

Received: 2015.12.17
Accepted: 2016.10.19
Published: 2016.12.20

Transformacja roślin leczniczych za pomocą *Agrobacterium tumefaciens**

Transformation of medicinal plants using *Agrobacterium tumefaciens*

Katarzyna Bandurska, Agnieszka Berdowska, Małgorzata Król

Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii, Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie

Streszczenie

Od wielu lat są podejmowane próby opracowania skutecznych metod transformacji roślin leczniczych za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*. Jest to bakteria glebowa mająca naturalną zdolność zakażania roślin w miejscach zranień, tworząc rakowate narośla. Jest to możliwe dzięki przenoszeniu fragmentu jej plazmidu Ti do komórek roślinnych i trwałej integracji z genomem roślinnym. Skuteczność transformacji roślin leczniczych zależy od wielu czynników, m.in. od szczepu *Agrobacterium*, metod oraz procedur transformacji i od gatunku rośliny, typu, wieku eksplantatu, a także warunków regeneracji. Głównym celem transformacji roślin jest zwiększenie zawartości naturalnie w nich występujących związków aktywnych biologicznie oraz produkcja biofarmaceutyków. Transformacja genetyczna roślin z udziałem bakterii z rodzaju *Agrobacterium* jest procesem złożonym, wymaga wnikliwej analizy ekspresji wprowadzonego transgenu i zachodzi jedynie wtedy, gdy komórka rośliny nabywa zdolność do regeneracji. W wielu przypadkach wydajne procesy regeneracji zaobserwowane u roślin leczniczych są nieefektywne po przeprowadzeniu procedur transformacji. Dotąd podjęto próby transformacji genetycznej z wykorzystaniem *A. tumefaciens* roślin leczniczych z rodzin: *Apocynaceae*, *Araceae*, *Araliaceae*, *Asphodelaceae*, *Asteraceae*, *Begoniaceae*, *Crassulaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Linaceae*, *Papaveraceae*, *Plantaginaceae*, *Scrophulariaceae* oraz *Solanaceae*.

Słowa kluczowe:

transformacja genetyczna roślin leczniczych • *Agrobacterium tumefaciens* • produkcja substancji biologicznie czynnych

Summary

For many years attempts are made to develop efficient methods for transformation of medicinal plants via *Agrobacterium tumefaciens*. It is a soil bacteria which possess a natural ability to infect plants in places of injuries which results in arise of cancerous growths (crown gall). This is possible thanks a transfer of fragment of Ti plasmid into plant cells and stable integration with a plant genome. Efficiency of medicinal plant transformation depends on many factors for example: *Agrobacterium* strain, methods and procedures of transformation as well as on plant species, type and age of the explants and regeneration conditions. The main goal of plant transformation is to increase the amount of naturally occurring bioactive compounds and the production of biopharmaceuticals. Genetic plant transformation via bacteria of the genus *Agrobacterium* is a complex process which requires detailed analysis of incorporated

* Praca była realizowana w ramach Programu Homing Plus/2010-1/1 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjny Gospodarka, Priorytet 1. Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Działanie 1.2. Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki 2007-2013).

Key words:	transgene expression and occurs only in the case when the plant cell acquires the ability to regenerate. In many cases, the regeneration efficiency observed in medicinal plants are inefficient after applied transformation procedures. To date there have been attempts of genetic transformation by using <i>A. tumefaciens</i> of medicinal plants belonging to the families: <i>Apocynaceae</i> , <i>Araceae</i> , <i>Araliaceae</i> , <i>Asphodelaceae</i> , <i>Asteraceae</i> , <i>Begoniaceae</i> , <i>Crassulaceae</i> , <i>Fabaceae</i> , <i>Lamiaceae</i> , <i>Linaceae</i> , <i>Papaveraceae</i> , <i>Plantaginaceae</i> , <i>Scrophulariaceae</i> and <i>Solanaceae</i> .
Key words:	genetic transformation of medicinal plants • <i>Agrobacterium tumefaciens</i> • production of biologically active substances
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1226660
Word count:	2832
Tables:	1
Figures:	–
References:	75

Adres autorki: dr Katarzyna Bandurska, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii, Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa; e-mail: k.bandurska@ajd.czyst.pl

WSTĘP

Surowce pochodzenia roślinnego były wykorzystywane przez człowieka w celach leczniczych od zarania dziejów. W dalszym ciągu rośliny są źródłem cennych surowców leczniczych stosowanych zarówno w medycynie tradycyjnej, jak i oficjalnej. Wciąż są odkrywane ich nowe właściwości i zastosowania. W niektórych przypadkach rośliny są jedynym źródłem substancji leczniczej, która nie może być zsyntetyzowana chemicznie.

Narzędzia nowoczesnej inżynierii genetycznej pozwalają na uzyskanie roślin leczniczych o zwiększonych zawartościach substancji biologicznie czynnych lub użycie tych, a także innych gatunków roślin, do produkcji rekombinowanych białek o znaczeniu medycznym. W tym celu wykorzystywana jest naturalna zdolność Gram-ujemnych bakterii glebowych z rodzaju *Agrobacterium* do transformacji roślin. *A. tumefaciens* powoduje powstawanie guzowatości szyjki korzeniowej roślin dwuliściennych [19]. W procesie tym, zwanym agroinfekcją, następuje przenoszenie do komórek roślin fragmentu bakteryjnego transferowego DNA, tzw. T-DNA (transferred – DNA), który jest częścią dużego (około 200 kbp) plazmidu Ti (tumor inducing). Kluczowymi, z punktu widzenia transformacji, elementami plazmidu są: region wirulencji *vir*, fragment T-DNA ograniczony z obu stron sekwencjami granicznymi oraz geny odpowiedzialne za katabolizm opin i przekazywanie plazmidu Ti między komórkami bakterii [17]. Opiny, to metabolity wytwarzane przez rakowate narośla roślin w wyniku ekspresji genów pochodzących od *Agrobacterium* i wbudowanych do ich genomu. Są nieprzyswajalne dla roślin, ale są metabolizowane i służą jako pokarm dla *Agrobacterium*.

Szczepy *Agrobacterium* są klasyfikowane ze względu na obecność genów syntezy – charakterystycznego, zwykle jednego rodzaju opiny (np. nopaliny w szczepie C58 lub oktopiny w szczepie LBA4404). Komercyjnie są dostępne tzw. „rozbrojone” wirulentne szczepy *Agrobacterium tumefaciens* (pozbawione sekwencji genów szlaku syntezy hormonów roślinnych oraz genów syntazy opin), które umożliwiają skuteczną transformację wielu gatunków roślin [9]. W pracy omówiono rośliny lecznicze, które transformowano z wykorzystaniem *A. tumefaciens* (tab. 1).

