

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

3.1 Franklin, Gregory

Nazwisko w publikacjach/ Name in Publications: **Franklin G., G. Franklin, Gregory Franklin**

3.2 Dyplomy i Stopnie naukowe

2014 LLM European and Transglobal Business Law

School of Law, University of Minho, Braga, Portugal

Tytuł pracy: Intellectual property landscape of genetically modified plants in Europe. Supervisors: Dr. Maria Miguel Carvalho (Assistant Professor, School of Law, University of Minho, Portugal) and Dr. José Antonio Gómez Segade (Professor, Institute of Intellectual Property Law, University of Santiago de Compostela, Spain)

2001 PhD Botany-Zoology interdisciplinary

Entomology Research Institute, Loyola College, University of Madras, Chennai, India

Tytuł pracy: *In vitro* studies in *Pisum sativum* L, *Vigna mungo* L. Hepper and *Cajanus cajan* L. Millsp. Supervisor: Rev Fr. Dr. S. Ignacimuthu sj (Director, Entomology Research Institute, Loyola College)

1997 MPhil Botany

St. Joseph's College, Bharathidhasan University, Tiruchirappalli, Passed with Distinction and stood First in the class

Tytuł pracy: Callus induction and shoot organogenesis in *Cajanus cajan* L. Millsp. Supervisor: Dr. R. Jeyachandran (Associate Professor, Department of Botany, St. Joseph's College affiliated to Bharathidhasan University, Tiruchirappalli)

1995 MSc Botany

St Xavier's College (Affiliated to Manonmanium Sundaranar University), Palayamkottai, India, First in the class

Tytuł pracy: The influence of commercial vitamins and some growth regulators on regeneration of selected plants *in vitro*. Supervisor: Dr. D. Patric Raja (Associate Professor, department of Botany, St Xavier's College)

1992 BSc Botany

St Xavier's College (Affiliated to Madurai Kamaraj University), Palayamkottai, India – Pierwsza lokata w klasie / First in the class

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

3.3 Krótki życiorys (Miejsca i lata pracy)

Polska czerwiec 2015 - obecnie – Present: Doświadczony Pracownik naukowy (R3)/ Adiunkt; Kierownik zespołu (Biotalent- EU- FP7), Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Portugalia październik 2013 – maj 2015: Zaproszony naukowiec, Wydział Biologii, Uniwersytet Minho, Braga

Portugalia październik 2008 – wrzesień 2013: Ciencia 2008 Investigador Auxiliar/Asystent naukowy profesora, Wydział Biologii, Uniwersytet Minho, Braga

Portugalia listopad 2007 – wrzesień 2008: Zaproszony asystent profesora / Invited Assistant Professor, Wydział Biologii, Uniwersytet Minho, Braga

Portugal listopad 2004 – październik 2007: FCT Postdoctoral Fellow, Wydział Biologii, Uniwersytet Minho, Braga

Indie Maj 2004– październik 2004: Pracownik naukowy, Instytut Hodowli Trzciny Cukrowej (Indyjska Rada Badań Rolniczych), Coimbatore

USA Maj 2002 – marzec 2004: Postdoctoral Fellow, Centrum Badań nad Roślinami, Uniwersytet w Toledo, Toledo, OH

Arabia Saudyjska Luty 2002 – kwiecień 2002: Specjalista w zakresie biologii molekularnej roślin, Centrum Badań Palm Daktylowych, King Faisal University, Al-Hofuf

Indie Październik 2001 – grudzień 2001: Asystent Profesora, Wydział Biotechnologii, Szkoła Wyższa Ayya Nadar Janaki Ammal , Sivakasi, związana z Uniwersytetem w Madurai Kamaraj

Indie październik 1999 – wrzesień 2001: DBT-IISc postdoc training fellow, Wydział Mikrobiologii i Biologii Komórki, Indyjski Instytut Naukowy, Bangalore

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Poland 2015 June – Present: Senior Researcher/ Group leader (Biotalent- EU- FP7), Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences, Poznan

Portugal October 2013 – May 2015: Invited Scientist, Department of Biology, University of Minho, Braga

Portugal 2008 October – 2013 September: Ciencia 2008 Investigador Auxiliar/Research Assistant Professor, Department of Biology, University of Minho, Braga

Portugal 2007 November – 2008 September: Invited Assistant Professor, Department of Biology, University of Minho, Braga

Portugal 2004 November – 2007 October: FCT Postdoctoral Fellow, Department of Biology, University of Minho, Braga

India 2004 May – 2004 October: Research Associate, Sugarcane Breeding Institute (Indian Council of Agricultural Research), Coimbatore

USA 2002 May – 2004 March: Postdoctoral Fellow, Plant Science Research Center, University of Toledo, Toledo, OH

Saudi Arabia 2002 February – 2002 April: Plant molecular biology specialist, Date palm Research Center, King Faisal University, Al-Hofuf

India 2001 October – 2001 December: Assistant Professor, Department of Biotechnology, Ayya Nadar Janaki Ammal College, Sivakasi, affiliated to Madurai Kamaraj University

India 1999 October – 2001 September: DBT-IISc postdoc training fellow, Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore

3.4 Tytuł osiągnięcia naukowego / Title of the Achievement

Odkrycie systemu niekompatybilnych interakcji *Agrobacterium* – *Hypericum perforatum*: doskonałe narzędzie do badania oporności roślin względem transformacji T-DNA

3.5 Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego z punktami IF i MNiSW / List of articles for scientific achievement with IF and MNiSW points

Franklin G, Dias ACP (2006) Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. *In vitro Cell Dev Biol- Plant* 42: 324-330

IF: 1.04

Cytowania/ Citations: 17

MNiSW: 20

Zaplanowałem badania, wykonałem całą pracę laboratoryjną, zebrałem i przeanalizowałem dane, wyciągnąłem wnioski i napisałem manuskrypt. Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosił 95%.

I designed the experiments, performed all the bench work, collected and analyzed the data, drawn conclusions and wrote the manuscript. Altogether, I contributed 95% in this article.

Franklin G, Oliveira M, Dias ACP (2007) Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. *Plant Science* 172: 1193-1203

IF: 3.437

Cytowania/ Citations: 19

MNiSW: 30

Opracowałem plan badań i uzyskałem kultury tkankowe, zbadałem *Agrobacterium* pod względem transformacji i skuteczności bombardowania mikrocząstkami opłaszczonymi plazmidem. Zebrałem dane, przeanalizowałem je i wyciągnąłem wnioski. Zebrałem wszystkie dane, zebrałem literaturę i napisałem manuskrypt. Podsumowując, mój wkład w ten artykuł wyniósł 90%.

I designed the experiments, and performed the establishment of organogenic nodule culture, screening of *Agrobacterium* for transformation and bombardment with plasmid-coated microparticles. collected the data, analyzed them and drew conclusions. Compiled all the data, collected literature and wrote the manuscript. In summary, my contribution to this article was 90%.

Franklin G, Conceição LFR, Kombrink E, Dias ACP (2008) *Hypericum perforatum* plant cells reduce *Agrobacterium* viability during co-cultivation. *Planta* 227: 1401-1408

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

IF: 3.361

Cytowania/ Citations: 18

MNiSW: 40

Opracowałem ideę eksperymentu i wykonałem większość prac prowadzących do opublikowania niniejszego artykułu. Praca obejmowała wyprowadzenie kultur zawiesinowych *Hypericum perforatum*, ich ko-kulturę z *Agrobacterium*, pomiary reaktywnych form tlenu, ekstrakcję związków fenolowych, analizy HPLC, testy żywotności, izolację RNA, analizę ekspresji mRNA itp. Napisałem manuskrypt, zgromadziłem i zanalizowałem dane, zinterpretowałem wyniki i dokonałem przeglądu literatury. Mój wkład w powstanie pracy wynosi 85%.

I conceived the idea and performed most of the work for this article. This includes the establishment of *Hypericum perforatum* cell suspension culture, co-cultivation with *Agrobacterium*, reactive oxygen species measurements, extraction of phenolic compounds, HPLC analyses, viability assays, RNA isolation, mRNA expression analysis etc. I have also performed the writing of the article, including the collection of data, analysis of data, interpretation of the results and literature review. I believe that my contribution is 85%.

Franklin G, Conceição LFR, Kombrink E, Dias ACP (2009) Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry* 70: 65-73

IF: 3.205

Cytowania/ Citations: 50

MNiSW: 35

Opracowałem ideę eksperymentu i wykonałem większość pracy. Obejmowała ona uzyskanie kultur zawiesinowych *Hypericum perforatum*, ko-kulturę z *Agrobacterium*, dokonałem pomiaru reaktywnych form tlenu, wykonałem ekstrakcję związków fenolowych, analizy HPLC, testy żywotności, izolację RNA, analizę ekspresji mRNA itp. Napisałem artykuł, zgromadziłem dane i dokonałem ich analizy, zinterpretowałem wyniki i dokonałem przeglądu literatury. Opracowałem również model. Mój wkład w tę pracę wynosi 85%

I conceived the idea and performed most of the work. This includes the establishment of *Hypericum perforatum* cell suspension culture, co-cultivation with *Agrobacterium*, reactive oxygen species measurements, extraction of phenolic compounds, HPLC analyses, viability assays, RNA isolation, mRNA expression analysis etc. I have also performed the writing of the article, including the collection of data, analysis of data, interpretation of the results and literature review. I have also developed the model and believe my contribution to this work is 85%.

Franklin G, Dias ACP (2011) Chlorogenic acid participates in the regulation of shoot, root and root hair development in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol Biochem.* 49: 835-842

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

IF: 3.096

Cytowania/ Citations: 17

MNiSW: 35

Zaprojektowałem eksperymenty, wykonałem wszystkie prace laboratoryjne, zebrałem i przeanalizowałem dane, wyciągnąłem wnioski i napisałem manuskrypt. Prace laboratoryjne obejmują uzyskanie kultur *in vitro*, test inhibicji i żywienia roślin; wykonałem też analizy histologiczne, izolację i identyfikację związków. Prowadziłem omówione kultury, zbierałem dane, przeprowadziłem analizy, wyciągnąłem wnioski i napisałem manuskrypt. Wykonałem około 95% prac prowadzących do powstania niniejszego artykułu.

I designed the experiments, performed all the bench work, collected and analyzed the data, drawn conclusions and wrote the manuscript. The bench work includes the *in vitro* culture, inhibitor and feeding assays, histological sectioning, isolation and identification of compounds. Maintained the cultures, collected data, performed analysis, drew conclusions and wrote the manuscript. Thus, I contributed 95% in this article.

Hou HW, Shakya P, Franklin G (2016) A perspective on genetic transformation of *Hypericum perforatum*. Front. Plant Sci. 7:879. doi: 10.3389/fpls.2016.00879 40 (Corresponding author)

IF: 4.29

Cytowania/ Citations: 2

MNiSW: 40

Opracowałem ideę doświadczenia, zebrałem informacje, zaprojektowałem grafikę i napisałem manuskrypt. Komunikowałem się z redakcją czasopisma jako autor korespondencyjny. Mój wkład w powstanie tej pracy wynosi 61,5%

I conceived the idea of this article, collected information, designed graphics and wrote the manuscript. I have also communicated with the journal as the corresponding author. My contribution is 61.5% in this article.

