

*Doktori (Ph.D.) tézisek*

***Lobelia inflata* L. hairy root kultúrák  
növekedésének és speciális anyagcseréjének vizsgálata**

**BÁLVÁNYOS ISTVÁN**

Témavezető: Szőke Éva D.Sc. egyetemi tanár

SEMMELWEIS EGYETEM  
FARMAKOGNÓZIA INTÉZET

Budapest, 2002.

Doktori (Ph.D.) értekezés  
Készült: Semmelweis Egyetem, Farmakognózia Intézet, Budapest, 2002.  
Témavezető: Prof. Dr. Szőke Éva

**Bálványos István**

***Lobelia inflata* L. hairy root kultúrák  
növekedésének és speciális anyagcseréjének vizsgálata**

**Összefoglaló**

A *Lobelia inflata* L. számos gyógyászati szempontból fontos hatóanyagot tartalmaz. A herbában mintegy 20 piperidinvázis alkaloidot mutattak ki. Főalkaloidja a lobelin, melynek a légzőközpontra serkentő hatása van, gáz- és narkotikummérgezés esetén használják, továbbá dohányzás elleni készítményekben is alkalmazzák. Beszámoltak a *L. inflata* leveléből izolált **b**-amirin-palmitát antidepresszáns hatásáról. Újabban a növényben jelentős mennyiségben azonosítottak poliacetilén vegyületeket is (lobetiol, lobetiolin és lobetiolinin).

Munkánk során célul tűztük ki a *L. inflata* genetikailag transzformált és nem transzformált kultúrák növekedési sajátosságainak és speciális anyagcseréjének *in vitro* és *in vivo* tanulmányozását a biomassza- és hatóanyagképzés fokozása céljából.

*In vitro* a szilárd táptalajon nevelt organizált kultúrák jól növekedtek, összalkaloid tartalmuk hasonló volt az intakt növényhez. Üvegházi adaptáció során alkaloid tartalmuk jelentősen nőtt, ugyanakkor a kultúrák fő poliacetilén komponensének, a lobetiolinnak mennyisége csökkent a hajtásban, de még így is meghaladta az intakt növényben mért értéket. A kiültetett kultúrák túlélése 100%-os volt. Alkaloid tartalom bár csökkent, de a hajtásban nagyobb volt mint az *in vitro* kultúrákban; a poliacetilének mennyisége jelentősen nőtt.

A hatóanyag termelés fokozása céljából géntranszformált kultúrákat is előállítottunk. A steril *in vitro* növények szárát *Agrobacterium rhizogenes* R1601 törzssel fertőzve hairy root képződést indukáltunk. A géntranszformált kultúráink intenzíven növekedtek és magas bioszintetikus potenciállal rendelkeztek. A vizsgált klónok poliacetilén tartalma kimagasló volt (kb. 3,5% lobetiolin és 1,5% lobetiolinin), összalkaloid tartalmuk hasonló volt az intakt növényhez. A tenyésztési körülmények optimalizálásával (ásványi sók, szacharóz, növekedési regulátorok, prekursor aminosavak adagolásával) fokoztuk a hatóanyag termelést. A hairy root kultúrák folyékony tápközegben, ill. bioreaktorban történő tenyésztése további lehetőséget nyújtott a speciális anyagcsere termékek mennyiségének növelésére.

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A növények által szintetizált speciális anyagcseretermékek a gyógyszer-, élelmiszer-, ill. kozmetikai ipar nélkülözhetetlen alapanyagai. A növényi hatóanyagok iránt mutatkozó fokozódó kereslet ösztönzően hat új eljárások kifejlesztésére. A bioaktív vegyületek termeltetésére ígéretes lehetőséget nyújt a növénybiotechnológiai módszerek alkalmazása. A hatóanyag produkció fokozása céljából fontos az előnyös tulajdonságokkal rendelkező sejtvonalak optimális feltételek mellett történő tenyésztése. A modern analitikai módszerek rohamos fejlődése is nagymértékben hozzájárult a növényi hatóanyagokról megszerzett ismereteink pontosításához és bővítéséhez.

A *Lobelia inflata* gyógyászati szempontból fontos hatóanyagokat szintetizál. A növény mintegy 20 piperidin vázas alkaloidot tartalmaz, főalkaloidját a lobelint légzésfokozó hatása miatt újszülöttkori asphyxia esetén, ill. mérgezéseknél fellépő légzésbénulásnál, nikotinszerű hatása miatt pedig dohányzásról leszoktató készítményekben alkalmazzák. A legújabb vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a lobelin ill. származékainak alkalmazása potenciális lehetőséget jelenthet a pszichostimuláns (metamfetamin) abúzus hatékony kezelésére is. A közelmúltban megjelent közlemények beszámoltak továbbá az intakt növényben és szövettenyészteteiben kimutatott poliacetilénekről, melyek tovább növelhetik a *L. inflata* kultúrák gyógyászati potenciálját.

Munkánk során célul tűztük ki géntranszformált és nem transzformált *L. inflata* kultúrák növekedési sajátosságainak és speciális anyagcseréjének *in vitro* és *in vivo* tanulmányozását a biomassza - és hatóanyagképzés fokozása céljából. Mindenek előtt fontosnak tartottuk magas hatóanyag tartalmú *L. inflata in vitro* organizált kultúrák előállítását mind az *in vivo* tenyésztési kísérletekhez, mind pedig a géntranszformált hairy root kultúrák létrehozásához. Célunk volt a *L. inflata* üvegházi adaptációját követően a szabadföldi kiültetés megvalósítása, megalapozva ezáltal a gyógyászati szempontból fontos hatóanyagok ipari méretű termeltetésének lehetőségét is.

A hagyományos szövettenyésztési eljárások mellett napjainkban széles körben alkalmazzák a géntechnológiai módszereket is. Az *Agrobacterium* génátviteli mechanizmuson alapuló metodikák közül érdeklődésünk elsősorban a hairy root kultúrák felé irányult. Előnyös tulajdonságaik közül kiemelésre érdemes, hogy genetikailag stabilak, hormonmentes táptalajon intenzív növekedésre képesek, és hatóanyag szintetizáló képességük sok esetben meghaladja az intakt növényét.

Munkánk során kiemelt célként tűztük ki, hogy intenzív növekedéssel és magas hatóanyag produkcióval rendelkező géntranszformált hairy root kultúrát hozzunk létre. A különböző típusú hatóanyagok vizsgálata, kvantitatív meghatározása szükségessé tette hatékony analitikai metodikák kifejlesztését. Annak érdekében, hogy a növényi sejtek bioszintetikus kapacitását eredményesen aknázhassuk ki, alapvetően fontosnak tartottuk a kultúrák tápanyag, ill. egyéb környezeti szükségleteinek biztosítását. Lényegesnek tartottuk olyan növekedés-metodikai vizsgálatok elvégzését, melyek a hairy root kultúrák növekedési sajátosságainak tanulmányozására irányulnak, és segíthetnek a legalkalmasabb tenyésztési körülmény kidolgozásához. Jelentős szempontnak tartottuk az alaptáptalaj kiválasztását, továbbá a

tápközeg összetevőinek (pl. ásványielem, cukor) optimalizálását a *hairy root* kultúrák hatóanyag termelésének fokozása érdekében. Az előzetes vizsgálatok rámutattak, hogy az *in vitro* *L. inflata* kultúrák fejlődése és speciális anyagcseréje kedvezően befolyásolható növekedési regulátorok adagolásával, ezért tanulmányozni kívántuk néhány növényi hormon (auxinok, citokininek) *hairy root* kultúrákra gyakorolt hatását, beleértve a morfológiai változásokat és hatóanyag tartalom alakulását is. Számos kísérleti adat utalt arra, hogy a kultúrák alkaloid tartalma eredményesen fokozható az alkaloid bioszintézisben résztvevő prekursor aminosavak (Lys, Phe) adagolásával, így ilyen irányú vizsgálatokat is terveztük.