ALOES ZWYCZAJNY

Aloes zwyczajny (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) jest sukulentem z rodziny *Asphodelaceae*, wykorzystywanym do produkcji różnorodnych produktów leczniczych i kosmetyków. Stwierdzono występowanie w nim ponad 200 związków chemicznych, z których około 75 wykazuje aktywność biologiczną. Liście aloesu mają działanie przeciwdrobnoustrojowe, immunomodulujące, antyoksydacyjne, hepatoprotekcyjne oraz przeciwnowotworowe [41]. Głównym ograniczeniem w jego wykorzystaniu jest to, że nie jest rośliną samopylną oraz wysoki stopień bezpłodności kwiatów męskich. Aloes najczęściej jest rozmnażany wegetatywnie. Jednak ze względu na niewiele roślin potomnych stosuje się na coraz szerszą skalę metody mikropropagacji oraz transformacji genetycznych [53]. Mikropropagacja aloesu polega na izolowaniu eksplantów z komórek merystematycznych i stymulacji tworzenia zawiązków roślin za pomocą bezpośredniej organogenezy [20,33]. He i wsp. optymalizowali różnorodne parametry regeneracji i transformacji pokrewnego gatunku *Aloe barbadensis* Miller, m.in. przez wybór odpowiedniego

Tabela 1. Transformacja roślin leczniczych z udziałem *A. tumefaciens*

Roślina	Szczep <i>A. tumefaciens</i>	Eksplantat	Efekt	Źródła
Aloes zwyczajny (<i>Aloe vera</i>)	EHA105, C58C1	Łodygi, liście	Optymalizacja transformacji	[21]
Begonia bulwiasta (<i>Begonia tuberhybrida</i>)	LBA 4404	Liście	Optymalizacja transformacji	[31]
Bylica roczna (<i>Artemisia annua</i>)	EHA105	Liście	Zwiększenie produkcji artemizyny	[58]
	AGL1, GV3101, LBA4404	Liście	Optymalizacja transformacji	[12]
	EHA105	Liście	Produkcja taksydieniu	[35]
Katarantus różowy (<i>Catharanthus roseus</i>)	LBA4404	Kalusy pochodzące z liści	Optymalizacja transformacji	[64]
	EHA105	Hipokotyle	Produkcja windoliny	[69]
Kozieradka pospolita (<i>Trigonella foenum-graecum</i>)	A281	Korzenie, liścienie, hipokotyle	Optymalizacja transformacji	[30]
Len zwyczajny (<i>Linum usitatissimum</i>)	b.d.	Liścienie	Produkcja polihydroksymaślanu we włóknach lnu	[65]
	b.d.	b.d.	Zwiększenie zawartości flawonoidów	[43]
Mak lekarski (<i>Papaver somniferum</i>)	C58	Liście	Produkcja kodeiny i morfiny	[22]
Mięta pieprzowa (<i>Mentha piperita</i>)	GV3101	Międzywęzła	Produkcja syntazy limonenu	[32]
Naparstnica purpurowa (<i>Digitalis purpurea</i>)	GV2260, GV3101	Fragmety liści	Optymalizacja transformacji	[36]
Pokrzyk wilcza jagoda (<i>Atropa belladonna</i>)	LBA4404, GV3101, EHA105	Hipokotyle, liścienie	Optymalizacja transformacji	[62]
Remania kleista (<i>Rehmannia glutinosa</i>)	LBA4404	Liście	Zwiększenie produkcji resweratrolu	[18]
Rumian rzymski (<i>Anthemis nobilis</i>)	C58, T37	Części nadziemne	Optymalizacja transformacji	[25]
Rzęsa drobna (<i>Lemna minor</i>)	EHA105	Kultury kalusowe	Optymalizacja transformacji	[8]
Szałwia czerwona (<i>Salvia miltiorrhiza</i>)	EHA105	Liście	Optymalizacja transformacji	[72]
Witania ospała (<i>Withania somnifera</i>)	LBA4404, EHA101	Liście	Optymalizacja transformacji	[45]
	LBA4404	Łodygi z międzywęzłami	Optymalizacja transformacji	[61]
Żeń-szeń amerykański (<i>Panax quinquefolium</i>)	LBA4404	Epikotyle	Zwiększenie odporności na infekcje grzybicze	[7]
Żółwik nagi (<i>Chelone glabra</i>)	GV2260, GV3101	Liście	Optymalizacja transformacji	[16]
Żyworódka (<i>Kalanchoe pinnata</i>)	LBA4404	Liście, rozmnożki	Produkcja rekombinowanego przeciwciała 3D8 scFv	[29]

b.d. – brak danych

eksplantatu, metody sterylizacji, różne szczepy *Agrobacterium* (EHA105 i C58C1) oraz warunki kokultury. Uzyskali odpowiednio 80 i 30% wydajności [21]. Natomiast Lowther i wsp. wyprodukowali w kalusowych kulturach aloesu zwyczajnego transformowanych metodą biolisticzną ludzki interferon- $\alpha 2$ (IFN- $\alpha 2$) [39]. Interferony- α tworzą pierwszą linię obrony organizmu człowieka i są wytwa-

rzane w odpowiedzi na infekcję wywołaną różnorodnymi mikroorganizmami, zwłaszcza wirusami [3].

BEGONIA BULWIASTA

Begonia bulwiasta (*Begonia tuberhybrida* Voss) jest byliną ozdobną z rodziny begoniowatych (*Begoniaceae*). Wystę-

puje w niej kukurbitacyna B oraz D [38]. Kukurbitacyna B działa przeciwwzapalnie oraz zapobiegająco i leczniczo w hepatotoksyczności wywołanej przez czterochlorek węgla. Natomiast kukurbitacyna D wykazuje silne właściwości cytotoksyczne przeciwko wielu liniom komórkowym wywodzącym się z ludzkich nowotworów złośliwych [6].