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Franklin G, Beerhues L and Čellárová E (2016) Editorial: Molecular and biotechnological advancements in *Hypericum* Species. Front. Plant Sci. 7:1687. doi: 10.3389/fpls.2016.01687 (Corresponding author)

IF: 4.29

Cytowania/ Citations: 0

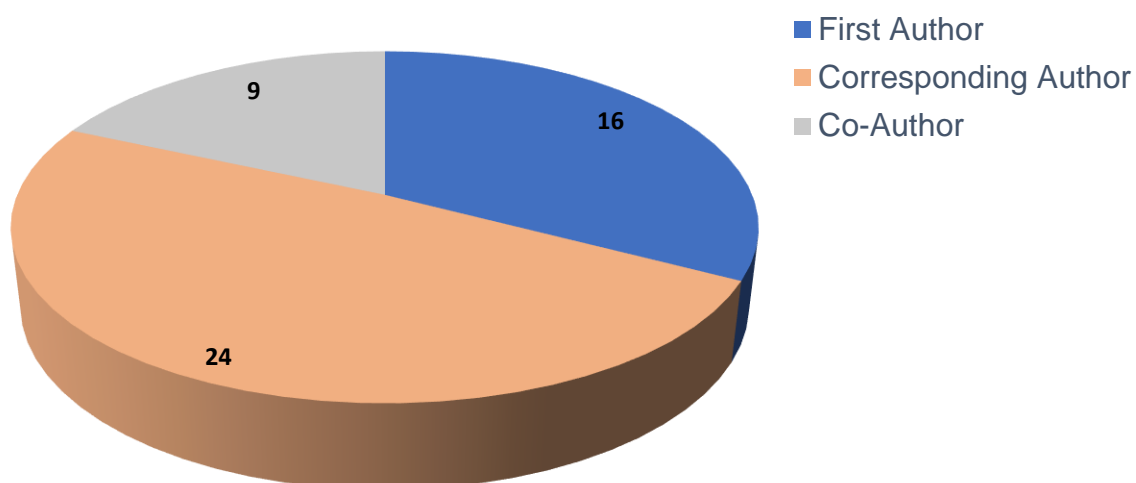
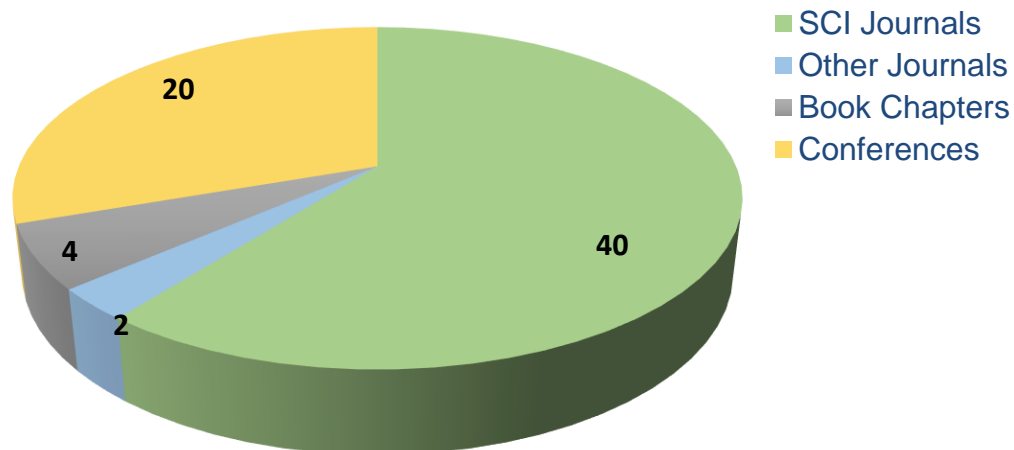
MNiSW: 40

Opracowałem pomysł na ten artykuł, zebrałem informacje i napisałem manuskrypt. Z redaktorem czasopisma kontaktowałem się jako autor korespondencyjny. Mój wkład wynosi 67,5% w tym artykule.

I developed the idea of this article, collected information and wrote the manuscript. I have also communicated with the journal editor as the corresponding author. My contribution is 67.5% in this article.

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

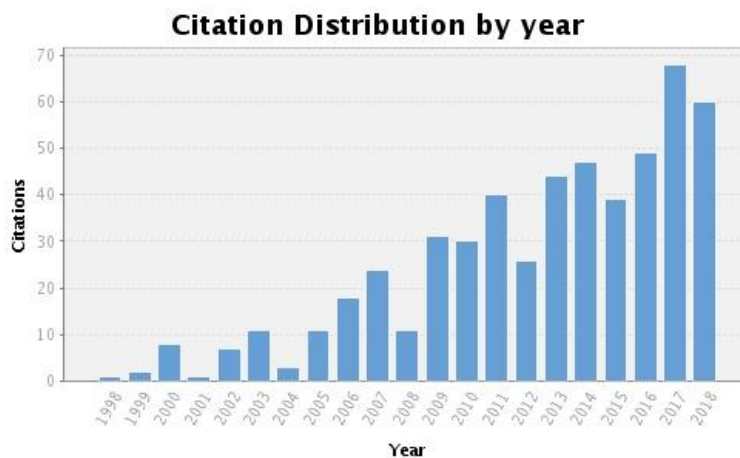
3.6 Podsumowanie punktów IF, MNiSW i Indeks Hirscha



Joint Impact Factor: **115.22**

Suma punktów MNiSW: **1275**

Web of Science

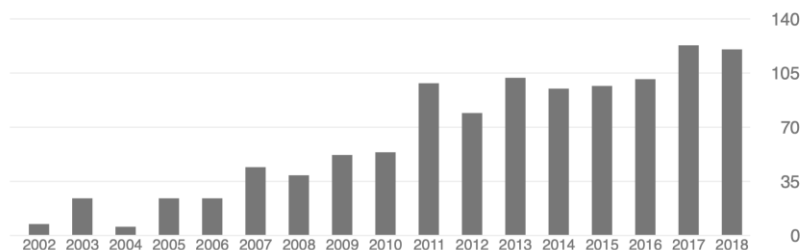


Sum of the Times Cited **531**

Average Citations per Article **14.75**

h-index **16**

Google scholar



Sum of the Times Cited **1122**

h-index **20**

i10-index **27**

3.7 Opis osiągnięcia naukowego

3.7.1 Wprowadzenie

„Centralnym dogmatem” doskonalenia roślin uprawnych, genomiki funkcjonalnej, edycji genomu, biologii syntetycznej i podobnych dziedzin jest umiejętność wprowadzania genów do roślin (Hwang i in., 2015; Nester, 2015; Sainsbury i Lomonossoff, 2014; Xu i in., 2014). Jest wiele dostępnych metod wprowadzania genów do roślin. Wśród metod biologicznych wymienić można transformację za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* i za pomocą wirusów. Natomiast metody fizyczne obejmują: mikrowstrzeliwanie, elektroporację, mikroiniekcję, nanocząstki czy też transfekcję wspomaganą chemicznie. Pomimo dostępności metod alternatywnych, wprowadzanie genu za pomocą *A. tumefaciens* jest techniką preferowaną ze względu na swoją prostotę oraz częstą integrację pojedynczej kopii transgeny z genomem żywiciela, co może zapobiec wyciszeniu transgeny.

Chociaż *A. tumefaciens* jest często wykorzystywana jako nośnik genu w genomice funkcjonalnej roślin modelowych i niektórych gatunków roślin uprawnych, w przypadku dużej grupy gatunków roślin transformacja za pomocą tej bakterii jest trudna ze względu na **„oporność rośliny”, zjawisko, którego istota do tej pory nie została całkowicie wyjaśniona**. Ponieważ oporność rośliny hamuje postęp genomiki funkcjonalnej i możliwość doskonalenia istotnych ekonomicznie gatunków roślin, ważne jest zrozumienie mechanizmu tego zjawiska. Badania prowadzone na roślinach podatnych na infekcję *A. tumefaciens* (np. *Nicotiana tabacum* i *Arabidopsis thaliana*) wzbogaciły zasób wiedzy na temat interakcji pomiędzy *Agrobacterium* i rośliną (Anand i in., 2008; Ditt i in., 2006; Pruss i in., 2008; Veena i in., 2003; Yuan i in., 2007). Jednak studia te nie były w stanie wyjaśnić mechanizmów oporności roślin na poziomie molekularnym, ponieważ prowadzone były głównie na roślinach podatnych na zakażenie *A. tumefaciens*.

Chociaż wyjaśnienie reakcji gatunków roślin opornych na infekcję *A. tumefaciens* przyczyniłoby się do zrozumienia mechanizmów oporności roślin na poziomie molekularnym, badania nad opornością roślin ograniczały się zwykle do roślin modelowych ze względu na brak efektywnego systemu roślin opornych. W wyniku pionierskich badań prowadzonych w ostatnich latach, udało nam się ustalić, że **interakcja pomiędzy *Hypericum perforatum* i *A. tumefaciens* jest niekompatybilna** (Franklin i in., 2008, 2009a; Franklin i in., 2007; Hou i in., 2016; Singh i in., 2014). Ten nowy układ doświadczalny może przyczynić się do zrozumienia mechanizmów zachodzących na poziomie molekularnym w przypadku oporności roślin na transformację za pośrednictwem *A. tumefaciens* i może przynieść znaczny postęp techniczny w tej dziedzinie badań. Pokazanie komponentów biorących udział w interakcji niekompatybilnej, takich jak elicytory, receptory, cząsteczki sygnalizacyjne, geny obronne itd., może pozwolić na **zdefiniowanie nowych strategii opracowywania metod transformacji w odniesieniu do kilku opornych gatunków roślin, a w niedalekiej przyszłości stworzyć odmiany odporne na guzowatość i włosowatość korzeni**.

