

**VLIV 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 AgNO_3 na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. *in vitro***

Byl testován vliv abiotického elicitoru – 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 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 – AgNO_3 – abiotický elicitor

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 186–188

SUMMARY**Effect of AgNO_3 on the Production of Flavonoids by the Culture of *Ononis arvensis* L. *in vitro***

The study tested the effect of abiotic elicitor, 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 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 – 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 ¹⁾. 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 ²⁾.

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 ³⁾.

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 NiCl_2 , CoCl_2 , CrCl_3 , CuSO_4 a CdCl_2 , $\text{Hg}(\text{Cl})_2$ ⁴⁻⁷⁾. Také v kalusové kultuře *Glycyrrhiza glabra* bylo zaznamenáno zvýšení obsahu glycyrrhizinu a glycyrrhetinu po elicitaci CrCl_3 a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ⁸⁾.

V dalších pokusech byl proto testován účinek AgNO_3 jako abiotického elicitoru s cílem zvýšit produkci flavonoidů v kultuře *Ononis arvensis* L. *in vitro*.

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

U *Capsicum annuum* byl zjištěn pozitivní vliv AgNO_3

na tvorbu haploidních embryí z prašníků. Největší úspěch byl zjištěn u koncentrace 15 mg/l AgNO_3 (45,7 embryí na 100 prašníků)¹⁰⁾.

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 μM AgNO_3 . Maximum embryí bylo získáno při použití roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci 40 μM ¹¹⁾.

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 AgNO_3 ¹²⁾.

U suspenzní kultury *Sussurea medusa* byl testován vliv glutathionu a AgNO_3 na produkci sekundárních látek. Přídavek glutathionu či 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 samostatně¹³⁾.

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 AgNO_3 na ethylen. CaCl_2 neměl žádný efekt na uvolňování nebo akumulaci alkaloidů, CdCl_2 pozitivně ovlivňoval uvolňování alkaloidů¹⁴⁾.

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 rostlin¹⁵⁾.

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 Skooga¹⁶⁾ s obsahem kyseliny α -naftyl-octové v koncentraci 10 mg.l⁻¹ 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 2002¹⁷⁾.

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 metabolitů⁵⁾.

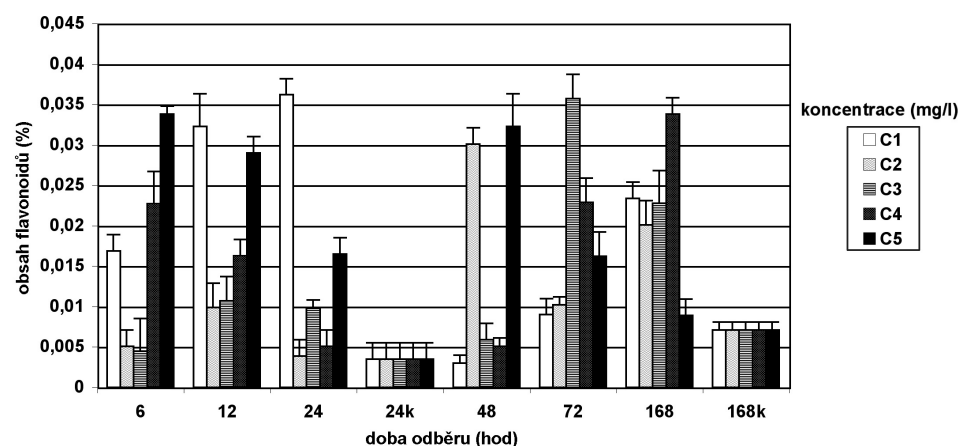
Na základě provedení všech elicitačních pokusů s dusičnanem stříbrným lze konstatovat, že ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonoidů došlo po aplikaci AgNO_3 v koncentraci c_1 po 6, 12, 24 a 168 hodinách. Při použití elicitoru v koncentraci c_2 po 48, 72 a 168 hodinách. Elicitor v koncentraci 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 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).