Kiyokawa i wsp. transformowali trzy gatunki begonii: *Begonia semperflorens* Link et Otto, *Begonia x hiemalis* (Fotsch) cv. Schwabenland Red oraz *Begonia tuberhybrida* cv. Perfecta za pomocą *A. tumefaciens* LBA4404, zawierającego wektor z genami *rol*, pochodzącymi z pokrewnego gatunku *A. rhizogenes* i determinującymi intensywny rozwój tzw. korzeni włóknikowatych. Jedyne w przypadku begonii bulwiastej uzyskali transformanty z ekspresją pojedynczych genów *rolA*, *B* i *C*. Dojrzałe rośliny, mimo transformacji z użyciem *A. tumefaciens*, fenotypowo miały cechy roślin begonii transformowanych *A. rhizogenes* i znacznie różniły się od roślin nietransformowanych. Miały ponadto nieprawidłowe cechy morfologiczne, takie jak: karłowatość, pomarszczone liście i płatki lub zaburzone procesy rozwojowe i opóźnione kwitnienie [31].

BYLICA ROCZNA

Bylica roczna (*Artemisia annua* L.) z rodziny astrowatych (*Asteraceae*) zawiera artemizynę, która jest stosowana jako środek przeciwko *Plasmodium* spp., chociaż obserwuje się narastającą na nią oporność zarodźców malarii, zwłaszcza w Azji Południowo-Wschodniej [55,70]. Zawartość artemizyny w bylicy jest niewielka (0,01-1,4% suchej masy) i zależy od genotypu oraz warunków hodowli [1], natomiast produkcja tego związku metodami syntezy chemicznej okazała się mało wydajna i kosztowna. Głównym enzymem w szlaku biosyntezy artemizyny jest monooksygenaza cytochromu P450 (CYP71AV1), która uczestniczy aż w trzech przekształceniach związków pośrednich [58]. Shen i wsp. transformowali liście bylicy rocznej konstrukcjami zawierającymi geny monooksygenazy cytochromu P450 (CYP71AV1) i reduktazy cytochromu P450 za pomocą *A. tumefaciens* szczepu EHA105. Po 20 tygodniach kultury otrzymanych roślin transgenicznych, w których odnotowano dużą zawartość mRNA wprowadzonych genów *cyp71av1* i *cpr*, stwierdzono zwiększoną zawartość artemizyny w porównaniu z roślinami kontrolnymi, maksymalnie o 38% [58].

Elfahmi i wsp. transformowali liście dwutygodniowych i dwumiesięcznych roślin bylicy rocznej trzema szczepami *A. tumefaciens*: AGL1, GV3101 i LBA4404. Transformacja z użyciem szczepu AGL1 okazała się najbardziej wydajna i wyniosła prawie 71%, podczas gdy dla pozostałych szczepów była na poziomie odpowiednio 49,25 i 45,45% [12].

Ponadto próbowano wykorzystać bylicę roczną do produkcji paklitakselu jako leku przeciwnowotworowego. Wprowadzono gen *txs* syntazy taksadienu z cisu (*Taxus*) i transformowano młode liście bylicy za pomocą *A.*

tumefaciens szczepu EHA105. W otrzymanych roślinach transgenicznych, w których potwierdzono ekspresję transgenu, odnotowano zawartość taksadienu (który może zostać przekształcony metodami chemicznymi do paklitakselu) w ilości 4,4-129,7 µg/g suchej masy [35].

KATARANTUS RÓŻOWY

Katarantus różowy (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), krzew z rodziny toinowatych (*Apocynaceae*) [64], jest rośliną modelową wykorzystywaną do badań nad metabolitami wtórnymi [13]. Dotąd wyizolowano z niego ponad 130 związków chemicznych [66]. Niestety ilość uzyskiwanych leków przeciwnowotworowych winkrystyny i winblastyny w dzikich odmianach katarantusa różowego jest mała. Ponadto próby wyprodukowania ich w większej ilości w kulturach zawiesinowych i korzeni oraz metodami chemicznymi nie przyniosły oczekiwanych rezultatów [40,73]. Srivastava i wsp. przeprowadzili optymalizację warunków transformacji kalusów uzyskanych z liści katarantusa różowego z użyciem *A. tumefaciens* szczepu LBA4404. W 98% transformowanych regenerantów potwierdzili obecność wprowadzanych transgenów: *uidA*, *gylI* i *nptII* [64]. Wang i wsp. opracowali metodę regeneracji i transformacji katarantusa różowego z użyciem *A. tumefaciens* szczepu EHA105. Po transformacji hipokotyli konstrukcjami kodującymi gen *dat* – acetylotransferazy 4-O-diacetylowindoliny, kluczowego enzymu w biosyntezie alkaloidów katarantusa, uzyskano regeneranty ze zwiększoną zawartością windoliny będącej prekursorem winblastyny. Osiągnęli 11% wydajność regeneracji transformowanych eksplantatów [69].

KOZIERADKA POSPOLITA

Kozieradka pospolita (*Trigonella foenum-graecum* L.) jest rośliną jednoroczną z rodziny bobowatych (*Fabaceae*). Zawiera alkaloidy (m.in. karpinę, trigonelinę), saponiny (takie jak fenugrekin czy diosgenina) oraz flawonoidy [47]. Jest stosowana w dolegliwościach przewodu pokarmowego (np. przy zaparciach), chorobach nerek, zapaleniu oskrzeli, przewlekłym kaszlu, zmianach zapalnych na skórze. Obniża stężenie glukozy we krwi, działa antyoksydacyjnie oraz immunomodulująco [15,47]. Jest wykorzystywana do maskowania smaku leków, gdyż smakiem i zapachem przypomina syrop klonowy [15].

Khawar i wsp. opracowali optymalizację warunków transformacji kozieradki pospolitej transformowanych konstrukcjami zawierającymi gen *uidA* z wykorzystaniem *A. tumefaciens* dzikiego szczepu A281. W zregenerowanych z hipokotyli, liścieni oraz korzeni kozieradki potwierdzono ekspresję β-glukuronidazy (GUS) [30].

LEN ZWYCZAJNY

Len zwyczajny (*Linum usitatissimum* L.), należący do rodziny lnowatych (*Linaceae*), jest jedną z najstarszych

roślin uprawnych, wykorzystywaną głównie w przemyśle tekstylnym, ale też do otrzymywania oleju, stosowanego jako pokost oraz w farmacji. Olej lniany ma właściwości przeciwzakrzepowe i obniżające ciśnienie tętnicze krwi. Spożywanie mielonych nasion lnu zmniejsza zawartość cholesterolu całkowitego i LDL (lipoproteiny o niskiej gęstości) we krwi. Len stosowany jest również w leczeniu hiperglykემii, zmniejsza ryzyko chorób układu krążenia oraz ma właściwości antyoksydacyjne [26].