3.7.2 Transformacja roślin za pomocą *Agrobacterium*

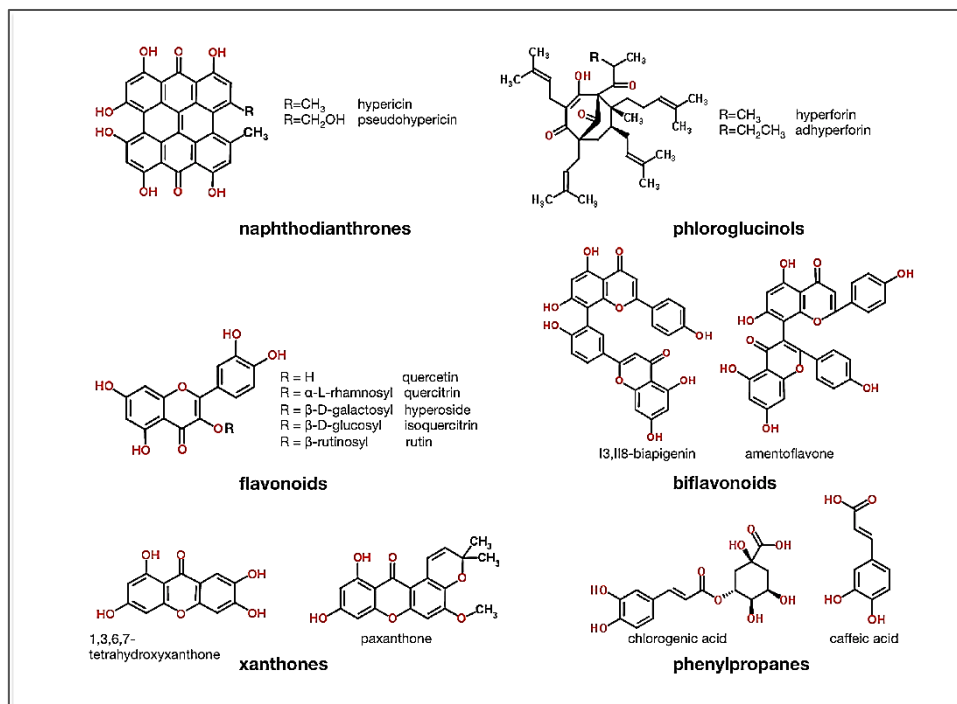
Agrobacterium jest nazywana „naturalnym inżynierem genetycznym” ze względu na jej naturalną zdolność do wprowadzania do komórek rośliny fragmentu DNA (przenoszony DNA, T-DNA) z plazmidu wywołującego guzy (Ti, z ang. *tumour-inducing*) lub tworzenie się korzeni włosowatych (Ri, z ang. *root inducing*). Proces ten znany jest jako „transfer T-DNA” (Earanna, 2013; Nester, 2015). Kiedy T-DNA znajdzie się już w komórce rośliny, transportowany jest do jądra rośliny i ulega trwałej integracji z jej genomem. T-DNA koduje geny odpowiedzialne za syntezę auksyny, cytokininy i opiny. Stąd integracja T-DNA z genomem oraz następująca po niej ekspresja kodowanych przez T-DNA genów auksyny i cytokininy powoduje nierównowagę w proporcji tych hormonów w komórce rośliny żywiciela. Ponieważ nierównowaga ta powoduje niekontrolowany podział komórek, w zainfekowanej roślinie wywoływane są choroby neoplastyczne, takie jak guzowatość i włosowatość korzeni. Ze względu na to, że T-DNA koduje również geny odpowiedzialne za syntezę opiny – związku niezbędnego do przeżycia *Agrobacterium*, tkanki guzów korzeniowych i korzeni włosowatych służą wytwarzania tego związku. T-DNA nie może być transkrybowane w *Agrobacterium*, a opina nie może być metabolizowana przez rośliny. Oba powyższe fakty oznaczają, że proces transferu T-DNA jest „molekularną niszą” dla kolonizacji i przetrwania *Agrobacterium*. Choroby neoplastyczne występują naturalnie i są powszechne w przypadku kilku ekonomicznie istotnych gatunków roślin (takich jak róża, winorośl, drzewa owocowe, pomidor), co powoduje ogromne straty plonów (Kerr, 2016; Kerr i Tate, 2016). **Kontrolowanie chorób neoplastycznych metodami chemicznymi i innymi metodami konwencjonalnymi nadal stanowi wyzwanie ze względu na to, że po zintegrowaniu T-DNA z genomem rośliny fizyczne występowanie bakterii nie jest konieczne do dalszego rozwoju choroby .**

W wyniku kilku lat intensywnych badań, mechanizm transferu T-DNA wywołującego choroby został wykorzystany jako narzędzie wprowadzania pożądanych genów do roślin. Transformacja za pomocą *A. tumefaciens* jest powszechnie wykorzystywana do ulepszania upraw i genomiki funkcjonalnej (Earanna, 2013; Nester, 2015), natomiast kultury korzeni włosowatych wywoływane w wyniku transformacji za pomocą *A. rhizogenes* są często stosowane w produkcji metabolitów wtórnych przydatnych w przemyśle farmaceutycznym (Georgiev i in., 2012; Oksman-Caldentey i Sévon, 2002).

Skuteczność transformacji w warunkach laboratoryjnych w dużej mierze zależy od dwóch istotnych parametrów, mianowicie: „efektywności wprowadzania genu do komórek rośliny docelowej” oraz „zdolności transformowanych komórek do regeneracji w kompletne rośliny”. Niepowodzenie w przypadku któregoś z tych czynników będzie miało istotny wpływ na obniżenie skuteczności transformacji. W przypadku niektórych gatunków problem stanowi wprowadzenie DNA, w przypadku innych trudna jest regeneracja roślin z kultur komórkowych lub tkankowych. **Pomimo obecnej dostępności doskonałych metod regeneracji, wyprowadzenie roślin transgenicznych nadal stanowi wyzwanie w odniesieniu do pewnych gatunków roślin, w tym *Hypericum perforatum*.**

3.7.3 *Hypericum perforatum* jest rośliną istotną ze względów medycznych

Dziurawiec zwyczajny (*H. perforatum* L.) należy do rodziny dziurawcowatych i jest powszechnie stosowany w ziołolecznictwie. Tradycyjne zastosowanie tej rośliny leczniczej miało miejsce już w pierwszym wieku naszej ery, kiedy to greccy zielarze docenili jej właściwości farmakologiczne w leczeniu kilku dolegliwości. Od tamtego czasu stosowane są wyciągi, napary i wywary z różnych części tej rośliny (Franklin i Dias, 2006; Franklin i in., 2007; Guedes i in., 2012). Farmakologiczne właściwości rośliny *H. perforatum* są w dużej mierze przypisywane jej metabolitom wtórnym (Wang i in., 2015). Analiza fitochemiczna wyciągów z *H. perforatum* ujawniła, że zawierają one naftodiantrony (hiperycynę i pseudohiperycynę), prenylowane acylo-floroglucynole (hyperforyna i adhyperforyna), flawonoidy (kwercetyna, hiperozyd, rutyna, katechina i izokwercytryna), biflawonoidy (amentoflawon, biapigenina), związki fenolowe (kwas chlorogenowy, kwas taninowy i kwas kawowy), ksantony (1,3,6,7-tetrahydroksyantony), a także olejek eteryczny bogaty w seskwiterpeny (Bruni i Sacchetti, 2009; Guedes i in., 2012; Tatsis i in., 2007).



Rysunek 1. Główne klasy metabolitów wtórnych znalezionych w *H. perforatum* (Shakya i in., 2017)

Ostatnie badania i próby kliniczne udowodniły, że wyciągi z *H. perforatum* są tak samo skuteczne jak ich odpowiedniki farmaceutyczne takie jak fluoksetyna (Prozac), sertralina (Zoloft) i inne wiodące leki antydepresyjne. Z tego względu zioło to jest szeroko stosowane w leczeniu łagodnej i umiarkowanej depresji (Oliveira i in., 2016). Szereg badań sugeruje, że jest ono nie tylko skuteczne w leczeniu zaburzeń neurologicznych, ale może być również przydatne w leczeniu raka, stanów zapalnych, ran i infekcji (Franchi i in., 2011; Klemow i in., 2011; Olivo i in., 2012; Silva i in., 2005; Silva i in., 2008; Yadollah-Damavandi i in., 2015). Ze względu na uznane właściwości medyczne *H. perforatum* znajduje się w Farmakopeach kilku państw w

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Europie, a także Stanów Zjednoczonych. Zgodnie z amerykańską oraz europejskimi Farmakopeami, czysty lek składa się z suszonych kwiatostanów oraz części nadziemnych rośliny. Ze względu na swoją skuteczność i popularność, *H. perforatum* pozostaje jednym z najlepiej sprzedających się ziół na rynku. Produkty z *H. perforatum* są wydawane w niektórych krajach UE na receptę, podczas gdy w USA są sprzedawane bez recepty jako ziołowy suplement dietetyczny, środek antydepresyjny, uspokajający i poprawiający nastrój (Shelton, 2009; Sirvent i Gibson, 2002). Wykorzystanie tego zioła leczniczego dramatycznie wzrosło w ciągu ostatniej dekady ze względu na to, że leczenie ludzi i zwierząt wyciągiem z *H. perforatum* nie wykazuje żadnych poważnych, szkodliwych skutków ubocznych (Trautmann-Sponsel i Diemel, 2004).

W celu zaspokojenia stale rosnącego zapotrzebowania sektora farmaceutycznego na biomasę *H. perforatum*, roślina ta jest uprawiana na całym świecie. Ponieważ główne właściwości farmakologiczne wyciągów z *H. perforatum* są zasadniczo określone poprzez ogólny skład i proporcje pomiędzy składnikami, każda zmiana w składzie lub proporcjach może mieć wpływ na skuteczność leczenia tymi wyciągami (Božin i in., 2013; Marrelli i in., 2014). Ze względu na to, że wyciągi pozyskiwane z roślin *H. perforatum* rosnących w różnych regionach geograficznych, o różnych porach roku, w różnych warunkach glebowych itd. znacząco różniły się od siebie pod względem profilu fitochemicznego (Bruni i in., 2005; Murch i in., 2003; Southwell i Bourke, 2001), kultury *in vitro* pojawiły się jako alternatywa do upraw polowych (Murch i Saxena, 2006; Zobayed i in., 2004).

3.7.4 Regeneracja roślin *H. perforatum*

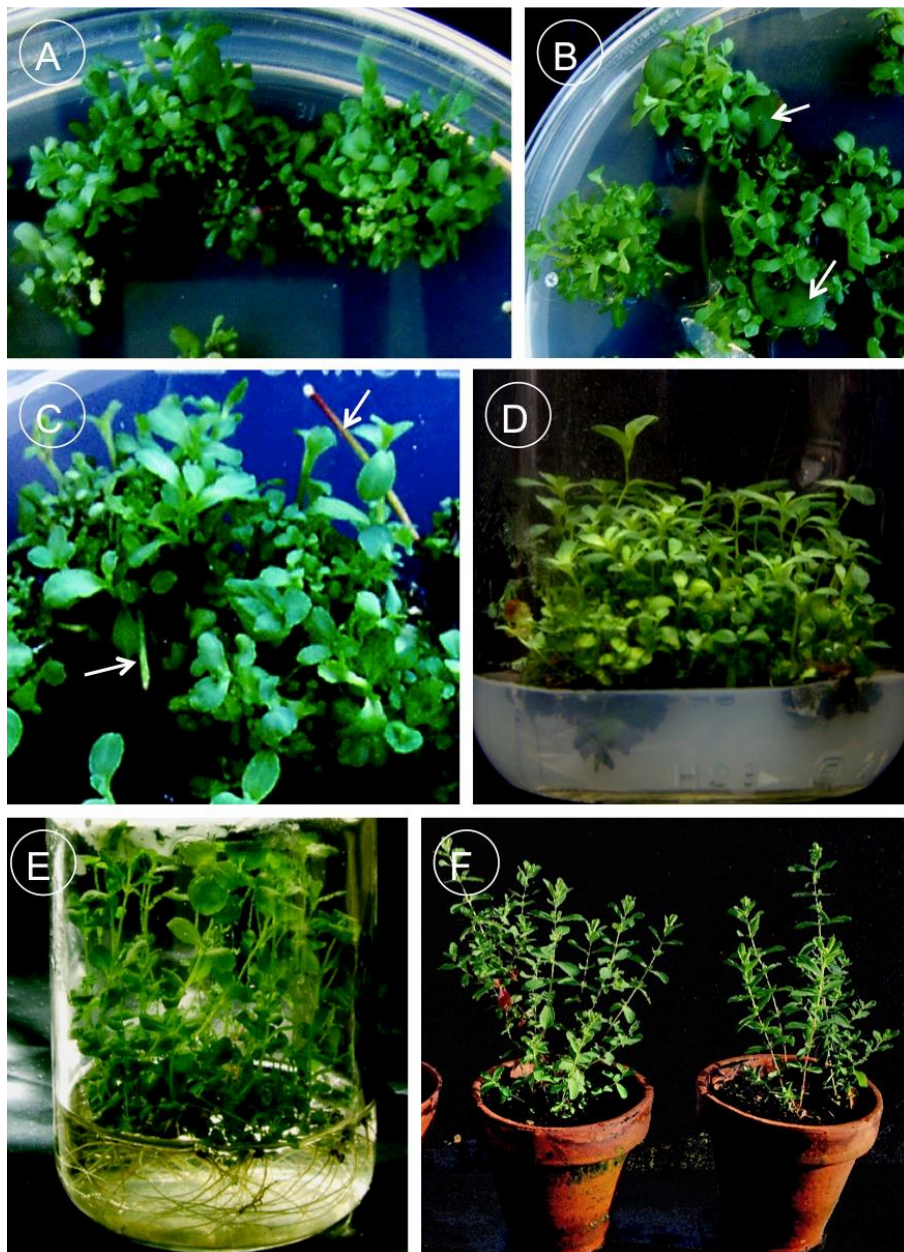
W ostatnim okresie, podejmowano próby kultury *H. perforatum in vitro*, koncentrując się głównie na produkcji biomasy o wysokiej jakości, odpowiedniej dla przemysłu farmaceutycznego. W szczególności prowadzono szeroko zakrojone badania nad wpływem regulatorów wzrostu roślin (PGR) na koncentrację metabolitów wtórnych w kulturach komórek i tkanek. Ostatecznie badania te doprowadziły do opracowania metod regeneracji roślin właściwych dla *H. perforatum*. Jednak ich efektywność była ograniczona do konkretnych genotypów (Murch i in., 2000; Pretto i Santarem, 2000; Zobayed i in., 2004; Zobayed i Saxena, 2003).

