warunkach hodowli in vitro metabolity wtórne produkowane są często jedynie w pierwszych pasażach, a później zdolności biosyntetyczne hodowli maleją lub nawet zanikają. W niniejszej pracy analizie fitochemicznej poddano więc materiał zebrany z hodowli ok. 12-miesięcznej (pasaże 9-13). Analizowano także wybiórczo materiał z ok. 2-letniej hodowli (pasaże 23-25), w którym stwierdzono zachowaną zdolność biosyntezy oznaczanych metabolitów - głównie bergaptenu i umbeliferonu, dając dowód możliwości wykorzystania hodowli tkankowej Ammi majus L. jako źródła tych metabolitów wtórnych.

4. Porównanie możliwości biosyntetycznych hodowli tkankowej i rośliny macierzystej

W analizowanym materiale uzyskanym w różnych warunkach hodowlanych stwierdzono obecność wszystkich sześciu oznaczanych połączeń kumarynowych, typowych dla metabolizmu rośliny macierzystej: umbeliferonu, bergaptenu, imperatoryny, izopimpineli-ny, ksantotoksyny i marmezyny [61,62]. Tylko jeden spośród tych metabolitów - bergapten, występował we wszystkich analizowanych tkankach z różnych warunków hodowlanych oraz we wszystkich frakcjach pożywek hodowli zawiesinowych.

Podobnie w większości analizowanych prób materiału hodowlanego stwierdzano obecność umbeliferonu. Pozostałe metabolity gromadzone były jedynie w materiale uzyskanym w wybranych warunkach hodowlanych.

Maksymalna całkowita zawartość oznaczanych metabolitów w ma-

teriale uzyskanym w hodowli *Ammi majus* L. in vitro wynosiła 113,83 mg% i była ok. 8-krotnie mniejsza od zawartości tych związków w owocach *Ammi majus* L., z których wyprowadzono hodowlę (906,96 mg%). Ilościowo przeważającymi składnikami tych owoców były marmezyna i ksantotoksyna. Pozostałe połączenia kumarynowe gromadzone były w zdecydowanie mniejszych ilościach (por. tab. 16).

W uzyskanym z hodowli in vitro materiale najwyższe zawartości marmezyny (34,48 mg%) i ksantotoksyny (6,67 mg%) były odpowiednio ok. 20- i 25-krotnie mniejsze od zawartości tych metabolitów w owocach rośliny. W większości prób, w których stwierdzono obecność tych metabolitów były to zawartości poniżej 10 mg% dla marmezyny i poniżej 1 mg% dla ksantotoksyny.

W przypadku pozostałych oznaczanych metabolitów wtórnych, uzyskano większą ich ilościową zawartość w materiale hodowlanym.

Najwyższe ilości umbeliferonu (35,83%) dorównywały jego zawartości w owocach. W większości analizowanych prób były to jednak wartości poniżej 20 mg%.

W przypadku bergaptenu, najwyższe notowane ilości w materiale z kultur tkankowych (25,16 mg%) były nieznacznie niższe od zawartości tego metabolitu w owocach. Dla większości prób uzyskano ilości poniżej 15 mg%.

Na jednej z wersji testowanych podłoży (zawierającej po 10,0 mg/dm³ BAF i 2,4-D, wersja 8) uzyskano zawartość izopimpinliny równą poziomowi w owocach (28,57 mg%) oraz ilości imperatoryny dwukrotnie większe niż w owocach (22,11 mg%).

W większości analizowanych prób, w których stwierdzono obecność tych furanokumaryn, otrzymywano wyniki poniżej wartości 1 mg%.

Porównanie uzyskanej w materiale z hodowli in vitro ilości-

wej zawartości poszczególnych metabolitów, podobnie jak i ich całkowitej zawartości, z odpowiednimi wartościami otrzymanymi dla owoców rośliny macierzystej, wypada niekorzystnie dla hodowli *in vitro*. Przy tych porównaniach należy jednak pamiętać, że owoce *Ammi majus* L. są organem rośliny najbogatszym w oznaczane w niniejszej pracy połączenia kumarynowe (por. rozdz. część teoret.).

Z analizy fitochemicznej siewek uzyskanych w warunkach sterylnych z owoców, z których wyprowadzono kultury tkankowe wynikało, że ilościowa zawartość marmezyny i ksantotoksyny osiągała także najniższe wartości, a ilości umbeliferonu, bergaptenu i izopimpineliny były jedynie parokrotnie mniejsze, w porównaniu z zawartością tych związków w owocach rośliny, analogicznie jak w przypadku analizowanych tkanek kalusowych. Metabolizm siewek nastawiony jest głównie na realizację programu metabolizmu podstawowego, sprzyjającego ich rozwojowi; podobna sytuacja istnieje w szybko rosnących tkankach kalusowych.

Uzyskanie w analizowanym materiale z hodowli tkankowej *Ammi majus* L. wysokich zawartości interesującego terapeutycznie bergaptenu oraz umbeliferonu należy uznać za osiągnięcie, gdyż niewielka jest lista metabolitów wtórnych produkowanych w ilościach dorównujących ich poziomowi w materiale macierzystym (por. rozdz. 6).

Zastanawiającym jest fakt, że bergapten, czyli 5-metoksypsoralen jest biosyntetyzowany w dość wysokich ilościach w warunkach hodowli *in vitro*, podczas gdy inne interesujące terapeutycznie furanokumaryny - szczególnie ksantotoksyna, a także imperatoryna, pochodne psoralenu z podstawnikami w pozycji 8, są produkowane w zdecydowanie mniejszych ilościach.

Zastanawiającym jest także fakt obecności minimalnych ilości marmezyny w materiale z kultur tkankowych, związku stanowiącego *in vivo* etap poprzedzający biosyntezę psoralenu i jego alkoksylowych pochodnych. Być może w warunkach hodowli *in vitro* zachowuje się ona jako przemijający prekursor, błyskawicznie transformowany w inne metabolity. Dość wysoki poziom zawartości endogennego umbeliferonu w materiale hodowlanym może jednak świadczyć o niezawansowaniu procesów biosyntezy furanokumaryn. Związek ten jest bowiem znanym prekursorem tych połączeń. Możliwe jest także, że biosynteza najprostszych pochodnych psoralenu przebiega *in vitro* na innej drodze, niż stwierdzono to *in vivo* (por. rozdz. 2,3.)

Oprócz przedstawionych powyżej różnic w ilościowej zawartości poszczególnych metabolitów wtórnych, stwierdzono także ich jakościowo inny skład w materiale z hodowli tkankowej, w porównaniu z owocami *Ammi majus* L. Wśród metabolitów hodowli wykazano bowiem obecność nowych, wstępnie zidentyfikowanych połączeń furanokumarynowych (związki C, D i E). Z porównania wyników analizy spektralnej tych związków z danymi z piśmiennictwa [29,60, 100,131,172,188] można sądzić, że związki C, D i E nie są żadnymi spośród ok. 20 znanych dla metabolizmu rośliny macierzystej połączeń kumarynowych (por. rozdz. część teoret. i 2,2,3.). Związki te należą obok umbeliferonu i bergaptenu do metabolitów gromadzonych w materiale hodowlanym uzyskanym prawie z wszystkich warunków hodowlanych.

W materiale z hodowli *Ammi majus* L. *in vitro* stwierdzono także obecność dwóch innych związków - związku F i G. Ze względu jednak na sporadyczne pojawianie się ich wśród metabolitów hodowli, nie podjęto badań zmierzających do ustalenia ich struktury

w ramach niniejszej pracy.

Obecność nowych, nieznanych dla roślin macierzystych połączeń wśród metabolitów hodowli tkankowych roślin wyższych jest wielokrotnie stwierdzana w warunkach hodowli *in vitro* (por. rozdz. 6).

Spośród połączeń kumarynowych takim nowym połączeniem, którego obecność stwierdzono w hodowli *in vitro* *Ruta graveolens* jest 3-(1',1'-dimetyloallilo)-skopoletyna, związek niespotykany w rodzinie Rutaceae, a także rutakultyna - nowe naturalne połączenie uzyskane po raz pierwszy w przyrodzie z tej właśnie hodowli (por. rozdz. 8).

Być może pełna identyfikacja związków C, D i E, wyizolowanych w niniejszej pracy, wzbogaci listę tych nowych połączeń.

V. WNIOSKI

- Tkanki *Ammi majus* L. zadowolająco rosną w różnych warunkach hodowli *in vitro*, mogą więc być wykorzystane m.in. w badaniach nad biosyntezą metabolitów wtórnych.
- Metabolizm wtórny tkanek *Ammi majus* L. w warunkach hodowli *in vitro* jest wyraźnie zmieniony w stosunku do metabolizmu tkanek rośliny macierzystej
- Tkanki kalusowe wykazują zdolność do endogennej produkcji połączeń kumarynowych charakterystycznych dla rośliny macierzystej: umbeliferonu, bergaptenu, imperatoryny, izopimpinliny, ksantotoksyny i marmezyny lecz ilościowa zawartość poszczególnych metabolitów jest odmienna niż w roślinie gruntowej.
- W warunkach hodowli *in vitro* produkowane są także nowe, nieznanne dla metabolizmu rośliny macierzystej furanokumarynowe połączenia (związki C, D, E).
- W hodowli *Ammi majus* L. *in vitro* zahamowana jest wyraźnie biosynteza pochodnych psoralenu z podstawnikami w pozycji 8: ksantotoksyny, imperatoryny, izopimpinliny, a preferowana jest wyraźnie droga prowadząca do biosyntezy 5-metoksypsoralenu, czyli bergaptenu.
- Tylko dwa, spośród znanych dla metabolizmu *Ammi majus* L. związków - interesujący terapeutycznie bergapten i umbeliferon biosyntetyzowane są w wybranych warunkach hodowlanych w ilościach dorównujących poziomowi ich zawartości w owocach rośliny. Hodowla tkankowa *Ammi majus* L. może więc być potencjalnym źródłem tych związków.
- Hodowla tkankowa *Ammi majus* L. może być również źródłem nowych furanokumarynowych połączeń (związków C, D i E), gdyż należą

one także do najobficiej gromadzonych metabolitów wtórnych.

- Istnieje możliwość stymulacji produkcji poszczególnych analizowanych w pracy połączeń kumarynowych poprzez zmianę warunków hodowlanych. Warunki hodowlane obejmujące: kompozycje substancji wzrostowych w podłożu hodowlanym, warunki świetlne, rodzaj hodowli oraz obecność prekursora mają wyraźny lecz zróżnicowany wpływ na jakościową i ilościową zawartość poszczególnych metabolitów wtórnych.

W rozdziałach chromatograficznych analizowanych furanokumaryn i umbeliferonu najlepsze zastosowanie mają techniki chromatograficzne z fazami odwróconymi, wykorzystujące zróżnicowane właściwości hydrofobowe poszczególnych związków.

Tematyczny wykaz tabel

	str
Tab. 1 Budowa połączeń kumarynowych występujących w Ammi majus L.	21-22
Tab. 2: Skład podłoża stosowanych w hodowli Ammi majus L. in vitro	47
Tab. 3: Wersje podłoża Linsmaiera-Skooga testowane w hodowli tkankowej Ammi majus L.	48
Tab. 4-8: Wpływ różnych warunków hodowlanych na przyrosty masy tkankowej	71-73
Tab. 9: Wyniki rozdziałów chromatograficznych wzorcowych furanokumaryn i umbeliferonu techniką TLC	85
Tab. 10-15: Wpływ różnych warunków hodowlanych na zawartość metabolitów wtórnych w materiale z hodowli in vitro	99-104
Tab. 16: Porównanie zawartości oznaczanych metabolitów wtórnych w owocach Ammi majus L., siewkach i materiale z hodowli in vitro	104
Tab. 17: Wyniki rozdziałów chromatograficznych wyizolowanych związków A, B, C, D, E techniką TLC	109

Tematyczny wykaz rycin

Ryc. 1	Fotografia Ammi majus L.	str. 139
Ryc. 2-9:	Fotografie związane z hodowlą tkankową Ammi majus L.	139-144
Ryc. 10-12:	Ryciny przedstawiające strukturę furanokumaryn, wzór biadduktu z tyminą oraz schemat biosyntezy tych związków	145-146
Ryc. 13-21:	Wyniki wpływu różnych warunków hodowlanych na przyrosty masy tkankowej Ammi majus L.	147-151
Ryc. 22-26:	Wyniki rozdziałów chromatograficznych wzorcowych furanokumaryn i umbeliferonu techniką TLC	152-154
Ryc. 27-29:	Ryciny związane z chromatograficzną analizą furanokumaryn i umbeliferonu techniką HPLC	155-156
Ryc. 30-31	Wyniki rozdziałów chromatograficznych wyizolowanych związków A, B, C, D, E techniką TLC	157
Ryc. 32-50:	Ryciny dotyczące analizy spektralnej wyizolowanych związków A, B, C, D, E	158-167

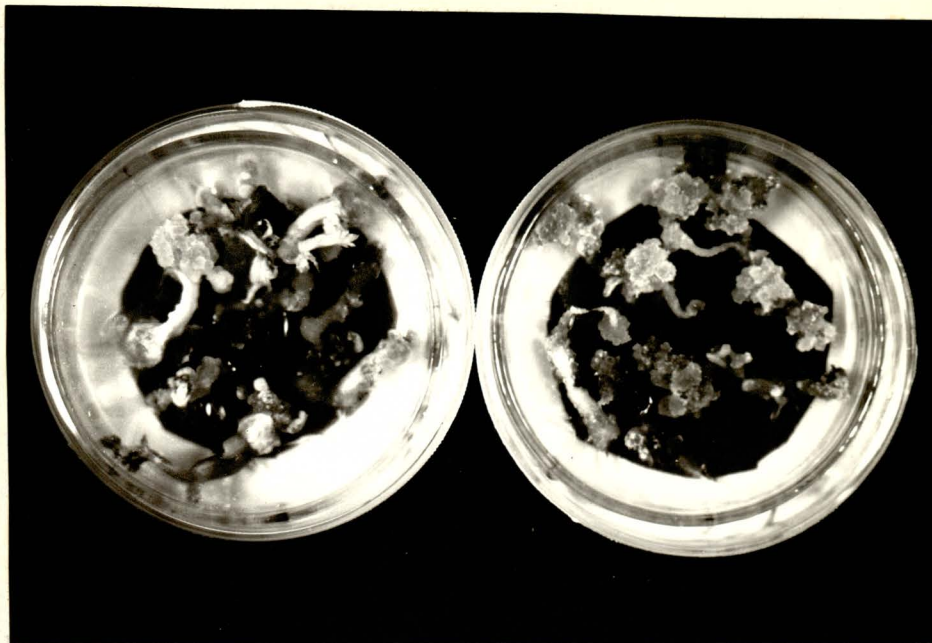
ALBUM RYCIN.



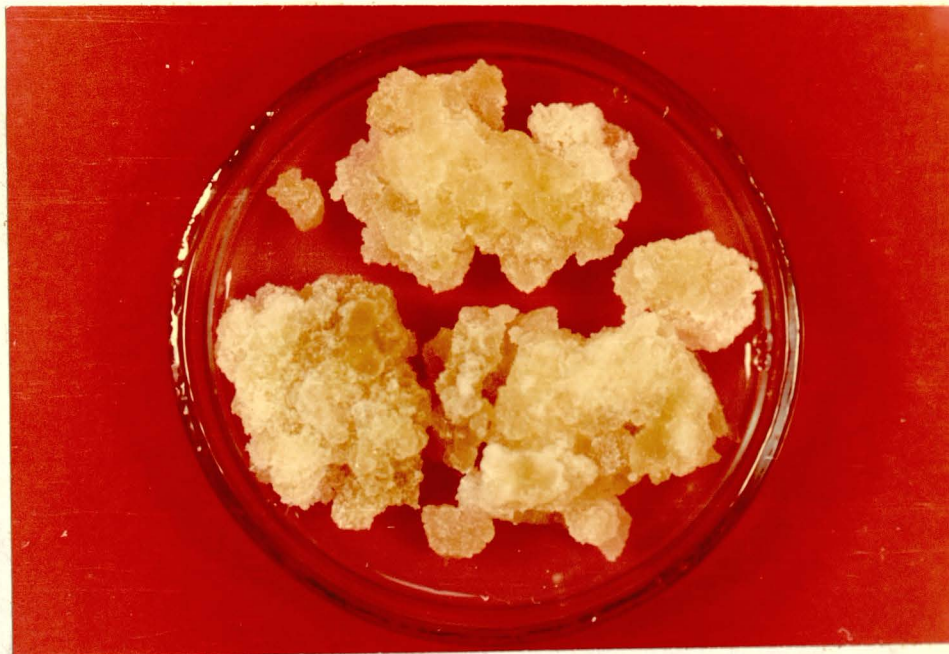
ryc. 1. *Ammi majus* L. wg Turowej A.D., Sapożnikowej E.N. [1963].



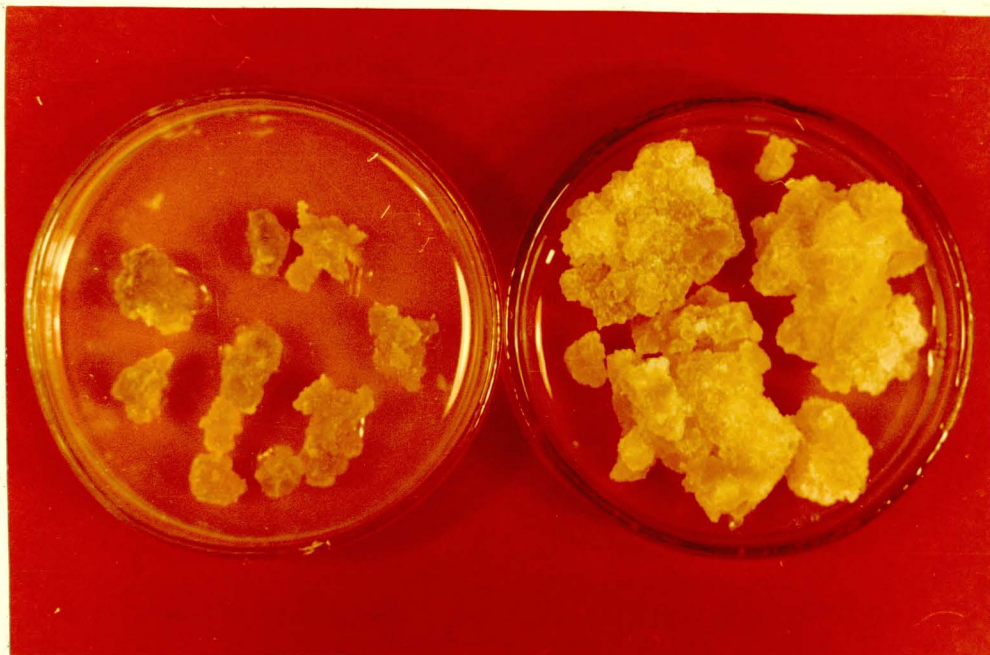
ryc. 2. Kiełkujące w warunkach aseptycznych owoce *Ammi majus* L., z których wyprowadzono hodowle in vitro, Podłoże: roztwór kinetyny i kwasu giberelinowego ($c = 10^{-4} \text{g/dm}^3$).



ryc. 3. Inicjacja kalusowania, Podłoże L-S zawierające 2,0 mg/dm³ BAP i 2,0 mg/dm³ NAA,



ryc. 4. Typowa tkanka kalusowa z hodowli agarowej, Podłoże L-S zawierające 1,0 mg/dm³ BAP i 5,0 mg/dm³ NAA, pasaż 12.



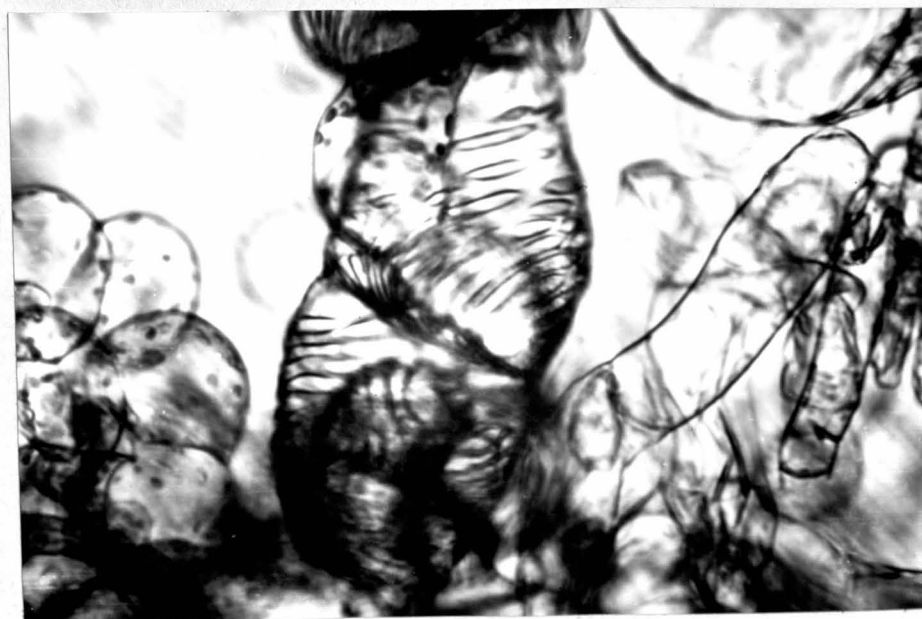
ryc. 5. Przeciętnie uzyskiwane w okresie 1 pasażu przyrosty masy tkankowej, Podłoże L-S; BAP-1,0 mg/dm³, NAA-5,0 mg/dm³, Pasaż 12, masa początkowa - 2,0 g
a) hodowla agarowa, masa końcowa - 11,1 g



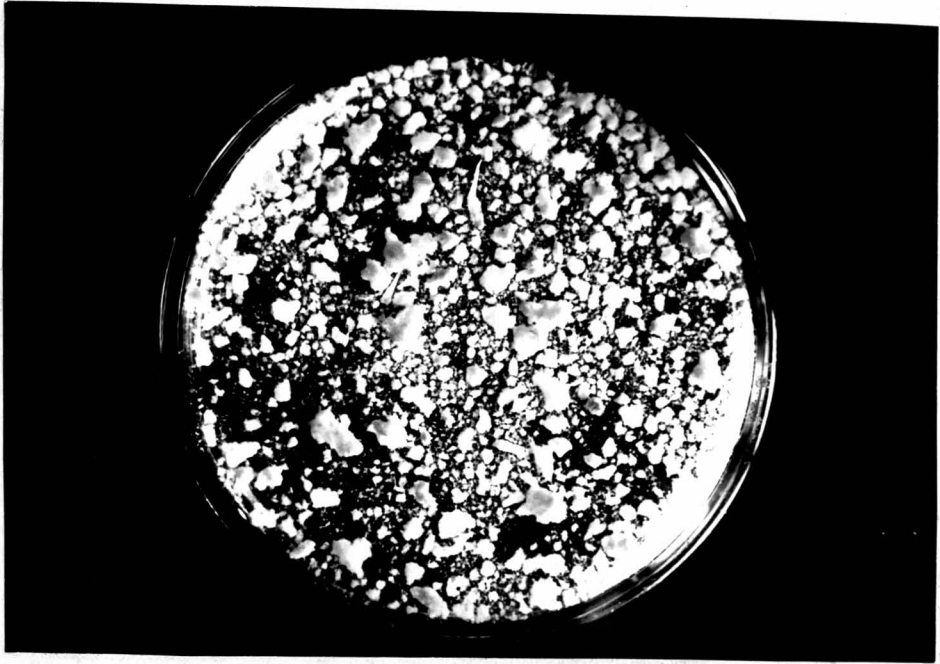
b) hodowla płynna stacjonarna, masa końcowa - 12,8 g.



ryc. 6. Mikroskopowy obraz komórek z hodowli agarowej.
Podłoże L-S zawierające $1,0 \text{ mg/dm}^3$ BAP i $1,0 \text{ mg/dm}^3$ IBA,
a) niezróżnicowane komórki kalusa, pow. $\times 300$



b) skupisko elementów trachealnych, pow. $\times 360$.