Mierziak i wsp. podjęli próbę uzyskania transgenicznego lnu o zwiększonej zawartości flawonoidów, które są bardzo aktywnymi naturalnymi antyoksydantami. W tym celu wykorzystali konstrukt zawierający geny *chs*, *chi* i *dfr* pochodzące od *Petunia* hybryda do transformacji *Linum usitatissimum* var. *linola* z udziałem *A. tumefaciens*. Uzyskali również transgeniczne rośliny zawierające gen *gt* pochodzący od *Solanum* *sogardinum*. W następnym etapie krzyżowali wspomniane rośliny pokolenia F2 i analizowali zawartość flawonoidów w łądych i torebkach nasiennych po 6 miesiącach. Stwierdzili zwiększoną ilość flawonoidów w roślinach uzyskanych po skrzyżowaniu. Ponadto ekstrakty z nich uzyskane miały silniejsze właściwości antyoksydacyjne w porównaniu z roślinami rodzicielskimi i nietransgenicznymi [43].

Włókno lniane może mieć natomiast potencjalne zastosowanie jako materiał opatrunkowy oraz nośnik i stabilizator leków [59]. Szopa i wsp., w celu otrzymania włókien zbudowanych częściowo z polihydroksymaślanu, wprowadzili do genomu lnu za pomocą *A. tumefaciens* trzycenowy konstrukt zawierający cDNA pochodzące od *Ralstonia eutropha* i kodujące bakteryjne enzymy szlaku biosyntezy polihydroksymaślanu: reduktazę acetylo-CoA, β -ketotiolazę oraz syntazę polihydroksymaślanu. Włókna pochodzące z transgenicznych roślin cechowały się większą wytrzymałością i sztywnością w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Ponadto prawie nie indukowały agregacji płytek krwi, w związku z czym mogą być przydatne do produkcji materiałów biomedycznych, które wchodzą w kontakt z krwią [65].

MAK LEKARSKI

Mak lekarski (*Papaver somniferum* L.) z rodziny mako-watych (*Papaveraceae*) jest źródłem wielu różnych alkaloidów m.in. morfiny i kodeiny wytwarzanej w rurek mlecznych rośliny. W przekształceniu kodeinonu w kodeinę oraz morfinonu w morfinę uczestniczy enzym COR [22]. Hosseini i wsp. wprowadzili gen kodujący reduktazę kodeinonu do *A. tumefaciens* szczepu C58 i transformowali nim liście z 6-tygodniowych roślin maku lekarskiego za pomocą technik agroinfiltracji metodą przejściowej transformacji w celu nadprodukcji reduktazy kodeinonu. Po raz pierwszy udało im się uzyskać ekspresję przejściową kodeiny i morfiny w liściach roślin (wcześniej sądzono, że jest to możliwe jedynie do osiągnięcia w rurek mlecznych) [22].

MIĘTA PIEPRZOWA

Mięta pieprzowa (*Mentha piperita* L.), bylina z rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*), zawiera olejki eteryczne stosowane w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym [49]. Prekursorem wszystkich olejków eterycznych mięty jest monoterpren limonen (4-izopropenyl-1-metylocykloheksen), związek szeroko rozpowszechniony w królestwie roślin. Syntaza limonenu, enzym przekształcający pirofosforan geranylu w limonen, jest czynnikiem determinującym zawartość olejków eterycznych. Krasnyanski i wsp. wprowadzili gen syntazy limonenu do *A. tumefaciens* GV3101 i transformowali nim międzywęzła mięty pieprzowej. W uzyskanych regenerantach potwierdzono obecność syntazy limonenu podobnie jak w przypadku bezpośredniej transformacji protoplastów mięty pieprzowej z zastosowaniem PEG (glikolu polietylenowego) [32].

NAPARSTNICA PURPUROWA

Naparstnica purpurowa (*Digitalis purpurea* L.) jest rozpowszechnioną rośliną ozdobną z rodziny babkowatych (*Plantaginaceae*), uprawianą również w celu pozyskiwania surowców leczniczych. Zawiera glikozydy naserowe digitoksynę i digoksynę [2], stosowane przede wszystkim w leczeniu niewydolności krążenia [48,57]. Ponadto stwierdzono, że są one skuteczne przeciwko pewnym typom nowotworów [42,71]. Niestety zawartość glikozydów w naparstnicy purpurowej jest bardzo mała, a ich synteza chemiczna jest skomplikowana [48]. Stąd są podejmowane próby wykorzystania modyfikacji genetycznych w celu zwiększenia skali ich produkcji. Li i wsp. użyli fragmenty liści z 6-8-tygodniowych roślin naparstnicy purpurowej do transformacji z udziałem *A. tumefaciens* szczepów GV2260 i GV3101. Wektory binarne użyte do transformacji *Agrobacterium* zawierały gen reporterowy β -glukuronidazy w celu łatwiejszej wizualizacji roślin transgenicznych; wydajność transformacji wyniosła 52,2-60%. Prace nad optymalizacją warunków regeneracji i transformacji naparstnicy miały na celu potencjalne jej wykorzystanie jako platformy do nadprodukcji biologicznie aktywnych substancji leczniczych: digitoksyny, digoksyny i digoksygeniny [36].

POKRZYK WILCZA JAGODA

Pokrzyk wilcza jagoda (*Atropa belladonna* L.), bylina z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), jest ważną rośliną leczniczą uprawianą w celu pozyskiwania atropiny i skopolaminy (będących znanymi antagonistami receptorów muskarynowych). Jest wykorzystywana do badań nad szlakami biosyntezy alkaloidów. Wyciągi z roślin stosuje się w okulistyce, w stanach zapalnych, chorobie wrzodowej, w przypadku reakcji histaminowej oraz bólu głowy [52,54]. Jest składnikiem leków homeopatycznych [54].

Song i wsp. opracowali protokół wydajnej transformacji pokrzyku za pomocą *A. tumefaciens* szczepów LBA4404, GV3101 oraz EHA105. W końcowym efekcie ponad 80%

transformowanych hipokotyli zregenerowało transgeniczne rośliny w ciągu 2-3 miesięcy [62].