Ze względu na fakt, iż regeneracja roślin jest jednym z głównych warunków skutecznej transformacji, **na podstawie obserwacji różnych parametrów opracowaliśmy protokół regeneracji roślin *H. perforatum* niezależny od genotypu (Franklin i Dias, 2006)**. Wyniki naszej pracy pokazały, że jeśli chodzi o regenerację roślin, genotypy różnią się od siebie w niewielkim stopniu. Z drugiej strony typ eksplantatu (hipokotyl, liść lub korzeń) w znacznym stopniu wpływał na regenerację rośliny (Rysunek 2). W związku z tym wykazano, że w przypadku *H. perforatum* proces regeneracji jest kontrolowany przez regulatory wzrostu roślin i zależy od eksplantatu.

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Wiek źródła eksplantatu w znacznym stopniu wpływał na potencjał regeneracyjny liścia, hipokotylu i eksplantatu pochodzącego z płatków kwiatowych (**Franklin i Dias, 2006**; Goel i in., 2008). Z drugiej strony wiek nie wpływał na potencjał morfogenetyczny segmentów korzenia (**Franklin i Dias, 2006**). Brak zależności potencjału regeneracyjnego segmentów korzenia od wieku obserwowany w naszych badaniach można przypisać wysokiej aktywności metabolicznej i szybszym podziałom komórkowym korzeni. Ułożenie eksplantatu pochodzącego z liścia na pożywce również miało wyraźny wpływ na regenerację. Liście ułożone na pożywce powierzchnią doosiową wykazywały wysoką częstotliwość regeneracji, natomiast liście dotykające medium drugą stroną nie wykazywały żadnej reakcji.

Chociaż w przypadku większości gatunków roślin głównym warunkiem regeneracji pędów jest wysoka zawartość cytokininy w stosunku do auksyny, *H. perforatum* wykazywało skuteczną regenerację pędów bezpośrednich przy niskim stosunku cytokininy względem auksyny (**Franklin and Dias, 2006**). Z drugiej strony, do regeneracji pędów za pomocą kalusa *H. perforatum* potrzebny był wysoki stosunek cytokininy do auksyny. Interesujące jest to, że rośliny regenerowały się również skutecznie na medium podstawowym z eksplantatów korzeniowych (**Franklin i Dias, 2006**).

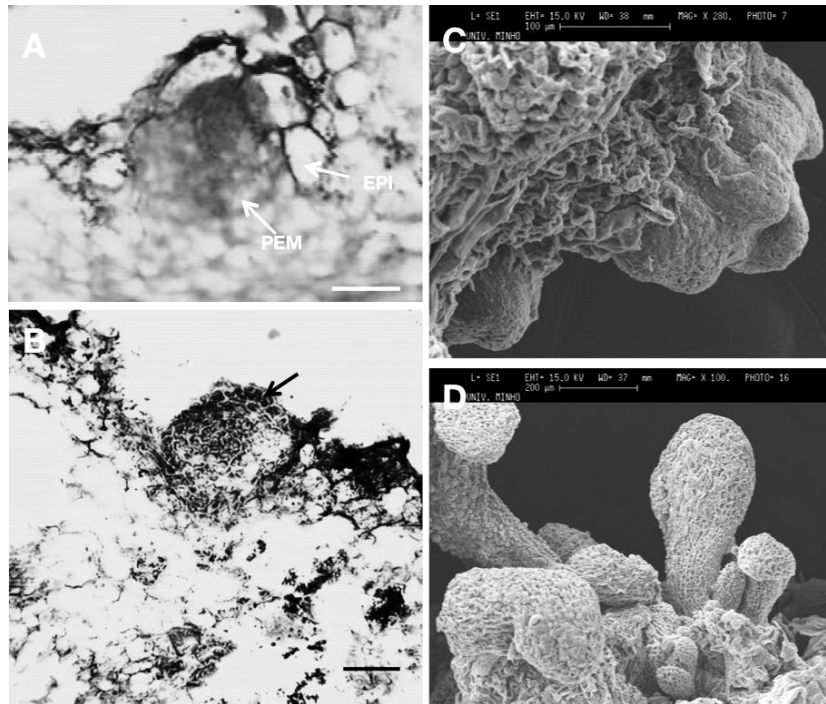


Rysunek 2. Wydajna metoda regeneracji roślin *H. perforatum* z różnych eksplantatów opracowana w naszym laboratorium (Franklin i Dias, 2006)

Regeneracja roślin z eksplantatów uzyskanych w określonych warunkach mogła nastąpić za pomocą organogenezy lub embriogenezy somatycznej. Organogeneza jest procesem, w którym tworzy się organ, natomiast proces rozwoju zarodka z komórek somatycznych nazywany jest embriogenezą somatyczną. Powstanie jednobiegunowego zawiązku i dwubiegunowego zarodka to cechy charakterystyczne odpowiednio organogenezy i embriogenezy somatycznej. Jeśli podczas tych procesów ma miejsce dedyferencjacja (formuje się tkanka kalusowa), to nazywa się je regeneracją pośrednią. **Wykazaliśmy, że regeneracja *H. perforatum* może następować zarówno przez embriogenezę jak i organogenezę w tej samej**

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

kulturze jak pokazano na Rysunku 3 (Franklin i Dias, 2006). Odkryliśmy, że grupa komórek merystematycznych uformowanych w warstwie podnaskórkowej rozwijała się równocześnie w dwie globularne struktury, odrębne funkcjonalnie. Te struktury, które były związane z eksplantatem rozwinęły się w pędy, natomiast struktury z nim nie związane przeszły proces embriogenezy. Embriogeneza postępowała od stadium globularnego zarodka do liścienia poprzez stadia zarodka sercowatego i torpedowatego.

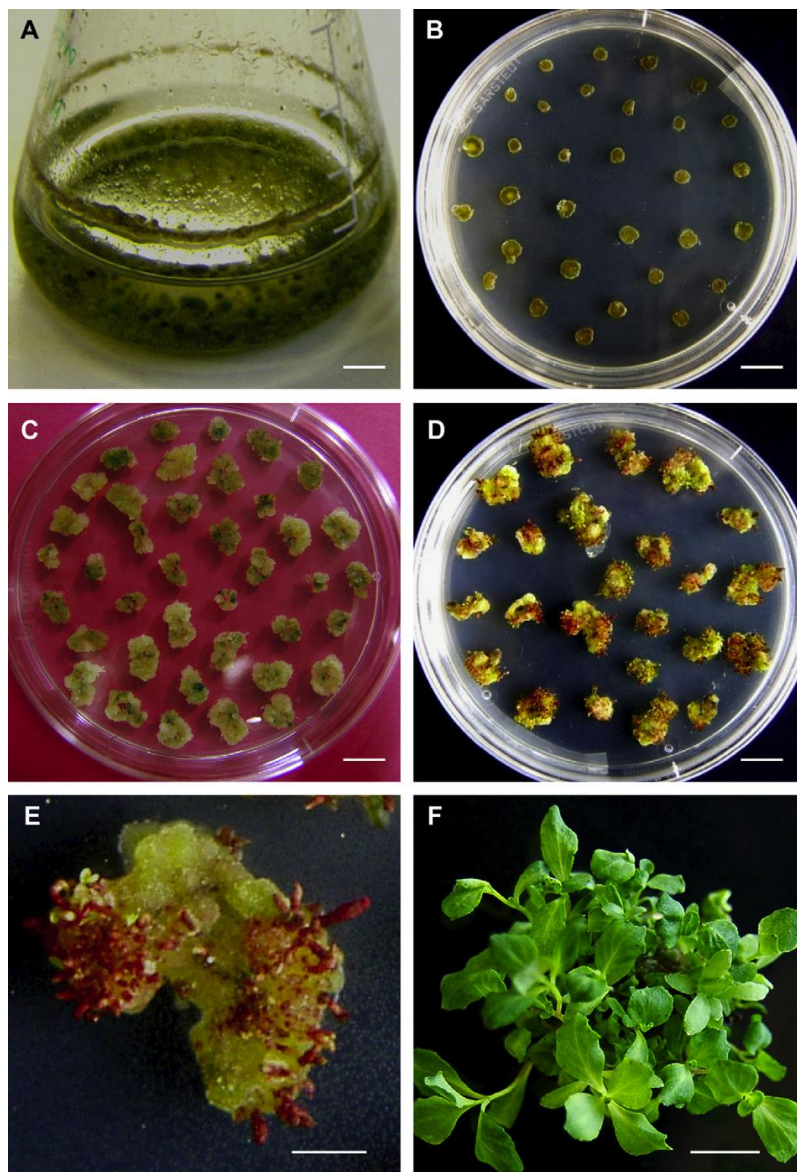


Rysunek 3. Regeneracja rośliny *H. perforatum* poprzez organogenezę i embriogenezę (Franklin i Dias, 2006). A, formowanie się masy proembryogenicznej (PEM) w wyniku mitozy w komórkach podnaskórkowych i następujący po nim rozwój komórek naskórkowych (EPI) (pasek skali=100µm); B, wczesne stadium globularne zarodka bez prokambium (pasek skali=100 µm); C, obraz z mikroskopu elektronowego pokazujący rozwój liści pierwotnych po 12 dniach kultury; D, obraz z mikroskopu elektronowego pokazujący rozwój pąków pędów po 20 dniach kultury.