A nagyobb hatóanyag termelés érdekében célszerűnek tartottuk, hogy a *L. inflata hairy root* kultúrákat folyékony tápközegben is neveljük. Terveink közt szerepelt a kultúrák bioreaktorban történő tenyésztése, mely további lehetőséget nyújt a hatóanyag termelésének fokozására.

## **2. VIZSGÁLATI ANYAG ÉS MÓDSZER**

Biotechnológiai kísérleteink alapjául szolgáló *L. inflata* kultúrák létrehozásához a maganyagot Németországból (Grosspöna Botanikuskert) bocsájtották rendelkezésünkre.

### **2.1. *Lobelia inflata* organizált kultúrák *in vitro* tenyésztése**

A *L. inflata* magokat diocid oldattal sterilizáltuk, majd steril desztillált vízzel mostuk. A fényen csíráztatott magokat szilárd 1/2 Murashige-Skoog (MS) hormonmentes táptalajra helyeztük, majd 3% szacharóz tartalmú 1/2 MS és B5 szilárd táptalajon fényen neveltük.

#### **• MgSO<sub>4</sub> koncentrációjának változtatása a táptalajban**

*L. inflata* növényeket különböző (0, 125, 250, 500, 1000 mg/l) MgSO<sub>4</sub> koncentrációjú 3% szacharózt tartalmazó szilárd Gamborg (B5) táptalajon fényen (2500 Lux) neveltünk 8 hétig.

### **2.2. *Lobelia inflata* kultúrák *in vivo* tenyésztése üvegházban és szabadföldön**

#### **• Üvegházi nevelés**

Az 1/2 MS táptalajon *in vitro* körülmények között nevelt *L. inflata* kultúrák átültetését (200 tő) 2,5 hetes korukban végeztük. A kultúrák gyökeréhez tapadt szilárd tápközéget vizes öblítéssel mostuk, majd a növényeket föld/ perlit/ tőzeg keverékbe ültettük. A növények felett védőhálót feszítettünk ki árnyékolás céljából, melyet később eltávolítottunk. Az üvegházban a növényeket 5 héten keresztül neveltük, gyakori párasítást alkalmazva.

#### **• Szabadföldi termesztés**

Az üvegházban 5 hétig nevelt *L. inflata* palántákat földlabdával együtt ültettük ki (július elején) szabadföldi parcellákba (200 tő). A tőtávolság 15 cm, a sortávolság pedig 30 cm volt. A növények fölé szintén védőhálót helyeztünk, melyet a kiültetést követő 3. héten távolítottunk el. A kultúrákat az 1. hét után már csak időszakos jelleggel öntöztük.

### **2.3. *Lobelia inflata* géntranszformált *hairy root* kultúrák**

- **Hairy root kultúrák előállítása és tenyésztése**

A steril *L. inflata* növények szárát *Agrobacterium rhizogenes* R1601 baktérium törzssel fertőztük mikroinjektálással. Két héttel a fertőzést követően 62 hairy root klónt izoláltunk, melyeket cefotaxim és ampicillin tartalmú szilárd MS táptalajra helyeztünk baktérium mentesítés céljából. Közülük húsz jól növekvő baktérium mentes klónt szilárd és folyékony MS, ill. B5 táptalajon tenyésztettük tovább sötétben, vagy fényen (2500 Lux), 24°C-on.

### **2.3.1. Hairy root kultúrák tenyésztése szilárd táptalajon**

- **Táptalaj makroelem összetételének változtatása**

A 8009/f4 klónt különböző  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$  és  $NaH_2PO_4$  koncentrációjú, valamint  $KNO_3$ -ot és  $(NH_4)_2SO_4$ -ot különböző arányban és koncentrációban tartalmazó (8009/h7 klón) szilárd B5 táptalajon tenyésztettük.

- **Hormonok adagolása a tápközegbe**

A 8009/h7 klónt különböző NES, IES és kinetin koncentrációjú szilárd B5 táptalajon tenyésztettük. Növekedés metodikai vizsgálatok során az IES hatását részletesebben tanulmányoztuk (8009/h2 klón).

- **Alkaloid prekursor aminosavak adagolása a tápközegbe**

Az alkaloid prekursor aminosavakat (Lys, Phe) hormonmentes ill. 2 mg/l IES-at és 0,2 mg/l kinetint tartalmazó B5 szilárd táptalajba adagoltuk (8009/h7 klón).

### **2.3.2. Hairy root kultúrák tenyésztése folyékony tápközegben, rázatott lombikban**

- **Szacharóz koncentrációjának változtatása**

A 8009/f2 klónt különböző szacharóz koncentrációjú folyékony B5 táptalajban tenyésztettük Erlenmeyer lombikban, klimatizált rázószekrényben fényen, 24°C-on.

### **2.3.3. Hairy root kultúrák tenyésztése bioreaktorban**

A kultúrákat 10 literes buborékoszlopos bioreaktorban tenyésztettük, melybe nylon hálót helyeztünk. 5 liter B5 folyékony tápközéget alkalmaztunk a kultúrák 34 napos batch tenyésztésénél (8009/h7 klón). A fermentációt táptalajcserével is elvégeztük (8009/h2 klón).

## **2.4. A kultúrák növekedésének jellemzése**

A kultúrák növekedés-dinamikai vizsgálata során az alábbi paramétereket mértük:

- **Organizált növények:** friss súly, száraz súly (liofilizált), a gyökér és a hajtás hossza, levélszám, elsárgult levelek száma.
- **Hairy root kultúrák:** friss súly, száraz súly (liofilizált), hosszirányú növekedés, elágazások száma, maximális keresztmetszet, térfogat, sűrűség.

## **2.5. Analitikai vizsgálatok**

- **Opinok kimutatása *Lobelia inflata* hairy root kultúrákban**

A *hairy root* kultúrák opin tartalmát papír-elektroforézissel mutattuk ki (Petit módszere szerint). Tesztként mannopint alkalmaztunk.

• **Extrakciós módszer kiválasztása alkaloidok és poliacetilének vizsgálatához**

Az alkaloidok és poliacetilének kivonására a legalkalmasabbnak a 0,1M HCl/metanol (1:1, v/v) kivonószereleggyel ultrahangos sejtfeltáróban végzett 3x10 perces kivonás bizonyult.