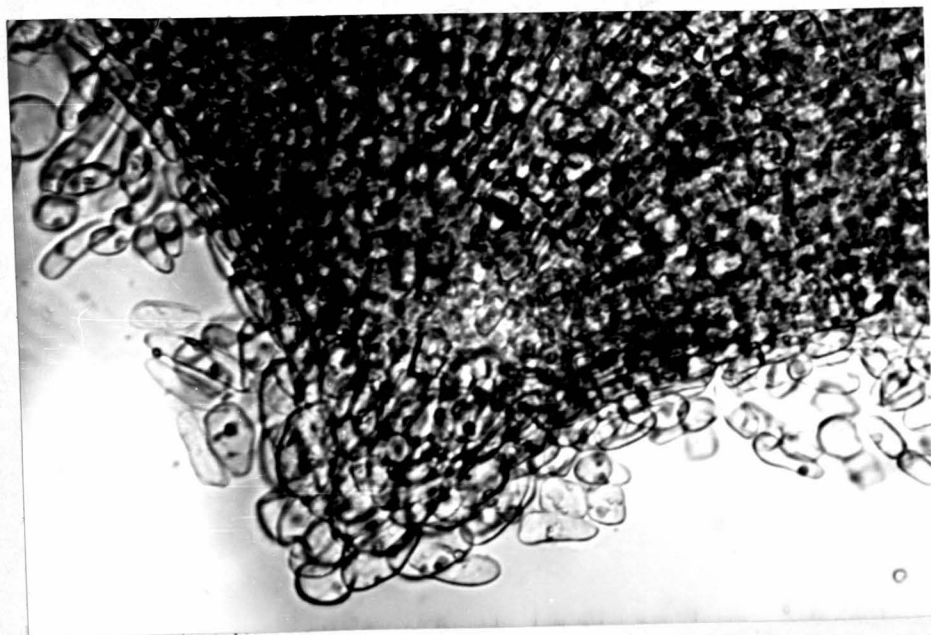
ryc. 7. Agregaty komórkowe z hodowli zawieszinowej. Podłoże L-S;
BAP - 0,1 mg/dm² i IBA - 0,1 mg/dm².



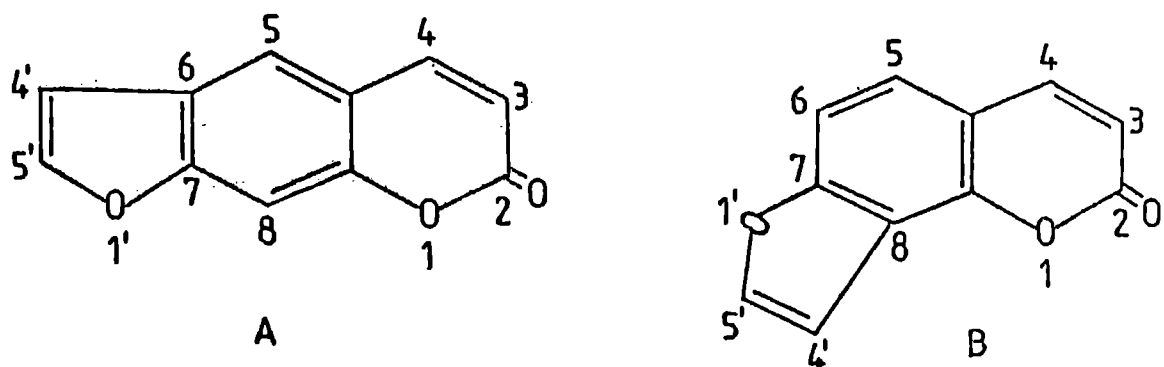
ryc. 8. Komórki z hodowli zawieszinowej widoczne na tle siatki
komory Fuchs-Rosenthala. Podłoże j.w., pow. x 260.



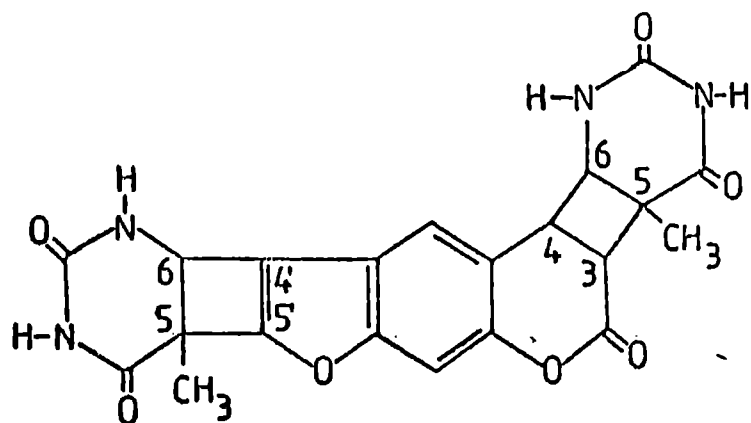
ryc. 9. Hodowla agarowa - początkowe stadia morfogenezy.
Podłoże L-S zawierające $0,1 \text{ mg/dm}^3$ BAF i $0,1 \text{ mg/dm}^3$ IBA
a) wielkość naturalna



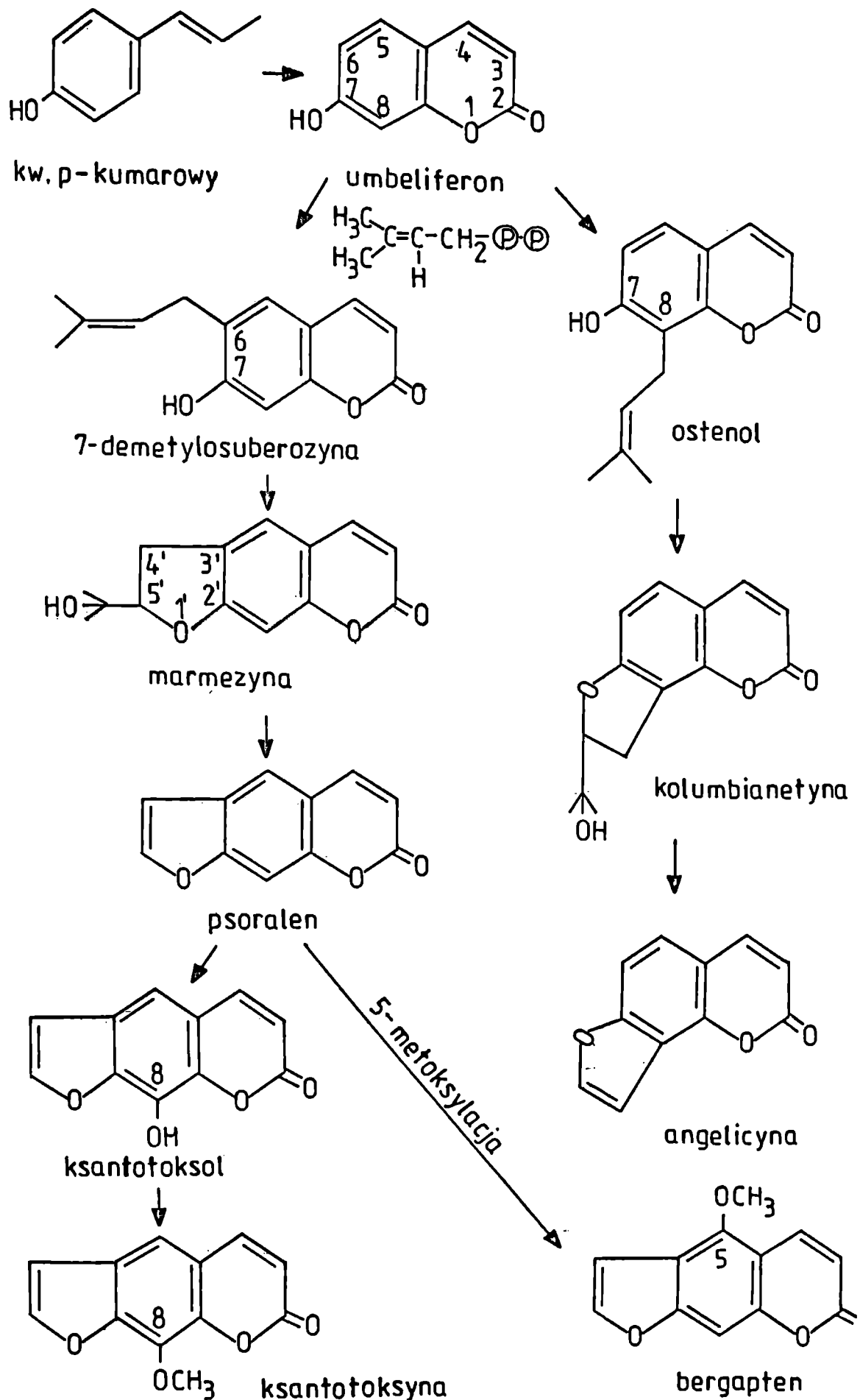
b) mikroskopowy obraz powstałych elementów morfotycznych, pow. $\times 130$.



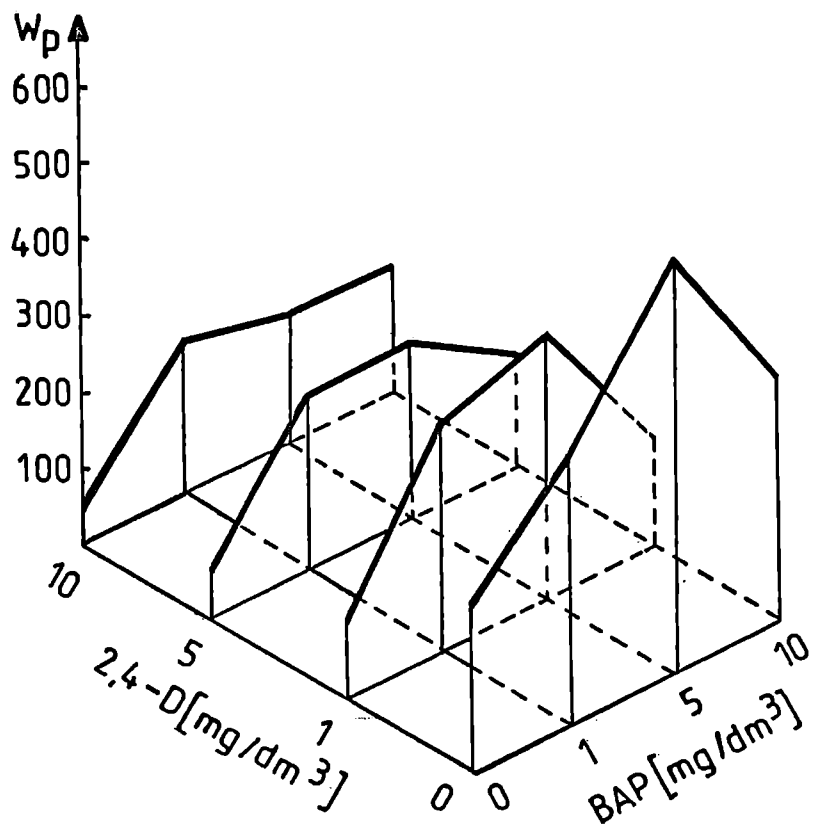
ryc. 10. Struktura psoralenu (A) i angelicyny (B).



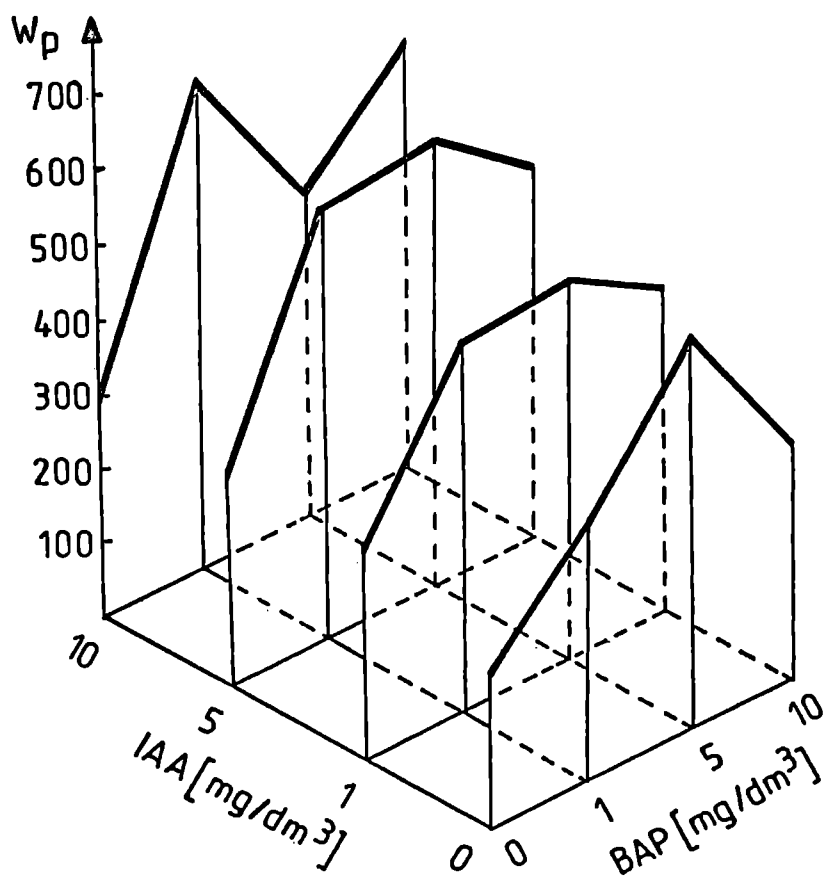
ryc. 11 Wzór 3,4 - 4',5' biadduktu psoralenu z tymina wg Beyricha Th, [29].



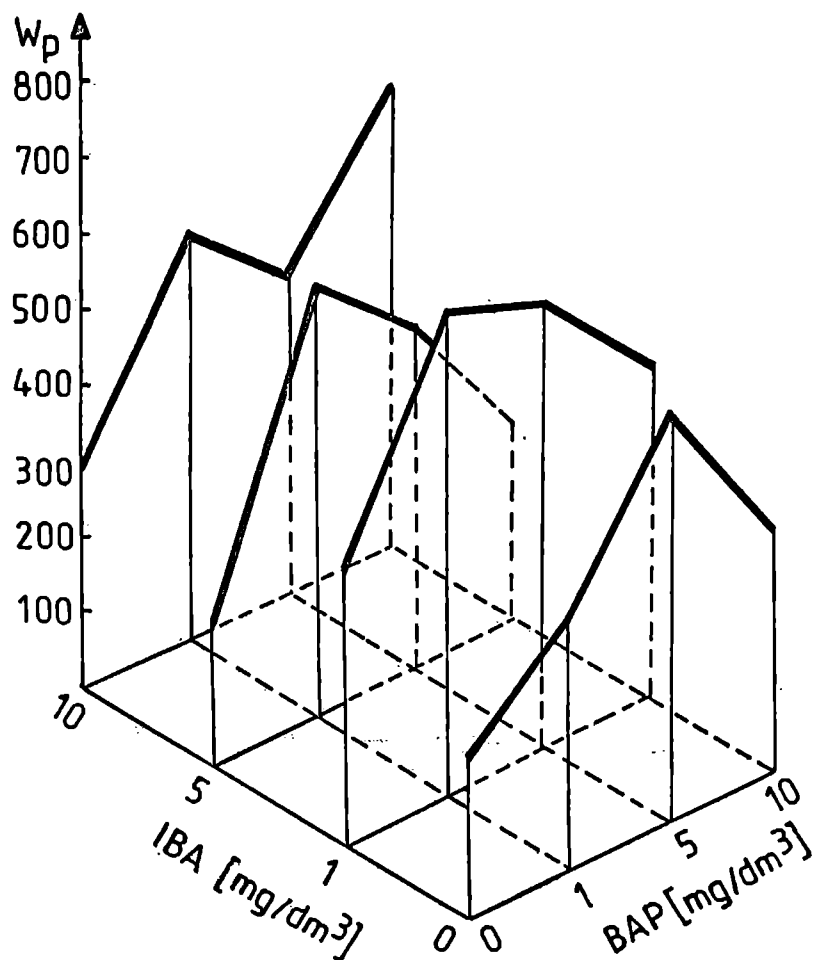
ryc. 12. Schemat biosyntezy podstawowych furanokumaryn wg danych z piśmiennictwa [40,41,56,106,179,181].



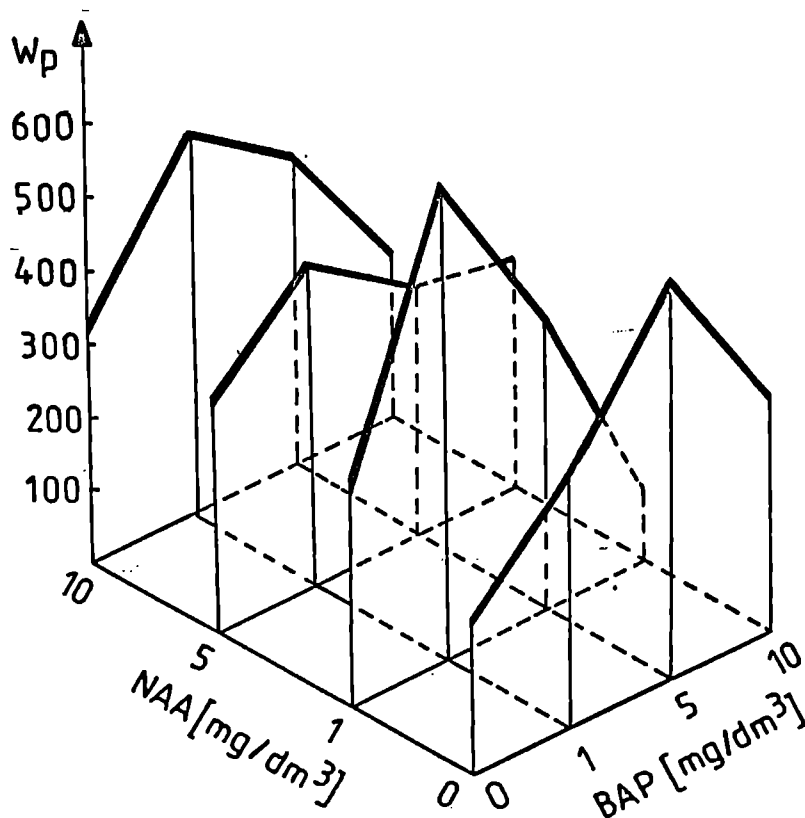
ryc. 13. Zależność wartości wskaźników przyrostu (W_p) dla tkanek *Ammi majus* L. od wzajemnego stężenia BAP i 2,4-D w agarowych podłożach L-S.



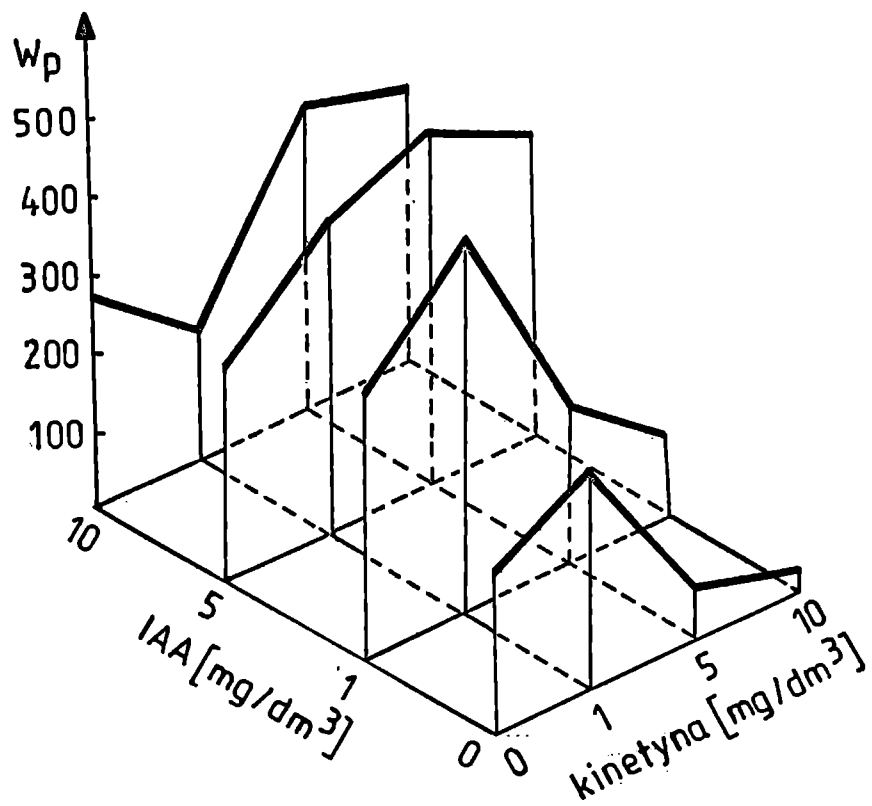
ryc. 14. Zależność wartości W_p dla tkanek *Ammi majus* L. od wzajemnego stężenia BAP i IAA w agarowych podłożach L-S.