Oprócz ustalenia powyższej metody szybkiej regeneracji poprzez organogenezę i embriogenezę, **stworzyliśmy również dla *H. perforatum* system regeneracji za pomocą kultury cienkowarstwowej (ang. *thin cell layer*, *TCL*) z pośrednią fazą kalusa (Franklin i Dias, 2011).** W skrócie, zielone organogeniczne agregaty zebrane z zawiesiny komórkowej zostały pokrojone na okrągłe TCL o grubości około 0,5-1,0 mm i uprawiane *in vitro* na pożywce MS zawierającej 0,1 mg/l 6-benzyloaminopuryny (BAP) i 0,1 mg/l kwasu naftylooctowego (NAA). Na każdą płytkę zawierającą 25 ml medium regeneracyjnego wyszczepiano 10-15 eksplantatów TCL (Rysunek 14B) i pozostawiono w ciemności w temperaturze 25°C. Gdy zaobserwowano pojawienie się charakterystycznych czerwonych pąków pędów, kultury były przenoszone do środowiska o fotoperiodzie 16-8 godzin w celu uzyskania zielonych pędów. Następnie kultury z zielonymi pąkami przenoszone były na podstawową pożywkę MS w celu uzyskania elongacji

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

pędów. Z kolei pędy były ukorzeniane i jak się wzmocniły – skutecznie przenoszone do warunków naturalnych. Ogólnie, pośrednia metoda regeneracji jest najlepsza w przypadku regeneracji roślin transgenicznych, ponieważ wybór transgenicznego kalusa jest zwykle prosty i umożliwia efektywne wzbogacenie transformowanej tkanki przed regeneracją. Z drugiej strony regeneracja bezpośrednia po transformacji często skutkuje powstaniem chimer roślinnych.



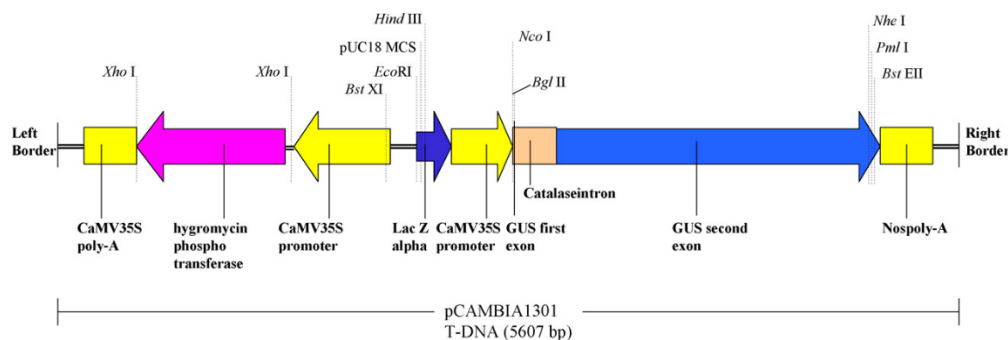
Rysunek 4. Stworzenie metody regeneracji za pomocą kultury cienkowarstwowej (ang. *thin cell layer, TCL*) dla *H. perforatum* (Franklin i Dias, 2011). A, zawiesina komórkowa *H. perforatum* zawierająca zielone organogeniczne bryłki; B, cienkie warstwy komórek wyciętych z zielonych bryłek organogenicznych na medium regeneracyjnym; C, indukcja rozrośniętego kalusa z cienkich warstw po 30 dniach kultury na pożywce regeneracyjnej w ciemności; D, regeneracja charakterystycznych czerwonych pąków pędów z kalusa w ciemności; E, zbliżenie eksplantatu pokazujące zróżnicowane czerwone pąki pędów; F, kultura z wydłużonymi zielonymi pędami po przeniesieniu do warunków fotoperiodycznych. (Paski skali A-D, F = 1 cm, E = 0,25 cm).

3.7.5 *H. perforatum* jest rośliną oporną względem transformacji za pomocą *Agrobacterium*

Przedmiotem zainteresowań w dziedzinie biotechnologii *H. perforatum* jest stymulacja produkcji dotychczas znanych metabolitów wtórnych a także wytwarzania związków o nowych właściwościach biologicznych (Shakya i in., 2017). Ostatnie osiągnięcia w dziedzinie systemów kultury komórek roślinnych takie jak wybór linii komórkowej, immobilizacja komórek, permeabilizacja, suplementacja prekursorami, sekrecja produktu, biotransformacja, elicytacja, inżynieria bioreaktorów, biologia syntetyczna czy inżynieria metaboliczna mogłyby być stosowane w tym celu (Rao i Ravishankar, 2002; Trosset i Carbonell, 2015; Wilson i Roberts, 2012). Wśród nich atrakcyjną strategią produkcji interesujących związków jest inżynieria metaboliczna roślin, technologia oparta na możliwości wprowadzania do roślin genów związanych ze szlakami metabolicznymi. Chociaż dla różnych gatunków donoszono o uzyskaniu na drodze inżynierii metabolicznej roślin o poprawionej wydajności wytwarzania związków bioaktywnych (Lu i in., 2016; Tatsis i O'Connor, 2016), zastosowanie tego narzędzia ciągle przysparza trudności w przypadku takich gatunków jak *H. perforatum*. Jest to spowodowane brakiem informacji genetycznych o szlakach biosyntetycznych i metod skutecznej transformacji (Franklin i in., 2016; Hou i in., 2016).

W celu ustalenia metod transformacji dla *H. perforatum*, jako pierwsi dokonaliśmy ewaluacji systemów transformacji za pomocą *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* i wstrzeliwania biolistycznego (Franklin i in., 2007).

Prowadzono kokulturę różnych eksplantatów (fragmenty blaszki liściowej, ogonka liścia, łodygi i korzenia) razem ze szczepami *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* niosącymi wektor binarny pCAMBIA1301, który w rejonie T-DNA zawiera gen fosfotransferazy hygromycyny (*HPT*) jako marker selekcji i gen reporterowy kodujący beta-glukuronidazę (*GUS*) z intronem eukariotycznym (Rysunek 5). Kiedy eksplantaty te zostały poddane inkubacji z substratem dla *GUS*, nie stwierdzono akumulacji niebieskiego barwnika będącego produktem reakcji enzymatycznej, co wskazywało na to, że żaden z nich nie uległ transformacji (Franklin i in., 2007). Podobny rezultat osiągnięto bez względu na tło chromosomowe szczepów *Agrobacterium*, indukcję genu *Vir* i obecność w pożywce antyoksydantu, cysteiny, inhibitorów etylenu itd.



Rysunek 5. Region T-DNA binarnego wektora pCAMBIA1301 pokazujący miejsca restrykcji (Franklin i

in., 2007).

Ponieważ przypuszczaliśmy, że być może *Agrobacterium* nie jest w stanie zainfekować eksplantatów z powodu przeciwbakteryjnego działania metabolitów wtórnych *H. perforatum* (np. hiperycyny), przetestowaliśmy organogeniczne bryłki otrzymane z kultury zawiesiny komórkowej, w której nie ma gruczołów hiperycyny i które nie są w stanie syntetyzować tego związku (Franklin i in., 2007). Eksplantaty te w kokulturze z *A. tumefaciens* lub *A. rhizogenes* stawały się również brązowe w ciągu 24 godzin, a następnie nekrotyczne w ciągu 15 dni. Poddane barwieniu GUS, eksplantaty te również nie wykazywały ognisk GUS, co świadczyło o tym, że nie uległy transformacji na skutek *Agrobacterium*. Zgodnie z oczekiwaniami po przeniesieniu na medium zawierające antybiotyk selektywny hygromycynę, nie zaobserwowano formowania się kalusów. Jednak w warunkach nieselektywnych, tzn. bez hygromycyny, eksplantaty te wytwarzały kalusy porównywalne do tych w kulturze kontrolnej. Pomimo brązowego zabarwienia pojawiającego się po kokulturze z *Agrobacterium*, eksplantaty te nie wykazywały fragmentacji DNA, wskazując na fakt, że niekompatybilność transformacji *H. perforatum* za pomocą *Agrobacterium* nie wynikała z nekrozy spowodowanej przez zaprogramowaną śmierć komórki, tak jak to stwierdzono w przypadku kukurydzy (Hansen, 2000).

Kilka eksplantatów wykazywało jedną lub dwie plamy GUS po wspólnej kokulturze z bakterią na pożywce zawierającej silny antyoksydant (BHT). Jednak żaden eksplantat uprawiany *in vitro* w obecności innych antyoksydantów i inhibitorów etylenu nie wykazywał ognisk GUS. Chociaż mnożenie się pędów z kalusów otrzymanych w warunkach nieselektywnych było porównywalne do kultury kontrolnej, żaden z nich po zabarwieniu GUS nie okazał się transgeniczny bez względu na skład zastosowanej pożywki. Szereg gatunków roślin wcześniej uważanych za odporne na *A. tumefaciens* ulega transformacji po suplementacji pożywki antyoksydantami (Das i in., 2002; Frame i in., 2002) i/lub inhibitorami etylenu (Han i in., 2005; Petri i in., 2005; Seong i in., 2005) ze względu na ich zdolność do tłumienia/wymiatania wolnych rodników lub hamowania produkcji etylenu podczas interakcji roślina–*Agrobacterium*. Jednak w przypadku *H. perforatum* ani antyoksydanty ani inhibitor etylenu obecne w pożywce nie zapobiegły zbrązowieniu tkanki i nie sprzyjały transformacji. **Zarówno *A. rhizogenes* jak i *A. tumefaciens* nie były w stanie zainfekować tkanek *H. perforatum* (Franklin i in., 2007).**

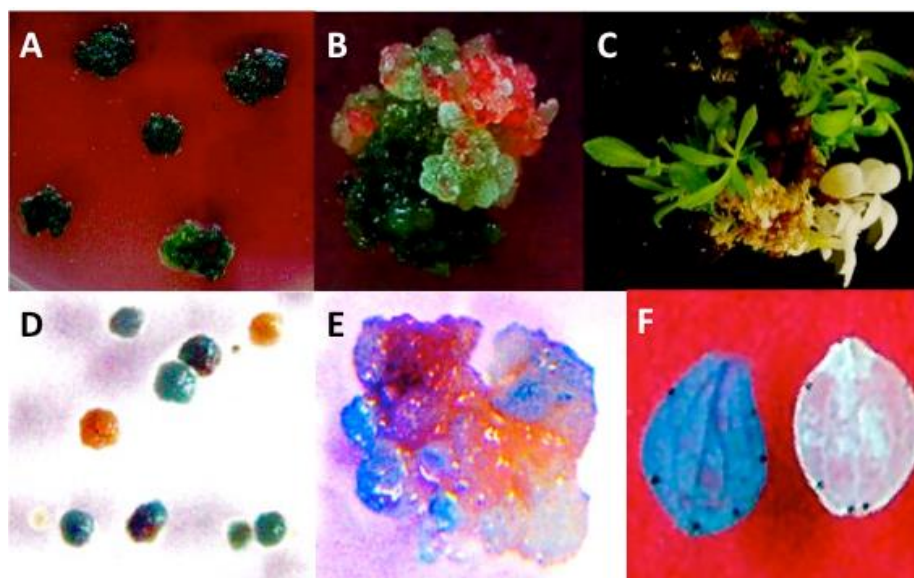
3.7.6 Transformacja *H. perforatum* za pomocą mikrowstrzeliwania

Mikrowstrzeliwanie jest metodą, którą można zastosować do wprowadzenia genu do rośliny w przypadku gatunków opornych na transformację za pomocą *Agrobacterium*. W tej procedurze mikronośniki opłaszczone DNA są wstrzeliwane do tkanki rośliny w wyniku procesu fizycznego. Ze względu na fakt, iż nie zachodzi tutaj żadna interakcja biologiczna, geny mogą zostać wprowadzone do dosłownie każdego typu komórki lub gatunku rośliny i jest to druga najszerszej stosowana technika transformacji roślin. **Za pomocą tej techniki**

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

dokonałiśmy uwieńczonej powodzeniem transformacji *H. perforatum* przy użyciu wektora ekspresji pCAMBIA1301 (Franklin i in., 2007; Franklin i in., 2009b).