REMANIA KLEISTA

Remania kleista (*Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Steud) należy do rodziny trędownikowatych (*Scrophulariaceae*) [37]. Zawiera resweratrol, związki z grupy irydoidów (katalpol i dihydrokatalpol) oraz flawonoidy [37,56]. Resweratrol jest silnym antyoksydantem występującym także w dużych ilościach w skórkach winogron [56,67]. Wykazano, że ma właściwości neuro- i kardioprotekcyjne, zmniejszające ryzyko powstawania nowotworów, opóźniające procesy starzenia oraz przeciwgrzybicze [5,23,75]. Korzeń remanii kleistej ma właściwości przeciwgorączkowe, przeciwzkrzepowe, zmniejszające stężenie glukozy we krwi, stymulujące aktywność osteoblastów i hamujące resorpcję kości przez osteoklasty [37].

Ghimire i wsp. wykorzystali *A. tumefaciens* szczepu LBA4404 do transformacji remanii kleistej konstrukcjami zawierającymi gen syntetazy resweratrolu. Uzyskane rośliny transgeniczne miały znacząco więcej resweratrolu w liściach w porównaniu z roślinami kontrolnymi oraz wykazywały silniejsze właściwości antyoksydacyjne i mikrobójcze [18].

RUMIAN RZYMSKI

Rumian rzymski (rumian szlachetny, *Anthemis nobilis* L.) jest popularną byliną z rodziny astrowatych (*Asteraceae*). Substancją czynną jest niebieski olejek eteryczny zawierający chamazulen, azulen (mniej niż w rumianku pospolitym *Matricaria chamomilla*), pinokarwon, farnezen, estry kwasów, flawonoidy (glikozydy kumarynowe, apigenina), poliacetyleny, kwasy organiczne, trójterpeny, sole mineralne, węglowodany, sterole [63].

Olejek jest szeroko stosowany w leczeniu w związku z jego właściwościami przeciwzapalnymi, antibakteryjnymi, rozkurczającymi, cytotoksycznymi, sedatywnymi. Podawany zewnętrznie łagodzi podrażnienia i oparzenia skóry oraz objawy ukąszeń owadów. W kosmetyce jest substancją stosowaną przeciw wypryskom skórnym oraz jako składnik rozjaśniających i przeciwłupieżowych szamponów do włosów przetłuszczających się [25,63].

Jaziri i wsp. podjęli próby transformacji rumianku rzymskiego z użyciem *A. tumefaciens* szczepów C58 i T37. Analiza poszczególnych tkanek i organów transformowanych i zregenerowanych roślin wykazała podobną zawartość olejków eterycznych w porównaniu z roślinami kontrolnymi (nietransformowanymi) [25].

RZĘSA DROBNA

Rzęsa drobna (*Lemna minor* L.) jest rośliną wodną należącą do rodziny obrazkowatych (*Araceae*). Wykazuje właściwości zmniejszające wrażliwość organizmu czło-

wieka na działanie alergenów. Jest stosowana w leczeniu pokrzywki i obrzęków (zwłaszcza o podłożu uczuleniowym), podagry, infekcji górnych dróg oddechowych, chorób wątroby i tarczycy, jako środek przeciwgorączkowy oraz zewnętrznie przy przewlekłych owrzodzeniach i czyrakach [68].

Chhabra i wsp. opracowali protokół transformacji rzęsy z udziałem *A. tumefaciens* szczepu EHA105. Udało im się uzyskać rośliny transgeniczne z prawie 4% wydajnością, w czasie 11-13 tygodni [8].

SZAŁWIA CZERWONA

Szałwia czerwona (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) jest byliną z rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*) [11]. W korzeniu zawiera dwie grupy związków biologicznie aktywnych: pochodne kwasu kawowego i tansinony. Jest stosowana w leczeniu schorzeń sercowo-naczyniowych, naczyń mózgowych, hiperlipidemii i w ostrym udarze niedokrwinnym [74]. Ponadto jej metabolity wtórne wykazują aktywność antywirusową, antynowotworową, przeciwzkrzepową oraz antyoksydacyjną [27]. Yan i wsp. opracowali prosty i skuteczny sposób transformacji szałwii czerwonej za pomocą *A. tumefaciens* szczepu EHA105. W badaniach testowano konstrukty z wprowadzonym genem reporterowym *uidA* i markerowym (selekcyjnym) *nptIII* i uzyskano pierwsze potwierdzone transformanty szałwii czerwonej z 70% wydajnością. Opracowany przez nich protokół transformacji będzie mógł być wykorzystany do produkcji roślin o zwiększonej zawartości związków biologicznie czynnych [72].

WITANIA OSPAŁA

Witania ospała (*Withania somnifera* (L.) Dunal), roślina z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), zawiera ważne z medycznego punktu widzenia witanozydy i witanolidy występujące w korzeniach i liściach [44,60]. Wykazuje właściwości przeciwzapalne, antyoksydacyjne, immunomodulujące i przeciwnowotworowe [4,24].

Pandey i wsp. za pomocą *A. tumefaciens* szczepu LBA4404 transformowali fragmenty liści witanii ospałej i uzyskali transgeniczne rośliny z wydajnością 1,67%. Nie udało się jednak uzyskać regenerantów z użyciem szczepu *A. tumefaciens* EHA101 [45]. Sivanandhan i wsp. użyli *A. tumefaciens* szczepu LBA4404 do transformacji fragmentów łodyg zawierających międzywęźla i osiągnęli 10% wydajność transformacji. Stwierdzili, że zawartość witanolidów w pokoleniu T0 i T1 roślin transgenicznych była minimalnie większa w porównaniu z roślinami kontrolnymi [61].

ŻEŃ-SZEŃ AMERYKAŃSKI

Żeń-szeń amerykański (*Panax quinquefolium* L.) jest wolno rosnącą byliną z rodziny araliowatych (*Araliaceae*), uprawianą ze względu na zawartość leczniczych składników w korzeniach [28]. Zawiera ginsenozydy, związki

z grupy saponin triterpenowych. W różnych częściach rośliny stwierdzono występowanie ponad 60 ginsenydów. Żeń-szeń wykazuje właściwości przeciwzapalne, antyoksydacyjne, immunostymulujące, hamujące rozwój nowotworów. Wpływa na układ krążenia, nerwowy, wydzielania wewnętrznego i odpornościowy. Korzystnie działa w chorobach degeneracyjnych układu nerwowego, działa antyarytmicznie, obniża ciśnienie tętnicze oraz zmniejsza zawartość glukozy we krwi [51]. Straty w uprawie wynikają z długiego okresu wzrostu i dużej wrażliwości roślin na infekcje grzybicze [28]. W celu zwiększenia oporności na infekcje grzybicze transformowano rośliny transgenami kodującymi chitynazę [50].