• **Összalkaloid tartalom meghatározása spektrofotometriás módszerrel**

Az összalkaloid tartalmat Mahmud El Masry által kidolgozott, majd Krajewska által módosított módszer alapján fotometriásan határoztuk meg. A vöröses színű oldat abszorbanciáját 510 nm-en mértük Hitachi U 1100 spektrofotométerrel. Az összalkaloid tartalmat lobelin bázisra vonatkoztattuk.

• **Alkaloidok (lobelin) szilárdfázisú extrakciója (SPE)**

Tisztítás céljából a törzsoldatot előzetesen metanollal és vízzel aktivált SPE oszlopra (Supelclean LC-8, 3 ml) vittük fel. Az oszlopot vízzel mostuk, majd az alkaloid (lobelin) tartalmú frakciót metanollal eluáltuk, melyet folyadék-kromatográfiásan vizsgáltunk.

• **Lobelin tartalom meghatározása HPLC módszerrel**

Az elválasztást HPLC-vel (kvaterner gradiens pumpa Spectra Physics P4000, FOCUS scanning UV-VIS detektor, Rheodyne 7125 injektor) Eurospher 100-C8 fordított fázisú Vertex oszlopon végeztük, előtétoszlopot alkalmazva. Az eluens acetonitril: 0,1 % trifluoecetsav 33,2: 66,8 (v/v) arányú elegye volt (1 ml/perc). A lobelint standard addícióval (lobelin bázis) és UV-spektrum analízissel azonosítottuk, és mennyiségét külső standard módszerrel (250 nm-en) határoztuk meg.

• **Poliacetilén tartalom meghatározása HPLC módszerrel**

A poliacetilének HPLC analíziséhez Hypersil MOS oszlopot alkalmaztunk, az eluens acetonitril: víz = 15: 85 (v/v) arányú elegye volt. A lobetiolint és lobetiolinint standard addícióval és UV-spektrum analízissel azonosítottuk. A kvantitatív meghatározás külső standard módszerrel (270 nm-en) történt.

• **Antociánok vizsgálata**

A VRK vizsgálatot Wagner és Bladt módszere szerint végeztük. A liofilizált mintákat MeOH/25% HCl (9/1; v/v) elegyével extraháltuk ultrahangfürdőben. Hordozónak Kieselgel 60-at (Merck) alkalmaztunk, a kifejlesztő elegy: etilacetát-jégecet-hangyasav-víz (100:11:11:26; v/v) volt. Az antocián VIS spektrumát denzitométerrel (Shimadzu CS-930), ill. spektrofotométerrel (HITACHI U-2000) vizsgáltuk.

## 2.6. Vizsgálatok kiértékelése

A párhuzamos mérések (n=3-10) eredményeit átlagoltuk; az adatok statisztikai kiértékeléséhez kiszámítottuk a szórást és a megbízhatóságot ( $\pm$  SD,  $p < 0,05$ ).

## 3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

### 3.1. Módszerfejlesztés

#### **- Metodikai tanulmányok a *hairy root* kultúrák növekedésének jellemzésére**

A növekedési adatok jellemzésére egységes fogalom rendszert vezetünk be és a következő alapfogalmakat definiáltuk: inokulum növekedése (mm), átlagos növekedés (mm), inokulum napi növekedése (mm/nap), átlagos növekedés intenzitás (mm/nap), összesített inokulum növekedés (mm), összesített átlagos növekedés (mm), elágazás szám, összesített elágazás szám. A kultúrák növekedésének jellemzésénél kiemelt hangsúlyt helyeztünk az *átlagos növekedés intenzitás* alakulásának, azaz a *hairy root* kultúrák időegység alatt bekövetkezett átlagos növekedésének bemutatására, mely a mért növekedési adatok alapján egyszerűen számítható.

A kultúrák növekedését kísérő morfológiai változások részletesebb jellemzése érdekében további módszereket dolgoztunk ki a *hairy root* kultúrák térfogatának mérése, sűrűségének kiszámítása, valamint a keresztmetszet, ill. az elméleti maximális keresztmetszet meghatározása érdekében.

#### **- Extrakciós módszer, minta előkészítés optimalizálása (kvantitatív mérésekhez)**

Az extrakciós módszerek között vizsgáltuk mind a savas közegben (0,1 M HCl, ill. 0,1 M HCl/metanol), mind pedig az alkaloid bázis feltárását követő szerves oldószerrel (kloroform) végzett kivonási módszerek hatékonyságát. Az extrakciót különböző készülékkel (ultrahangos sejteltáró, rázó gép, Soxhlet-készülék) végeztük. A vizsgált extrakciós módszerek közül a leghatékonyabbnak a 0,1 M HCl/metanol (1/1) eleggyel ultrahangos sejteltáróban végzett kivonás bizonyult.

Az alkaloid tartalmú kivonatok tisztítására hatékonynak bizonyult a szilárdfázisú extrakció (SPE). Előzetesen (metanollal és vízzel) aktivált SPE oszlopra vittünk fel a kivonatokból készített (törzs)oldatok részleteit. A mintafelvitelt követően az oszlopot vízzel mostuk, majd az alkaloid (lobelin) tartalmú frakciót metanollal eluáltuk. A lobelin visszanyerése  $102 \pm 5.3\%$  volt ( $n = 3$ ).

A poliacetilének extrakciójára is alkalmasnak találtuk az alkaloidok kivonására kifejlesztett módszert, melynek adaptálása lehetővé tette azonos kivonatból történő többféle típusú hatóanyagok analízisét.

### **3.2. *Lobelia inflata in vitro* kultúrák**

A *L. inflata in vitro* organizált kultúrák előállítását alapvető jelentőségű volt mind az *in vivo* tenyésztési kísérletek, mind pedig a géntranszformált kultúrák létrehozása szempontjából. A sterilizált és fényen csírázott magokból kifejlődött növényeket 1/2 MS szilárd táptalajon neveltük. A kultúrák szaporítását vegetatív módszerrel végeztük. A kultúrák *in vitro* tenyésztése szempontjából az 1/2 MS és B5 szilárd táptalaj egyaránt alkalmasnak bizonyult.

#### **- Magnézium-szulfát hatásának vizsgálata**

Mivel számos kutatási eredmény igazolta, hogy a magnézium adagolása előnyösen befolyásolhatja a különböző típusú szövettenyészetek biomassza termelését, serkeni az organizált kultúrák gyökerének fejlődését, fontosnak tartottuk a különböző  $MgSO_4$  tartalmú B5 táptalajon *in vitro* nevelt *L. inflata* növények növekedésének és hatóanyagképzésének tanulmányozását.

