Farmacie 5-07 29.10.2007 11:29 Str. 230
proLékaře.cz | 18.9.2024

Vliv sloučenin vanadu na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L.

SIATKA T., KAŠPAROVÁ M.
Katedra farmakognozie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové

Došlo: 4. července 2007 / Přijato: 15. srpna 2007

SOUHRN

Vliv sloučenin vanadu na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L.

Rostlinné tkáňové kultury představují nadějný zdroj látek přírodního původu. Hlavním problémem jejich využití je nízká produkce většiny sekundárních metabolitů. Jednou z metod pro zvýšení tvorby těchto látek je elicitace, protože biosyntéza mnoha sekundárních metabolitů v rostlinných buňkách je součástí obranné reakce vůči biologickým nebo abiotickým stresovým vlivům. V práci byly testovány sloučeniny vanadu jako potenciální elicitory produkce kumarinů: vanadičnan sodný (0,2; 1; 10; 100 a 1000 μM/l média) a síran vanadylu (10; 20; 50; 100; 200 a 500 μM/l média). Současně byla sledována toxicita těchto sloučenin pro kulturu hodnocením vlivu na růst (charakterizován čerstvou a suchou hmotností biomasy na konci čtrnáctidenní kultivace). Kultury byly kultivovány na světle a ve tmě. Růst kultur není ovlivněn vanadičnanem sodným v koncentracích 0,2–100 μM. Koncentrace vanadičnanu 1000 μM působí již toxicky (ve srovnání s kontrolní kulturou jsou sníženy čerstvá hmotnost o 28 % a suchá hmotnost o 41 % při kultivaci na světle; čerstvá hmotnost o 69 % a suchá hmotnost o 66 % při kultivaci ve tmě). Síran vanadylu v koncentracích 10–50 μM neovlivňuje růst kultury, ve vyšších koncentracích ho postupně snižuje; koncentrace 500 μM působí již toxicky, opět výrazněji při kultivaci na světle (ve srovnání s kontrolní kulturou jsou sníženy čerstvá hmotnost o 27 % a suchá hmotnost o 38 % při kultivaci na světle; čerstvá hmotnost o 65 % a suchá hmotnost o 61 % při kultivaci ve tmě). Produkce kumarinů byla stimulována vanadičnanem sodným v koncentraci 0,2 a 1 μM při kultivaci na světle. Obsah kumarinů ve srovnání s kontrolní kulturou vzrostl především v médiu, a to o 46 % a 25 % při koncentraci vanadičnanu 0,2 a 1 μM. Síran vanadylu tvorbu kumarinů nezvyšoval.

Klíčová slova: *Angelica archangelica* L. – suspenzní kultura – růst – produkce kumarinů – vanad – toxicita – vanadičnan – síran vanadiu

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 230–234

SUMMARY

Effect of vanadium compounds on the growth and production of coumarins in the suspension culture of *Angelica archangelica* L.

Plant tissue cultures represent a promising source of substances of natural origin. The main problem of their use is a low production of the majority of secondary metabolites. One of the methods of increasing the production of these substances is elicitation, because the biosynthesis of many secondary metabolites in plant cells is part of the defensive reaction against biological or abiotic stress influences. The paper tested vanadium compounds as potential elicitors of the production of coumarins: sodium vanadate (0.2; 1; 10; 100 and 1000 μM/l of medium) and vanadyl sulfate (10; 20; 50; 100; 200 and 500 μM/l of medium). The toxicity of these substances for the culture was simultaneously monitored by means of the evaluation of the effects on growth (characterized by fresh and dry weights of biomass at the end of two-week cultivation). The cultures were grown both in the light and dark. The growth of the

Adresa pro korespondenci:
PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.
Katedra farmakognozie FaF UK
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail: siatka@faf.cuni.cz