Chen i wsp. transformowali 2-3-tygodniowe epikotyle żeń-szenia amerykańskiego z zastosowaniem *A. tumefaciens* szczepu LBA4404 zawierającego wektor z genem chitynazy ryżowej. Udało im się osiągnąć 90% wydajność transformacji [7].

ŻÓŁWIK NAGI

Żółwik nagi (*Chelone glabra* L.) jest rośliną zaliczaną do rodziny babkowatych (*Plantaginaceae*) [2], zawiera glikozydy irydoidowe oraz aukubinę. Działa przeciwzapalnie, przeciwwirusowo, przeciwmalarycznie, przeciwgorączkowo, przeczyszczająco i przeciwnowotworowo, zwalcza robaki pasożytnicze [14,42,46]. Gao i wsp. transformowali fragmenty liści z użyciem *A. tumefaciens* szczepów GV2260 i GV3101. Uzyskali i wydajność transformacji na poziomie 2-8% [16].

ŻYWORÓDKA

Żyworódka (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) jest sukulentem liściowym z rodziny gruboszowatych (*Crassulaceae*), który wytwarza aseksualnie charakterystyczne rozmnożki na zakończeniach nerwów liści. Znalazła zastosowanie w medycynie m.in. jako: środek przeciwbólowy, przeciwzapalny, uspokajający i antyoksydacyjny. Stosowana w leczeniu chorób nowotworowych, wirusowych, bakteryjnych i alergicznych [10].

Jung i wsp. transformowali młode liście i rozmnożki za pomocą *A. tumefaciens* szczepu LBA4404 zawierającego wektor z genem zrekombinowanego przeciwciała 3D8 scFv [29]. To przeciwciało wykazuje aktywność DNA-zy w jądrze komórkowym hamując replikację DNA i transkrypcję oraz aktywność RNA-zy w cytoplazmie hamując translację białek i w konsekwencji zapobiega namnażaniu wirusów DNA [34]. Osiągnęli oni wydajność transformacji na poziomie 77-84% [29].

PODSUMOWANIE

Rośliny lecznicze, będące źródłem wielu związków chemicznych, są cenione nie tylko w medycynie. Z farmaceutycznego punktu widzenia, istotnym wydaje się wykorzystanie roślin leczniczych do badań nad produkcją biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych. Wykorzystywane są m.in. do leczenia schorzeń kardiologicznych, dermatologicznych, ginekologicznych, nowotworowych, układu pokarmowego, oddechowego, wydalniczego oraz zaburzeń metabolicznych. Wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe i antyoksydacyjne.

Agrobacterium tumefaciens jest przydatnym i skutecznym narzędziem inżynierii genetycznej, umożliwiającym uzyskanie z roślin większych ilości substancji leczniczych oraz produkcję nowych rekombinowanych związków biologicznie aktywnych. Transformacja roślin leczniczych, z których wiele pochodzi z różnych stref klimatycznych, nadal jest wielkim wyzwaniem. Wiele z nich jest odporne na infekcje *Agrobacterium tumefaciens* oraz często napotyka się trudności z regeneracją transformowanych eksplantatów. W związku z tym wydajność transformacji jest najczęściej mała, ponadto częstym problemem jest mała zawartość wytwarzanych w nich substancji biologicznie czynnych. Również ekspresja wprowadzanych transgenów nie jest jednakowa we wszystkich częściach rośliny i może wykazywać tendencje do spadku z upływem czasu. Nadal są prowadzone intensywne prace nad optymalizacją procesów regeneracji i transformacji roślin leczniczych oraz zwiększoną i stabilną ekspresją heterologicznych białek.

PIŚMIENICTWO

[1] Abdin M.Z., Israr M., Rehman R.U., Jain S.K.: Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Med.*, 2003; 69: 289-299

[2] Albach D.C., Meudt H.M., Oxelman B.: Piecing together the „new“ *Plantaginaceae*. *Am. J. Bot.*, 2005; 92: 297-315

[3] Bandurska K., Król I., Myga-Nowak M.: Interferony: między strukturą a funkcją. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 428-440

[4] Bhattacharya A., Ramanathan M., Ghosal S., Bhattacharya S.K.: Effect of *Withania somnifera* glycowithanolides on iron-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.*, 2000; 14: 568-570

[5] Cal C., Garban H., Jazirehi A., Yeh C., Mizutani Y., Bonavida B.: Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.*, 2003; 3: 77-93

[6] Chen J.C., Chiu M.H., Nie R.L., Cordell G.A., Qiu S.X.: Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.*, 2005; 22: 386-399

[7] Chen W.P., Punja Z.K.: *Agrobacterium*-mediated transformation of American ginseng with a rice chitinase gene. *Plant. Cell. Rep.*, 2002; 20: 1039-1045

[8] Chhabra G., Chaudhary D., Sainger M., Jaiwal P.K.: Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants.*, 2011; 17: 129-136

[9] Christie P.J., Gordon J.E.: The *Agrobacterium* Ti plasmids. *Microbiol. Spectr.*, 2014; 2: PLAS-0010-2013