W celu osiągnięcia transformacji *H. perforatum* za pomocą wstrzeliwania biolistycznego, zoptymalizowaliśmy ciśnienie przyspieszenia, odległości pomiędzy dyskiem wyzwalającym, makronośnikiem, dyskiem zatrzymującym i płytką docelową, ciśnienie próżni w komorze, liczbę wstrzeliwań oraz wielkość i gęstość mikroośników. Rodzaj eksplantatu, okres kultury przed i po wstrzeliwaniu, skład pożywki i warunki osmotyczne zostały zoptymalizowane dla tej rośliny. Ekspresja GUS w eksplantatach była widoczna po trzech dniach od wprowadzenia plazmidu metodą mikrowstrzeliwania (**Rysunek 5**). Po trzech miesiącach ciągłej selekcji na pożywce zawierającej 20 mg/l hygromycyny, wygenerowano kultury kalusów transgenicznych odporne na hygromycynę a następnie rośliny transgeniczne (**Rysunek 6**). Transgeniczność tych roślin została potwierdzona w drodze analiz molekularnych DNA, takich jak reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) oraz hybrydyzacja metodą Southerna, które ujawniły obecność zarówno genów GUS jak i HPT.



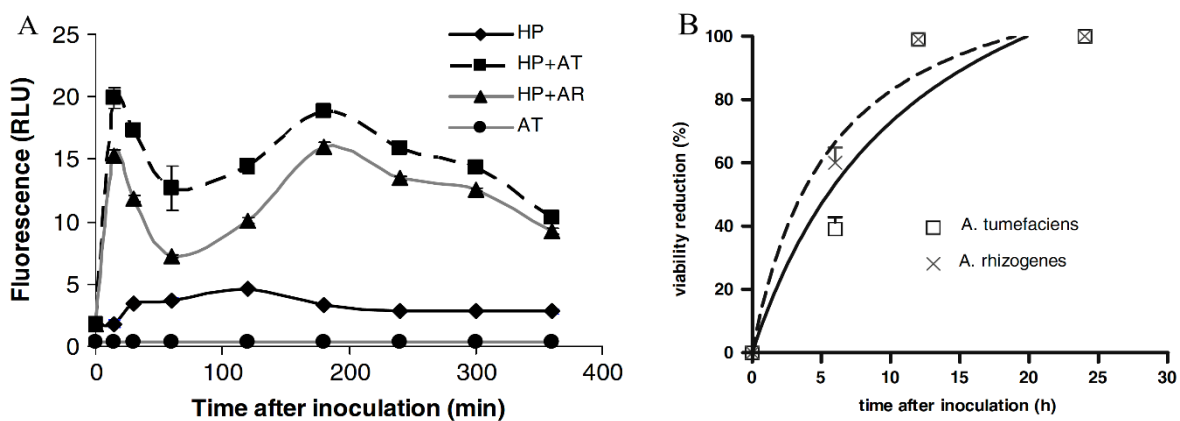
Rysunek 6. Transformacja *H. perforatum* za pomocą mikrowstrzeliwania (Franklin i in., 2007). A, kalus rozwijający się z ostrzeliwanych eksplantatów po 10 tygodniach selekcji hygromycyną; B, szybkie namnażanie się żółtawych kalusów o charakterystycznej czerwonej pigmentacji z ostrzeliwanych eksplantatów w warunkach nieselektywnych po 6 tygodniach inkubacji w ciemności; C, kultura albinotycznych i zielonych pędów w późniejszej selekcji (3 miesiące) kultur trzymanych początkowo w warunkach nieselektywnych; D, organogeniczne eksplantaty bryłkowe ostrzeliwane DNA pCAMBIA1301 przy użyciu dysku wyzwalającego 1100 psi (funty na cal kwadratowy) z odległości 9,0 cm – wiele eksplantatów ma charakterystyczny niebieski kolor po zabarwieniu GUS, co wskazuje na ekspresję genu GUS i inne bez ekspresji; E, organogeniczny eksplantat bryłkowy wskazujący na aktywność GUS ograniczoną do nowo powstałych kalusów we wczesnej selekcji po wstrzeliwaniu; F, liść transgenicznej rośliny *H. perforatum* pokazujący aktywność GUS i liść kontrolny po prawej.

Chociaż nie udało nam się dokonać transformacji *H. perforatum* przy użyciu *Agrobacterium* przenoszącej pCAMBIA1301, wprowadzenie T-DNA z tego samego plazmidu do *H. perforatum* okazało się możliwe metodą biolistyczną (Franklin i in., 2007; Franklin i in., 2009b), co

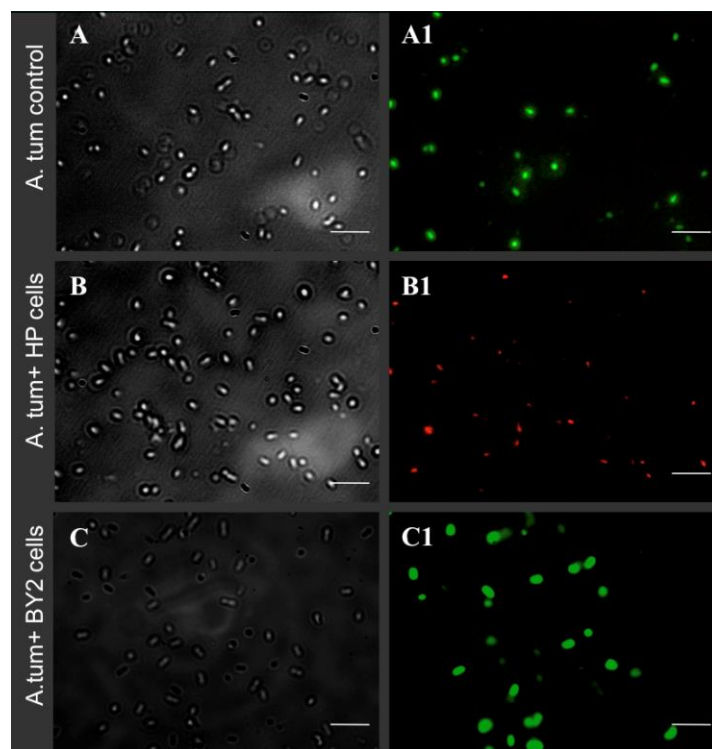
wskazuje na fakt, że biologiczna interakcja pomiędzy bakterią a rośliną może ograniczać przyjęcie T-DNA przez komórki *H. perforatum*.

3.7.7 Reakcja obronna *H. perforatum* wobec *Agrobacterium*

W celu zbadania interakcji pomiędzy *H. perforatum* i *Agrobacterium*, wykorzystaliśmy kultury komórkowe (Franklin i in., 2008, 2009a). Zawiesiny komórkowy *H. perforatum* zostały zaszczerpione *A. tumefaciens* (szczep EHA105) oraz *A. rhizogenes* (szczep A4), które w obu przypadkach zawierały plazmid pCAMBIA1301. Komórki rośliny i bakterie były zbierane i analizowane w różnych okresach po inokulacji (0, 6, 12 i 24 godziny). **Zanotowaliśmy typowy dwufazowy wybuch reaktywnych form tlenu (RFT) i następujące po nim ściemnienie komórek *H. perforatum* po kokulturze z *Agrobacterium* (Rysunek 7A).** Pomimo produkcji RFT, komórki *H. perforatum* pozostały żywotne i nie uległy apoptozie. Chociaż śmiertelność zarówno *A. tumefaciens* jak i *A. rhizogenes* osiągnęła 99% w ciągu 12 godzin kokultury z komórkami *H. perforatum* (Rysunek 7B), ich żywotność nie była zakłócona w przypadku kultury z komórkami tytoniu BY2 prowadzonej w takich samych warunkach (Rysunek 8).



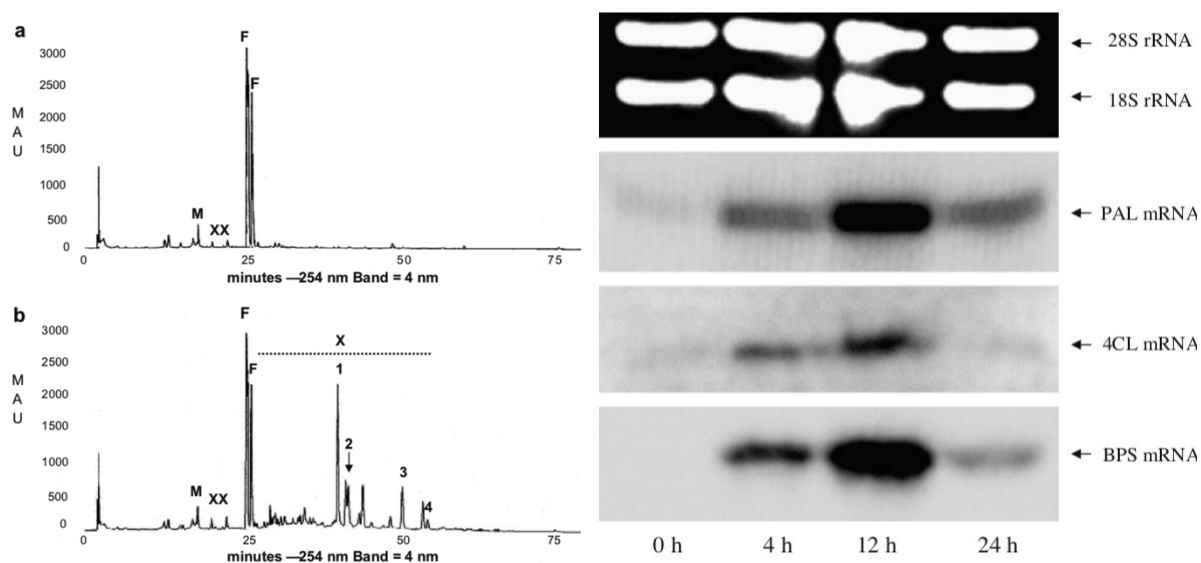
Rysunek 7A. Wewnątrzkomórkowa produkcja RFT w komórkach *H. perforatum* podczas kokultury z *Agrobacterium* (Franklin i in., 2008). HP, kontrolne komórki *H. perforatum* bez bakterii; HP+AT, komórki *H. perforatum* w kokulturze z *A. tumefaciens*; HP+AR, komórki *H. perforatum* w kokulturze z *A. rhizogenes*; AT, kontrolne *A. tumefaciens* bez komórek *H. perforatum*. **Rysunek 7B.** Spadek zawartości żywych bakterii *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* po 0, 6, 12 i 24 godz. od zaszczerpiania komórek *H. perforatum*. W celu oszacowania liczby żywych komórek bakterii 100 μ l kultury *H. perforatum* rozcieńczono do 10^{-6} i (zawierających około 250 komórek bakterii) rozprowadzono na płytkach hodowlanych i inkubowano w ciemności w 28°C.



Rysunek 8. Żywotność *A. tumefaciens* po kokulturze z komórkami *H. perforatum* i komórkami tytoniu (Franklin i in., 2008). Pasek skali = 25 μm . A, obraz mikroskopowy kultur kontrolnych *A. tumefaciens*; B, kultura po 24 godzinach kokultury z komórkami *H. perforatum*; C, kultura po 24 godzinach kokultury z komórkami tytoniu BY2; po prawej stronie (A1, B1 i C1) odpowiednie obrazy z mikroskopu epifluorescencyjnego. .