Megállapítottuk, hogy a tenyésztés végén mért levélszám a nagyobb koncentrációban adagolt  $\text{MgSO}_4$  hatására csökkent. A kultúrák szárának hossznövekedését és a gyökérhossz alakulását nem befolyásolta szignifikánsan a táptalaj magnézium tartalma. Maximális biomassza képződést a 250 mg/l  $\text{MgSO}_4$  tartalmú táptalajon mértünk. A HPLC analízis alapján megállapítottuk, hogy a lobelin tartalmat és lobelin produkciót leginkább a 125 mg/l  $\text{MgSO}_4$  fokozta. Maximális összsalkaloid tartalmat is a 125 mg/l  $\text{MgSO}_4$  koncentrációjú táptalajon nevelt kultúrák gyökerében detektáltunk spektrofotometriásan. A magnéziumsó koncentrációjának növelése a gyökér összsalkaloid tartalmának csökkenését eredményezte, míg a hajtásba magasabb  $\text{MgSO}_4$  koncentrációk hatására nem csökkent a szöveti összsalkaloid tartalom. Az összsalkaloid produkció szempontjából a gyökér esetében a 125 és 250 mg/l  $\text{MgSO}_4$  koncentráció bizonyult kedvezőbbnek, a hajtásban azonban a  $\text{MgSO}_4$  koncentráció változtatása nem okozott szignifikáns eltéréseket. A  $\text{MgSO}_4$  megvonása természetesen az alkaloid produkció csökkenését eredményezte.

Maximális poliacetilén tartalom és produkció a 250 mg/l  $\text{MgSO}_4$ -ot tartalmazó táptalajon nevelt növényekben volt mérhető.

Míg az *in vitro* kultúrák összsalkaloid tartalma megegyezett az intakt növényben mért értékkel, addig az *in vitro* kultúrák poliacetilén tartalma jelentősen felülmúlta azt (különösen a hajtásban: a lobetiolin kb. 15-szöröse, a lobetiolinin 4-szerese volt).

### **3.3. *Lobelia inflata* *in vivo* kultúrák**

Célul tűztük ki a *L. inflata in vivo* magyarországi adaptációjának megvalósítását is. Kísérleteink megkezdése előtt bízónak értékeltük, hogy az általunk létrehozott *in vitro* kultúrák kimagasló poliacetilén (és megfelelő alkaloid) tartalommal rendelkeztek.

#### **• *Lobelia inflata* kultúrák tenyésztése üvegházban**

A *L. inflata in vitro* kultúrákat (200 tő) 25 hetes korukban ültettük át földkeverékbe és 5 héten át üvegházban neveltük. A kultiváció során a növények víz igényét gyakori párasítással biztosítottuk. A növények jól fejlődtek, túlélésük 100% volt.

Az összsalkaloid tartalom mérése során kimagaslóan magas értéket (17 mg/g) detektáltunk a gyökérben, és a hajtás összsalkaloid tartalma is nagymértékben fokozódott, lényegesen meghaladva az intakt növényben mért értéket. Az *in vitro* tenyészetekhez képest jelentősen nőtt az üvegházban nevelt kultúrák lobelin tartalma és lobelin produkciója is (leginkább a hajtásban). A poliacetilének vizsgálata során megállapítottuk, hogy a kultúrák gyökerének lobetiolin tartalma megfelelt az *in vitro* tenyészetek gyökerében detektált értéknek, azaz kétszerese volt az intakt növénynek. Az üvegházi növények hajtásában lényegesen kisebb lobetiolin tartalmat mértünk, mint az *in vitro* tenyészetekben, mely azonban még így is jelentősen meghaladta az intakt növényben detektált értéket. Nagy mértékű csökkenést tapasztaltunk viszont a lobetiolinin tartalom tekintetében. A gyökér lobetiolin produkciója meghaladta a hajtását. A lobetiolinin produkció a növény minkét szervében alacsony szinten maradt.

#### **• *Lobelia inflata* kultúrák szabadföldi termesztése**



Az üvegházban nevelt *L. inflata* palántákat 5 hetes korukban ültették ki szabadföldi parcellákba. A kiültetett növények szabadföldi adaptációjának biztosítása érdekében a kultiváció kezdeti szakaszában védőhálót alkalmaztunk. A növények mintegy 10%-ánál már három hét elteltével hajtásmegnyúlás és virágzás volt megfigyelhető (45 cm-es magasságot is elérték). A hajtások alsó része az antocián tartalomtól pirosra színeződött. A kultúrák túlélése 100% volt.

A 8 hetes kiültetett növények összalkaloid tartalma és lobelin tartalma csökkent az üvegházi kultúrákhoz képest, de a hajtásban mért értékek meghaladták az *in vitro* kultúrákét. A poliacetilének mennyisége nagymértékben nőtt a szabadföldi növényekben, különösen a gyökérben (40 mg/g lobetiolin és 17 mg/g lobetiolinin).

### **3.4. Géntranszformált *Lobelia inflata hairy root* kultúrák**

Japán kutatók által ATCC 15834 *Agrobacterium rhizogenes* törzssel transzformált *L. inflata hairy root* kultúrák jelentős bioszintetikus potenciállal rendelkeztek, különös tekintettel a poliacetilén származékokra. Munkánk során fontosnak tartottuk, hogy más baktérium törzssel is módosítsuk genetikailag a *L. inflata* kultúráinkat a speciális anyagcsere tanulmányozása céljából.

Az *in vitro* nevelt *L. inflata* növény szárát mikroinjektálással fertőztük *A. rhizogenes* különböző törzseivel (A4-Y, 1834, R1601), melyek közül az R1601 törzssel sikerült jól növekvő *hairy root* kultúrákat előállítanunk. Opin kimutatásával (elektroforézissel) igazoltuk a *hairy root*-ok géntranszformációját. Húszt jól növekvő klónokat izoláltunk, melyeket MS és B5 táptalajon tenyésztettük. A *hairy root* klónok B5 táptalajon növekedtek intenzívebben, melyet további vizsgálatainkhoz alaptáptalajnak választottunk. A 8009/h7 klón biomassza képzése volt a legkiemelkedőbb. A szilárd alaptáptalajon nevelt kultúrában 29 µg/g lobelin tartalmat és 1,7mg/g összalkaloid tartalmat mértünk. A poliacetilének közül 21,7 mg/g lobetiolint és 7,7 mg/g lobetiolinint detektáltunk. Fény hatására a szilárd és a folyékony táptalajon nevelt *hairy root* kultúrák antocián termelésére utaló piros elszíneződést tapasztaltunk, hasonlóan az *in vitro* és *in vivo* növényekhez.

A további vizsgálataink során kiemelt célul tűztük ki a *hairy root* kultúrák hatóanyag termelésének fokozását a tenyésztési körülmények optimalizálásával (pl. makroelemek, szacharóz, növényi hormonok és prekursorok alkalmazása).

#### **- Makroelemek hatásának vizsgálata**

##### ***Magnézium-szulfát hatása***

A *L. inflata hairy root* kultúrák növekedési intenzitása és biomassza termelése a kontrol (250 mg/l) táptalajhoz képest négyszeres MgSO<sub>4</sub> koncentráció hatására volt maximális. Maximális lobelin tartalmat az 500 mg/l MgSO<sub>4</sub> tartalmú táptalajon mértünk. A lobelin termelést az 1000 mg/l MgSO<sub>4</sub> mintegy 70%-al fokozta a kontrolhoz képest.