[10] Cruz E.A., Reuter S., Martin H., Dehzad N., Muzitano M.F., Co-

- sta S.S., Rossi-Bergmann B., Buhl R., Stassen M., Taube C.: *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. *Phytomedicine*, 2012; 19: 115-121
- [11] Dreger M., Krajewska-Patan A., Górska-Paukszta M., Pieszak M., Buchwald W., Mikołajczak P.: Production of the secondary metabolites in *Salvia miltiorrhiza* *in vitro* cultures. *Herb. Polon.*, 2010; 56: 78-90
- [12] Elfahmi S.S., Suhandono S., Chahyadi A.: Optimization of genetic transformation of *Artemisia annua* L. using *Agrobacterium* for artemisinin production. *Pharmacogn. Mag.*, 2014; 10: S176-S180
- [13] Facchini P.J., De Luca V.: Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant. J.*, 2008; 54: 763-784
- [14] Franzyk H., Olsen C.E., Jensen S.R.: Dopaoil 2-keto- and 2,3-diketoglycosides from *Chelone obliqua*. *J. Nat. Prod.*, 2004; 67: 1052-1054
- [15] Gala B.V., Gujar V.: Product development, biochemical, anti-microbial and organoleptic analysis on (*Trigonella foenum-graecum*) fenugreek seeds and leaves. *Plant Sciences Feed*, 2014; 4: 15-18
- [16] Gao Z., Li Y., Chen J., Chen Z., Cui M.L.: A rapid and stable *Agrobacterium*-mediated transformation method of a medicinal plant *Chelone glabra* L. *App. Biochem. Biotechnol.*, 2015; 175: 2390-2398
- [17] Gelvin S. B.: *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant. Physiol.*, 2009; 150: 1665-1676
- [18] Ghimire B.K., Lim J.D., Yu C.Y.: Biological activity of *Rehmannia glutinosa* transformed with resveratrol synthase genes. W: *Transgenic plants – advances and limitations*, red.: Yelda Ozden Çiftçi. InTech, 2012, 161-172
- [19] Gohlke J., Deeken R.: Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Front. Plant. Sci.*, 2014; 5: 1-11
- [20] Hashem Abadi D., Kaviani B.: *In vitro* proliferation of an important medicinal plant aloe – a method for rapid production. *Aust. J. Crop. Sci.*, 2010; 4: 216-222
- [21] He C., Zhang J., Chen J., Ye X., Du L., Dong Y., Zhao H.: Genetic transformation of *Aloe barbadensis* Miller by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Genet. Genomics.*, 2007; 34: 1053-1060
- [22] Hosseini B., Shahriari-Ahmadi F., Hashemi H., Marashi M.H., Mohseniazar M., Farokhzad A., Sabokbari M.: Transient expression of *cor* gene in *Papaver somniferum*. *BioImpacts*, 2011; 1: 229-235
- [23] Ignatowicz E., Baer-Dubowska W.: Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol. J. Pharmacol.*, 2001; 53: 557-569
- [24] Jayaprakasam B., Nair M.G.: Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory withanolides from *Withania somnifera* leaves. *Tetrahedron.*, 2003; 59: 841-849
- [25] Jaziri M., Fauconnier M.L., Guo Y.W., Marlier M., Vanhaelen M.: Genetic transformation of *Anthemis nobilis* L. (Roman chamomile). *Biotechnol. Agricult. Forest.*, 1999; 45: 47-54
- [26] Jhala A., Hall L.: Flax (*Linum usitatissimum* L.): current uses and future applications. *Aust. J. Bas. App. Sci.*, 2010; 4: 4304-4312
- [27] Jiang R.W., Lau K.M., Hon P.M., Mark T.C., Woo K.S., Fung K.P.: Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Curr. Med. Chem.*, 2005; 12: 237-246
- [28] Jiao X.L., Bi W., Li M., Luo Y., Gao W.W.: Dynamic response of ginsenosides in American ginseng to root fungal pathogens. *Plant Soil*, 2011; 339: 317-327
- [29] Jung Y., Rhee Y., Auh C.K., Shim H., Choi J.J., Kwon S.T., Yang J.S., Kim D., Kwon M.H., Kim Y.S., Lee S.: Production of recombinant single chain antibodies (scFv) in vegetatively reproductive *Kalanchoe pinnata* by *in planta* transformation. *Plant. Cell. Rep.*, 2009; 28: 1593-1602
- [30] Khawar K.M., Gulbitti-Onarici S., Çöçü S., Erisen S., Sancak C., Özcan S.: *In vitro* crown galls induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 (pTiBo542) in *Trigonella foenum-graecum*. *Biol. Plant.*, 2004; 48: 441-444
- [31] Kiyokawa S., Kikuchi Y., Kamada H., Harada H.: Genetic transformation of *Begonia tuberhybrida* by *Ri rol* genes. *Plant Cell. Rep.*, 1996; 15: 606-609
- [32] Krasnyanski S., May R.A., Loskutov A., Ball T.M., Sink K.C.: Transformation of the limonene synthase gene into peppermint (*Mentha piperita* L.) and preliminary studies on the essential oil profiles of single transgenic plants. *Theor. Appl. Genet.*, 1999; 99: 676-682
- [33] Kumar M., Singh S., Singh S.: *In vitro* morphogenesis of a medicinal plant *Aloe vera* L. *Asian J. Plant. Sci. Res.*, 2011; 1: 31-40
- [34] Lee G., Yu J., Cho S., Byun S.J., Kim D.H., Lee T.K., Kwon M.H., Lee S.: A nucleic-acid hydrolyzing single chain antibody confers resistance to DNA virus infection in HeLa cells and C57BL/6 Mice. *PLOS Pathog.*, 2014; 10: e1004208
- [35] Li M., Jiang F., Yu X., Miao Z.: Engineering isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua* L. for the production of taxadiene: a key intermediate of taxol. *Biomed. Res. Int.*, 2015; 2015: 504932
- [36] Li Y., Gao Z., Piao C., Lu K., Wang Z., Cui M.L.: A stable and efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the medicinal plant *Digitalis purpurea* L. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014; 172: 1807-1817
- [37] Lim D.W., Kim Y.T.: Dried root of *Rehmannia glutinosa* prevents bone loss in ovariectomized rats. *Molecules*, 2013; 18: 5804-5813
- [38] Lim T.K.: *Begonia x tuberhybrida*. W: *Edible medicinal and non-medicinal plants. Vol. 7 Flowers*. Springer Netherlands 2014, 556-558
- [39] Lowther W., Lorick K., Lawrence S.D., Yeow WS.: Expression of biologically active human interferon alpha 2 in *Aloe vera*. *Transgenic Res.*, 2012; 21: 1349-1357
- [40] Magnotta M., Murata J., Chen J., De Luca V.: Expression of decacetylindoline-4-O-acetyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Phytochemistry*, 2007; 68: 1922-1931
- [41] Manvitha K., Bida B.: *Aloe vera*: a wonder plant its history, cultivation and medicinal uses. *J. Pharmacognosy Phytochem.*, 2014; 2: 85-88
- [42] Menger L., Vacchelli E., Kepp O., Eggermont A., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L.: Trial watch: Cardiac glycosides and cancer therapy. *Oncoimmunology*, 2013; 2: e23082
- [43] Mierziak J., Wojtasik W., Kostyn K., Czuj T., Szopa J., Kulma A.: Crossbreeding of transgenic flax plants overproducing flavonoids and glucosyltransferase results in progeny with improved antifungal and antioxidative properties. *Mol. Breed.*, 2014; 34: 1917-1932
- [44] Mirjalili M.H., Fakhr-Tabatabaei S.M., Bonfill M., Alizadeh H., Cusido R.M., Ghassempour A., Palazon J.: Morphology and withanolide production of *Withania coagulans* hairy root cultures. *Eng. Life. Sci.*, 2009; 9: 197-204
- [45] Pandey V., Misra P., Chaturvedi P., Mishra M.K., Trivedi P.K., Tuli R.: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Withania somnifera* (L.) Dunal: an important medical plant. *Plant Cell. Rep.*, 2010; 29: 133-141
- [46] Park K.S., Chang I.M.: Anti-inflammatory activity of aucubin by inhibition of tumor necrosis factor- α production in RAW 264.7 cells. *Planta Med.*, 2004; 70: 778-779
- [47] Patil S., Jain G.: Holistic approach of *Trigonella foenum-graecum* in phytochemistry and pharmacology – a review. *Curr. Trends Technol. Sci.* 2014; 3: 34-48
- [48] Pérez-Bermúdez P., García A.A., Tuñón I., Gavidia I.: *Digitalis purpurea* P5 β R2, encoding steroid 5 β -reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. *New Phytol.*, 2010; 185: 687-700
- [49] Pramila D.M., Xavier R., Marimuthu K., Kathiresan S., Khoo M.L.,