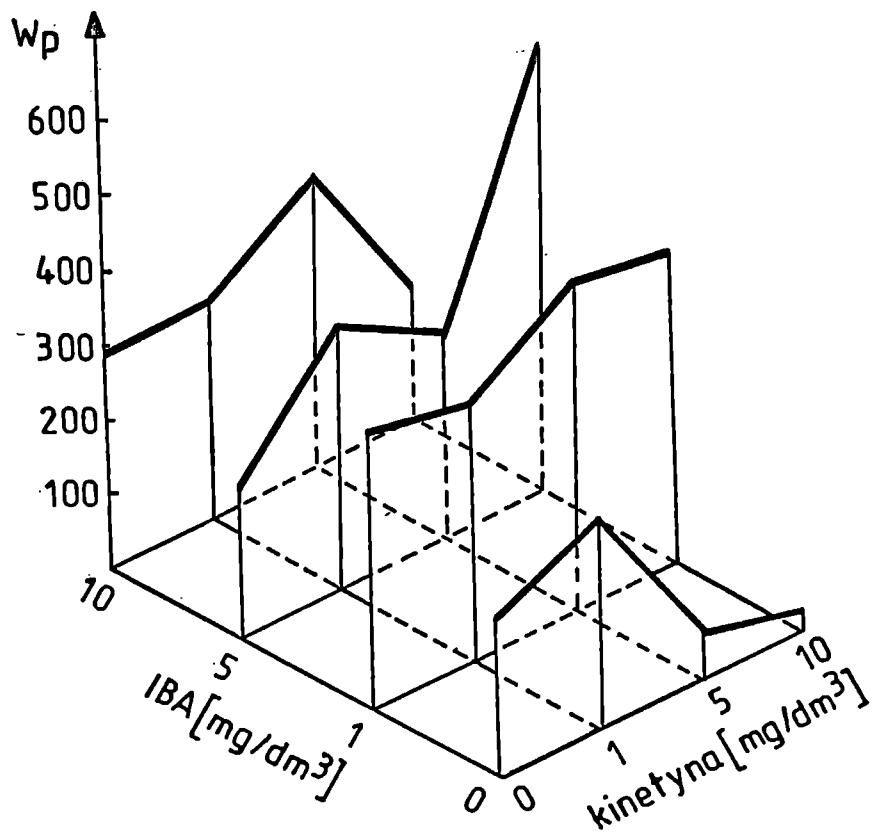
ryc. 15. Zależność wartości W_p dla tkanek *Ammi majus* L. od wzajemnego stężenia BAP i IBA w agarowych podłożach L-S.



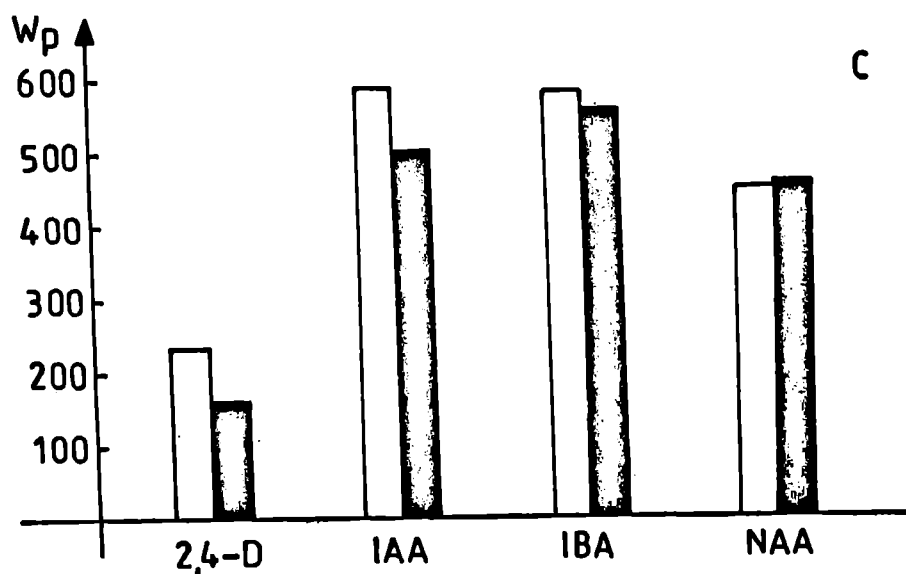
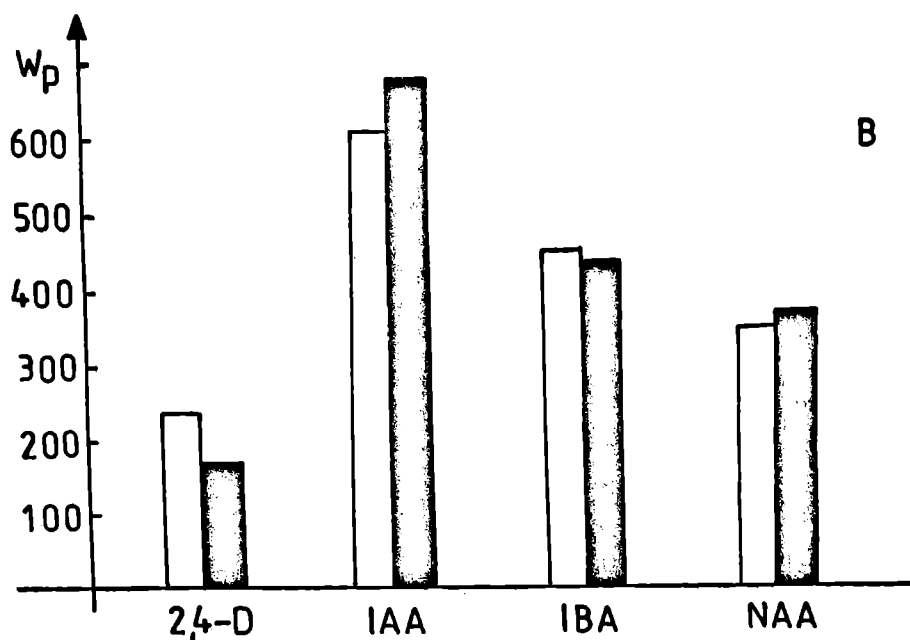
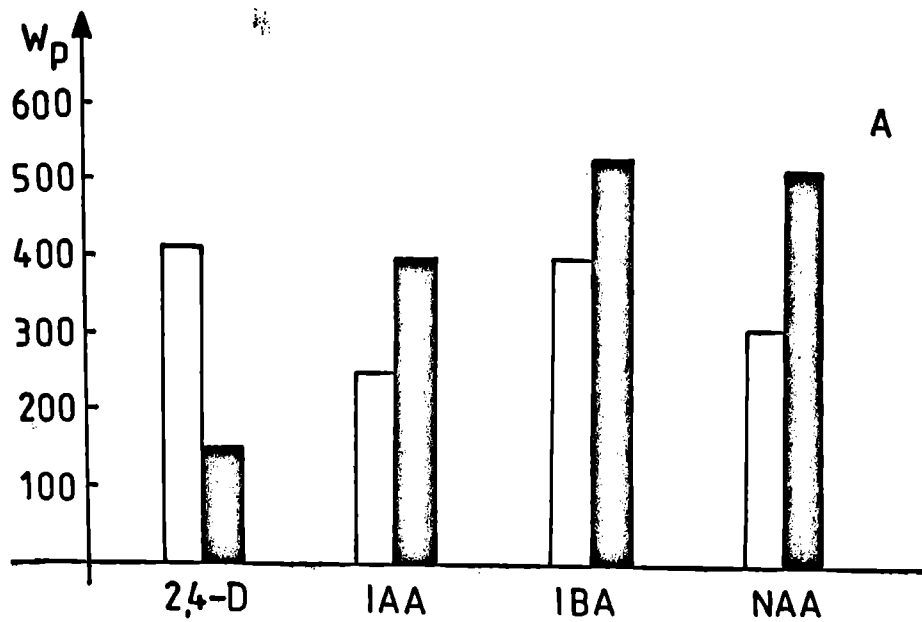
ryc. 16. Zależność wartości W_p dla tkanek *Ammi majus* L. od wzajemnego stężenia BAP i NAA w agarowych podłożach L-S.



ryc. 17 Zależność wartości W_p dla tkanek *Ammi majus* L. od wzajemnego stężenia kinetyny i IAA w agarowych podłożach L-S.

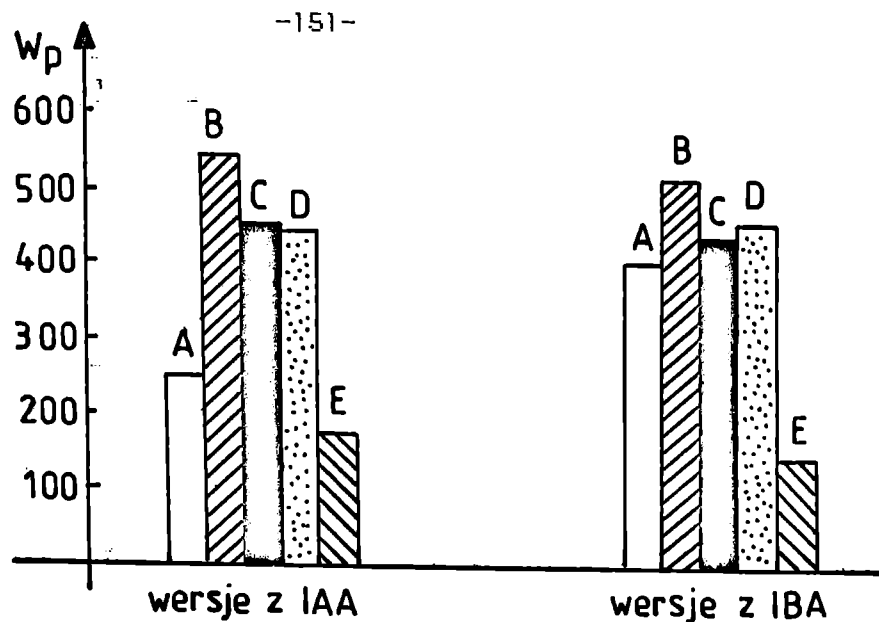


ryc. 18. Zależność wartości W_p dla tkanek *Ammi majus* L. od wzajemnego stężenia kinetyny i IBA w agarowych podłożach L-S.

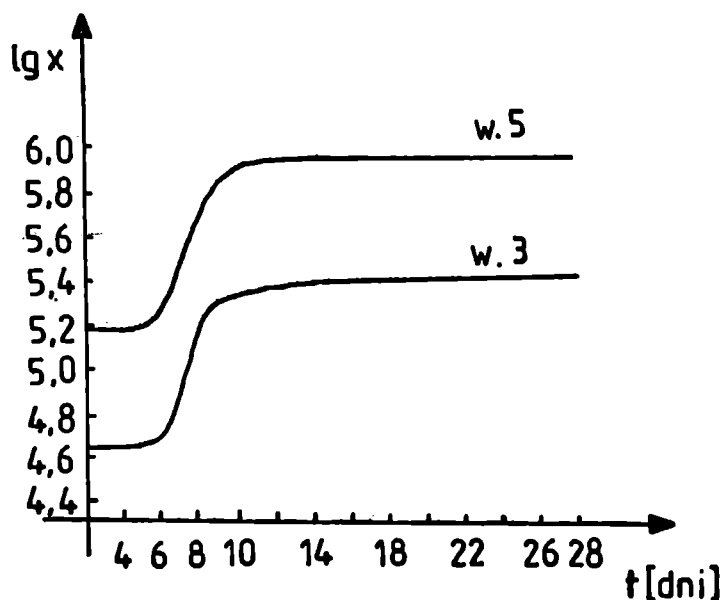


□ oświetlenie (900lx) ■ brak dostępu światła

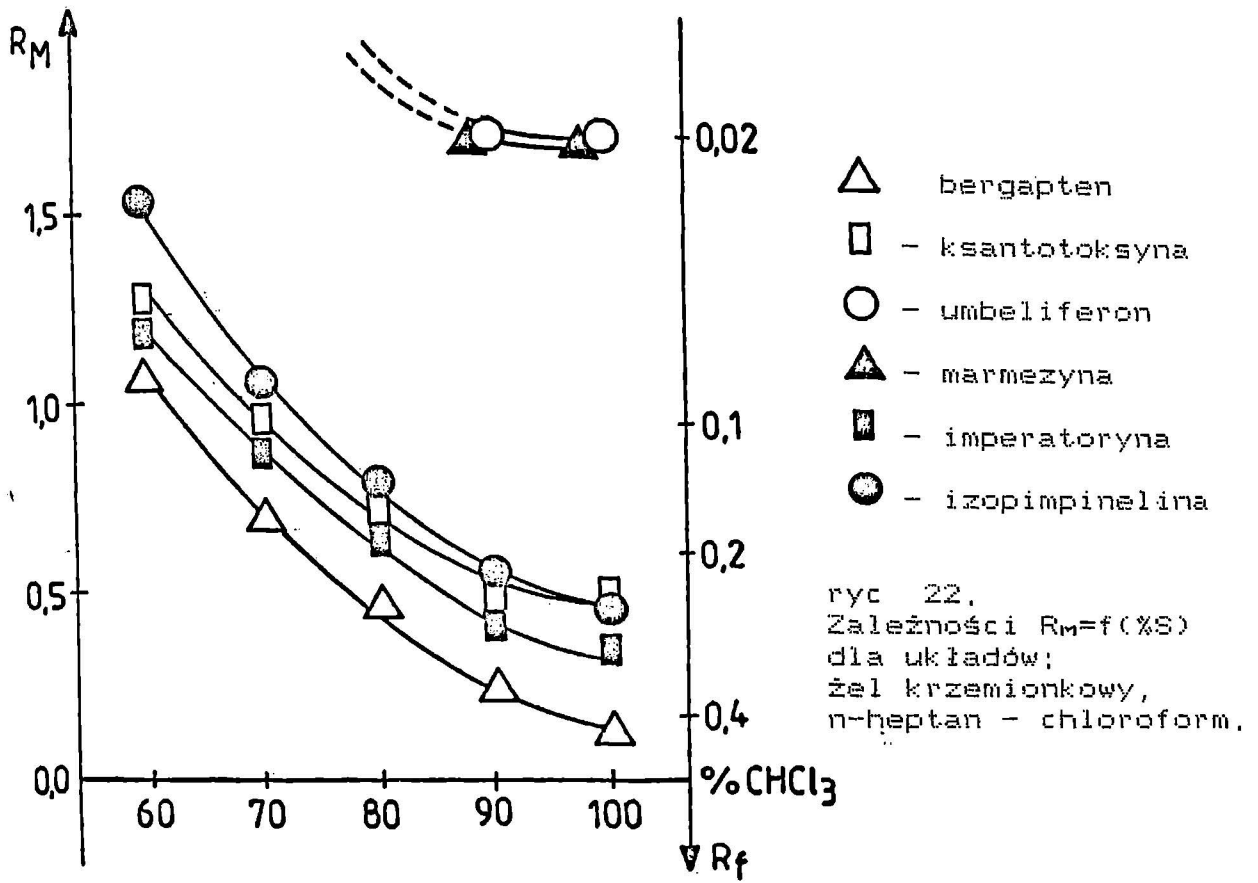
ryc. 19. Wpływ warunków świetlnych na wartości W_p dla tkanek Ammi majus L. z agarowych podłoży L-S; A - wersje 5, B - wersje 2, C - wersje 6 (wersje z BAP, wg tab. 3).



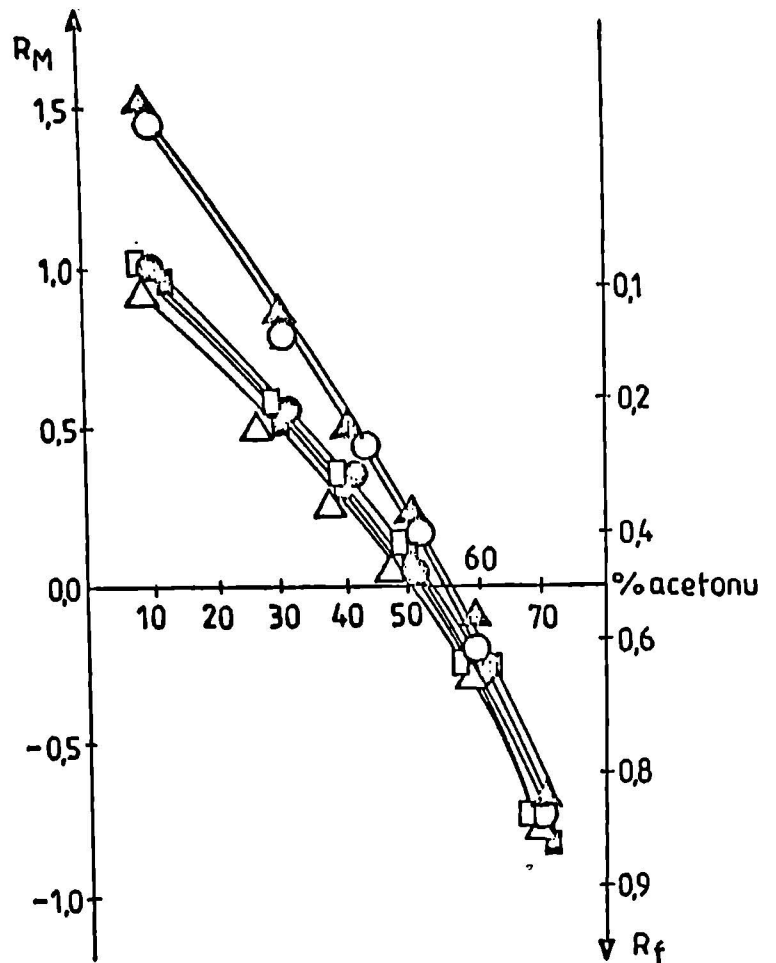
ryc. 20. Wpływ kompleksów odżywczych na wartości W_p dla tkanek *Ammi majus* L., Agarowe podłoża L-S; A - pożywka podstawowa (w. 5), B - z wodą kokosową (w. 18), C - z mleczkiem kukurydzianym (w. 19), D - z hydrolizatem kazeiny (w. 20), E - z kompleksem witamin (w. 21); w. = wersja podłoża, por. tab. 3.

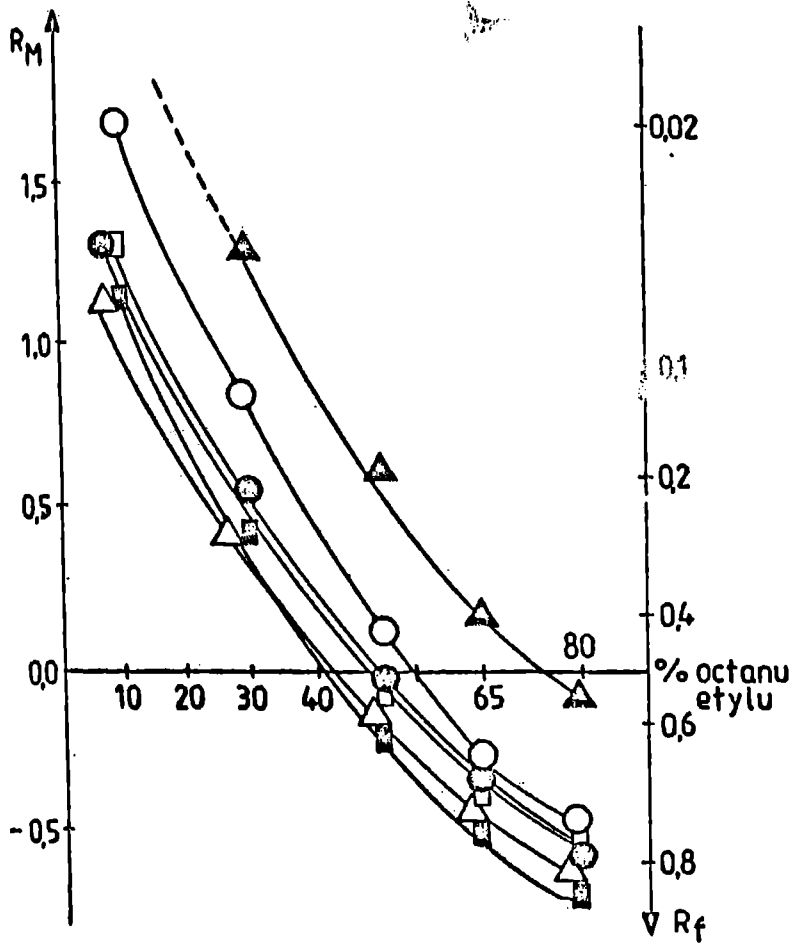


ryc. 21. Hodowle zawiesinowe - wykresy zależności $\lg x$ z liczby komórek (x) w 1cm^3 zawiesiny od czasu trwania (t) hodowli, $\lg(x)=f(t)$; w. = wersja podłoża L-S, w.3 - BAP i IAA, w.5 - BAP i IBA, por. tab. 3.



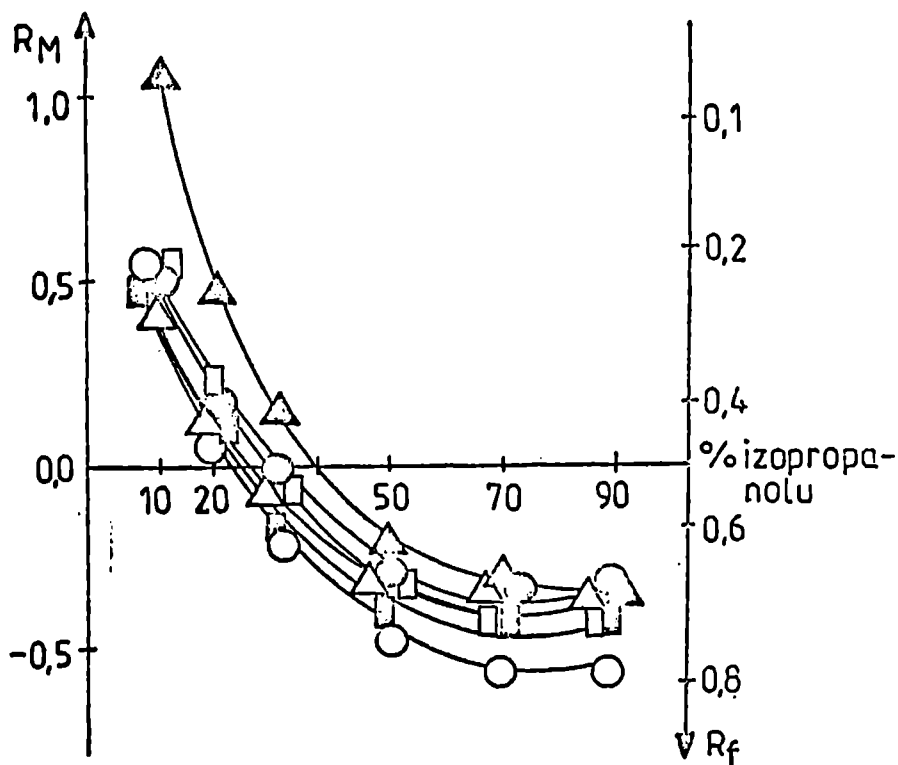
ryc. 23.
Zależności $R_M=f(\%S)$
dla układów:
żel krzemionkowy,
n-heptan - aceton.