A *hairy root* kultúrák poliacetilén tartalma meghaladta az *in vitro* kultúrákban mért jelentősnek tekinthető értékeket is. Összehasonlítva az intakt növény gyökerének poliacetilén tartalmával a lobetiolin esetén

mintegy háromszoros, a lobetiolin esetében pedig csaknem tizenkétszeres a különbség a *hairy root* kultúrák javára. A  $MgSO_4$  adagolása a lobetiolin tartalmat jelentős mértékben nem befolyásolta, azonban a lobetiolin tartalom a kontrolnál nagyobb  $MgSO_4$  koncentrációk adagolásának hatására több mint 30%-al csökkent. Az 1000 mg/l  $MgSO_4$  - mindenek előtt a biomassza termelés serkentése révén - jelentősen fokozta a kultúrák lobetiolin produkcióját.

#### ***Kalcium-klorid hatása***

Legintenzívebb hosszirányú növekedést a kontrol (150 mg/l  $CaCl_2$ ) esetében mértünk, mely a tenyésztési végéig fokozódott. A kultúrák biomassza termelése a kontrolnál kisebb ill, a legnagyobb koncentrációban adagolt kalciumsó hatására jelentősen csökkent, de nem különbözött szignifikánsan a 300 mg/l  $CaCl_2$  tartalmú táptalajon mért értékektől.

Maximális lobelin tartalma a 75 mg/l  $CaCl_2$  tartalmú táptalajon nevelt kultúrákban detektáltunk, mely mintegy 1,5-szerese volt a  $CaCl_2$  mentes tápközegben nevelt kultúrákban vagy a kontrol tenyésztésben mért értékeknek. A legmagasabb lobelin produkciót a kontrol, valamint a 75 mg/l  $CaCl_2$  koncentrációjú táptalajon nevelt kultúrák érték el.

A  $CaCl_2$  nagyobb koncentrációban fokozta a poliacetilén tartalmat. Jelentős értéket mértünk azonban a  $CaCl_2$  mentes táptalajon is. Maximális lobetiolin produkciót az alaptáptalajhoz képest kétszeres, míg maximális lobetiolin produkciót a négyszeres  $CaCl_2$  koncentrációjú táptalajon nevelt kultúrák érték el.

#### ***Nátrium-dihidrogén-foszfát hatása***

A *hairy root* kultúrák növekedési intenzitásának mérése során a  $NaH_2PO_4$  hatására nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket. Legtöbb biomasszát a kontrol (150 mg/l  $NaH_2PO_4$ ), ill. a négyszeres  $NaH_2PO_4$  koncentrációt tartalmazó táptalajon nevelt kultúrák termelték.

A szövetek maximális lobelin tartalma a 600 mg/l  $NaH_2PO_4$  esetén volt detektálható. A legmagasabb lobelin produkciót kontrol, ill. a 600 mg  $NaH_2PO_4$  koncentrációt tartalmazó táptalajon nevelt kultúrák érték el.

A  $NaH_2PO_4$  koncentrációjának változtatása a poliacetilének közül a lobetiolin tartalmat nem befolyásolta szignifikánsan, azonban a négyszeres koncentrációban adagolt só a lobetiolin tartalmat a kontrolhoz képest csaknem 70%-al fokozta, mely hatására a lobetiolin produkció jelentős mértékben, mintegy 60%-al fokozódott.

#### ***Ammónium - és nitrátok hatása***

A *hairy root* kultúrákat  $KNO_3$ -ot és  $(NH_4)_2SO_4$ -ot négy különböző arányban, ill. koncentrációban tartalmazó B5 táptalajon tenyésztettük. A biomassza termelés a B5 alaptáptalajon nevelt kultúrák esetében volt a legjelentősebb, míg a legnagyobb ammónium és nitrát koncentráció (MS táptalajnak megfelelő) gátolta a növekedést. Az  $(NH_4)_2SO_4$  koncentrációjának növelése szignifikánsan csökkentette a biomassza termelést, abban az esetben is amikor a tápközeg  $KNO_3$  koncentrációja változatlan volt.

Vizsgálataink kiegészítésére a *hairy root* kultúrákat különböző (0-536 mg/l) koncentrációjú  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tartalmú szilárd B5 táptalajon tenyésztettük. A B5 alaptáptalajon nevelt kultúrák viszonylag intenzíven növekedtek, biomassza képzésük kiemelkedő volt. Az ammóniumsó a legnagyobb koncentrációban szignifikánsan gátolta a biomassza termelést.

A vizsgálatok azt mutatták, hogy a B5 táptalajon tapasztalt, az MS tápközeghez képest kedvezőbb növekedés leginkább a B5 tápközeg alacsonyabb ammóniumsó koncentrációjára, valamint a magasabb  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  arányára vezethető vissza.

#### **• Növekedési regulátorok hatásának vizsgálata**

Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a növekedési regulátorok kedvező hatást gyakoroltak a *L. inflata* kallusz és organizált kultúrák anyagcseréjére, így indokoltnak tartottuk, hogy a növekedési regulátorok hatását a *hairy root* kultúrák esetén is vizsgáljuk.

#### ***Naftilecetsav hatása***

A NES koncentrációjának növelése a *hairy root* kultúrák átlagos növekedés intenzitásának szignifikáns csökkenését, valamint a növekedés megindulásának időbeni eltolódását eredményezte. A NES hatására azonban az inokulumból kiinduló oldalágak számának fokozódása is megfigyelhető volt, mely befolyásolta a biomassza produkciót.

2 mg/l NES hatására maximális volt a biomassza képzés, mely a szárazsúly több mint 60%-os fokozását jelentette a kontrolhoz képest. A hormon nagyobb koncentrációban viszont gátolta a növekedést.

A lobelin tartalom és produkció szempontjából is a 0,2 mg/l NES-at tartalmazó táptalaj bizonyult a legelőnyösebbnek, melynek hatására a lobelin produkció 1,5-szeresére nőtt. A 0,2 ill. 2 mg/l NES-at tartalmazó táptalajon nevelt kultúrák összalkaloid tartalma a kontrolhoz képest mintegy 75%-al nőtt. A hormon nagyobb koncentrációban az összalkaloid tartalmat is csökkentette. Az összalkaloid produkciót leginkább a 2 mg/l NES fokozta (kontrolhoz képest 3-szorosára).

#### ***Indolecetsav hatása***

Megállapítottuk, hogy az IES hatására hasonló növekedési változások következtek be mint a NES esetében. Az 5 mg/l IES tartalmú táptalajon több mint 2-szeresére nőtt a kultúrák száraz súlya a kontrolhoz képest.

Maximális lobelin és összalkaloid tartalom a 0,2 mg/l IES hatására volt mérhető, mely meghaladta NES esetén mért értéket is. Legmagasabb lobelin és összalkaloid produkciót a kultúrák az 5 mg/l IES-at tartalmazó táptalajon érték el.

Az IES hatására a poliacetilén tartalom is fokozódott, maximális értéket a 10 mg/l IES tartalmú táptalajon nevelt kultúrákban detektáltunk. A poliacetilén produkció tekintetében az 5 ill 10 mg/l IES bizonyult legkedvezőbbnek.