W komórkach *H. perforatum* po zaszczepieniu *Agrobacterium* produkowane były RFT, a ponadto obserwowano podwyższoną ekspresję genów kodujących ważne enzymy ścieżki fenylopropanoidowej, takich jak amoniako-liaza fenyloalaniny (PAL), ligaza 4-kumaroilo-CoA (4CL) i syntaza benzofenonu (Rysunek 9B). Analizy rozpuszczalnej frakcji związków fenolowych z komórek *H. perforatum* zaszczepionych *Agrobacterium* (Franklin i in., 2009a), wykazały znaczący (12-krotny) wzrost zawartości ksantonu i pojawienie się wielu nowych ksantonów, natomiast zawartość flawonoidów pozostała niezmienną (Rysunek 9A). Z drugiej strony, kiedy analizowano frakcję związków fenolowych ściany komórkowej (Singh i in., 2014), zaobserwowano znaczny wzrost zawartości ligniny i flawonoidów (np. kwercetyny, kwercetryny i innych). Stąd wniosek, że ksantony pozostawały we frakcji fenoli rozpuszczalnych, natomiast flawonoidy były inkorporowane do ściany komórkowej. Wszystkie te obserwacje jasno sugerowały, że *H. perforatum* mogła wzmocnić swoją ścianę komórkową jako mechanizm ochronny przed infekcją *A. tumefaciens*. Szybka zmiana biosyntezy metabolitów wtórnych w komórkach roślin odgrywa podwójną rolę: – tworzenie antyoksydantów chroniących komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi oraz tworzenie fitoaleksyn mających zahamować wzrost *Agrobacterium*.

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE



Rysunek 9. Reakcja komórek rośliny *H. perforatum* na hodowlę z *A. tumefaciens* (Franklin i in., 2009a). A, chromatogramy HPLC pokazujące główne związki fenolowe (F- flawonoidy; X- ksantony, M- mangiferyna) w próbce kontrolnej; B, chromatogramy HPLC pokazujące główne związki fenolowe (F- flawonoidy; X- ksantony, M- mangiferyna) w komórkach *H. perforatum* hodowanych z *A. tumefaciens* przez 24 godziny; C, analiza metodą northern całkowitego RNA wyizolowanego z próbki kontrolnej komórek *H. perforatum* i z komórek hodowanych z *A. tumefaciens* pokazująca wzrost ekspresji genów *PAL*, *4CL* i *BPS* w zależności od czasu. Uwaga: Wierzchołki 1, 2, 3 i 4 zostały zidentyfikowane odpowiednio jako: 1,3,6,7-tetrahydroksy-8-prenyloksanton, 1,3,6,7-tetrahydroksy-2-prenyloksanton, 1,3,7-trihydroksy-6-metoksy-8-prenyloksanton i paksanton.

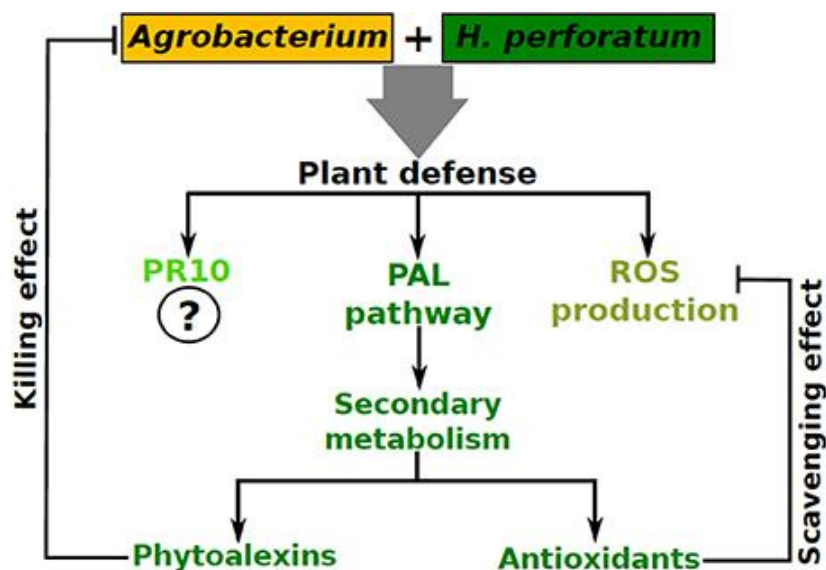
Chociaż *A. rhizogenes* nie indukowała korzeni włośnikowatych z żadnego z testowanych eksplantatów *H. perforatum* i doznała 99% redukcji żywotności po hodowli z zawiesiną komórkową (Franklin i in., 2008; Franklin i in., 2007), w literaturze można znaleźć kilka artykułów donoszących o produkcji kultur korzeni włośnikowatych *H. perforatum* przy wykorzystaniu tej bakterii. Paradoksalnie, szczep *A. rhizogenes* A4, którego śmiertelność w naszych badaniach osiągała 99% w ciągu 12 godzin współkultury, (Franklin i in., 2008), według innych badaczy miał indukować powstawanie korzeni włośnikowatych z epikotyli *H. perforatum* (Vinterhalter i in., 2006) i segmentów korzeni *H. perforatum* (Tusevski i in., 2014; Tusevski i in., 2013). Oprócz tego, że te korzenie włośnikowate wykazywały wysoki potencjał do spontanicznej regeneracji w kompletne rośliny, wytwarzały one kilka metabolitów wtórnych, takich jak kwasy fenolowe, glikozydy flawonolowe, aglikony flawonoidowe, flawan-3-ole i ksantony (Tusevski i in., 2014; Tusevski i in., 2013). Ze względu na to, że podczas kokultury *H. perforatum* z *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* również dochodziło do akumulacji wspomnianych wyżej metabolitów wtórnych (Franklin i in., 2009a; Tusevski i in., 2015), można założyć, że obserwowane zjawisko nie wymaga integracji genów *Agrobacterium* z genomem roślinnym. Poziom hipercyliny był zwiększony w przypadku korzeni przybyszowych *H. perforatum* w kokulturze ze szczepem *A. rhizogenes* K599 nawet bez integracji T-DNA i produkcji korzeni włośnikowatych (Santarem i in., 2010; Santarem i in., 2008), która to obserwacja również potwierdza naszą hipotezę. Zaskakujące było również doniesienie (Bertoli i in., 2008), że kultury korzeni włośnikowatych *H. perforatum* wykazywały podwyższony

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

poziom zawartości hiperycyny, związku fotoaktywnego, który może się akumulować tylko w ciemnych gruczołach, których nie ma w korzeniach.

Ze względu na to, że integracja transgenów z genomem żywiciela uwidoczniło jedynie metodą PCR się w tym badaniu tylko poprzez amplifikację genów *rol* w DNA wyizolowanym z korzeni włośnikowatych, można podać alternatywne wyjaśnienia dotyczące wyników. Przy interpretacji danych na temat kultur korzeni włośnikowatych *H. perforatum*, powinno się brać pod uwagę następujące fakty: 1. Korzenie przybyszowe mogą być łatwo indukowane z każdego eksplantatu *H. perforatum* na podstawowej pożywce hodowlanej, 2. Ze względu na wysoką aktywność metaboliczną korzeni *H. perforatum* łatwo dochodzi do regeneracji z nich roślin (Franklin i Dias, 2006) i 3. *Agrobacterium* mogą żyć w tkankach roślin hodowanych wspólnie przez wiele pokoleń, co może prowadzić do fałszywych wyników dodatnich w badaniach amplifikacji DNA genomu metodą PCR.

Podsumowując, dostarczyliśmy pierwszego dowodu na indukcję typowego dwufazowego wybuchu tlenowego RFT w komórkach *H. perforatum* przy interakcji z *Agrobacterium*, co jest cechą charakterystyczną niekompatybilnej interakcji roślina – patogen. Wykazaliśmy również, że antybakteryjna i antyoksydacyjna reakcja obronna skumulowana ze wzrostem ekspresji genów ścieżki fenylopropanoidowej w *H. perforatum* może mieć wpływ zarówno na żywotność *Agrobacterium* jak i na transformację. Zanotowano również wzrost ekspresji genów związanych z patogenezą (z ang. *pathogenesis-related* – PR) w *H. perforatum* w hodowli z *A. tumefaciens* (Kosuth i in., 2013; Sliwiak i in., 2015). Opierając się na powyższych informacjach, uważamy, że odporne rośliny mogą mobilizować swoje mechanizmy antyoksydacyjne, antybakteryjne i obronne związane z genami PR do walki z *Agrobacterium* i zapobiegać w ten sposób transferowi T-DNA do swoich komórek (Rysunek 10).



Rysunek 10. Model podsumowujący obronę rośliny *H. perforatum* w interakcji z *Agrobacterium* (Hou i in., 2016)

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

3.7.8 Literatura

- Anand, A., Uppalapati, S.R., Ryu, C.M., Allen, S.N., Kang, L., Tang, Y.H., and Mysore, K.S. (2008). Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* *146*, 703-715.
- Bertoli, A., Giovannini, A., Ruffoni, B., Guardo, A.D., Spinelli, G., Mazzetti, M., and Pistelli, L. (2008). Bioactive Constituent Production in St. John's Wort in Vitro Hairy Roots. Regenerated Plant Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *56*, 5078-5082.
- Božin, B., Kladar, N., Grujić, N., Anačkov, G., Samojlik, I., Gavarić, N., and Čonić, B.S. (2013). Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant properties of some St. John's wort species (*Hypericum* spp., *Hypericaceae*) from the Central Balkans. *Molecules* *18*, 11733-11750.
- Bruni, R., Pellati, F., Bellardi, M.G., Benvenuti, S., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., and Bianchi, A. (2005). Herbal drug quality and phytochemical composition of *Hypericum perforatum* L. affected by ash yellows phytoplasma infection. *Journal of agricultural and food chemistry* *53*, 964-968.
- Bruni, R., and Sacchetti, G. (2009). Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. *Hypericaceae/Guttiferae*). *Molecules* *14*, 682-725.
- Cellarova, E., Kimakova, K., and Brutovska, R. (1992). Multiple Shoot Formation and Phenotypic Changes of R0 Regenerants in *Hypericum-Perforatum* L. *Acta Biotechnol* *12*, 445-452.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G. (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* *18*, 465-476.
- Das, D.K., Reddy, M.K., Upadhyaya, K.C., and Sopory, S.K. (2002). An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep* *20*, 999-1005.
- Ditt, R.F., Kerr, K.F., de Figueiredo, P., Delrow, J., Comai, L., and Nester, E.W. (2006). The Arabidopsis thaliana transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Plant Microbe In* *19*, 665-681.
- Earanna, N. (2013). *Agrobacterium tumefaciens*- A Nature's Genetic Engineer for Development Transgenic Plants. *Res J Biotechnol* *8*, 1-2.
- Frame, B.R., Shou, H.X., Chikwamba, R.K., Zhang, Z.Y., Xiang, C.B., Fonger, T.M., Pegg, S.E.K., Li, B.C., Nettleton, D.S., Pei, D.Q., *et al.* (2002). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol* 129, 13-22.

Franchi, G.G., Nencini, C., Collavoli, E., and Massarelli, P. (2011). Composition and antioxidant activity in vitro of different St. Johns Wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 4349-4353.

