

## VLIV $\text{AgNO}_3$ NA PRODUKCI FLAVONOIDŮ KULTUROU *ONONIS ARVENSIS* L. *IN VITRO*

TŮMOVÁ L., POLÍVKOVÁ D.

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie

### SOUHRN

#### Vliv $\text{AgNO}_3$ na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. *in vitro*

Byl testován vliv abiotického elicitoru –  $\text{AgNO}_3$  v různých koncentracích na produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. Použití tohoto abiotického elicitoru se osvědčilo pro zvýšení produkce flavonoidů v kultuře *in vitro*. Maximální produkce bylo dosaženo po 24 hodinové elicitaci  $\text{AgNO}_3$  v koncentraci  $c_1$  (0,5 mg/l) – zvýšení o 934 % oproti kontrole (bez působení elicitoru).

**Klíčová slova:** *Ononis arvensis* L. – kalusová kultura – flavonoid –  $\text{AgNO}_3$  – abiotický elicitor

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 186–188

### SUMMARY

#### Effect of $\text{AgNO}_3$ on the Production of Flavonoids by the Culture of *Ononis arvensis* L. *in vitro*

The study tested the effect of abiotic elicitor,  $\text{AgNO}_3$ , in different concentrations, on the production of flavonoids in the callus culture *Ononis arvensis* L. The use of this abiotic elicitor proved to be good to increase the production of flavonoids in *in vitro* culture. The maximal production was achieved after a 24-hour elicitation with  $\text{AgNO}_3$  in a concentration  $c_1$  (0.5 mg/l) – an increase by 934 % versus the control (without the elicitor's action).

**Key words:** *Ononis arvensis* L. – callus culture – flavonoid –  $\text{AgNO}_3$  – abiotic elicitor

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 186–188

Má

Sekundární metabolity hrají významnou roli při adaptaci rostlin na podmínky prostředí a zároveň představují důležitý zdroj léčiv<sup>1)</sup>. V řadě případů je při výrobě léčiv výhodné vycházet přímo z rostlinného materiálu, někdy je to dokonce jediný možný způsob (syntetická výroba je buď zcela vyloučena, nebo je ekonomicky nevýhodná). Sběr divoce rostoucích rostlin i jejich pěstování je sezonní záležitostí, jejíž výsledek závisí na mnoha činitelích a nelze jej dále zvyšovat. Díky rozvoji biotechnologických věd jsou dalším možným zdrojem léčiv kultury rostlinných explantátů<sup>2)</sup>.

Problémem *in vitro* kultur je velmi nízká nebo nulová koncentrace požadovaných metabolitů. Nízké výtěžky souvisí se snížením nebo zablokováním enzymové aktivity a následně i metabolismu. Jedním z efektivních způsobů jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních je využití metody elicitace. Strategie je založena na faktu, že akumulace většiny sekundárních látek v rostlinách je součástí obranných mechanismů vyvolaných buď patogeny, nebo vlivy prostředí. Dosavadní poznatky naznačují,

že se jedná o ekonomicky výhodný způsob získávání přírodních látek, který bude v budoucnu nabývat na významu<sup>3)</sup>.

Experimenty provedené v minulých letech prokázaly, že po elicitaci solemi těžkých kovů dochází ke zvýšení produkce sekundárních látek v rostlinných tkáních. Například u kultury *Ononis arvensis in vitro* bylo pozorováno zvýšení produkce flavonoidů po aplikaci  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$  a  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{Hg}(\text{Cl})_2$ <sup>4-7)</sup>. Také v kalusové kultuře *Glycyrrhiza glabra* bylo zaznamenáno zvýšení obsahu glycyrrhizinu a glycyrrhetinu po elicitaci  $\text{CrCl}_3$  a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ <sup>8)</sup>.

V dalších pokusech byl proto testován účinek  $\text{AgNO}_3$  jako abiotického elicitoru s cílem zvýšit produkci flavonoidů v kultuře *Ononis arvensis* L. *in vitro*.

$\text{Ag}$  ionty ve formě  $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$  v koncentracích 15–40  $\mu\text{M}$  zvyšovaly tvorbu diterpenoidů – (tanshionin I, tanshionin IIA, cryptotanshionin) u kultury *Salvia miltiorrhiza*. Nárůst produkce těchto látek byl dvojnásobný 12. a 22. den působení tohoto elicitoru<sup>9)</sup>.