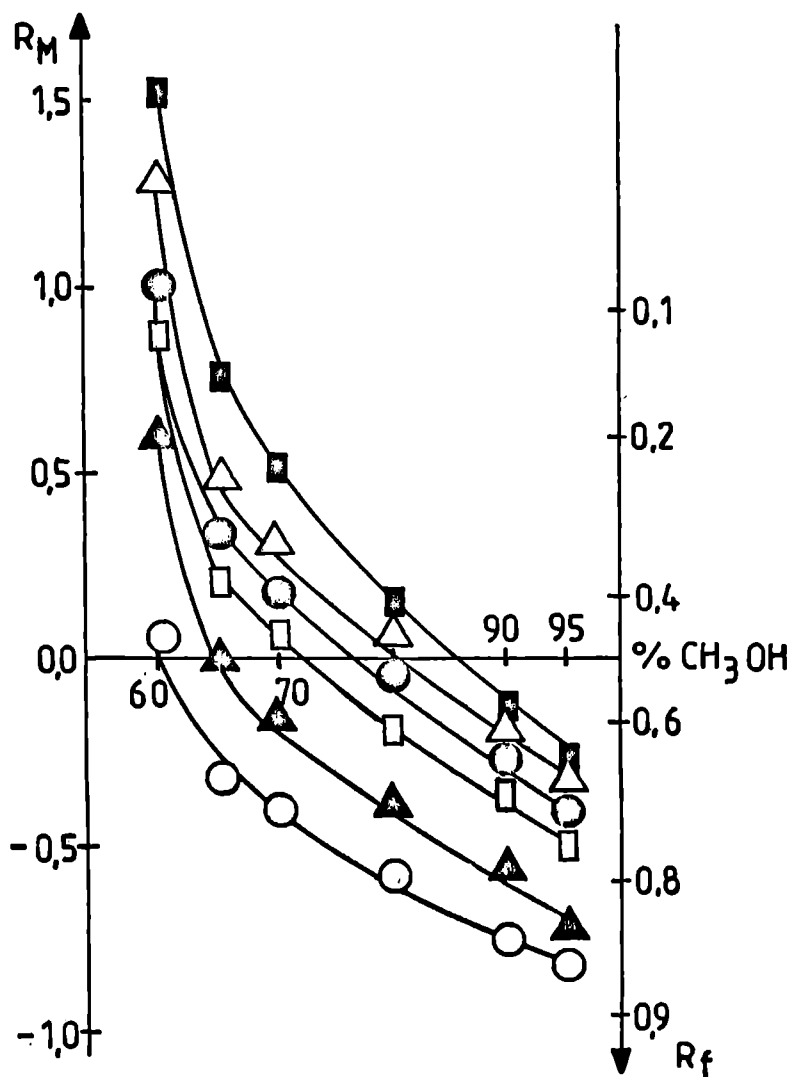




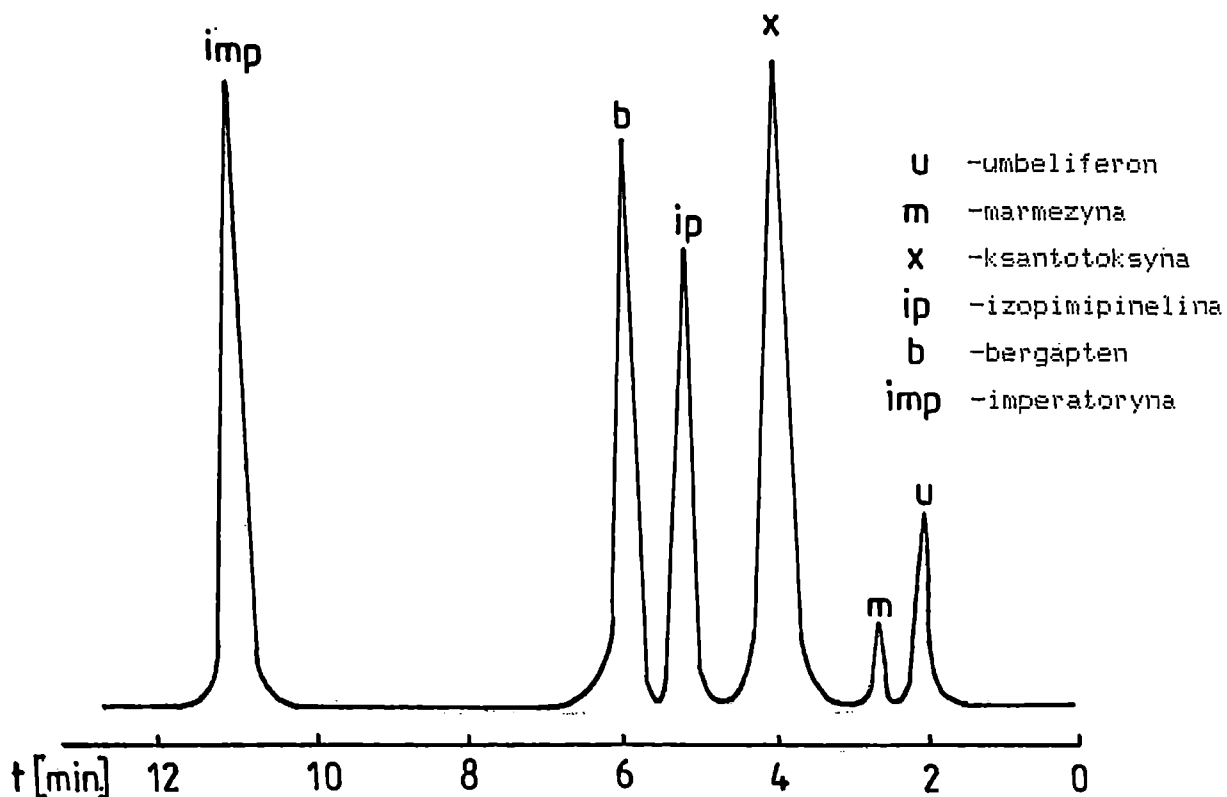
ryc. 24.
Zależności $R_M=f(\%S)$ dla
układów: żel krzemionkowy,
n-heptan - octan etylu,
Oznaczenia patrz ryc.22.

ryc. 25.
Zależności $R_M=f(\%S)$ dla ukła-
dów: żel krze-
mionkowy, n-hep-
tan-izopropanol.
Oznaczenia patrz
ryc. 22.

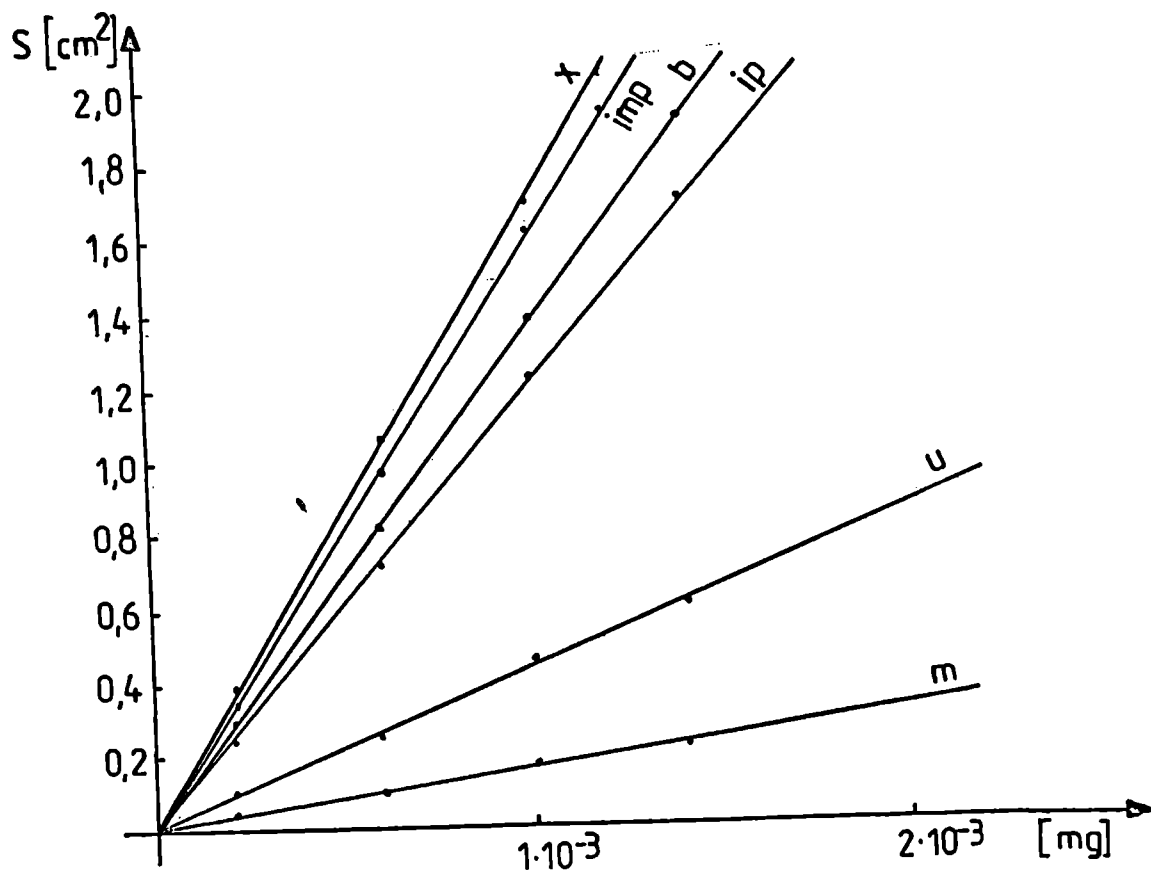




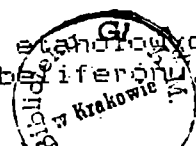
ryc. 26.
Zależności $R_M = f(X_S)$ dla
układów: RP-18, woda-metanol
Oznaczenia patrz ryc 22.

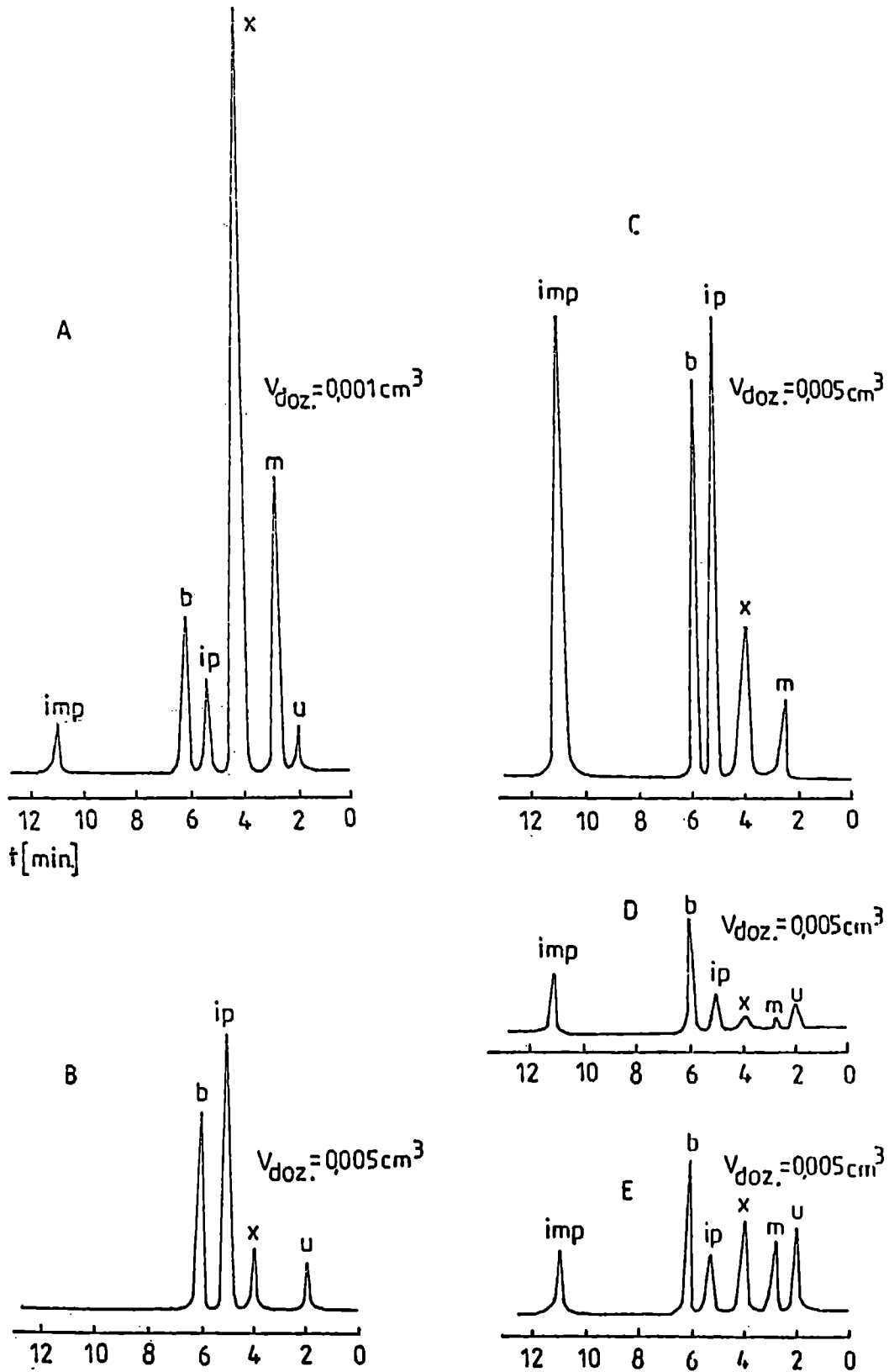


ryc 27 Rozdział mieszaniny 0,1% etanolewych roztworów substancji wzorcowych techniką HPLC; RP-18, woda:metanol - 3:7 $\lambda = 254 \text{ nm}$.

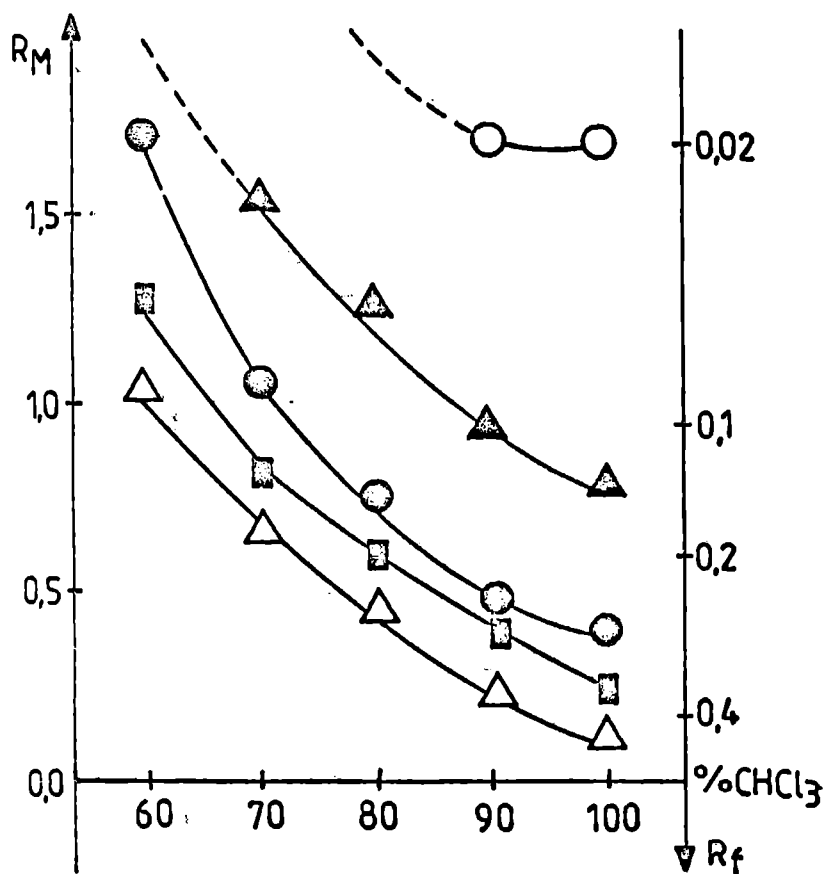


ryc. 28. Krzywe kalibracyjne dla 0,01% etanolewych roztworów wzorcowych furanokumaryn i umbeliferonu. Oznaczenia por ryc.27





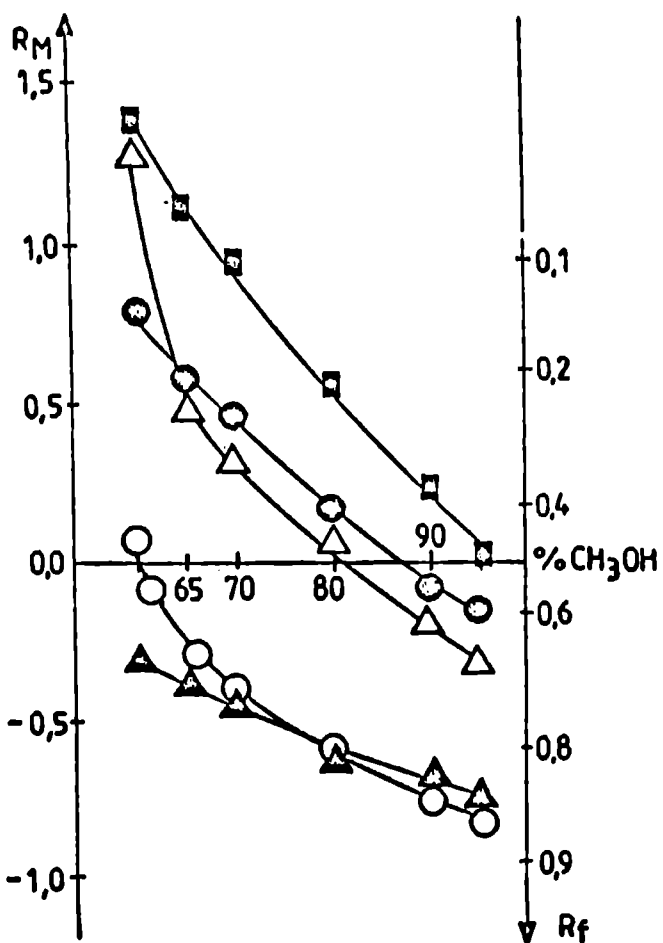
ryc. 29. Przykładowe rozdzielanie oznaczanych związków techniką HPLC. Ekstrakty - A: z owoców, B: z siewek, C-E: z materiału tkankowego z hodowli in vitro (C-hodowla agarowa, BAP i 2,4-D, w. 8; D-hodowla agarowa, BAP i IBA, w. 3; E-hodowla zawieszinowa, BAP i IAA, w. 2; w.=wersja podłoża L-S, wg tab. 3).

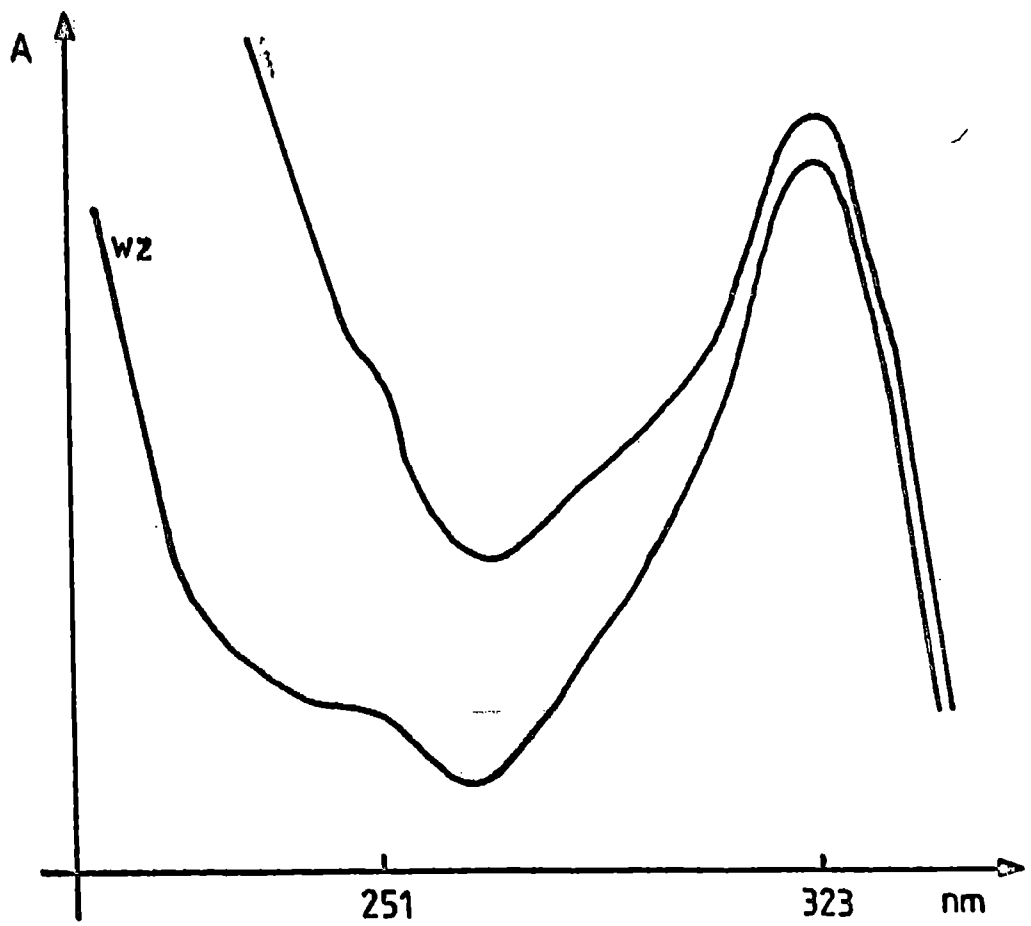


- - związek A
- △ - związek B
- ▲ - związek C
- - związek D
- - związek E

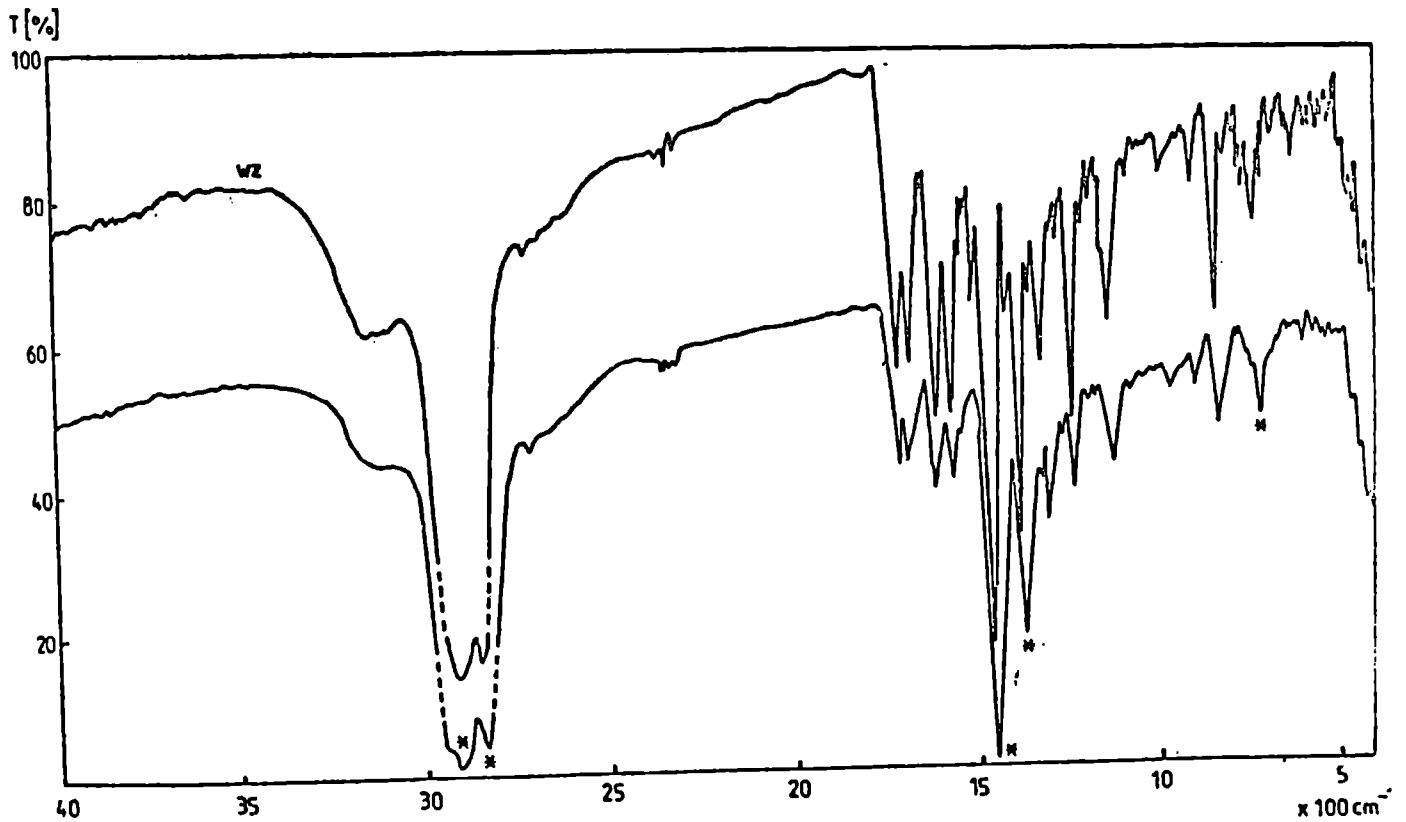
ryc. 30.
Zależności $R_M=f(\%S)$
dla układów:
żel krzemionkowy,
n-heptan - chloroform.