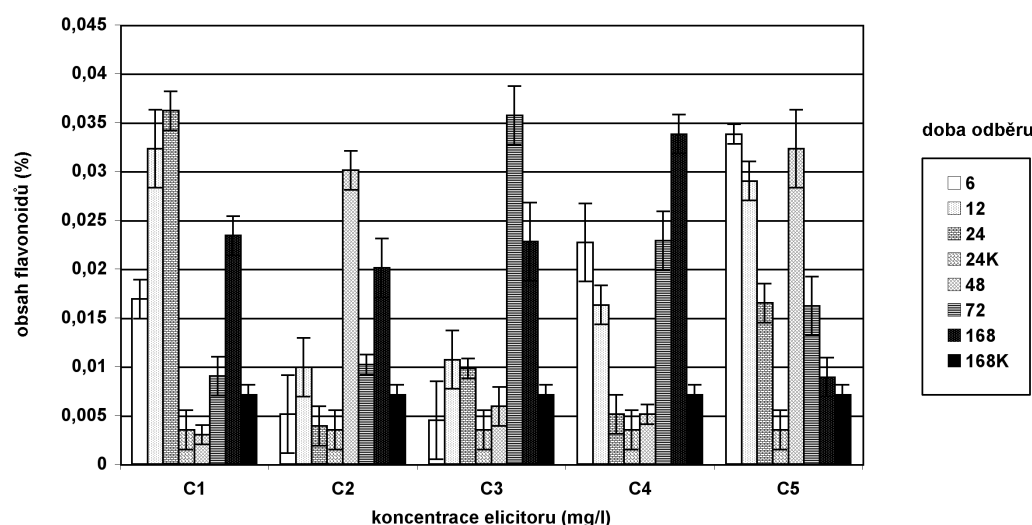
Nejvyšší nárůst obsahu flavonoidů tedy nastal po elicitaci roztokem AgNO_3 – v koncentraci c_1 (0,5 mg/l) po 24 hodinách a sice o 934 % ve srovnání s kontrolou.

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 (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

1. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Contier, E.: Plant Sci., 2001; 161, 839.
2. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty. Karolínium, Praha, 1992, s. 84.
3. Wu, J., Lin, L.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002; 59, 51.
4. Tůmová, L., Poustková, J., Tůma, J.: Acta Pharmaceutica, 2001; 51, 159.
5. Tůmová, L., Blažková, R.: Čes. slov. Farm., 2002; 51, 44.
6. Tůmová, L., Rusková, R.: Čes. slov. Farm., 1998; 47, 263.
7. Tůmová, L., Tůma, J., Staňková, J.: Herba Polonia, 1998; 44, 27.
8. Řimáková, J., Tůmová L.: Sborník příspěvků 2004. Konference Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, 15. 9. 2004, AF ČZU Praha.
9. Zhahg, Ch., Yan, Q., Cheuk, W. K., Wu, J. Y.: Planta Med., 2004; 70, 147.
10. Buyukalaca, S., Comlekcioglu, N., Abak, K. et al.: Eur. J. Hort. Sci., 2004; 69, 206.
11. Girindhar, P., Indu, E. P., Vinod, K., Chandrashekar, A. et al.: Acta Physiol. Plantarum, 2004; 26, 299.
12. Han, J. S., Oh, D. G., Mok, I. G. et al.: Plant Cell Reports, 2004; 23, 291.
13. Zhao, D. X., Fu, C. X., Han, Y. S., Lu, D. P.: Process biochemistry, 2005; 40, 739.
14. Pitta-Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., Giuliatti, M.: Enzyme Mikrob. Technic., 2000; 26, 252.
15. Zacchini, M. et al.: Plant Physiol. Biochem., 2003; 52, 189.
16. Murashige, T., Skoog, F.: J. Plant Physiol., 1962; 15, 473.
17. 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