U *Capsicum annuum* byl zjištěn pozitivní vliv  $\text{AgNO}_3$

na tvorbu haploidních embryí z prašníků. Největší úspěch byl zjištěn u koncentrace 15 mg/l  $\text{AgNO}_3$  (45,7 embryí na 100 prašníků)<sup>10</sup>.

Dusičnan stříbrný byl také použit u *Coffea arabica* L. a *Coffea P ex Fr.* k somatické embryogenezi. Studie probíhala na MS médiu s obsahem 10–70  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ . Maximum embryí bylo získáno při použití roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci 40  $\mu\text{M}$ <sup>11</sup>.

U *Lagenaria siceraria* Standl. byl pozorován vliv na regeneraci výhonků z kotyledonu. Maximální regeneraci vykazovala kultivace na MS médiu s přidavkem 0,5 mg/l  $\text{AgNO}_3$ <sup>12</sup>.

U suspenzní kultury *Sussurea medusa* byl testován vliv glutathionu a  $\text{AgNO}_3$  na produkci sekundárních látek. Přídavek glutathionu či  $\text{AgNO}_3$  zvýšil produkci jaceosidinu a hispidulinu (z 32,01 na 51,25 mg/l a z 3,11 na 5,13 mg/l). Přidáním obou látek současně v koncentracích 0,01 a 1,0 mmol/l dosáhla produkce jaceosidinu a hispidulinu hodnot 84,3 a 7,9 mg/l. Použitím obou elicitorů současně bylo dosaženo lepších výsledků v produkci látek než použitím každého elicitoru samostatně<sup>13</sup>.

Produkce tropanových alkaloidů u *Brugmansia candida* byla ovlivněna působením některých biotických a abiotických elicitorů. Dusičnan stříbrný významně zvyšoval uvolňování skopolaminu a akumulaci skopolaminu a hyoscyaminu, za tento účinek je pravděpodobně zodpovědný inhibiční efekt  $\text{AgNO}_3$  na ethylen.  $\text{CaCl}_2$  neměl žádný efekt na uvolňování nebo akumulaci alkaloidů,  $\text{CdCl}_2$  pozitivně ovlivňoval uvolňování alkaloidů<sup>14</sup>.

Těžké kovy mohou indukovat oxidativní stres s nadprodukcí aktivních forem kyslíku, které rychle reagují s DNA, lipidy a proteiny způsobujícími buněčné poškození. Aktivní formy kyslíku mají snahu se transformovat na více stabilní chemické formy jako peroxid vodíku, který stimuluje obranný systém rostlin<sup>15</sup>.

## POKUSNÁ ČÁST

### Chemikálie

Methenamin, čistý; aceton, čistý; kyselina chlorovodíková, čistá; síran sodný bezvodý, čistý; chlorid hlinitý, čistý; kyselina octová ledová, čistá; methanol, p.a.; ethyl ester kyseliny octové, čistý; dusičnan stříbrný, čistý.

### Biologický materiál

Pro pokusy byla použita tkáňová kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Ononis arvensis* L. ve 54.–57. pasáži.

### Kultivace tkáňové kultury

Pro kultivaci kalusové kultury bylo použito médium (MS) podle Murashigeho a Skooga<sup>16</sup> s obsahem kyseliny  $\alpha$ -naftyl-octové v koncentraci 10 mg.l<sup>-1</sup> jako růstový regulátor. Kultivace kalusové kultury probíhala v 100 ml Erlenmayerových baňkách za teploty 25 °C a osvětlení s 16 hodinovou světelnou periodou. Pasážování se provádělo vždy 25. den kultivace.

Jako elicitor byl použit vodný roztok dusičnanu stříbrného v 5 různých koncentracích, a to:

$c_1$  0,50 mg/l ( $0,29 \cdot 10^{-5}$  mol/l);  $c_2$  5 mg/l ( $2,94 \cdot 10^{-5}$  mol/l);  $c_3$  10 mg/l ( $5,89 \cdot 10^{-5}$  mol/l);  $c_4$  15 mg/l ( $8,83 \cdot 10^{-5}$  mol/l) a  $c_5$  20 mg/l ( $11,77 \cdot 10^{-5}$  mol/l).