Farmacie 5-07 29.10.2007 11:29 Str. 231
proLékaře.cz | 18.9.2024

cultures was not influenced by sodium vanadate at concentrations of 0.2 to 100 μM. A vanadate concentration of 1000 μM acted already toxically (in comparison with the control culture, the fresh weight was decreased by 28 % and the dry weight by 41 % when cultivated in the light; the fresh weight by 69 % and the dry weight by 66 % when cultivated in the dark). Vanadyl sulfate in concentrations of 10 to 50 μM did not affect the growth of the culture, at higher concentrations it decreased it gradually; a concentration of 500 μM acted already toxically, again more markedly when cultivated in the light (in comparison with the control culture, the fresh weight was decreased by 27 % and dry weight by 38 % when cultivated in the light; the fresh weight by 65 % and the dry weight by 61 % when cultivated in the dark). The production of coumarins was stimulated by sodium vanadate in a concentration of 0.2 and 1 μM when cultivated in the light. The content of coumarins increased in comparison with the control culture mainly in the medium by 46 % and by 25 % at vanadate concentrations of 0.2 and 1 μM, respectively. Vanadyl sulfate did not increase the production of coumarins.
Key words: *Angelica archangelica* L. – suspension culture – growth – coumarins production – vanadium – toxicity – vanadate –vanadyl sulfate

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 230–234 *Má*

Úvod

Rostlinné tkáňové kultury představují nadějný zdroj pro získávání látek přírodního původu. Hlavním problémem, který brání jejich využití, je nízká produkce většiny sekundárních metabolitů rostlinnými buňkami v podmínkách *in vitro* [1]. Proto jsou široce zkoumány různé možnosti zvýšení této produkce [2–6]. Jednou z metod je elicitace, založená na poznatku, že akumulace mnoha sekundárních látek v rostlinách a rostlinných tkáňových kulturách je součástí jejich obranné reakce vůči působení patogenů nebo stresových vlivů prostředí nebiologického původu (fyzikálních nebo chemických) [7–10]. Faktory vyvolávající obranné reakce se obecně označují jako elicitory. Mechanizmus účinku biotických a abiotických elicitorů není zcela znám. Stejně tak mnohdy chybí detailní znalost biosyntetických drah sekundárního metabolizmu. Vliv elicitoru na rostlinnou tkáňovou kulturu nelze tedy jednoduše předpovědět a musí být empiricky zkoušen.

V této práci je sledováno působení dvou sloučenin vanadu, vanadičnanu sodného a síranu vanadylu, jako potenciálních elicitorů v suspenzní kultuře anděliky lékařské.

POKUSNÁ ČÁST

Chemikálie

Chlorid thiaminia *puriss.*, chlorid pyridoxinia *puriss.* Koch–Light Laboratories, Colnbrook; skopoletin č. Fluka, Buchs; myoinositol, kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová Sigma, St. Louis; 6-benzylaminopurin reinst Serva, Heidelberg; glycin č., dihydrogenfosforečnan draselný *p.a.*, hydrogenfosforečnan sodný *p.a.*, kyselina nikotinová č., síran vanadylu *p.a.*, vanadičnanu sodný *p.a.*, metanol *p.a.*, sacharóza *p.a.* Lachema, Brno.

Přístroje

Autokláv PS 20A, Chirana, Brno; roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha; analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen; laboratorní odstředivka MPW 342, Med-Instruments, Varšava; laboratorní třepačka, IKA, Staufen; pístová pumpa, Alitea Instruments, Seattle; osmicestný selekční ventil, Vici Valco Instruments, Brockville; spektrofluorimetr FS 970, Spectra-Physics, Darmstadt.

Suspenzní kultura anděliky lékařské

K pokusům byla použita jedenáctiletá suspenzní kultura *Angelica archangelica* L., která byla kultivována na roleru v tekutém živném médiu podle Murashigeho a Skooga [11] (MS) s přídavkem 2 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 0,4 mg/l 6-benzylaminopurinu ve tmě a na světle (světelná perioda 16 hod. světlo/8 hod. tma). Pasážována byla ve čtrnáctidenním intervalu.