Senthilkumar M., Sathya K., Sreeramanan S.: Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (*Mentha piperita*: Lamiaceae). *J. Med. Plant. Res.*, 2012; 6: 331-335

[50] Punja Z.K.: Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. *Can. J. Plant. Pathol.*, 2001; 23: 216-235

[51] Qi L.W., Wang C.Z., Yuan C.S.: Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity. *Phytochemistry*, 2011; 72: 689-699

[52] Rajput H.: Effects of *Atropa belladonna* as an anti-cholinergic. *Nat. Prod. Chem. Res.*, 2013; 1: 104

[53] Reynolds T.: Aloes: the genus *Aloe*. CRC Press, Boca Raton 2004

[54] Rita P., Animesh D.K.: An updated overview on *Atropa belladonna* L. *Int. Res. J. Pharm.*, 2011; 2: 11-17

[55] Ro D.K., Paradise E.M., Ouellet M., Fisher K.J., Newman K.L., Ndungu J.M., Ho K.A., Eachus R.A., Ham T.S., Kirby J., Chang M.C., Withers S.T., Shiba Y., Sarpong R., Keasling J.D.: Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006; 440: 940-943

[56] Robb E.L., Page M.M., Wiens B.E., Stuart J.A.: Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: specific and progressive induction of MnSOD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 367: 406-412

[57] Sharma A., Purkait B.: Identification of medicinally active ingredient in ultradiluted *Digitalis purpurea*: fluorescence spectroscopic and cyclic-voltammetric study. *J. Anal. Methods Chem.*, 2012; 2012: 109058

[58] Shen Q., Chen Y.F., Wang T., Wu S.Y., Lu X., Zhang L., Zhang F.Y., Jiang W.M., Wang G.F., Tang K.X.: Overexpression of the cytochrome P450 monooxygenase (*cyp71av1*) and cytochrome P450 reductase (*cpr*) genes increased artemisinin content in *Artemisia annua* (Asteraceae). *Genet. Mol. Res.*, 2012; 11: 3298-3309

[59] Shim Y.Y., Reaney M.J.: Kinetic interactions between cyclolinopeptides and immobilized human serum albumin by surface plasmon resonance. *J. Agric. Food Chem.*, 2015; 63: 1099-1106

[60] Sivanandhan G., Arun M., Mayavan S., Rajesh M., Mariashibu T.S., Manickavasagam M., Selvaraj N., Ganapathi A.: Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Ind. Crop. Prod.*, 2012; 37: 124-129

[61] Sivanandhan G., Kapil Dev G., Thebora J., Selvaraj N., Ganapathi A., Manickavasagam M.: Sonication, vacuum infiltration and thiol compounds enhance the *Agrobacterium*-mediated transformation frequency of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *PLoS One*, 2015; 10: e0124693

[62] Song G., Walworth A.: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Atropa belladonna*. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.*, 2013; 115: 107-113

[63] Srivastava J.K., Shankar E., Gupta S.: Chamomile: a herbal medicine of the past with bright future. *Mol. Med. Rep.*, 2010; 3: 895-901

[64] Srivastava T., Das S., Sopory S.K., Srivastava P.S.: A reliable protocol for transformation of *Catharanthus roseus* through *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 2009; 15: 93-98

[65] Szopa J., Wróbel-Kwiatkowska M., Kulma A., Zuk M., Skórkowska-Telichowska K., Dymińska L., Mączka M., Hanuza J., Zebrowski J., Preisner M.: Chemical composition and molecular structure of fibers from transgenic flax producing polyhydroxybutyrate, and mechanical properties and platelet aggregation of composite materials containing these fibers. *Compos. Sci. Technol.*, 2009; 69: 2438-2446

[66] van Der Heijden R., Jacobs D.I., Snoeijer W., Hallard D., Verpoorte R.: The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr. Med. Chem.*, 2004; 11: 607-628

[67] Vincenzi S., Tomasi D., Gaiotti F., Lovat L., Giacosa S., Torchio F., Rio Segade S., Rolle L.: Comparative study of the resveratrol content of twenty-one italian red grape varieties. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 2013; 34: 30-35

[68] Vladimirova I.N., Georgiyants V.A.: Biologically active compounds from *Lemna minor* S. G. Gray. *Pharm. Chem. J.*, 2014; 47: 599-601

[69] Wang Q., Xing S., Pan Q., Yuan F., Zhao J., Tian Y., Chen Y., Wang G., Tang K.: Development of efficient *Catharanthus roseus* regeneration and transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* and hypocotyls as explants. *BMC Biotechnol.*, 2012; 12: 34

[70] WHO Malaria Policy Advisory Committee and Secretariat.: Malaria policy advisory committee to the WHO: conclusions and recommendations of eighth biannual meeting (September 2015). *Malar. J.*, 2016; 15: 117

[71] Wu B., Li Y., Yan H., Ma Y., Luo H., Yuan L., Chen S. Lu S.: Comprehensive transcriptome analysis reveals novel genes involved in cardiac glycoside biosynthesis and miRNAs associated with secondary metabolism and stress response in *Digitalis purpurea*. *BMC Genomics*, 2012; 13: 15

[72] Yan Y., Wang Z.: Genetic transformation of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.*, 2007; 88: 175-184

[73] Yang L., Stöckigt J.: Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 2010; 27:1469-1479

[74] Zhou L., Zuo Z., Chow M.S.: Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *J. Clin. Pharmacol.*, 2005; 45: 1345-1359

[75] Zhuang H., Kim Y.S., Koehler R.C., Dore S.: Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003; 993: 276-286

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.