K elicitaci bylo použito vždy 40 baněk pro každou koncentraci elicitoru. Do 30 baněk byl přidán 1 ml roztoku elicitoru dané koncentrace a 10 baněk bylo použito jako kontrola. Kalusy byly odebírány po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách působení elicitoru. Kontrolní kalusy se odebíraly po 24 a 168 hodinách. V rámci každého časového intervalu působení elicitoru včetně kontrol bylo použito k odběru 5 baněk. Kalusy po odběru byly usušeny za laboratorní teploty, upráškovány a byl v nich stanoven obsah flavonoidů dle Českého lékopisu 2002<sup>17</sup>.

## DISKUZE A ZÁVĚR

Experimentální práce s abiotickými elicitory, zejména se solemi těžkých kovů, UV zářením a herbicidy, ukázaly, že s jejich použitím lze dosáhnout zvýšené produkce některých sekundárních metabolitů<sup>5</sup>.

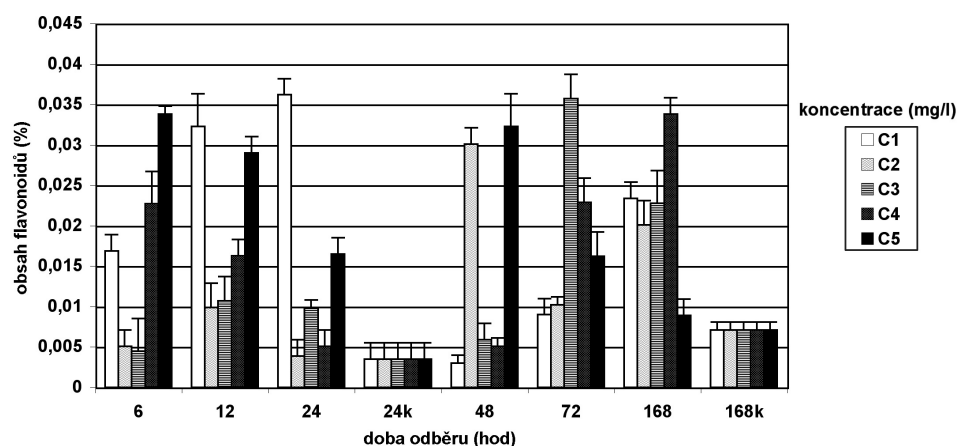
Na základě provedení všech elicitačních pokusů s dusičnanem stříbrným lze konstatovat, že ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonoidů došlo po aplikaci  $\text{AgNO}_3$  v koncentraci  $c_1$  po 6, 12, 24 a 168 hodinách. Při použití elicitoru v koncentraci  $c_2$  po 48, 72 a 168 hodinách. Elicitor v koncentraci  $c_3$  zvyšoval produkci flavonoidů po 12, 24, 72 a 168 hodinách; u koncentrace  $c_4$  byl zvýšen obsah flavonoidů po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách a při použití elicitoru v nejsilnější koncentraci  $c_5$  byl obsah flavonoidů zvýšen po 6, 12, 24, 48 a 168 hodinách (obr. 1 a 2).

Maximální nárůst produkce flavonoidů nastal po 24 hodinové elicitaci  $\text{AgNO}_3$  v koncentraci  $c_1$  (0,5 mg/l) – zvýšení o 934 % oproti kontrole (obr. 1 a 2), u koncentrace  $c_2$  (5 mg/l) maximální produkce nastala po 48 hodinách elicitace – zvýšení o 760 % (obr. 1 a 2); u koncentrace  $c_3$  (10 mg/l) maximální produkce se projevila po 72 hodinách – zvýšení o 920 % (obr. 1 a 2); u koncentrace elicitoru  $c_4$  (15 mg/l) také po 72 hodinách – zvýšení o 554 % (obr. 1 a 2) a u nejsilnější koncentrace elicitoru  $c_5$  (20 mg/l) po 6 hodinách působení elicitoru – zvýšení o 866 % v porovnání s kontrolou (obr. 1 a 2).