*Az IES növekedésre gyakorolt hatása (metodikai vizsgálatok)*

Megállapítottuk, hogy az IES hatására bekövetkezett késleltetett hosszirányú növekedés az elágazások ütemét nem befolyásolta. Igazoltuk tovább, hogy az IES hatására fokozódott azon oldalágak száma, melyek közvetlenül az inokulumból vagy annak "közeléből" indultak ki. A hormon koncentrációjának fokozása pedig növelte a *hairy root* kultúrák maximális keresztmetszetét, mely az IES hatására végbement vastagodási folyamatot is jelezte. A térfogat mérésének eredményei azt mutatták, hogy 0,2 mg/l IES hatására a 2. hét után a növekedés-intenzitás fokozódott, mely intenzív összterfogat-növekedéssel is együtt járt, jelentősen hozzájárulva a maximális biomassza képzéséhez. Megállapítottuk továbbá, hogy az IES koncentráció függően csökkentette a *hairy root* kultúrák sűrűségét.

### **Kinetin hatása**

A kinetin jelentősen gátolta a *hairy root* kultúrák hosszirányú növekedését, ill. biomassza képzését, azonban hatására (az auxinokkal ellentétben) nem következett be a kultúrák hosszirányú növekedésének időbeni eltolódása.

Kinetin hatására a kultúrák lobelin tartalma és produkciója is erőteljesen csökkent.

### **• Prekurzor aminosavak hatásának vizsgálata**

Az alkaloid prekursor aminosavakat (Phe-t és Lys-t) külön-külön ill. együttesen adagoltuk a B5 alap (hormonmentes)- és hormon tartalmú (2 mg/l IES és 0,2 mg/l kinetin) táptalajokba. Megállapítottuk, hogy a hormonmentes táptalajon a *hairy root* kultúrák intenzíven növekedtek, míg a hormon tartalmú táptalajokon csak a 2. hét után indult meg a növekedés. Hormon-mentes táptalajon a Phe és Lys hatására a kultúrák biomassza termelése nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól, míg a két aminosav együttes adagolása a száraz súly jelentős csökkenését eredményezte. Mindkét aminosavat és hormont együttesen tartalmazó táptalajon nevelt kultúrák száraz súlya azonban mintegy 4-szeresére fokozódott.

A lobelin tartalom hormonmentes táptalajon Phe hatására fokozódott a kontrollhoz képest, míg mindkét aminosav egyidejű adagolása a lobelin tartalom csökkenését eredményezte. Hormonok együttes adására a lobelin tartalom csökkenését detektáltuk. A kultúrák lobelin produkciója fokozódott a Phe, ill. a Lys adagolására hormonmentes táptalajon, valamint hormontartalmú táptalajon a Lys, ill. mindkét aminosav együttes hatására.

### **• Szacharóz hatása folyékony tápközegben nevelt *hairy root* kultúrákra**

Az *in vitro* növénykultúrák növekedésükhöz általában külső szénforrást igényelnek, mely biztosítására leggyakrabban szacharózt alkalmaznak. Vizsgálataink során elemeztük, hogy a szacharóz koncentrációjának változtatása (0 és 12% között) hogyan befolyásolja a *hairy root* kultúrák univerzális/primer- és speciális/szekunder anyagcseréjét folyékony B5 táptalajban. Az 1% szacharózt tartalmazó tápközegben mért szárazsúly négyszeresére nőtt a 6% szacharóz hatására.

A szövetekben maximális összalkaloid tartalmat az 1% szacharózt tartalmazó táptalajon nevelt kultúrák esetén mértünk. A cukor koncentrációjának növelése az alkaloid tartalom szignifikáns csökkenését

eredményezte. A legmagasabb összalkaloid produkciót a 3%, ill. 6% szacharóz tartalmú táptalajon nevelt kultúrák esetén számítottuk.

Az alkaloidok jelentős mennyiségben (30-50%-ban) kioldódtak a folyékony tápközegbe. Ezt figyelembe véve a teljes összalkaloid produkció szempontjából 6 % szacharóz alkalmazása bizonyult optimálisnak.

Vizsgálataink kiegészítésére mértük a tápközeg pH-jának változását, és megállapítottuk, hogy a kultivációs periódus végén a tápközeg kémhatása a legtöbb kezelés esetében emelkedet. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a tápközegbe kioldódott alkaloidok jelentős mértékben hozzájárulhattak a pH növeléséhez, amely azonban önmagában nem eredményezhette a mért nagyságú kémhatás változást.

A legnagyobb szöveti poliacetilén tartalmat az 1% szacharóz koncentrációjú tápközegben nevelt kultúrákban detektáltunk. A kiemelkedően magas, 13% lobetiolin tartalom jelentősen meghaladta mind a szilárd táptalajon nevelt hairy root kultúrákban mért értékeket, mind pedig az irodalmi adatokat. Maximális poliacetilén produkciót 3% szacharóz tartalmú táptalajon érték el a kultúrák. A táptalajba csekély mennyiségű poliacetilén oldódott ki csak ki, ellentétben az alkaloidokkal.

#### **• Lobelia inflata hairy root kultúrák tenyésztése bioreaktorban**

A hatóanyag produkció fokozására kedvező lehetőséget kínál a szövettenyészetek fermentorban/bioreaktorban történő tenyésztése. A hairy root kultúrák esetén is beszámoltak speciálisan átalakított bioreaktorban végzett sikeres tenyésztésről. Munkánk során 10 literes buborékoszlopos bioreaktort alkalmaztunk. A hairy root-ok megtapadásának és erőteljesebb növekedésének érdekében a reaktortér középső részébe nylon hálót helyeztünk. A hatóanyag produkció fokozása érdekében a tenyésztés során különböző technológiákat alkalmaztunk.

#### **„Batch technológia”**

A tápközeg mennyiségét a tenyésztés során nem változtattuk. A hairy root kultúra a fermentáció elején rögzült a háléhoz és növekedésnek indult. A begyűjtést követően a biomassza mintegy 3,5-szeresére fokozódott. A kultúra poliacetilén tartalma, lényegében megfelelt a szilárd B5 alaptáptalajon nevelt hairy root kultúrákban detektált értékeknek, de nem érte el a rázatott lombikbikos tenyészetben mért értéket. A lobetiolin produkció 407 mg/kult., lobetiolinin produkció 177 mg/kult. volt.

#### **Fermentáció kivitelezése a táptalaj cseréjével**

A kultúra növekedésének felgyorsítása érdekében a B5 tápközéget több szakaszban adagoltuk a tenyészetbe, és egy alkalommal a tápközeg cseréjét is elvégeztük. A hairy root kultúra néhány nap elteltével a -“batch technológiához” hasonlóan- rögzült a nylon háléhoz és intenzív növekedésnek indult. A kultiváció végén a tenyészet friss súlya mintegy 9-szeresére növekedett. A szövetekben mért összalkaloid tartalom lényegében megegyezett a 3% szacharóz tartalmú B5 szilárd és folyékony táptalajon tenyésztett hairy root kultúrákban detektált értékekkel. Megállapítottuk, hogy a rázatott lombikos tenyészetbe hasonlóan az alkaloidok nagymértékben (csaknem 60%-ban) kioldódtak a tápközegbe. A teljes összalkaloid produkció 24,8 mg/kult. volt. A hatóanyagok HPLC analízisével

megállapítottuk, hogy a sem a szövetekben sem pedig a tápközegben nem volt mérhető mennyiségben lobelin.