Účinek sloučenin vanadu byl sledován po přepasážování na MS média s různým obsahem zkoušené látky: u vanadičnanu sodného byly testovány koncentrace 0; 0,2; 1; 10; 100; 1000 μmol/l, u síranu vanadylu koncentrace 0; 10; 20; 50; 100; 200; 500 μmol/l média. Po čtrnáctidenní kultivaci byly buňky odděleny od média odsátím za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a zváženy pro zjištění čerstvé hmotnosti, poté byly usušeny a zváženy pro určení suché hmotnosti. Čerstvá a suchá hmotnost sloužily k hodnocení růstu kultur. V usušených buňkách a v médiu byl stanoven obsah kumarinů. Statistické vyhodnocení získaných výsledků bylo provedeno pomocí t-testu pro minimálně 3 členy souboru a hladinu významnosti p=0,05.

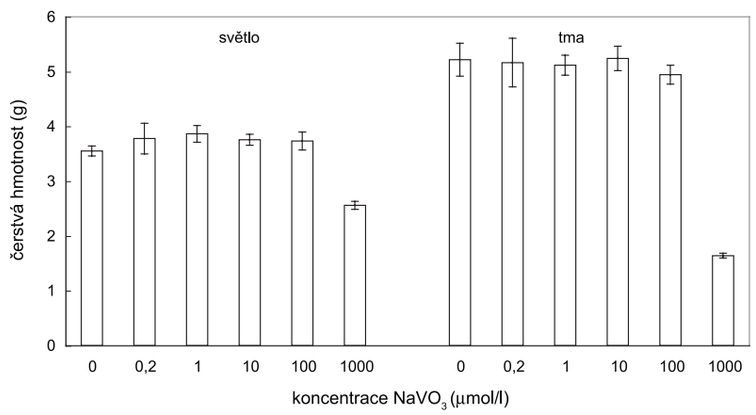
Stanovení kumarinů

Obsah kumarinů byl stanovován fluorimetricky technikou sekvenční injekční analýzy [12]. Podmínky stanovení byly následující: nosný proud – voda, průtoková rychlost 3 ml/min, mísící cívka 1,5 ml, dávkovaný objem vzorku 40 μl, dávkovaný objem fosforečnanového tlumivého roztoku o koncentraci 0,066 mol/l a pH6 100 μl, excitační vlnová délka 345 nm, emisní vlnová délka 390 nm. Jako standard byl použit skopoletin. Obsah kumarinů v buňkách byl vyjadřován v mg skopoletinu na g sušiny, v médiu v mg skopoletinu na litr média.

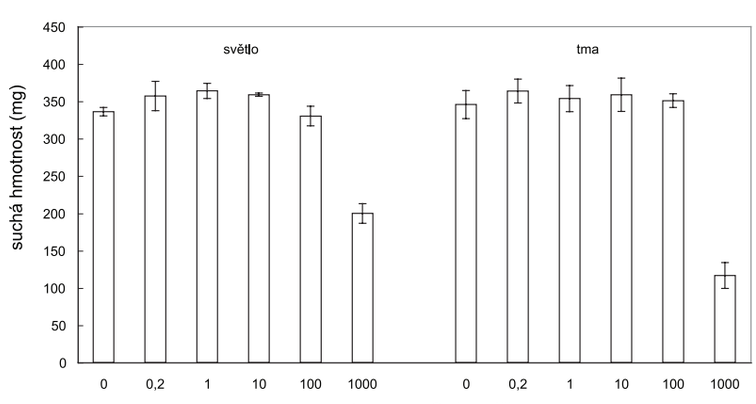
Farmacie 5-07 29.10.2007 11:29 Str. 232
proLékaře.cz | 18.9.2024