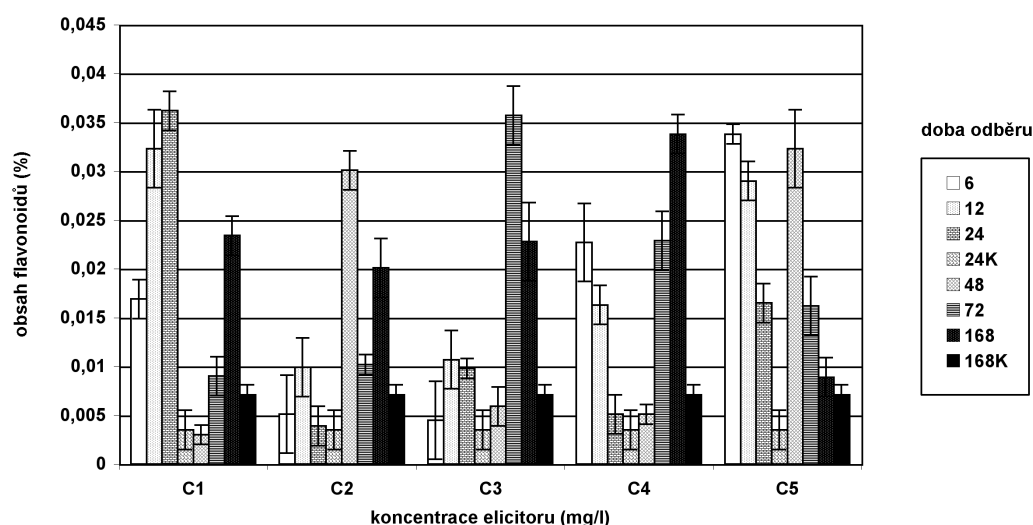
Nejvyšší nárůst obsahu flavonoidů tedy nastal po elicitaci roztokem  $\text{AgNO}_3$  – v koncentraci  $c_1$  (0,5 mg/l) po 24 hodinách a sice o 934 % ve srovnání s kontrolou.

Je zajímavé, že maximální zvýšení produkce flavonoidů nastalo ve většině případů po 24 nebo 48 hodinovém působení elicitoru, což lze vysvětlit tím, že buňky kultury *in vitro* reagují na působení elicitoru ( $\text{AgNO}_3$ ) poměrně rychle.

Dusičnan stříbrný je významným elicitem pro zvýšenou produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. *in vitro*. Výhoda jeho využití jako zástupce abiotických elicitorů spočívá v jeho nižší ceně a snadnější dostupnosti vůči biotickým elicitorům.



Obr. 1. Obsah flavonoidů (%) v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. v závislosti na době působení elicitoru



Obr. 2. Obsah flavonoidů (%) v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. v závislosti na koncentraci elicitoru

Práce byla vypracována za finanční podpory výzkumného záměru MS M0021620822.

## LITERATURA

- Bourgaard, F., Gravot, A., Milesi, S., Contier, E.: *Plant Sci.*, 2001; 161, 839.
- Sikyta, B., Dušek, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*. Karolínium, Praha, 1992, s. 84.
- Wu, J., Lin, L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002; 59, 51.
- Tůmová, L., Poustková, J., Tůma, J.: *Acta Pharmaceutica*, 2001; 51, 159.
- Tůmová, L., Blažková, R.: *Čes. slov. Farm.*, 2002; 51, 44.
- Tůmová, L., Rusková, R.: *Čes. slov. Farm.*, 1998; 47, 263.
- Tůmová, L., Tůma, J., Staňková, J.: *Herba Polonia*, 1998; 44, 27.
- Řimáková, J., Tůmová, L.: *Sborník příspěvků 2004. Konference Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin*, 15. 9. 2004, AF ČZU Praha.
- Zhang, Ch., Yan, Q., Cheuk, W. K., Wu, J. Y.: *Planta Med.*, 2004; 70, 147.
- Buyukalaca, S., Comlekcioglu, N., Abak, K. et al.: *Eur. J. Hort. Sci.*, 2004; 69, 206.
- Girindhar, P., Indu, E. P., Vinod, K., Chandrashekar, A. et al.: *Acta Physiol. Plantarum*, 2004; 26, 299.
- Han, J. S., Oh, D. G., Mok, I. G. et al.: *Plant Cell Reports*, 2004; 23, 291.
- Zhao, D. X., Fu, C. X., Han, Y. S., Lu, D. P.: *Process biochemistry*, 2005; 40, 739.
- Pitta-Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., Giuliatti, M.: *Enzyme Mikrob. Technic.*, 2000; 26, 252.
- Zacchini, M. et al.: *Plant Physiol. Biochem.*, 2003; 52, 189.
- Murashige, T., Skoog, F.: *J. Plant Physiol.*, 1962; 15, 473.
- Kolektiv autorů: *Český lékopis 2002*. Praha, Grada Publishing, 2002, s. 3655.

Došlo 13. 3. 2006.

Přijato ke zveřejnění 22. 5. 2006.

doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.  
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
e-mail: tumova@faf.cuni.cz