A szövetben mért poliacetilének közül a lobetiolin tartalom megegyezett a 'batch fermentáció' során mért értékkel, míg a lobetiolinin tartalom annál alacsonyabb volt. A poliacetilének kevésbé oldódtak ki a a tápközegbe (lobetiolin 15%-ban, a lobetiolinin 12%-ban), az alkaloidoknál tapasztalt tendenciával szemben. Ezt figyelembe véve a teljes lobetiolin produkció 264 mg/kult., lobetiolinin produkció 59 mg/kultúra volt.

**Összefoglalva eredményeinket** megállapítható, hogy az általunk létrehozott intenzíven fejlődő és jelentős hatóanyag (jó alkaloid és kimagasló poliacetilén) tartalommal rendelkező *L. inflata in vitro* organizált kultúrák jó alapot szolgáltak a növény szabadföldi termesztéséhez, valamint a géntranszformált *hairy root* kultúrák előállításához. A *hairy root* kultúráink intenzív növekedéssel és magas bioszintetikus potenciállal rendelkeznek, kimagasló a szövetek poliacetilén tartalma, összalkaloid tartalmuk pedig eléri az intakt növényét. A tenyésztési körülmények optimális megválasztásával (pl. hormonok, prekursorok adagolása, fermentáció) a hatóanyag produkció további fokozása volt elérhető.

Munkánk során elért eredményeket alapul véve, terveink közt szerepel az izolált bioaktív vegyületekkel (pl. poliacetilének) farmakológiai vizsgálatok végzése.

## **KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS**

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Szőke Éva** professzor asszonynak, a biológia tudományok doktorának, a Farmakognózia Intézet igazgatójának, akinek ösztönző szavai meghatározóak voltak doktori munkám megkezdésében. Témavezetőként mindvégig nagy odaadással irányította munkámat és értékes szakmai tanácsaival nagymértékben segítségemre volt. Körültekintő és igényes munkája a jövőben is követendő példaként fog szolgálni számomra.

Köszönettel tartozom továbbá:

**Verzárné Dr. Petri Gizella** professzor asszonynak,

**Dr. Kursinszki László** adjunktus úrnak,

**Mathuny Rudolfné**nak,

**Bányai Péter**nek,

**Dr. Máthé Ákos** professzor úrnak,

**Molnár Zsolt**nak,

**Placzer Gábor**nak,

**Dr. Anna Krajewskan**ak,

**Dr. Kanji Ishimaru** professzor úrnak, és

**valamennyi munkatársam**nak.

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

### Folyóiratban megjelent publikáció:

1. Szőke, É., Neszmélyi, A., **Bálványos**, I., Krajewska, K. (1998) NMR characterisation of lobeline from *Lobelia inflata* tissue cultures. *Medical Science Monitor*, 4: 15-19
2. **Bálványos**, I., Kursinszki, L., Szőke, É. (2001) The effect of growth regulators on the biomass formation and lobeline production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures. *Plant Growth Regulation*, 34: 339-345
3. Szőke, É., **Bálványos**, I., Kursinszki, L., Krajewska, A., Mészáros, A., Neszmélyi, A. (2001) Studies on the alkaloid production of genetically transformed and non-transformed cultures of *Lobelia inflata* L. *International Journal of Horticultural Science*, 2: 65-71
4. **Bálványos**, I., Szőke, É., Kursinszki, L. (2002) The influence of amino acids on the lobeline production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures. *Plant Growth Regulation*, 36: 241-244
5. **Bálványos**, I. Szőke, É., Kursinszki, L., Krajewska, A. Production of piperidine alkaloids in tissue cultures of *Lobelia inflata* L. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* (közlésre elfogadva)
6. **Bálványos**, I., Szőke, É., Kursinszki, L. Effect of macroelements on the growth and alkaloid production of *Lobelia inflata* L. hairy root kultures. *Acta Horticulturae* (in press)
7. Bányai, P., **Bálványos**, I., Kursinszki, L. and Szőke, É. Cultivation of *Lobelia inflata* L. hairy root culture in bioreactor. *Acta Horticulturae* (in press)

### Folyóiratban megjelent abstract:

8. Szőke, É., Neszmélyi A., Krajewska, A., **Bálványos**, I. (1996) *Lobelia inflata* szövetkultúrák alkaloidjainak NMR spektroszkópiás vizsgálata. *Gyógyszerészet*, 4: 247
9. **Bálványos**, I. Szőke, É., Kursinszki, L. (1998) Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures. *Magnesium Research*, 11: 237
10. **Bálványos**, I. Szőke, É., Kursinszki, L. (2001) Lobelin produkció fokozása géntranszformált *Lobelia inflata* L. kultúrákban. *Gyógyszerészet*, 5: 241-296
11. **Bálványos**, I., Vida, K., Tóth, E., Szőke, É. (2001) The effect of magnesium on the alkaloid production of *Atropa belladonna* L. hairy roots. *Magnesium Research*, 14: 163-164
12. **Bálványos**, I., László, I., Vida, K., Hank, H., Kursinszki, L., Tóth, E., Szőke, É. (2001) The effect of magnesium on the genetically modified *Atropa belladonna* L. cultures. *Magnesium Research*, 14: 309-310

### Könyvfejezet:

13. **Bálványos**, I. Szőke, É., Kursinszki, L. (1997): Connection between the magnesium content of the medium and the growth of the genetically transformed *Lobelia inflata* L. cultures. In: *Magnesium Current Status and New Developments. Theoretical, Biological and Medical Aspects*. Edited by Theophile Theophanides and Jane Anastassopoulou. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/ Boston/ London. pp. 85-87



14. **Bálványos**, I. Szőke, É., Kursinszki, L. (1998): Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures. In: Magnesium and Interaction of Magnesium with Trace elements. Ed. by Kiss A. S. Published by the Hungarian Chemical Society. Budapest. pp. 358-361
15. **Bálványos**, I., Vida, K., Tóth, E., Szőke, É. (2001) The effect of magnesium on the alkaloid production of *Atropa belladonna* L. hairy roots. In: Advances in Magnesium Research: Nutrition and Health. Ed. by Rayssiguier, Y., Mazur, A. and Durlach, J. John Libbey and Co Ltd. London. (in press)