Franklin, G., Beerhues, L., and Čellárová, E. (2016). Editorial: Molecular and Biotechnological Advancements in *Hypericum* Species. *Front Plant Sci* 7.

Franklin, G., Conceição, L.F.R., Kombrink, E., and Dias, A.C.P. (2008). *Hypericum perforatum* plant cells reduce *Agrobacterium* viability during co-cultivation. *Planta* 227, 1401-1408.

Franklin, G., Conceição, L.F.R., Kombrink, E., and Dias, A.C.P. (2009a). Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry* 70, 60-68.

Franklin, G., and Dias, A.C.P. (2006). Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42, 324-330.

Franklin, G., and Dias, A.C.P. (2011). Chlorogenic acid participates in the regulation of shoot, root and root hair development in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 835-842.

Franklin, G., Oliveira, A.L., and Dias, A.C.P. (2011). In vitro flowering and viable seed setting of transgenic lettuce cultures. *Plant Biotechnology* 28, 63-68.

Franklin, G., Oliveira, M., and Dias, A.C.P. (2007). Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. *Plant Sci* 172, 1193-1203.

Franklin, G., Oliveira, M.M., and Dias, A.C. (2009b). Transgenic *Hypericum perforatum*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 547, 217-234.

Franklin, G., and Sita, G. (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) using root explants. *Plant Cell Reports* 21, 549-554.

Georgiev, M.I., Agostini, E., Ludwig-Müller, J., and Xu, J. (2012). Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in Biotechnology* 30, 528-537.

Goel, M.K., Kukreja, A.K., and Bisht, N.S. (2008). In vitro manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96, 1-9.

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Guedes, A.P., Franklin, G., and Fernandes-Ferreira, M. (2012). Hypericum sp.: Essential oil composition and biological activities. *Phytochemistry Reviews* 11, 127-152.

Han, J.S., Kim, C.K., Park, S.H., Hirschi, K.D., and Mok, I. (2005). Agrobacterium-mediated transformation of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.). *Plant Cell Rep* 23, 692-698.

Hansen, G. (2000). Evidence for Agrobacterium-induced apoptosis in maize cells. *Mol Plant Microbe Interact* 13, 649-657.

Hou, W., Shakya, P., and Franklin, G. (2016). A Perspective on Hypericum perforatum Genetic Transformation. *Front Plant Sci* 7.

Hwang, H.H., Galvin, S.B., and Lai, E.M. (2015). Editorial: "Agrobacterium biology and its application to transgenic plant production". *Front Plant Sci* 6.

Kerr, A. (2016). Biological control of Crown Gall. *Australasian Plant Pathology* 45, 15-18.

Kerr, A., and Tate, M. (2016). Further studies on crown gall of stone fruit. *Australasian Plant Pathology* 45, 443-445.

Kitphati, W., Ngok-Ngam, P., Suwanmaneerat, S., Sukchawalit, R., and Mongkolsuk, S. (2007). Agrobacterium tumefaciens fur has important physiological roles in iron and manganese homeostasis, the oxidative stress response, and full virulence. *Appl Environ Microb* 73, 4760-4768.

Klemow, K.M., Bartlow, A., Crawford, J., Kocher, N., Shah, J., and Ritsick, M. (2011). 11 Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Lester Packer, Ph. D.*, 211.

Kosuth, J., Hrehorova, D., Jaskolski, M., and Cellarova, E. (2013). Stress-induced expression and structure of the putative gene hyp-1 for hypericin biosynthesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 114, 207-216.

Lu, X., Tang, K., and Li, P. (2016). Plant Metabolic Engineering Strategies for the Production of Pharmaceutical Terpenoids. *Front Plant Sci* 7, 1647.

Marrelli, M., Conforti, F., Toniolo, C., Nicoletti, M., Statti, G., and Menichini, F. (2014). *Hypericum perforatum*: Influences of the habitat on chemical composition, photo-induced cytotoxicity, and antiradical activity. *Pharmaceutical biology* 52, 909-918.

Murch, S.J., Choffe, K.L., Victor, J.M.R., Slimmon, T.Y., KrishnaRaj, S., and Saxena, P.K. (2000). Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*, cv 'Anthos'). *Plant Cell Rep* 19, 576-581.

Murch, S.J., Haq, K., Rupasinghe, H.P.V., and Saxena, P.K. (2003). Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Environmental and Experimental Botany* 49, 251-257.

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

- Murch, S.J., and Saxena, P.K. (2006). A melatonin-rich germplasm line of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *J Pineal Res* *41*, 284-287.
- Nester, E.W. (2015). *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front Plant Sci* *5*.
- Ngok-Ngam, P., Ruangkiattikul, N., Mahavihakanont, A., Virgem, S.S., Sukchawalit, R., and Mongkolsuk, S. (2009). Roles of *Agrobacterium tumefaciens* RirA in Iron Regulation, Oxidative Stress Response, and Virulence. *J Bacteriol* *191*, 2083-2090.
- Oksman-Caldentey, K.-M., and Sévon, N. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med* *68*, 859-868.
- Oliveira, A.I., Pinho, C., Sarmiento, B., and Dias, A.C.P. (2016). Neuroprotective Activity of *Hypericum perforatum* and Its Major Components. *Front Plant Sci* *7*.
- Olivo, M., Fu, C.Y., Raghavan, V., and Lau, W.K.O. (2012). New frontier in hypericin-mediated diagnosis of cancer with current optical technologies. *Annals of biomedical engineering* *40*, 460-473.
- Pasqua, G., Avato, P., Monacelli, B., Santamaria, A.R., and Argentieri, M.P. (2003). Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Sci* *165*, 977-982.
- Petri, C., Albuquerque, N., Perez-Tornero, O., and Burgos, L. (2005). Auxin pulses and a synergistic interaction between polyamines and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves and *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf tissues. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* *82*, 105-111.
- Pretto, F.R., and Santarem, E.R. (2000). Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* *62*, 107-113.
- Pruss, G.J., Nester, E.W., and Vance, V. (2008). Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* Induces Host Defense and Development-Dependent Responses in the Infiltrated Zone. *Mol Plant Microbe In* *21*, 1528-1538.
- Rao, S.R., and Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances* *20*, 101-153.
- Sainsbury, F., and Lomonossoff, G.P. (2014). Transient expressions of synthetic biology in plants. *Curr Opin Plant Biol* *19*, 1-7.
- Santarem, E., Silva, T., Freitas, K., Sartor, T., and Astarita, L. (2010). *Agrobacterium rhizogenes* and Salicylic Acid Trigger Defense Responses in *Hypericum perforatum* Shoots. *In Vitro Cell Dev-An* *46*, S159-S160.

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Santarém, E.R., and Astarita, L.V. (2003). Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15, 43-47.

Santarem, E.R., Zamban, D.C., Felix, L.M., and Astarita, L.V. (2008). Secondary metabolism of *Hypericum perforatum* induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cell Dev-An* 44, S52-S52.

Seong, E.S., Song, K.J., Jegal, S., Yu, C.Y., and Chung, I.M. (2005). Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect *Agrobacterium*-mediated apple transformation. *Plant Growth Regulation* 45, 75-82.

Shakya, P., Marslin, G., Siram, K., Beerhues, L., and Franklin, G. (2017). Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, n/a-n/a.

Shelton, R.C. (2009). St John's Wort (*Hypericum perforatum*) in Major Depression. *The Journal of clinical psychiatry* 70, 23-27.

Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O., and Dias, A.C. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem* 90, 157-167.

Silva, B.A., Malva, J.O., and Dias, A.C. (2008). St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress. *Food Chem* 110, 611-619.

Singh, R.K., Hou, W., Marslin, G., Dias, A.C.P., and Franklin, G. (2014). Lignin and flavonoid content increases in *Hypericum perforatum* cell wall after *Agrobacterium tumefaciens* co-cultivation. *Planta Med* 80, 1388-1388.

Sirvent, T., and Gibson, D. (2002). Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60, 311-320.

Sliwiak, J., Dauter, Z., Kowiel, M., McCoy, A.J., Read, R.J., and Jaskolski, M. (2015). ANS complex of St John's wort PR-10 protein with 28 copies in the asymmetric unit: a fiendish combination of pseudosymmetry with tetartohedral twinning. *Acta Crystallogr D* 71, 829-843.

Southwell, I.A., and Bourke, C.A. (2001). Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry* 56, 437-441.

Tatsis, E.C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A.N., Vervoort, J., and Gerothanassis, I.P. (2007). Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* 68, 383-393.

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Tatsis, E.C., and O'Connor, S.E. (2016). New developments in engineering plant metabolic pathways. *Current Opinion in Biotechnology* 42, 126-132.

Trautmann-Sponsel, R.D., and Diemel, A. (2004). Safety of Hypericum extract in mildly to moderately depressed outpatients - A review based on data from three randomized, placebo-controlled trials. *J Affect Disorders* 82, 303-307.

Trosset, J.-Y., and Carbonell, P. (2015). Synthetic biology for pharmaceutical drug discovery. *Drug design, development and therapy* 9, 6285.

Tusevski, O., Petreska Stanoeva, J., Stefova, M., Pavokovic, D., and Gadzovska Simic, S. (2014). Identification and quantification of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. transgenic shoots. *Acta Physiologiae Plantarum* 36, 2555-2569.

Tusevski, O., Stanoeva, J., Stefova, M., and Simic, S.G. (2015). *Agrobacterium* enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* cell suspensions. *Plant Growth Regulation* 76, 199-210.

Tusevski, O., Stanoeva, J.P., Stefova, M., Kungulovski, D., Pancevska, N.A., Sekulovski, N., Panov, S., and Simic, S.G. (2013). Hairy roots of *Hypericum perforatum* L.: a promising system for xanthone production. *Central European Journal of Biology* 8, 1010-1022.

Veena, Jiang, H.M., Doerge, R.W., and Gelvin, S.B. (2003). Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J* 35, 219-236.

Vinterhalter, B., Ninkovic, S., Cingel, A., and Vinterhalter, D. (2006). Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. *Biologia Plantarum* 50, 767-770.

Wang, J., Qian, J., Yao, L., and Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing* 2, 1-9.

Wilson, S.A., and Roberts, S.C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J* 10, 249-268.

Xu, R.F., Li, H., Qin, R.Y., Wang, L., Li, L., Wei, P.C., and Yang, J.B. (2014). Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice* 7.

Yadollah-Damavandi, S., Chavoshi-Nejad, M., Jangholi, E., Nekouyian, N., Hosseini, S., Seifaei, A., Rafiee, S., Karimi, H., Ashkani-Esfahani, S., Parsa, Y., *et al.* (2015). Topical *Hypericum perforatum* Improves Tissue Regeneration in Full-Thickness Excisional Wounds in Diabetic Rat Model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015, 245328.

3 OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Yuan, Z.C., Edlind, M.P., Liu, P., Saenkham, P., Banta, L.M., Wise, A.A., Ronzone, E., Binns, A.N., Kerr, K., and Nester, E.W. (2007). The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quorumone-quenching genes in *Agrobacterium*. *P Natl Acad Sci USA* *104*, 11790-11795.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* *125*, 749-760.

Zobayed, S.M.A., Murch, S.J., Rupasinghe, H.P.V., and Saxena, P.K. (2004). In vitro production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). *Plant Sci* *166*, 333-340.

Zobayed, S.M.A., and Saxena, P.K. (2003). In vitro-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. *Plant Sci* *165*, 463-470.