Farmacie 4-06 10.7.2006 13:14 Str. 186
proLékaře.cz | 17.7.2025

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE
Ročník LV – Číslo 4 – ČERVENEC 2006

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).

K l í č o v á s l o v a: *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).

K e y w o r d s: *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 metabolizmu. 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 mechanizmů 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 $CdCl_2$, $Hg(Cl)_2$ [4–7]. Také v kalusové kultuře *Glycyrrhiza glabra* bylo zaznamenáno zvýšení obsahu glycyrrhizinu a glycyrrhetinu po elicitaci $CrCl_3$ a $Pb(NO_3)_2$ [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 $Ag_2S_2O_3$ v koncentracích 15–40 μM zvyšovaly tvorbu diterpenoidů –(tanshionin I, tanshionin IIA, cryptotanshion) 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 $AgNO_3$

proLékaře.cz | 17.7.2025

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 přídavkem 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 samostatně [13].

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 alkaloidů [14].

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 [15].

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 klíční rostliny *Ononis arvensis* L. ve 54.–57. pasáži.

Kultivace tkáňové kultury

Pro kultivaci kalusové kultury bylo použito médium (MS) podle Murashigeho a Skooga [16] s obsahem kyseliny α-naftyloctové 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 ($0,29.10^{-5}$ mol/l); c_2 5 mg/l ($2,94.10^{-5}$ mol/l); c_3 10 mg/l ($5,89.10^{-5}$ mol/l); c_4 15 mg/l ($8,83.10^{-5}$ mol/l) a c_5 20 mg/l ($11,77.\ 10^{-5}$ 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 [17].

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 [5].

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).

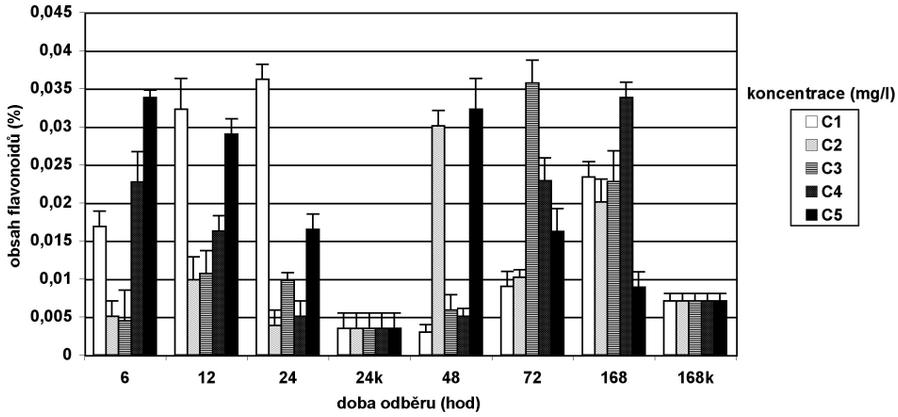
Maximální nárůst produkce flavonoidů nastal po 24 hodinové elicitaci $AgNO_3$ v koncentraci c_1 (0,5 mg/l) – zvýšení o 934 % oproti kontrole (obr. 1 a 2), u koncentrace c_2 (5 mg/l) maximální produkce nastala po 48 hodinách elicitace – zvýšení o 760 % (obr. 1 a 2); u koncentrace c_3 (10 mg/l) maximální 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.

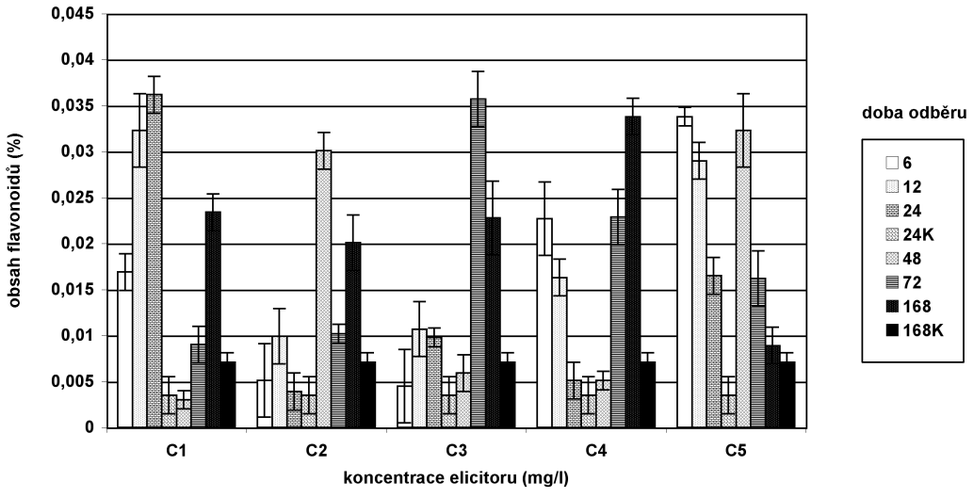
Je zajímavé, že maximální zvýšení produkce flavonoidů nastalo ve většině případů po 24 nebo 48 hodinovém působení elicitoru, což lze vysvětlit tím, že buňky kultury *in vitro* reagují na působení elicitoru ($AgNO_3$) poměrně rychle.

Dusičnan stříbrný je významným elicitorem 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.

proLékaře.cz | 17.7.2025



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. Karolínum, 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. Hortic. 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., Giulietti, 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