### **Nemzetközi és hazai konferenciák (előadás, poszter):**

1. Szőke, É., Krajewska, A., **Bálványos**, I. (1995) NMR Characterisation of Alkaloids from *Lobelia inflata* tissue cultures. Medicinal plants research and utilization '95. Szeged. Abstracts, p. 83
2. Kéry, Á., Blázovics, A., Fejes, Sz., Prónai, L., **Bálványos**, I., Petri, G. (1995) Screening of medicinal plants for antioxidant activity. Medicinal plants research and utilization '95. Szeged. Abstracts, p. 84
3. Szőke, É., Neszmélyi A., Krajewska, A., **Bálványos**, I. (1996) *Lobelia inflata* szövettényezetekben a lobelin NMR spektroszkópiás azonosítása. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus X. Budapest. Előadás-összefoglalók, p. 37
4. Kéry, Á., Blázovics, A., Fejes, Sz., Prónai, L., **Bálványos**, I., Petri, G. (1996). Studies on the Antioxidant Activity of Medicinal Plants with Phytotherapeutical Significance. 44<sup>th</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research and a Joint Meeting with the Czech Biotechnology Society. Prague. Abstracts of lectures and poster presentations, p. 61
5. Szőke, É., Neszmélyi A., Krajewska, A., **Bálványos**, I. (1996) NMR Characterisation of lobeline from *Lobelia inflata* tissue cultures. V. Semmelweis Science Fair. Budapest. Abstracts, P-69
6. **Bálványos**, I., Szőke, É., Kursinszki, L., Neszmélyi A. (1997) Hairy root cultures of *Lobelia inflata* L. 45<sup>th</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research. Regensburg. Program and Abstracts, P-L24
7. **Bálványos**, I., Szőke, É., Kursinszki, L. (1997) Connection between the magnesium content of the medium and the growth of the genetically transformed *Lobelia inflata* L. cultures. VI. Semmelweis Science Fair. Budapest. Abstracts, p. 38
8. **Bálványos**, I., Szőke, É., Kursinszki, L. (1997) Connection between the magnesium content of the medium and the growth of the genetically transformed *Lobelia inflata* L. cultures. VIII International Symposium on Magnesium. Greece, Heraklion. Book of abstracts, p. 27
9. **Bálványos**, I., Szőke, É., Kursinszki, L. (1998) Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures. 6<sup>th</sup> European Magnesium Congress. Budapest. Book of abstracts, p. 11
10. **Bálványos**, I., Szőke, É., Kursinszki, L. (1998) Pécsi Fitoterápiás Napok. Összefoglalók, p. 32
11. **Bálványos**, I., Szőke, É., Kursinszki, L. (1998) Cultivation of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures on media with various concentration of macroelements. 46<sup>th</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research. Austria, Vienna. Abstracts of plenary lectures, short lectures and posters, P-C31

12. **Bálványos**, I., Szöke, É., Kursinszki, L. (1998) Cultivation of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures on media with various concentration of macroelements. VI. Semmelweis Science Fair. Budapest. Abstracts, p. 30
13. **Bálványos**, I., Szöke, É., Kursinszki, L. (1998) Piperidinvázas alkaloidok képződése *Lobelia inflata* L. géntranszformált hairy root kultúrákban. Farmakokinetika és Gyógyszermetabolizmus Szimposium. Mátraháza. Program és előadáskivonatok, p. 24
14. **Bálványos**, I., Szöke, É., Kursinszki, L., Krajewska, A. (1999) *Lobelia inflata* L. géntranszformált kultúrák növekedésének optimalizálása. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XI. Siófok. Programme, abstracts, pp. 69-70
15. Vida, K., **Bálványos**, I., Szöke, É., Tóth, E. (2000) The alkaloid production of *Atropa belladonna* L. hairy roots. 12<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology. Budapest. Abstracts, p. 100
16. **Bálványos**, I., Szöke, É., Kursinszki, L., Krajewska A., Neszmélyi, A. (2000) Biotechnical methods applied to increase the alkaloid production of *Lobelia inflata* L. 12<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology. Budapest. Abstracts, p. 99
17. **Bálványos**, I., Vida, K., Tóth, E., Szöke, É. (2000) The effect of magnesium on the alkaloid production of *Atropa belladonna* L. hairy roots. 9<sup>th</sup> International Magnesium Symposium. France, Vichy. Programme and book of abstracts, p. 181
18. Szöke, É., **Bálványos**, I., Kursinszki, L., Krajewska A., Neszmélyi, A. (2000) Influence of precursors on lobeline production of *Lobelia inflata* L. cultures. The 6<sup>th</sup> European Congress of Pharmaceutical Sciences. Budapest. Abstracts, P-277
19. **Bálványos**, I., Szöke, É., Kursinszki, L. (2000) A lobelin produkció fokozása géntranszformált *Lobelia inflata* L. kultúrákban. A gyógynövénykutatás aktuális kérdései: Növénykémia, Alkaloidkémia, Kemotaxonomia. MGYT Gyógynövény Szakosztályának, MTA Alkaloidkémiai Munkabizottságának, MTA Növénykémiai és Kemotaxonomiai Munkacsoportjának és SZAB Farmakognózia Munkabizottságának Szimpoziuma. Szeged
20. **Bálványos**, I., László, I., Vida, K., Hank, H., Kursinszki, L., Tóth, E., Szöke, É. (2001) A magnézium hatása a géntranszformált *Atropa belladonna* kultúrákra. 7. Magyar Magnézium Szimpózium. Siófok, pp. 13-14.
21. **Bálványos**, I., Szöke, É., Kursinszki, L., Krajewska A., Neszmélyi, A. (2001) Effect of growth regulators and alkaloid precursors on lobeline production of *Lobelia inflata* L. cultures. World Conference on Medicinal and Aromatic Plants. Budapest. Program and abstracts, p. 217
22. Hank, H., Vida, K., László, I., **Bálványos**, I., Kursinszki, L., Tóth, E., Szöke, É. (2001) Investigation on the tropane alkaloid production of genetically modified *Atropa belladonna* L. in vitro cultures. World Conference on Medicinal and Aromatic Plants. Budapest. Abstracts, p. 265
23. Hank, H., **Bálványos**, I., László, I., Vida, K., Kursinszki, L., Kovács, Gy., Tóth, E., Szöke, É. (2002) Effect of magnesium on the alkaloid production of hairy root and reorganised plant cultures. The IIIrd Romanian Magnesium Symposium with international participation. Romania, Iasi. Abstract book, p. 135
24. **Bálványos**, I., Szöke, É., Kursinszki, L. (2002) *Lobelia inflata* hairy root kultúrák növekedésének és hatóanyagképzésének sajátosságai. Gyógynövények kutatása és felhasználása 2002. Kecskemét. Program és előadásösszefoglalók, p. 54
25. Hank, H., László, I., **Bálványos**, I., Kursinszki, L., Kovács, Gy., Tóth, E., Szöke, É. (2002) A magnézium hatásának vizsgálata *Atropa belladonna* L. géntranszformált gyökér-

és reorganizált növénykultúrákra. Gyógynövények kutatása és felhasználása 2002. Kecskemét. Program és előadásösszefoglalók, p. 92

26. Szőke, É., **Bálványos**, I., Kursinszki, L., Krajewska, A., Neszmélyi, A. (2002) The alkaloid production of genetically transformed and non-transformed cultures of *Lobelia inflata* L. 50<sup>th</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research. Spain, Barcelona. Book of abstracts, p.335