VÝSLEDKY A DISKUZE

Možnost využití chemických sloučenin jako abiotických elicitorů ke stimulaci produkce sekundárních metabolitů v rostlinných tkáňových kulturách poskytuje ve srovnání s biotickými elicitory některé výhody jako například snadnou dostupnost, relativně nižší cenu, definované složení. Vanadičnan sodný stimuluje například tvorbu isoflavonoidů v klíčních rostlinách *Cicer arietinum* [13] nebo benzofenantridinových alkaloidů v suspenzních kulturách *Eschscholtzia californica* [14]; síran vanadylu vykázal stimulační účinek na produkci indolových alkaloidů v suspenzních kulturách *Catharanthus roseus* [15] nebo taxanů v suspenzních kulturách *Taxus media* [16]. Vzhledem k pozorovanému pozitivnímu vlivu sloučenin vanadu na sekundární metabolizmus byly vanadičnan sodný a síran vanadylu testovány jako potenciální elicitory produkce kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské. Obě látky byly zkoušeny v širokém



Obr. 1a. Vliv vanadičnanu sodného na nárůst čerstvé hmotnosti suspenzní kultury anděliky lékařské

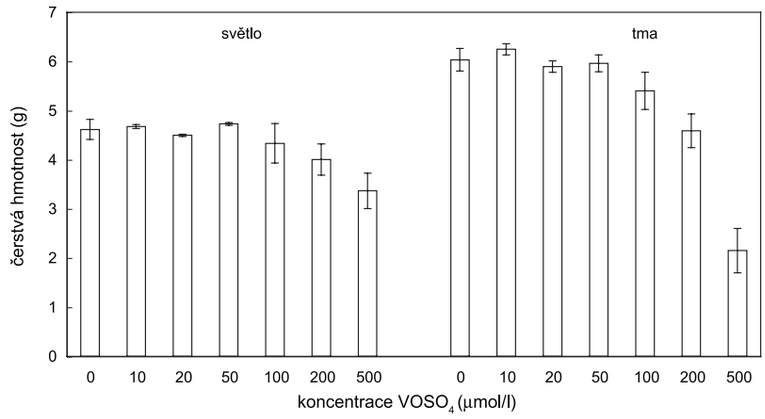


Obr. 1b. Vliv vanadičnanu sodného na nárůst suché hmotnosti suspenzní kultury anděliky lékařské

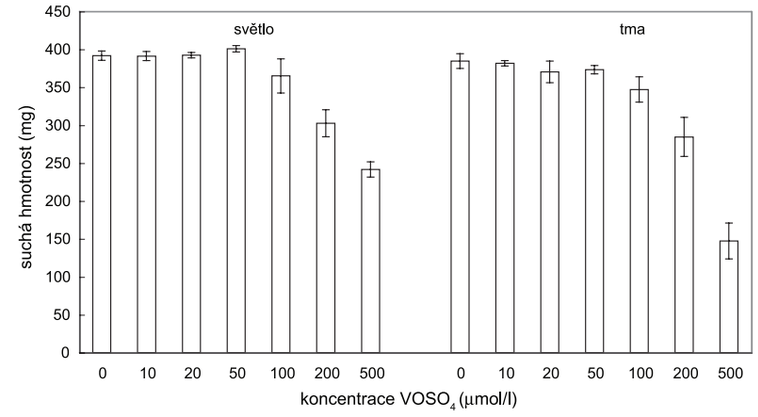
Tab. 1. Vliv vanadičnanu sodného na produkci kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské

Koncentrace $NaVO_3$ (μmol/l)	obsah kumarinů			
	kultivace ve tmě		kultivace za světla	
	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)
0	0,77±0,01	2,29±0,07	0,78±0,02	1,67±0,09
0,2	0,69±0,04	2,39±0,16	0,82±0,05	2,44±0,33
1	0,69±0,05	2,55±0,09	0,84±0,03	2,08±0,07
10	0,69±0,08	2,60±0,05	0,78±0,01	1,17±0,04
100	0,72±0,05	2,43±0,07	0,70±0,02	2,02±0,24
1000	0,15±0,02	1,71±0,03	0,32±0,03	0,24±0,04

proLékaře.cz | 18.9.2024



Obr. 2a. Vliv síranu vanadylu na nárůst čerstvé hmotnosti suspenzní kultury anděliky lékařské