ryc. 31.
Zależności $R_M=f(\%S)$
dla układów:
RP-18, woda - metanol.

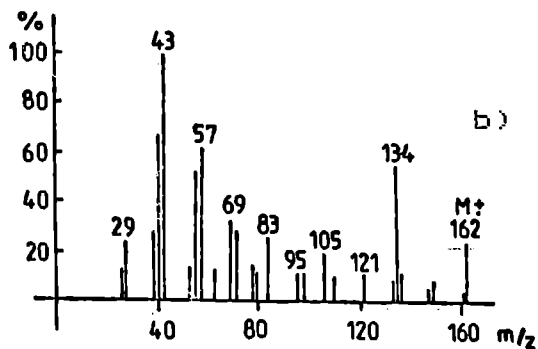
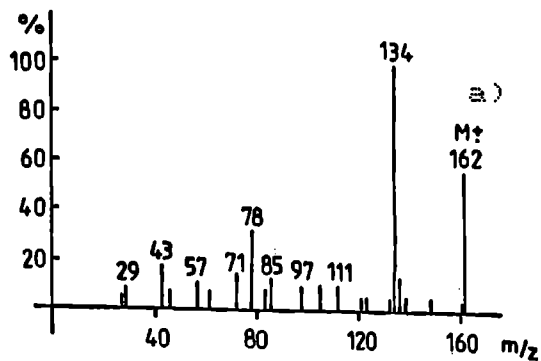




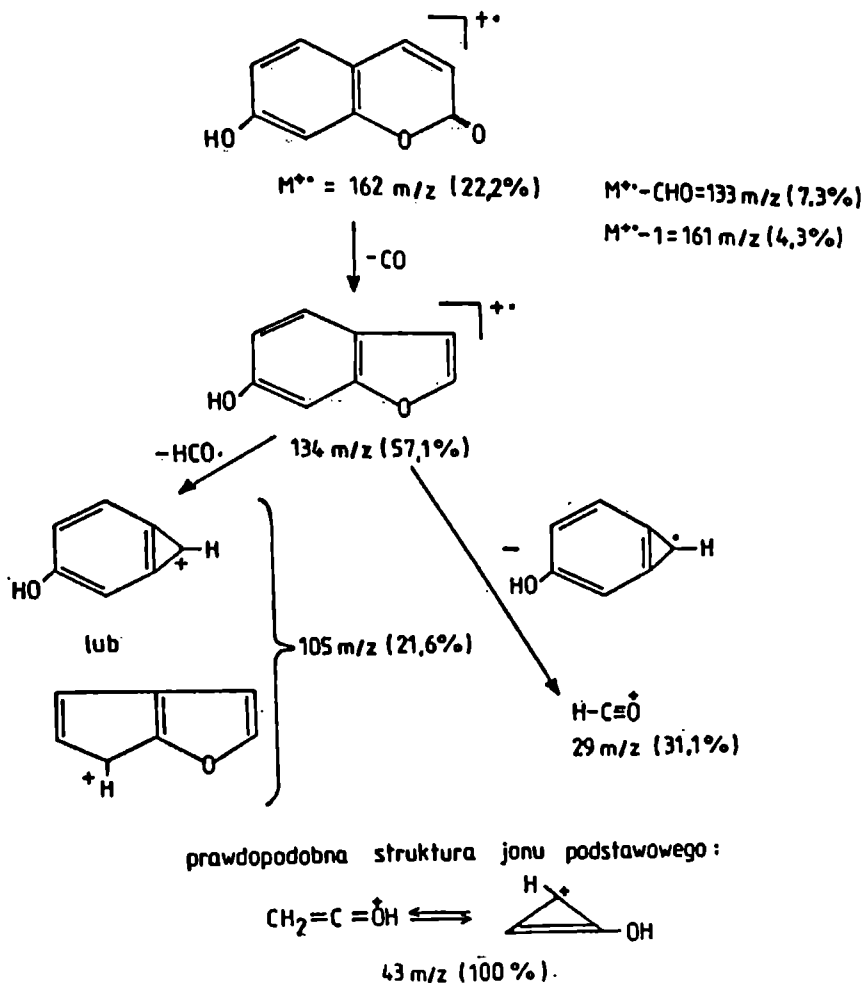
ryc. 32. Widmo UV wzorcowego umbeliferonu (wz) i wyizolowanego związku A.



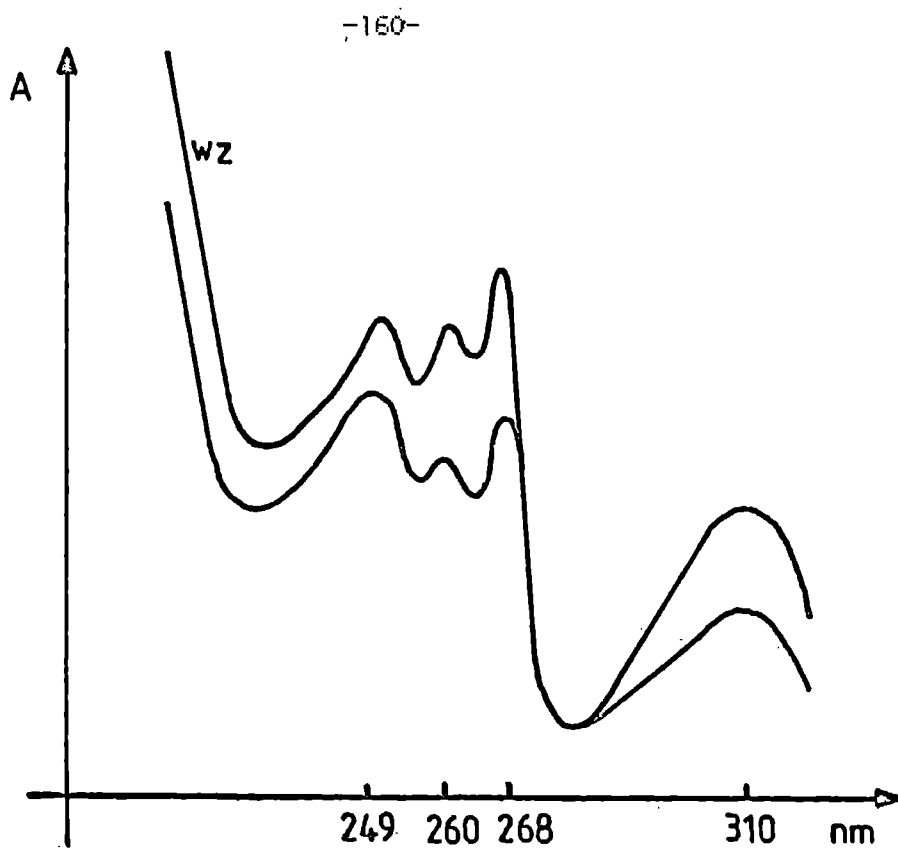
ryc. Widmo IR wzorcowego umbeliferonu (wz) i wyizolowanego związku A.
* - pasma absorpcji oleju parafinowego



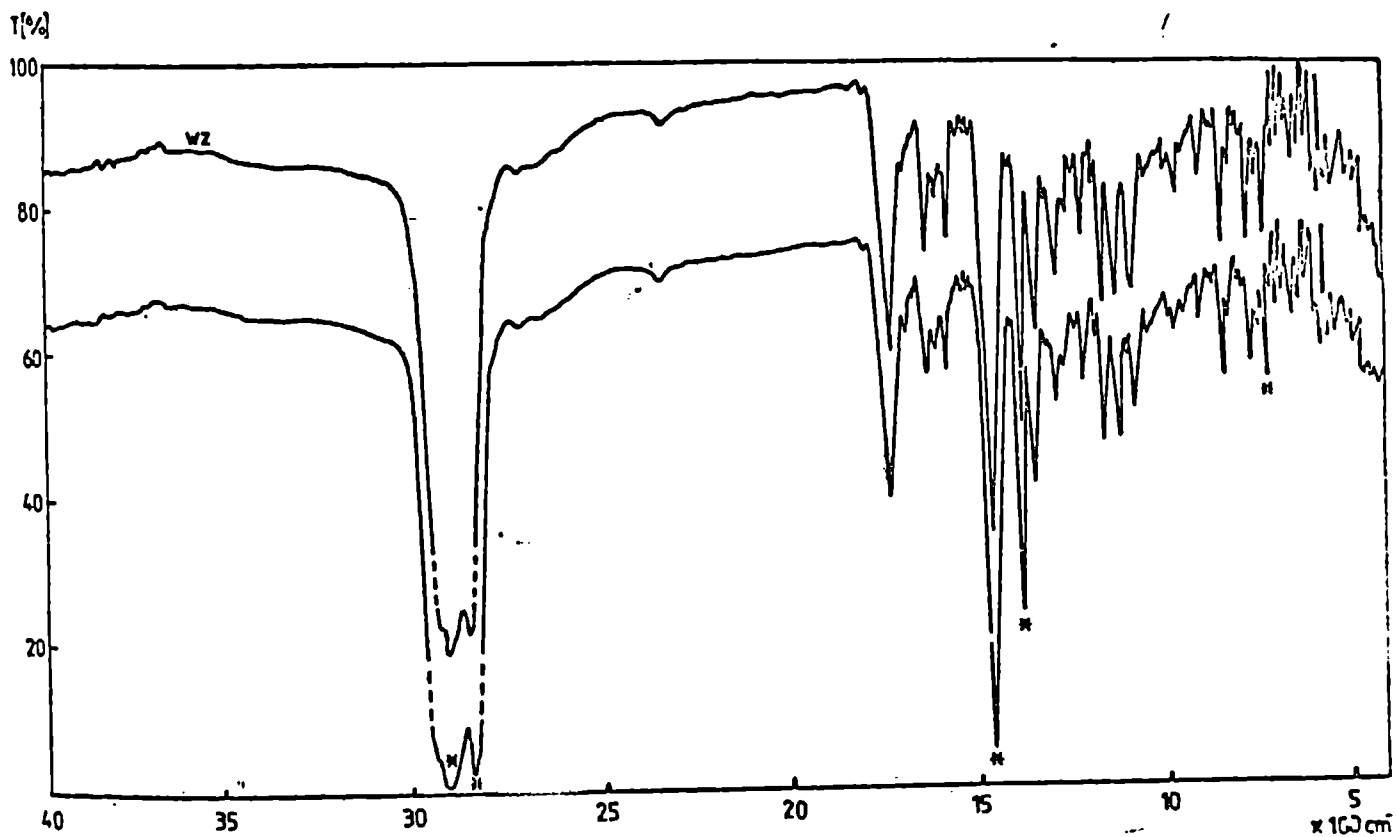
ryc. 34, Widmo masowe wyizolowanego związku A - a) 15 eV, b) 70 eV.



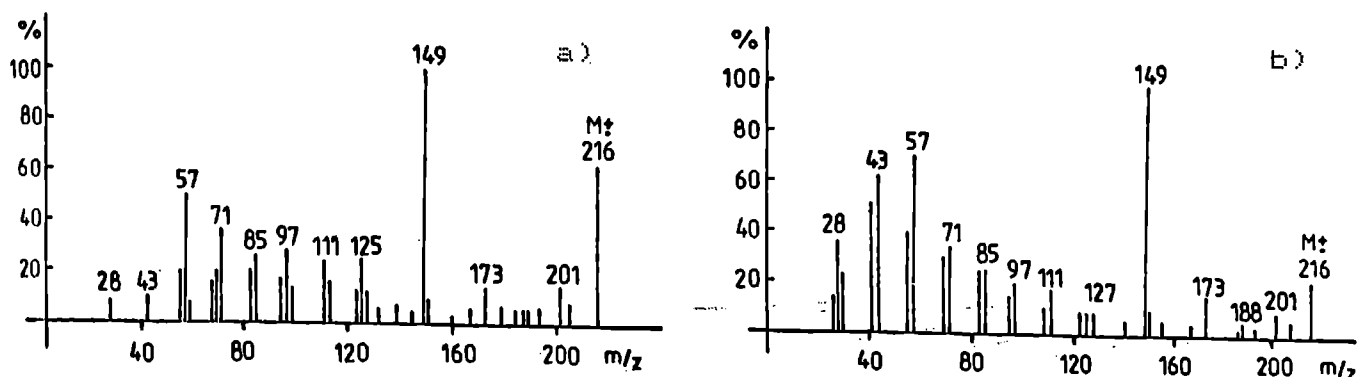
ryc. 35, Proponowany schemat fragmentacji masowej wyizolowanego związku A (70 eV).



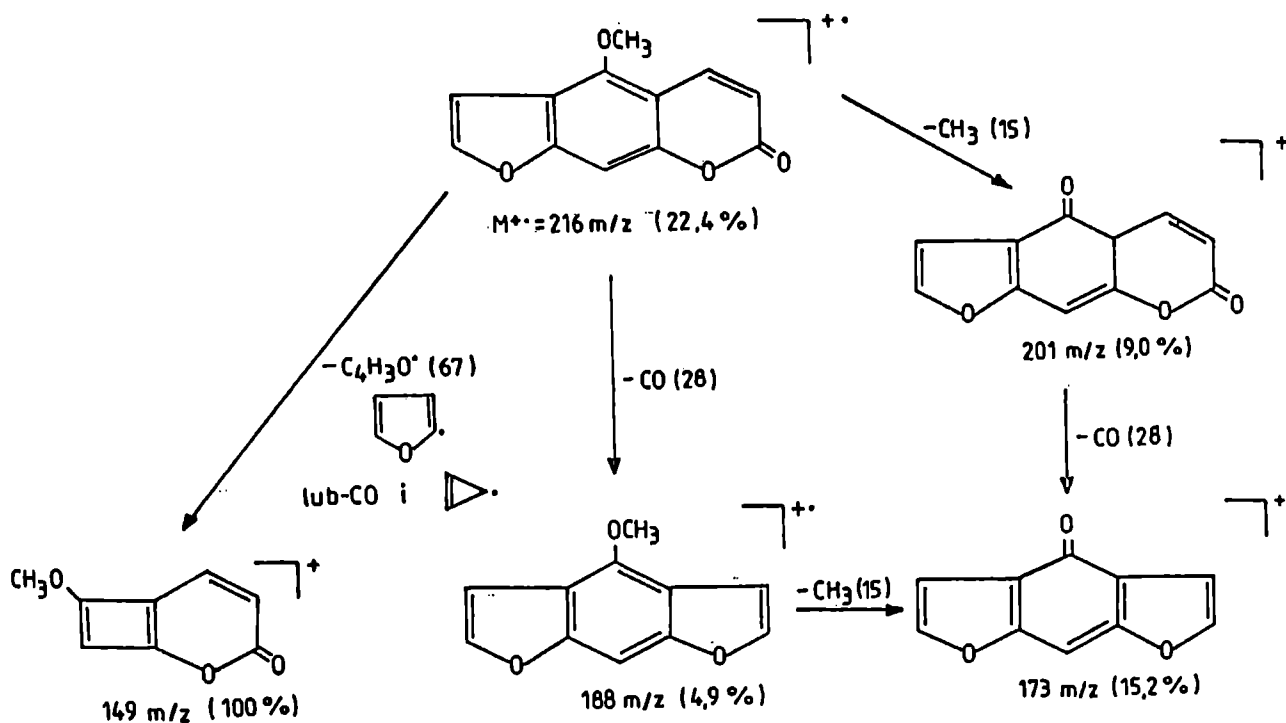
ryc. 36. Widmo UV wzorcowego bergaptenu (wz) i wyizolowanego związku B.



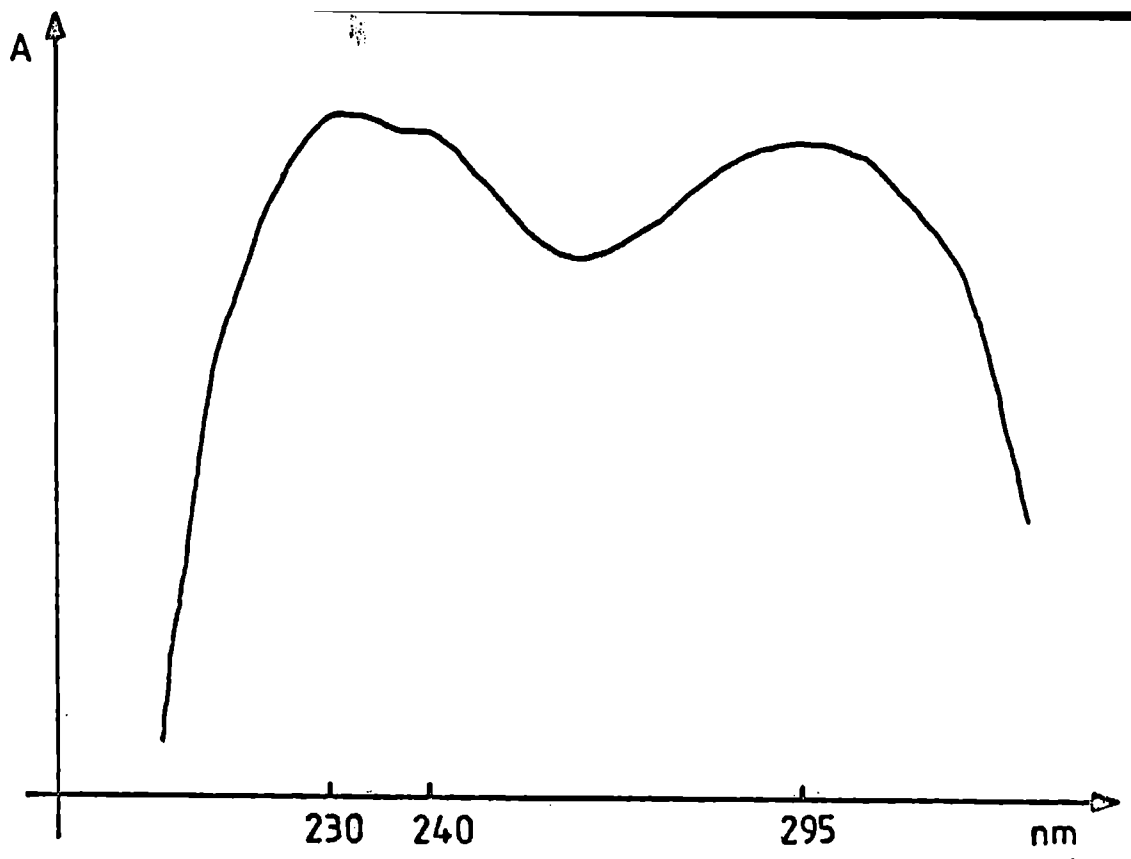
ryc. 37 Widmo IR wzorcowego bergaptenu (wz) i wyizolowanego związku B.
* - pasma absorpcji oleju parafinowego



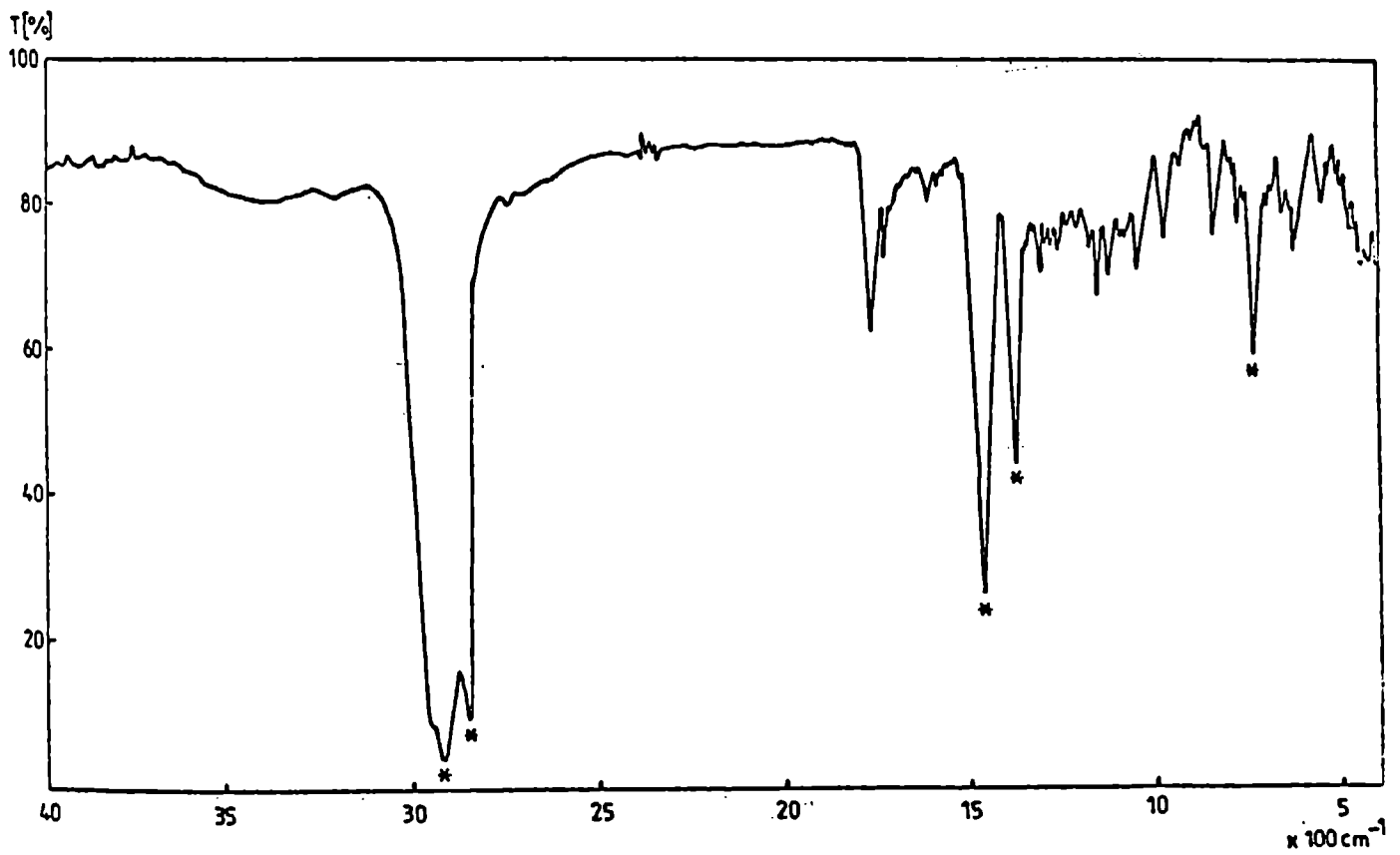
ryc. 38. Widmo masowe wyizolowanego związku B - a) 15 eV, b) 70 eV.



ryc. 39. Proponowany schemat fragmentacji masowej dla wyizolowanego związku B. (70 eV).

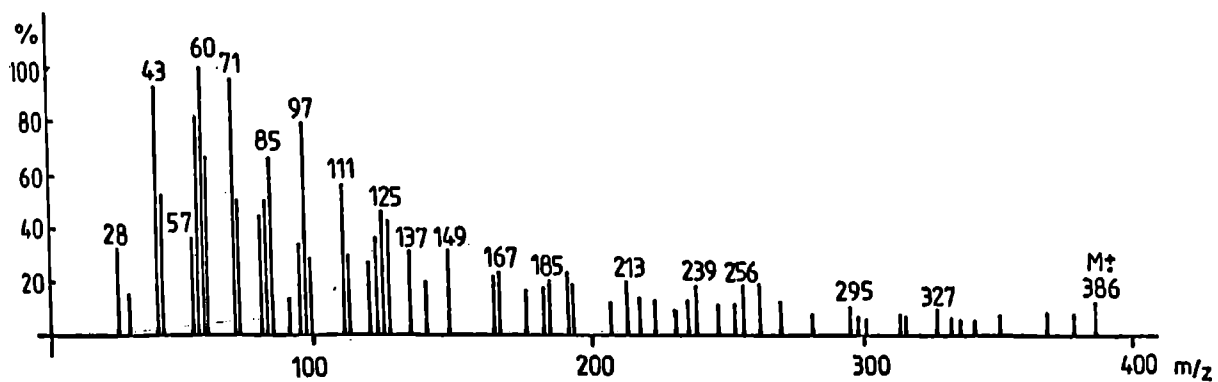


ryc. 40. Widmo UV wyizolowanego związku C.

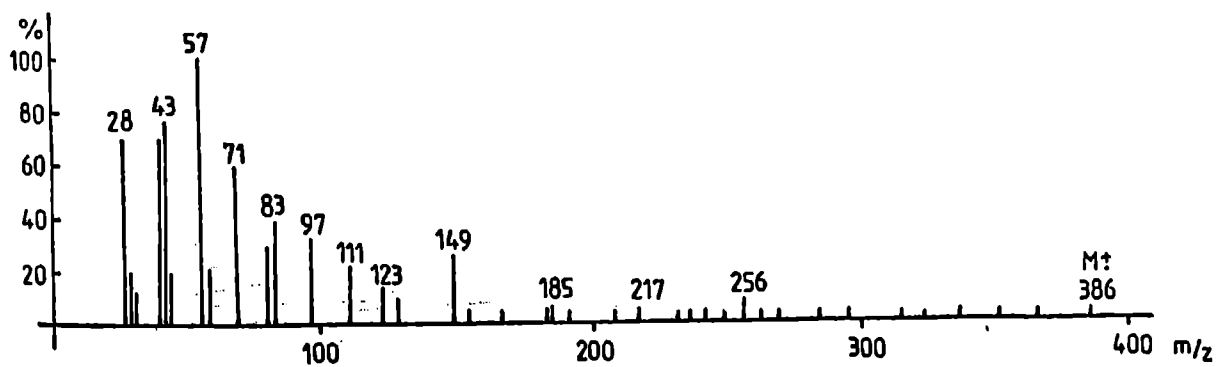


ryc. 41 Widmo IR wyizolowanego związku C.
* - pasma absorpcji oleju parafinowego

a)

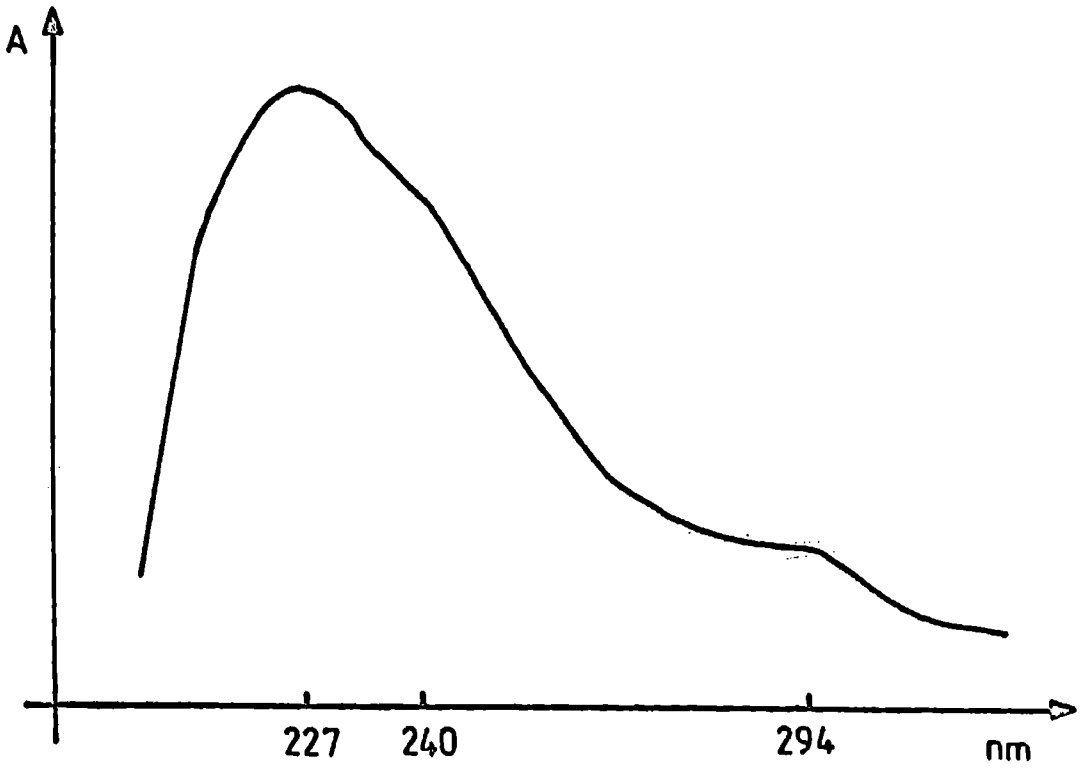


b)

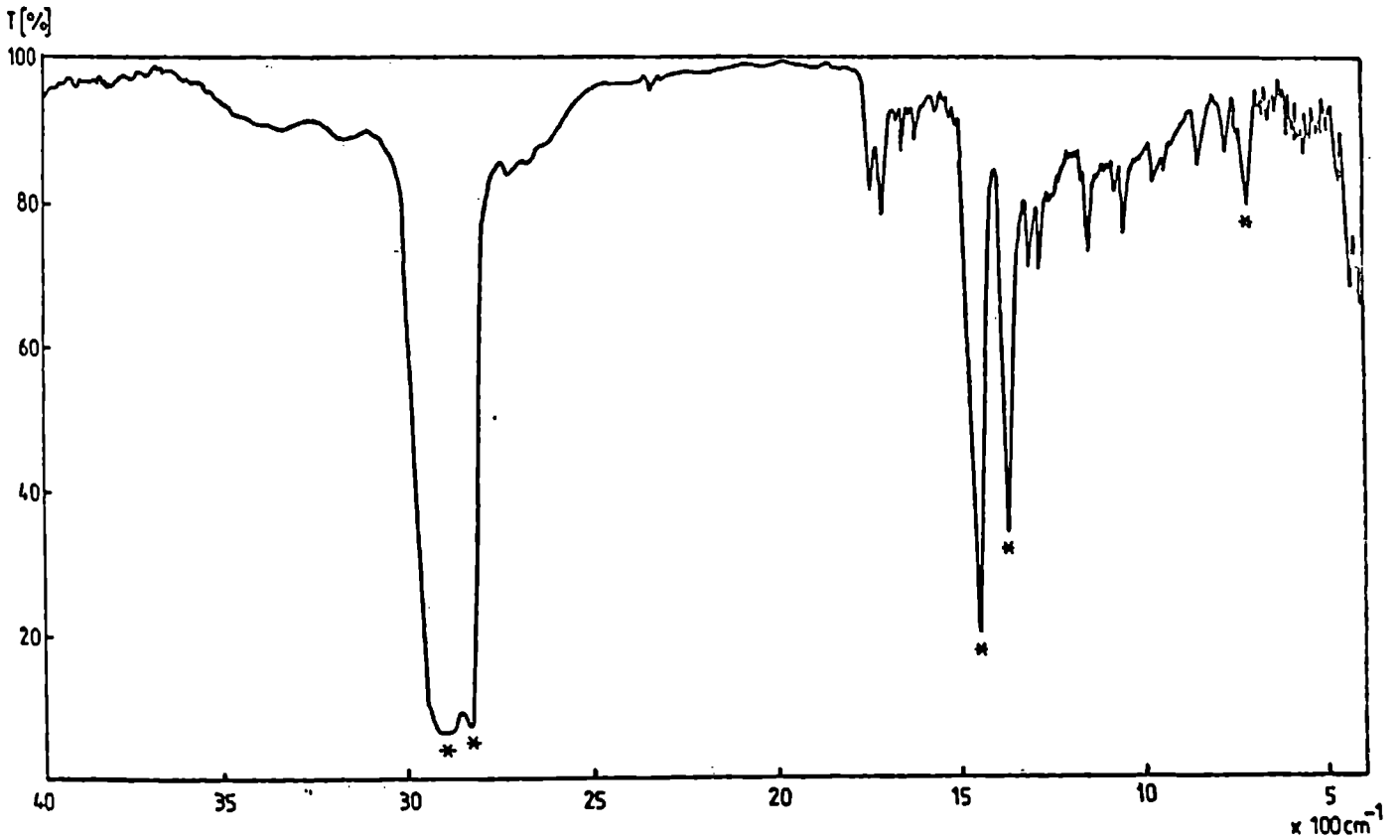


ryc 42. Widmo masowe wyizolowanego związku C - a) 15 eV,

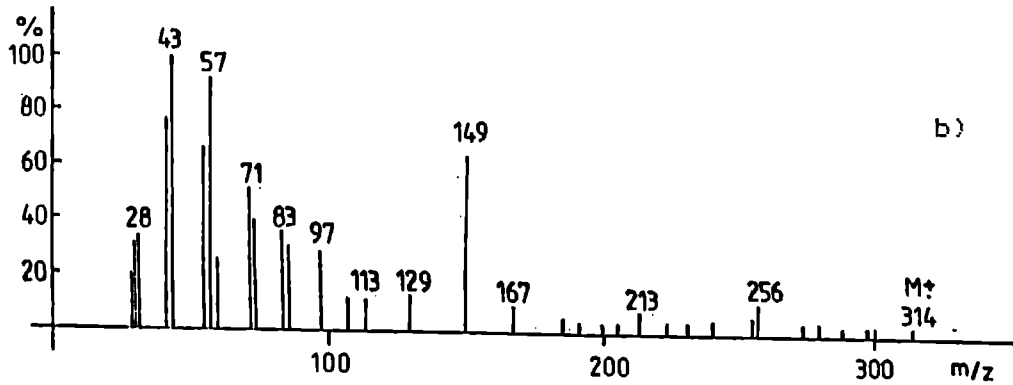
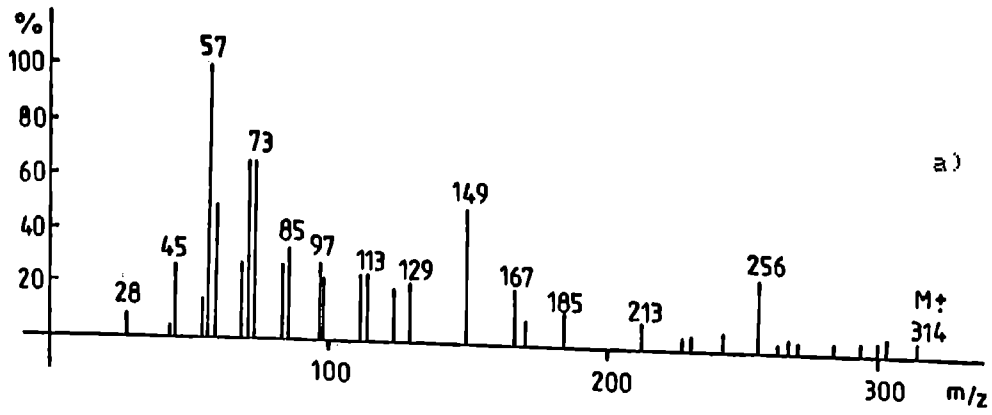
b) 70 eV



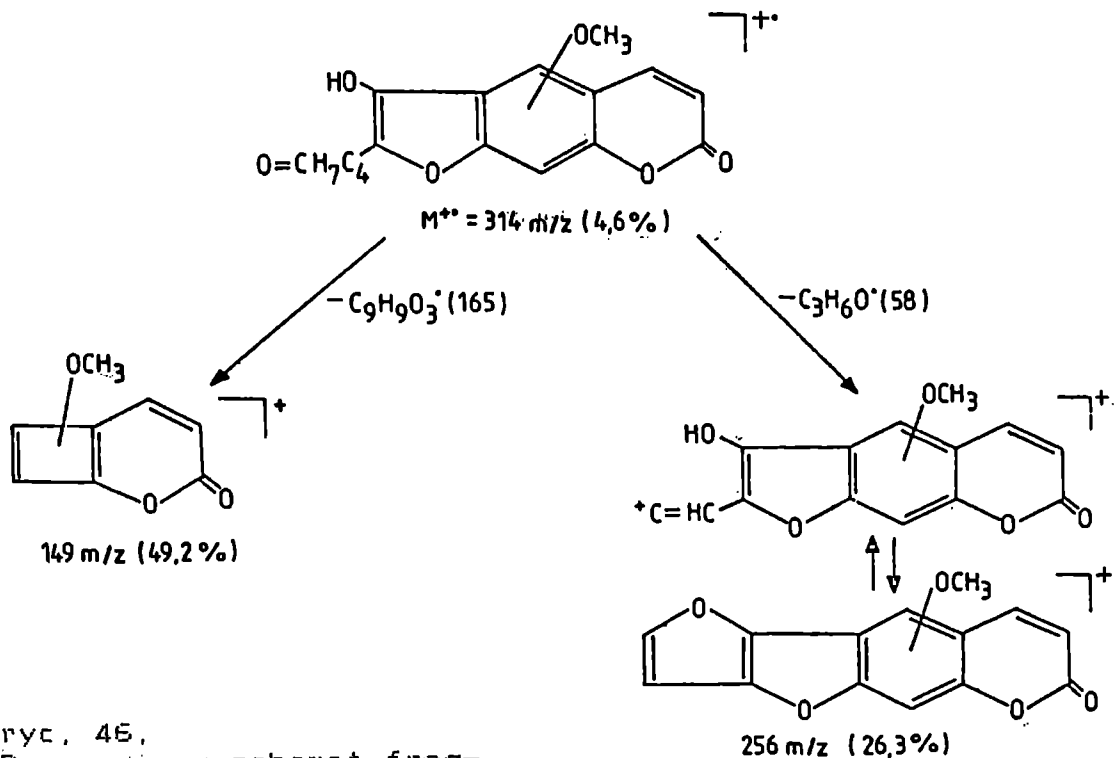
ryc. 43. Widmo UV wyizolowanego związku D.



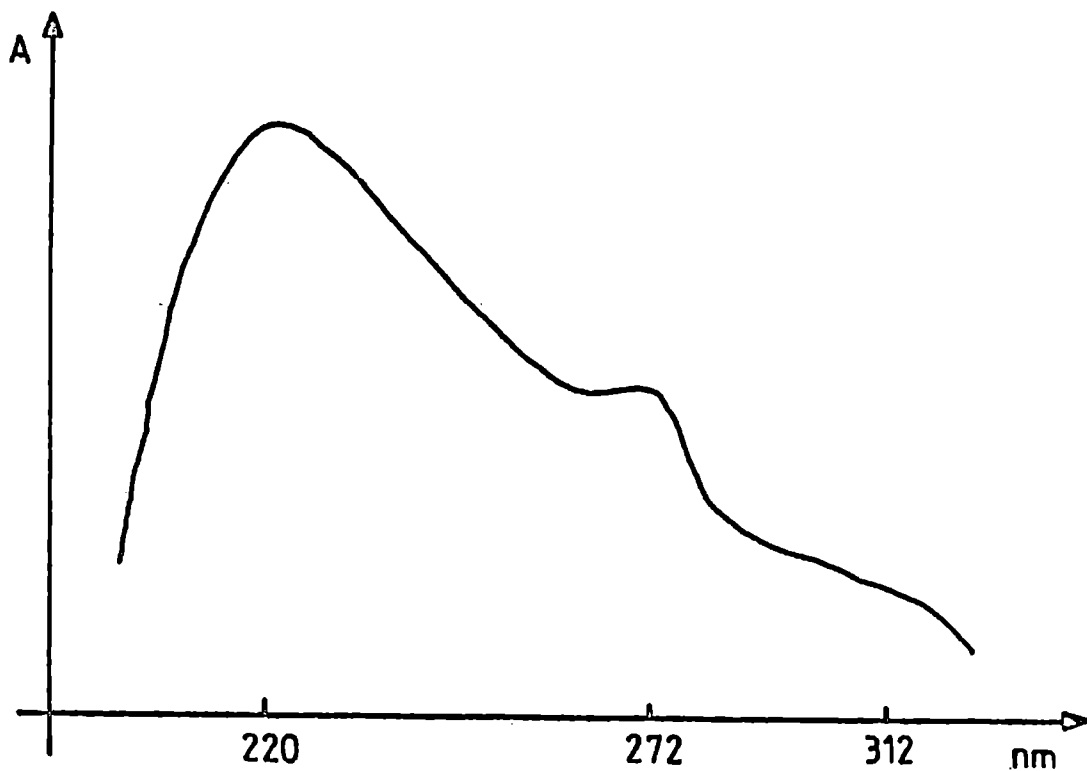
ryc. 44. Widmo IR wyizolowanego związku D.
* - pasma absorpcji oleju parafinowego



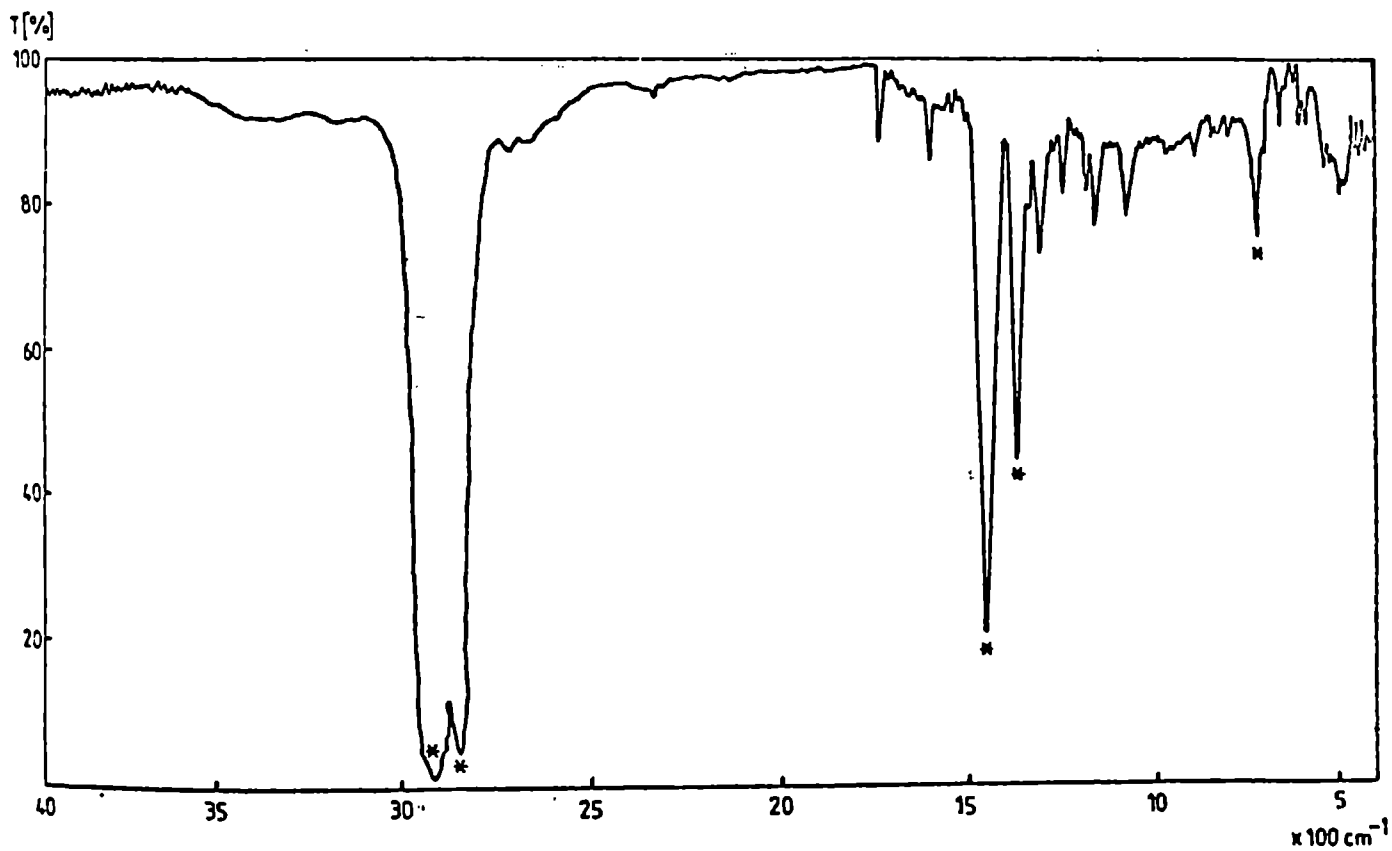
ryc. 45. Widmo masowe wyizolowanego związku D - a) 15. eV, b). 70 eV.



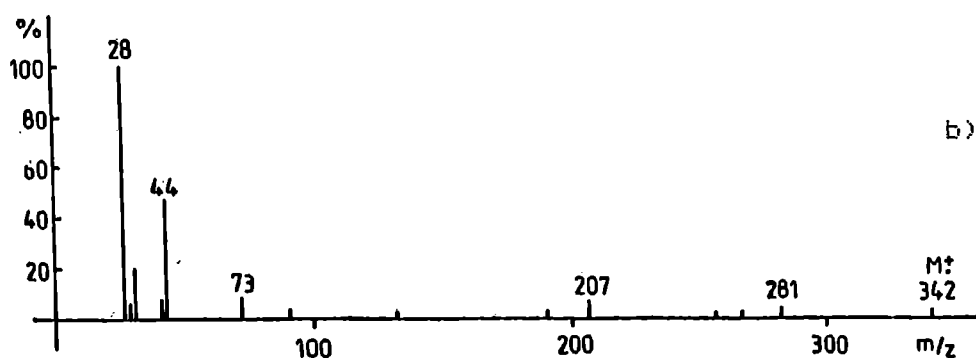
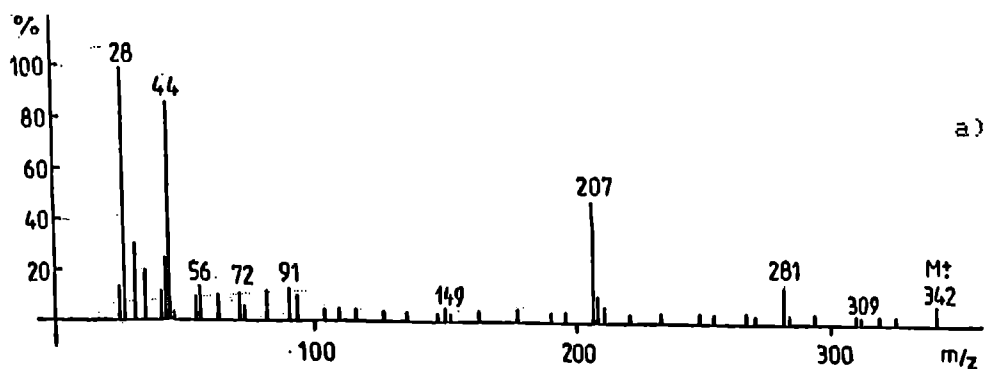
ryc. 46.
Proponowany schemat frag-
mentacji masowej dla wyizol-
owanego związku D. (15 eV).



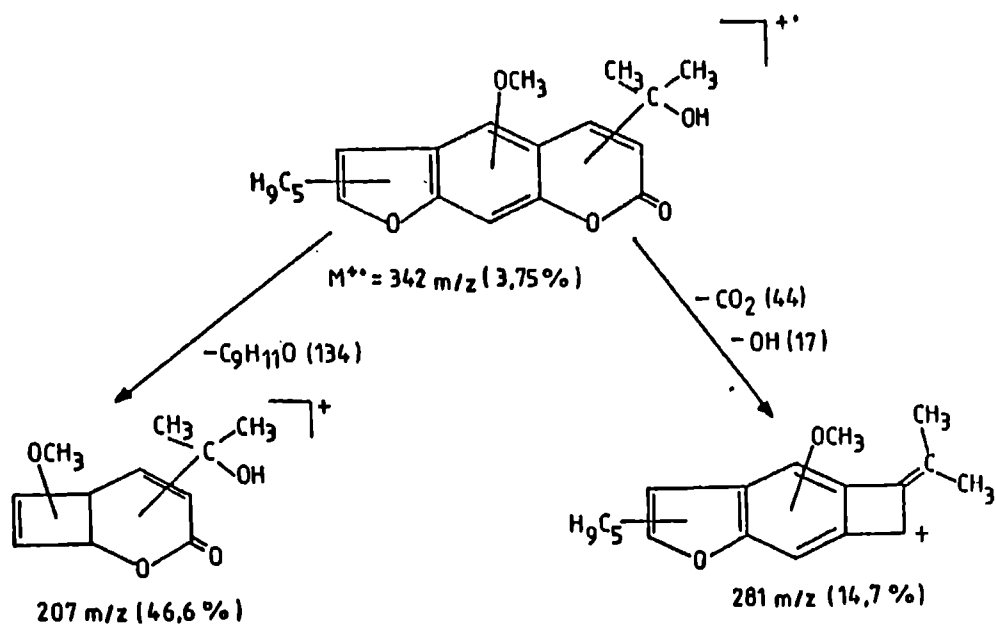
ryc. 47 Widmo UV wyizolowanego związku E.



ryc 48. Widmo IR wyizolowanego związku E.
* - pasma absorpcji oleju parafinowego



ryc. 49. Widmo masowe wyizolowanego związku E - a) 15 eV, b) 70 eV.



ryc. 50. Proponowany schemat fragmentacji masowej dla wyizolowanego związku E (15 eV).

PISMIENNICTWO

1. Abdel Hay F. M., Abu-Mustafa E. A., Fayez M. B. E. - Isolation of isopimpinellin from the fruits of *Ammi majus* L. Natural coumarins, Part IV. *Naturwissenschaften*, 53, 406 (1966).
2. Abu-Mustafa E. A., Badran N., Fayez M. B. E., Starkowsky N. A. - Isolation of marmesin from the fruits of *Ammi majus* Linn. *Nature*, 182, 54 (1958).
3. Abu-Mustafa E. A., El-Bay F. K. A., Fayez M. B. E. - Isoimperatorin, a further constituent of the fruits of *Ammi majus* L. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 87, 925 (1968).
4. Abu-Mustafa E. A., El-Bay F. K. A., Fayez M. B. E. - Natural coumarins. XI. The distribution of coumarins in the *Ammi majus* L. plant and a possible pattern for their biogenetic evolution. *Planta Med.*, 18, 90 (1970).
5. Abu-Mustafa E. A., El-Bay F. K. A., Fayez M. B. E. - Umbelliprenin, a constituent of *Ammi majus* L. fruits. *J. Pharm. Sci.*, 60, 788 (1971).
6. Abu-Mustafa E. A., El-Bay F. K. A., Fayez M. B. E. - The structure of majurin, a new constituent of *Ammi majus* L. fruits. *Tetrahedron Lett.*, nr 20, 1657 (1971).
7. Abu-Mustafa E. A., El-Bay F. K. A., Fayez M. B. E. - Ammirin, a new coumarin constituent from *Ammi majus* L. fruits. *Naturwissenschaften*, 62, 39 (1975).
8. Abu-Mustafa E. A., El-Bay F. K. A., Fayez M. B. E. - Alloimperatorin from *Ammi majus* fruits. *Naturwissenschaften*, 62, 40 (1975).
9. Abu-Mustafa E. A., Fayez M. B. E. - Natural coumarins. I. Marmesin and marmesinin, further products from the fruits of *Ammi majus* L. *J. Org. Chem.*, 26, 161 (1961).
10. Agren-Jonsson S., Tegner E. - PUVA therapy for palmoplantar pustulosis. *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)*, 65, 531 (1985).
11. Akačić B., Kuštrak D. - Pokusne kulture *Ammi visnaga* (L.) Lam. i *Ammi majus* L. *Acta Pharm. Jug.*, 8, 101 (1958).
12. Alfermann A. W. - Synthesis by plant cells, w "Biocatalysts in organic syntheses." *Proc. Int. Symp., Noordwijkerhout 1985*, str. 225-238.
13. Alfermann A. W., Reinhard E. - Possibilities and problems of natural compounds by cell culture methods, w "Production of natural compounds by cell culture methods." *Proc. Int. Symp. on Plant Cell Culture, München 1978*, str. 27-38.
14. Ashraf M., Ahmad R., Bhatti M. K. - Studies on the essential oils of the pakistani species of the family Umbelliferae. Part XXX. *Ammi majus* seed oils. *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 22, 255 (1979).
15. Austin D. J., Brown S. A. - Furanocoumarin biosynthesis in *Ruta gr.* cell cultures. *Phytochemistry*, 12, 1657 (1973).

16. Balbaa S. I., Hilal S. H., Haggag M. Y. - A study of the active constituents of *Ammi majus* fruits at different stages of maturity, *Planta Med.*, **22**, 122 (1972).
17. Balbaa S. I., Hilal S. H., Haggag M. Y. - A spectrophotometric method for the estimation of furocoumarin content of the fruits of *Ammi majus*, *Planta Med.*, **22**, 209 (1972).
18. Balbaa S. I., Hilal S. H., Haggag M. Y. - Separation of ammajin and marmesin from the fruits of *Ammi majus* and their chemical estimation, *Planta Med.*, **23**, 191 (1973).
19. Bartkowiak E. - Nowe kierunki w kulturze komórek i tkanek roślinnych, *Post. Biol. Kom.*, **3**, 161 (1976).
20. Barz W., Ellis B. E. - Potential of plant cell cultures for pharmaceutical production, w "Natural products as medicinal agents," Plenary Lectures of the Int. Res. Congress on Medicinal Plant Research, Strasbourg 1980, ed. Beal J. L., Reinhard E., Hippokrates Verlag, Stuttgart 1981, str. 471-507.
21. Beier R. C., Ivie G. W., Dertli E. H. - Psoralens as phytoalexins in food plants of the family Umbelliferae, w "Xenobiotics in foods and feeds", ed. Finley J. W., Schwass D. E., ACS Symp. Ser., nr 234, 295 (1983).
22. Beier R. C., Ivie G. W., Dertli E. H., Holt D. L. - HPLC analysis of linear furocoumarins (psoralens) in healthy celery (*Apium graveolens*), *Food Chem. Toxicol.*, **21**, 163 (1983).
23. Beier R. C., Dertli E. H. - Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery, *Phytochemistry*, **22**, 2595 (1983).
24. Ben-Hur E., Pill-Soon S. - The photochemistry and photobiology of furocoumarins (psoralens), *Advan. Radiat. Biol.*, **11**, 131 (1984).
25. Bettero A., Benassi C. A. - Determination of bergapten and citropten in perfums and suntan cosmetics by high-performance liquid chromatography and fluorescence, *J. Chromatogr.*, **280**, 167 (1983).
26. Beynon J. H., Saunders R. A., Williams A. E. - The mass spectra of organic molecules, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York 1968.
27. Beyrich Th. - Die quantitative Bestimmung von Furocoumarinen nach papierchromatographischer Trennung, *Pharmazie*, **19**, 700 (1964).
28. Beyrich Th. - Xanthotoxin als Pharmakon, *Pharmazie*, **21**, 282 (1966).
29. Beyrich Th. - Furocoumarine, *Wissenschaft, Ztschr. E. M. Arndt - Univ. Greifswald*, **30**, 25 (1981).
30. Bienkowska-Mochtak E. - Zastosowanie kultur in vitro w uprawie i hodowli roślin, PWRiL, Warszawa 1982.
31. Blažek Z. - Farmakognosie rostlinných časti *Ammi majus* L., *Farm. Obz.*, **35**, 495 (1966).

32. Blažek Z. - Furocumaringehalt einiger Pflanzenarten aus der Familie der Umbelliferae, Pharm. Zentralhalle, 102, 245 (1969).
33. Blažek Z., Stary F. - Qualitative und quantitative Veränderungen der Furocumaringehalte bei *Ammi majus* L. im Laufe der Vegetation, Arch. Pharm., 35, 117 (1965).
34. Blažek Z., Stary F. - Quantität und Qualität der Furocumarine der Art *Ammi majus* L. im Laufe der Blüte und Reifezeit, Scient. Pharm., 34, 97 (1966).
35. Böhm H. - The formation of secondary metabolites in plant tissue and cell cultures, w "Perspectives in plant cell and tissue culture", ed. Vasil I. K., Int. Rev. Cytol., Suppl. 11 B, 183 (1980).
36. Bradu B. L., Atal C. K. - Cultivation of *Ammi majus* Linn. in Jammu, Indian J. Pharmacy, 32, 165 (1970).
37. Brocke W., Reinhard E., Nicholson G., König W. A. - Über das Vorkommen von 3-(1',1'-dimethylallyl)-skopoletin in Gewebekulturen von *Ruta graveolens*, Z. Naturforsch. B, 26, 1252 (1971).
38. Broda B. - Metody histochemii roślinnej. PZWL, Warszawa 1971.
39. Brown P. R. - High pressure liquid chromatography. Biochemical and biomedical applications. Academic Press, New York-London 1973.
40. Brown S. A. - Biosynthetic studies on coumarins. Planta Med., 36, 299 (1979).
41. Brown S. A., El-Dakhakhny M., Steck W. - Biosynthesis of linear furano-coumarins. Can. J. Biochem., 48, 863 (1970).
42. Brown S. A., Sampathkumar S. - The biosynthesis of isopimpinellin. Can. J. Biochem., 55, 686 (1977).
43. Brown S. A., Tenniswood M. - Aberrant coumarin metabolism in crown gall tumor tissue of tobacco. Can. J. Bot., 52, 1091 (1974).
44. Bumba V., Kudrnáč S. - Chromatographische Trennung der Extrakt - Inhaltsstoffe von *Ammi majus* (nicht publiziert), wg Blažek Z., Stary F., poz. 33.
45. Butcher D. N. - Secondary products in tissue cultures, w "Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture", ed. Reinert J., Bajaj Y. P. S., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977, str. 668-693.
46. Butenko R. G. (ed.) - Plant cell culture. Mir Publishers, Moscow 1985.
47. Butienko R. G. (red.) - Kultura klijetok rastenij. Izdatielstwo Nauka, Moskwa 1986.
48. Butienko R. G. (red.) - Kultura klijetok rastenij i biotiehnologija. Izdatielstwo Nauka, Moskwa 1986.
49. Carew D. P., Bainbridge T. - Biotransformations with plant tissue cultures. Lloydia, 32, 147 (1976).

50. Chen M., Stohs S. J., Staba E. J. - The biosynthesis of visnagin from ^{14}C -acetate by *Ammi visnaga* suspension cultures and the metabolism of ^{14}C -visnagin and ^{14}C -khellin by *Ammi visnaga* and *Ammi majus*, *Lloydia*, **32**, 339 (1969).
51. Cisowski W. - Badania fitochemiczne niektórych roślin leczniczych z rodziny Umbelliferae w zakresie pochodnych benzo- α i γ -pironu, Rozprawa habilitacyjna, AM Wrocław, 1986.
52. Crowden R. K., Harborne J. B., Heywood V. H. - Chemosystematics of the Umbelliferae - a general survey. *Phytochemistry*, **2**, 1963 (1969).
53. Cyunel E., Ekiert H. - Hodowla tkankowa i badanie metabolitów *Scrophularia Scopolii* Hoppe. Cz. I. Hodowla tkankowa, *Herba Pol.*, **29**, 39 (1983).
54. Czygan F. C. - Pflanzliche Gewebe - und Zellkulturen als Arzneistoffproduzenten, w "Biogene Arzneistoffe", ed. Czygan F. C., Vieweg, Braunschweig-Wiesbaden 1984, str. 85-105.
55. Dall'Acqua F., Capozzi A., Marciani S., Caporale G. - Biosynthesis of furocoumarins. Further studies on *Ruta* gr. Z, *Naturforsch.* B, **27**, 813 (1972).
56. Dall'Acqua F., Innocenti G., Caporale G. - Biosynthesis of O-alkyl furocoumarins. *Planta Med.*, **27**, 343 (1975).
57. Dall'Acqua F., Vedaldi D., Baccichetli F., Bordin F. - Photochemotherapy of skin-diseases: comparative studies on the photochemical and photobiological properties of various mono- and bifunctional agents. *Farmaco, Ed. Sci.*, **36**, 519 (1981).
58. Dall'Acqua F., Vedaldi D., Bordin F., Baccichetli F., Carllass F., Tamaro M., Rodigiero P., Pastorini G., Guiotto A., Recchia G., Cristofolini M. - 4'-Methylangelicins: new potential agents for the photochemotherapy of psoriasis. *J. Med. Chem.*, **26**, 870 (1983).
59. Ehrendorfer F. - Oprac. roślin nasiennych, w "Lehrbuch der Botanik für Hochschulen", begründet von Strasburger E., Noll F., Schenck H., Schimper A. F. M., 32. Auflage neubearbeitet von v. Denffer D., Ziegler H., Ehrendorfer F., Bresinsky A., VEB Fischer G. Verlag, Jena 1983, str. 868-870.
60. Eisenreichová E., Bučková L., Kosáková L., Tomko J. - Obsahové látky *Ammi majus* L., *Farm. Obz.*, **42**, 503 (1980).
61. Ekiert H. - Metabolity hodowli tkankowej *Ammi majus* L., w "Streszczenia XIII Naukowego Zjazdu PTFarm.", Katowice 1986, str. 132.
62. Ekiert H. - Tissue culture of *Ammi majus* L. and its metabolites. *Acta Pol. Pharm.*, **43**, 634 (1986).
63. Ekiert H., Ekiert L. - Rozdziały pochodnych psoralenu w materiale roślinnym techniką TLC i HPLC, w "Chromatograficzne metody badania związków organicznych." Mat. Zjazd. XI Środowiskowego Seminarium Naukowego, Katowice 1987, str. 60-61.
64. Ellis B. E., Brown S. A. - Isolation of dimethylallylpyrophosphate: umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. *Can. J. Biochem.*, **52**, 734 (1974).

65. Engler A. - Syllabus der Pflanzenfamilien, Gebrüder Borntraeger Verlag, Berlin-Nikolassee 1964, t. 2, str. 372-379.
66. Erdelmeier C. A. J., Meier B., Sticher O. - Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of closely related furocoumarins, J. Chromatogr., 346, 456 (1985).
67. Fahmy I. R., Abu-Shady H. - Ammi majus Linn. - pharmacognostical study and isolation of a crystalline constituent ammoidin, Quart. J. Pharm. Pharmacol., 20, 281 (1947).
68. Fahmy I. R., Abu-Shady H. - Isolation and properties of ammoidin, ammidin and majudin, Quart. J. Pharm. Pharmacol., 21, 499 (1948).
69. Fahmy I. R., Abu-Shady H., Schönberg A., Sina A. - A crystalline principle from Ammi majus L., Nature, 150, 468 (1947).
70. Fayez M. B. E., El-Beih F. K. A., El-Tawil B. A. H., Khalil A. M. - A new coumarin from the fruits of Ammi majus L. Pharmazie, 37, 53 (1982).
71. Fiad S., Osman F. - Structure of glycerides and phospholipids in some wild Egyptian Umbelliferae. Seifen, Öle, Fette, Wachse, 101, 469 (1975), wg C.A. 84, 2272y (1976).
72. Fowler M. W. - Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture, w "Plant biotechnology", ed. Mantell S. H., Smith H., Cambridge University Press, Cambridge-London-New York-New Rochelle-Melbourne-Sydney 1983, str. 3-37.
73. Fritig B., Hirth L., Durisson G. - Identification de la scopoline et de la scopoletine dans des cultures de tissus de Tabac et variations de leur teneur au cours de la croissance, C. R. Acad. Sci., Ser. D, 263, 838 (1966).
74. Fritig B., Hirth L., Durisson G. - Biosynthesis of the coumarins: scopoletin formation in tobacco tissue cultures, Phytochemistry, 9, 1963 (1970).
75. Furuya T., Kojima H., Syono K. - Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissues, Phytochemistry, 10, 1529 (1971).
76. Gamborg D. L., Dunn-Coleman N. - New plant variants and hybrids from somatic cells, w "Advances in gene technology: molecular genetics of plants and animals," Proc. of the Miami Winter Symp., 20, 101 (1983).
77. Gheorghiu M., Pavel M., Tarpo E., Contz D., Grintescu A., Georgescu V. - Contributii la studiul speciei Ammi majus L. acclimatizată, Farmacia (Bucharest), 13, 541 (1965).
78. Gibbs N. K., Hönigsmann H., Young R. A. - PUVA treatment strategies and cancer risk, Lancet, 1, 150 (1986).
79. Głowniak K., Bieganowska M. - Optymalizacja układów chromatograficznych dla rozdzielania zespołu kumaryn i furokumaryn z ekstraktów roślinnych, w "Postępy chromatografii w Polsce w ostatnich latach," Mat. Symp. Komisji Chromatogr. Komitetu Chem. Analit. PAN, Lublin 1984, str. 81-88.
80. Głowniak K., Bieganowska M. L. - Reversed-phase systems for the separa-

- tion of coumarins and furocoumarins by thin-layer and high performance liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, **8**, 2927 (1985).
81. Główniak K., Bieganowska M. L. - Effects of modifier and molecular structure of some coumarins on retention in reversed-phase high-performance thin-layer and column chromatography, *J. Chromatogr.*, **370**, 281 (1986).
 82. Gołkiewicz W., Soczewiński E. - A simple molecular model of adsorption chromatography. VI. R_m - composition relationships of solutes with two functional groups, *Chromatographia*, **5**, 594 (1972).
 83. Gouw T. H., Jentoft R. E. - Chromatografia cieczowa o dużej zdolności rozdzielczej, w "Nowoczesne metody instrumentalnej analizy", red. Gouw T. H., WNT, Warszawa 1976, str. 52-90.
 84. Grewal S., Sachdeva U., Atal C. K. - Regeneration of plants by embryogenesis from hypocotyl cultures of *Ammi majus* L. *Indian J. Exp. Biol.*, **14**, 716 (1976).
 85. Grodzińska-Zachwieja Z., Bojarski J. - Cienkowanstwowa chromatografia z fazami odwróconymi, *Farm. Pol.*, **37**, 489 (1981).
 86. Grossweiner L. I. - Mechanisms of photosensitization by furocoumarins, w "Photochemotherapeutic aspects of psoralens," *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, nr 66, 47 (1984).
 87. Hamilton R. J., Sewell P. A. - Introduction to high performance liquid chromatography, Chapman and Hall, London 1979.
 88. Hannuksela M., Karvonen J. - Topical trioxsalen PUVA therapy, *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)*, Suppl. 113, 135 (1984).
 89. Harborne J. B., Williams Ch. A. - Flavonoid patterns in the fruits of the Umbelliferae, *Phytochemistry*, **11**, 1741 (1972).
 90. Harris A. L., Nylund H. B., Carew D. P. - Tissue culture studies of certain members of the Apocynaceae, *Lloydia*, **27**, 322 (1964).
 91. Hegi G. - *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*, A. Pichler's Witve und Sohn Verlag, Wien 1906-1931, t. V/2, str. 1170-1173.
 92. Hegnauer R. - Chemical patterns and relationships of Umbelliferae, w "Biology and chemistry of Umbelliferae", ed. Heywood V. H., Academic Press Inc., London 1971, str. 325-336.
 93. Hegnauer R. - *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart 1973, t. 6, str. 554-629.
 94. Henshaw G. G., Jha K. K., Mehta A. R., Shakeshaft D. J., Street H. E. - Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures, *J. Exp. Bot.*, **17**, 362 (1966).
 95. Hoppe A. - *Drogen Kunde*, Walter de Gruyter Verlag, Berlin-New York 1975, t. 1, str. 66-69.
 96. *Indeks Kewensis Plantarum Phanerogamarum*, Clarendon Press, Oxford 1895-1987, t. 1,2, Suppl. II, VII, X, XVI, XVII.

97. Innocenti G., Dall'Acqua F., Caporale G. - The role of 5,8-dihydroxy-psoralen in the biosynthesis of isopimpinellin. *Phytochemistry*, **22**, 10 (1983).
98. Innocenti G., Dall'Acqua F., Guiotto A., Rodigiero P., Caporale G. - The role of hydroxymarmesins in the biogenesis of O-alkylfurocoumarins. *Farmaco, Ed. Sci.*, **36**, 614 (1981).
99. Ivie W. G. - Toxicological significance of plant furocoumarins, w "Effects of poisonous plants on livestock." Academic Press Inc., New York-San Francisco-London 1978, str. 475-485.
100. Ivie W. G. - Linear furocoumarins (psoralens) from the seed of Texas *Ammi majus* L. (Bishop's Weed). *J. Agr. Food Chem.*, **26**, 1394 (1978).
101. Jabłońska S. (red.) - Choroby skóry. PZWL, Warszawa 1980, t. 1,2.
102. Kado C. I., Kleinhofs A. - Genetic modification of plant cells through uptake of foreign DNA, w "Perspectives in plant cell and tissue culture" ed. Vasil I. K., *Int. Rev. Cytol., Suppl.* **11 B**, 47 (1980).
103. Karawya M. S., Khayyal S. E., Youssef G. F. - Estimation of xanthotoxin, imperatorin and bergapten in *Ammi majus* fruits and formulations. *Planta Med.*, **18**, 195 (1970).
104. Kaul B., Staba E. J. - Visnagin: biosynthesis and isolation from *Ammi visnaga* suspension cultures. *Science*, **150**, 1731 (1965).
105. Kaul B., Staba E. J. - *Ammi visnaga* (L.) Lam. tissue cultures. Multi-liter suspension growth and examination for furanochromones. *Planta Med.*, **15**, 145 (1967).
106. Kączkowski J. - *Biochemia roślin*. PWN, Warszawa 1980, t. 1, str. 378-380, 1985, t. 2, str. 255-263.
107. Khanna P., Staba J. - Antimicrobials from plant tissue cultures. *Lloydia*, **31**, 180 (1968).
108. Kibalczicz P. N., Nikonow G. K., Cziernobaj N. H., Iwaszin D. S. - O kulturje *Ammi bolszoi* kak istocznika poluczienija furokumarinow. *Med. Prom. SSSR*, **14**, 23 (1960).
109. King, P. J. - Cell proliferation and growth in suspension cultures, w "Perspectives in plant cell and tissue culture", ed. Vasil I. K., *Int. Rev. Cytol., Suppl.* **11 A**, 25 (1980).
110. Klein R. M. - Interaction of ultraviolet and visible radiations on the growth of cell aggregates of *Ginkgo* pollen tissue. *Physiol. Plant.*, **16**, 73 (1963).
111. Knox C. N., Land E. J., Truscott T. G. - Singlet oxygen generation by furocoumarin triplet states. I. Linear furocoumarins (psoralens). *Photochem. Photobiol.*, **43**, 359 (1986).
112. Kohlmünzer S. - *Farmakognozja*. PZWL, Warszawa 1985, str. 145-158.
113. Kohlmünzer S., Waclaw R. - Badania fitochemiczne owoców *Ammi majus* L. *Diss. Pharm.*, **14**, 69 (1962).

114. Kohlmünzer S., Wacław-Rozkrutowa B. - Izolowanie ksantotoksyny i marmeryny z owoców *Ammi majus* L. *Acta Pol. Pharm.*, **20**, 321 (1963).
115. Kohlmünzer S., Rozkrutowa B. - An improved simple procedure for isolation of furocoumarins from *Ammi majus* fruits, w "Polyphenols International Conference Abstracts", Plovdiv 1984, B-8.
116. Koźmińska-Kubarska A. - Zarys kosmetyki lekarskiej. PZWL, Warszawa 1984.
117. Kurz W. G. W., Constabel F. - Plant cell cultures, a potential source of pharmaceuticals. *Advan. Appl. Microbiol.*, **25**, 209 (1979).
118. Kutney J. P., Salisbury P. J., Verma A. K. - Biosynthetic studies in the coumarin series - III. Studies in the tissue cultures of *Thamnosma montana* Torr. and Frem. The role of mevalonate. *Tetrahedron*, **29**, 2673 (1973).
119. Kuzowkina I. N., Kuzniecowa G. A., Smirnow A. M. - Sintez kumarinow w korniewej tkaniewej kulturze *Ruta graveolens*. *Herba Hung.*, **10**, 39 (1971).
120. Langner A., Wolska H. - Nowe metody leczenia łuszczycy. *Terapia i leki*, nr 2, 57 (1978).
121. Lindsey K., Yeoman M. M. - Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures, w "Plant biotechnology", ed. Mantell S. H., Smith H., Cambridge University Press, Cambridge-London-New York-New Rochelle-Melbourne-Sydney 1983, str. 39-66.
122. Linsmaier E. M., Skoog F. - Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **18**, 100 (1965).
123. Loewenberg J. R. - Observations on scopoletin and scopolin metabolism. *Phytochemistry*, **9**, 361 (1970).
124. Lutomski J., Szostak H., Speichert H. - Metoda oznaczania ksantotoksyny w owocach *Ammi majus* L. i ich przetworach. *Herba Pol.*, **12**, 200 (1966).
125. Mantell S. H., Smith H. - Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures, w "Plant biotechnology", ed. Mantell S. H., Smith H., Cambridge University Press, Cambridge-London-New York-New Rochelle-Melbourne-Sydney 1983, str. 75-108.
126. Misawa M. - Production of natural substances by plant cell cultures described in Japanese patents, w "Plant tissue culture and its biotechnological application." *Proc. of the First Int. Congress on Medicinal Plant Research, Section B*, Munich 1976, ed. Barz W., Reinhard E., Zenk M. H., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977, str. 17-26.
127. Mishaal A. S., Nawar M. A., Nofal Z., Elsherbiny A., Abu-Mustafa E. A. - Flavone glycosides, further constituents of *Ammi majus* L. fruits. *Proc. Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod.*, **3**, 111 (1981), wg C. A. **97**, 52539e (1982).
128. Murashige T., Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassay

- with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**, 431 (1962).
129. Musajo L., Rodigiero G. - Studies on the photo-C₄-cyclo-addition reactions between skin-photosensitizing furocoumarins and nucleic acids, *Photochem. Photobiol.*, **11**, 27 (1970).
130. Musajo L., Rodigiero G. - Photosensitizing properties of furocoumarins, *Herba Hung.*, **10**, 79 (1971).
131. Nielsen B. E. - Coumarins of umbelliferous plants, Kandrup and Wunsch, Copenhagen 1970.
132. Nielsen B. E. - Coumarin patterns in the Umbelliferae, w "Biology and chemistry of Umbelliferae", ed. Heywood V. H., Academic Press Inc., London 1971, str. 325-336.
133. Nikonow G. K. - Furokumariny Ammi, bolszoi. *Med. Prom. SSSR*, **1**, 21 (1965).
134. Nikonow G. K., Berezhinskaya V. V., Kibal'chich' P. M. - A therapeutic method for vitiligo and alopecia areata, *IPA*, **4**, 161 e (1967).
135. Nowak U. - Izolowane protoplasty i ich przydatność w badaniach biologicznych, *Wszechświat*, **5**, 125 (1978).
136. Nowiński M. - Dzieje upraw i roślin leczniczych, PWRiL, Warszawa 1980, str. 108 i 282.
137. Overton K. H., Picken D. J. - Studies in secondary metabolism with plant tissue cultures, w "Progress in the chemistry of organic natural products", ed. Herz W., Griesebach H., Kirby G. W., Springer Verlag, Wien-New York 1977, str. 249-298.
138. Ożarowski A. - Rośliny lecznicze stosowane w fitoterapii, w "Ziołolecznictwo", red. Ożarowski A., PZWL, Warszawa 1980, str. 62-63.
139. Pathak M. A. - Molecular aspects of drug photosensitivity with special emphasis on psoralen photosensitization reaction, *JNCI*, **69**, 163 (1982).
140. Pathak M. A., Parrish J. A., Fitzpatrick T. B. - Psoralens in photochemotherapy of skin diseases, *Farmaco, Ed. Sci.*, **36**, 479 (1981).
141. Pimentel G. C., McClellan A. L. - The hydrogen bond, Freeman W. H. and Company, San Francisco-London 1960, str. 226-254.
142. Plewig G., Hölzle E., Lehmann P. - Phototherapy for photodermatoses, *Curr. Probl. Derm.*, **15**, 254 (1986).
143. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A. - Leki współczesnej terapii, PZWL, Warszawa 1986, str. 384-385.
144. Polunin D. - Pflanzen Europas, BLV Verlagsgesellschaft mbH, München-Bern-Wien 1971, str. 212-231.
145. Ramadan S. - The Ammi majus plant, *Hamdard* **25**, 32 (1982).
146. Reinhard E. - Probleme der Production von Arzneistoffen durch pflanzliche Gewebekulturen, *Deut. Apoth. Ztg.*, **107**, 1201 (1967).

147. Reinhard E. - Möglichkeiten der Verwendung von Gewebekulturen (=Zellkulturen) in der Arzneipflanzenforschung, *Planta Med.*, Suppl., 1 (1975).
148. Reinhard E., Alfermann A. W. - Biotransformation by plant cell cultures, w "Advances in biochemical engineering, Plant cell cultures I", ed. Fiechter A., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 16, 49 (1980).
149. Reinhard E., Corduan G., Brocke W. - Untersuchungen über das ätherische Öl und die Cumarine in Gewebekulturen von *Ruta graveolens*, *Herba Hung.*, 10, 9 (1971).
150. Reinhard E., Corduan G., Volk D. H. - Die Scopoletin - abgabe von *Nicotiana tabacum* Gewebekulturen an das Medium in kontinuierlichen Suspensionskulturen, *Planta Med.*, 15, 357 (1967).
151. Reinhard E., Corduan G., Volk D. H. - Über Gewebekulturen von *Ruta graveolens*, *Planta Med.*, 16, 8 (1968).
152. Rennert A. - Z zagadnień kultur tkankowych, *Wiad. Bot.*, 10, 237 (1966).
153. Rodigiero G. - Hyperpigmentation induced by furocoumarins, *Farmaco, Ed. Prat.*, 40, 172 (1985).
154. Rodigiero G., Dall'Acqua F. - In vitro photoreactions of selected psoralens and methylangélicins with DNA, RNA and proteins, w "Photochemotherapeutic aspects of psoralens," *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, nr 66, 31 (1984).
155. Rodigiero G., Dall'Acqua F. - Present aspects concerning the molecular mechanisms of photochemotherapy with psoralens, *Drugs Exptl. Clin. Res.*, 12, 507 (1986).
156. Rodigiero G., Dall'Acqua F., Pathak M. A. - Photobiological properties of monofunctional furocoumarin derivatives, w "Topics in photomedicine", ed. Smith K. C., Plenum Publishing Corporation, New York 1984, str. 319-398.
157. Roenigh H. H. Jr. - Effectiveness of psoralens in mycosis fungoides, w "Photochemotherapeutic aspects of psoralens," *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, nr 66, 179 (1984).
158. Rogozińska J. H. - Hodowla tkanek roślinnych i jej przydatność, *Kosmos*, 20, 39 (1971).
159. Rudowska I. - Badania nad skutecznością leczenia bielactwa nabytego psoralenami i nad mechanizmem działania leku, *Praca doktorska*, AM Warszawa, 1964.
160. Sargent J. A., Skoog F. - Effects of indoleacetic acid and kinetin on scopoletin - scopolin levels in relation to growth of tobacco tissues in vitro, *Plant Physiol.*, 35, 934 (1960).
161. Sargent J. A., Skoog F. - Scopoletin glycosides in tobacco tissue, *Physiol. Plant.*, 14, 504 (1961).
162. Schieder D., Vasil I. K. - Protoplast fusion and somatic hybridization, w "Perspectives in plant cell and tissue culture", ed. Vasil I. K., *Int. Rev. Cytol.*, Suppl. 11 B, 21 (1980).

163. Schönberg A., Sina A. - Xanthotoxin from the fruits of *Ammi majus*. *Nature*, 161, 481 (1948).
164. Schönberg A., Sina A. - Experiments with xanthotoxin and imperatorin obtained from the fruits of *Ammi majus* L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 4826 (1950).
165. Sehgal C. B. - In vitro induction of polyembryony in *Ammi majus* L. *Curr. Sci.*, 41, 263 (1972).
166. Shawl A. S., Vishwapaul - Thin-layer chromatographic - spectrophotometric determination of methoxsalen (xanthotoxin) in *Ammi majus* seed, *Analyst (London)*, 102, 779 (1977).
167. Silverstein R. M., Bassler G. C. - Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych, PWN, Warszawa 1970.
168. Skoog F., Montaldi E. - Auxin-kinetin interaction regulating the scopolin and scopolin levels in tobacco tissue cultures, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 47, 36 (1961).
169. Soczewiński E. - Niektóre problemy optymalizacji cieczowych układów chromatograficznych, *Ann. UMCS, ser. D*, 24, 21 (1969).
170. Soczewiński E. - Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel - electron donor solvent, *Anal. Chem.*, 41, 179 (1969).
171. Soczewiński E. - Mechanizm, metodyka i teoria chromatografii cienkowarstwowej, w "Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej", red. Borkowski B., PZWL, Warszawa 1973, str. 13-56.
172. Soine T. O. - Naturally occurring coumarins and related physiological activities, *J. Pharm. Sci.*, 53, 231 (1964).
173. Staba E. J. - Plant tissue culture as a technique for the phytochemist, w "Recent advances in phytochemistry", ed. Seikel M. K., Runeckles V. C., North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1969, t. 2, str. 75-106.
174. Staba E. J. - Tissue culture and pharmacy, w "Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture", ed. Reinert J., Bajaj Y. P. S., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977, str. 694-702.
175. Staba E. J. - Milestones in plant tissue culture systems for the production of secondary products, *Lloydia*, 48, 203 (1985).
176. Stahl E., Herting D. - Über die Verteilung des ätherischen Öles und der Cumarine in den einzelnen Früchten einiger Apiaceen, *Planta Med.*, 29, 1 (1976).
177. Starkowsky N. A., Badran N. - Ammajin, a new constituent of *Ammi majus* (L.), *J. Org. Chem.*, 23, 1818 (1958).
178. Steck W., Bailey B. K., Shyluk J. P., Gamborg O. L. - Coumarins and alkaloids from cell cultures of *Ruta graveolens*, *Phytochemistry*, 10, 191 (1971).

179. Steck W., Brown S. A. - Biosynthesis of angular furanocoumarins. *Can. J. Biochem.*, **48**, 872 (1970).
180. Steck W., Constabel F. - Biotransformations in plant cell cultures. *Lloydia*, **37**, 185 (1974).
181. Steck W., El-Dakhakhny M., Brown S. A. - The role of marmesin and columbianetin in the biosynthesis of furanocoumarins. *Tetrahedron Lett.*, nr 54, 4805 (1969).
182. Stermitz F. R., Thomas R. D. - Separation of furocoumarins by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **77**, 431 (1973).
183. Street H. E. - Applications of cell suspension cultures, w "Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture", ed. Reinert J., Bajaj Y. P. S., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977, str. 649-667.
184. Supniewska J. H. - Hodowla in vitro tkanek roślin leczniczych, w "Postęp w dziedzinie leku roślinnego," *Herba Pol.*, Suppl., **13** (1972).
185. Supniewska J. H., Dohnal B. - Chromatographic study of marmesin and visnagin occurrence in *Ammi visnaga* Lam. suspension tissue cultures. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **46**, 559 (1977).
186. Tabata M. - Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures, w "Plant tissue culture and its bio-technological application," *Proc. of the First Int. Congress on Medicinal Plant Research, Section B, Munich 1976*, ed. Barz W., Reinhard E., Zenk M. H., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977, str. 3-16.
187. Tabata M. - (personal communication) wg Barz W., Ellis B. E., Potential of plant cell cultures for pharmaceutical production w "Natural products as medicinal agents," *Plenary Lectures of the Int. Res. Congress on Medicinal Plant Research, Strasbourg 1980*, ed. Beal J. L., Reinhard E., Hippokrates Verlag, Stuttgart 1981, str. 487-488.
188. Tandon S., Rastogi R. P. - Recent advances in naturally occurring coumarins. *J. Sci. Ind. Res.*, **38**, 428 (1979).
189. Tarpo E., Contz D., Gheorghiu M. - Contributii la studiul izolării izopimpinelinei din fructele indigene de *Ammi majus* L. *Farmacia (Bucharest)*, **14**, 473 (1966).
190. Tarpo E., Contz D., Gheorghiu M. - Contributii la studiul izolării xantotoxinei si bergaptenului din fructele de *Ammi majus* L., acclimatizată in Republica Socialistă România. *Farmacia (Bucharest)*, **15**, 493 (1967).
191. Tarpo E., Gheorghiu M., Contz D. - Studiul dozării furanocumarinelor din fructele de *Ammi majus* L. *Farmacia (Bucharest)*, **13**, 331 (1965).
192. Teuscher E. - Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen. *Pharmazie*, **28**, 6 (1973).
193. Trojáněk J., Hodková J., Čekan Z. - Über die Furocoumarine der Früchte *Ammi majus* L. *Planta Med.*, **9**, 200 (1961).
194. Tryon K. - Scopoletin in differentiating and nondifferentiating cultured

- tobacco tissue. *Science*, **123**, 590 (1956).
195. Turjanmaa K., Salo H., Reunala T. - Comparison of trioxsalen bath and oral methoxsalen PUVA in psoriasis. *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)*, **65**, 86 (1985).
196. Turowa A. D., Sapożnikowa E. N. - Liekarstwiennyje rastienija SSSR i ich primienienije. *Miedicina, Moskwa* 1983, str. 254-255.
197. Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. K., Moore D. M., Valentine D. H., Walters J. H., Webb D. A. (ed.) - *Flora Europaea*, Cambridge University Press, Cambridge 1968, t. 2, str. 353.
198. Vedaldi D., Dall'Acqua F., Bollettin P., Rodigiero G. - Skin photosensitizing furocoumarins; the possible role of superoxide radicals. *Med. Biol. Environ.*, **12**, 569 (1984).
199. Vedaldi D., Dall'Acqua F., Gennaro A., Rodigiero G. - Photosensitized effects of furocoumarins; the possible role of singlet oxygen. *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)*, Suppl. 113; 150 (1984).
200. Vigny P., Gaborian F., Voituriez L., Cadet J. - Chemical structure of psoralen - nucleic acid photoadducts. *Biochim.*, **62**, 317 (1985).
201. Willis I., Menter J. M. - Psoralens; a search for more effective derivatives for photochemotherapeutic regimens. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, nr 66, 143 (1984).
202. Withers L. A. - Preservation of germplasm, w "Perspectives in plant cell and tissue culture", ed. Vasil I. K., *Int. Rev. Cytol.*, Suppl. 11 B, 101 (1980).
203. Wolff F. A., Tessa T. V. - Clinical pharmacokinetics of methoxsalen and other psoralens. *Clin. Pharmacokin.*, **11**, 62 (1986).
204. Yeoman M. M., Forche E. - Cell proliferation and growth in callus cultures, w "Perspectives in plant cell and tissue culture", ed. Vasil I. K., *Int. Rev. Cytol.*, Suppl. 11 A, 1 (1980).
205. Yeoman M. M., Macleod A. J. - Tissue (callus) cultures techniques, w "Plant tissue and cell culture", ed. Street H. E., Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne 1977, str. 31-59.
206. Zenk M. H. - Production von sekundären Pflanzenstoffen durch pflanzliche Zellkulturen, w "Production of natural compounds by cell culture methods," *Proc. Int. Symp. on Plant Cell Culture*, München 1978, str. 180-182.
207. Zenkteller M. (red.) - *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*. PWN, Warszawa 1984.