Obr. 2b. Vliv síranu vanadylu na nárůst suché hmotnosti suspenzní kultury anděliky lékařské

Tab. 2. Vliv síranu vanadylu na produkci kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské

Koncentrace $VOSO_4$ (μmol/l)	obsah kumarinů			
	kultivace ve tmě		kultivace za světla	
	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)	buňky (mg/g sušiny)	médium (mg/l)
0	0,51±0,02	2,60±0,15	0,91±0,03	3,42±0,09
10	0,54±0,03	2,52±0,16	0,85±0,02	3,15±0,06
20	0,51±0,03	2,5±0,13	0,81±0,02	2,90±0,09
50	0,51±0,01	2,41±0,16	0,71±0,02	2,50±0,09
100	0,47±0,02	2,07±0,24	0,56±0,04	1,92±0,35
200	0,37±0,01	1,55±0,09	0,43±0,02	1,23±0,06
500	0,12±0,00	1,99±0,03	0,39±0,02	0,95±0,08

rozmezí koncentrací; byla sledována i jejich případná toxicita pro kulturu, a to hodnocením vlivu na růst, který byl charakterizován čerstvou a suchou hmotností biomasy na konci čtrnáctidenní kultivace. Kultury byly kultivovány ve tmě a na světle, protože světelné podmínky mohou výrazně ovlivnit růst rostlinných kultur i tvorbu sekundárních metabolitů [17–19].

Vliv vanadičnanu sodného na růst ukazuje obrázek 1a a 1b. Růst kultury anděliky lékařské není v rozmezí koncentrací 0,2 až 100 μmol/l ovlivněn. Koncentrace 1000 μmol/l vanadičnanu sodného působí již toxicky – při kultivaci na světle je nárůst čerstvé hmotnosti kultury o 28 % a suché hmotnosti o 41 % nižší ve srovnání s kontrolou, při kultivaci ve tmě je čerstvá hmotnost kultury snížena o 69 %, suchá o 66 %. Obsah kumarinů (tab. 1) v kulturách kultivovaných za světla i ve tmě nebyl ve většině případů působením vanadičnanu sodného v koncentraci 0,2 až 100 μmol/l výrazně ovlivněn; zvýšené množství kumarinů bylo nalezeno v médiu kultury kultivované za světla při koncentraci 0,2 a 1 μmol/l vanadičnanu (statisticky významné zvýšení o 46 % a 25 % ve srovnání s kontrolní kulturou), současně s mírným zvý-

Farmacie 5-07 29.10.2007 11:29 Str. 234
proLékaře.cz | 18.9.2024

šením obsahu kumarinů v buňkách těchto kultur. Podobný jev byl pozorován při elicitaci isoflavonoidů v klíčních rostlinách *Cicer arietinum* [13], při níž byla vanadičnanem mnohem více stimulována exkrece metabolitů než jejich akumulace v buňkách; je to dáváno do souvislosti s inhibičním působením vanadičnanu na H^+-ATPasu v plazmatické membráně, čímž je nejen vyvolána indukce tvorby sekundárních metabolitů, ale také ovlivněn jejich transport. Rovněž rozdílná reaktivita rostlinných buněk vůči elicitoru v závislosti na světelných podmínkách byla zaznamenána například v suspenzní kultuře *Digitalis lanata* [20]. Koncentrace 1000 μmol/l vanadičnanu sodného způsobila vedle výše zmíněné inhibice růstu též výrazný pokles tvorby kumarinů, což potvrzuje toxický vliv této koncentrace na metabolizmus kultur.

Účinek síranu vanadylu na růst suspenzní kultury anděliky lékařské je zobrazen na obrázku 2a a 2b. Růst kultur nebyl ovlivněn koncentracemi 10 až 50 μmol/l, poté dochází k jeho postupnému poklesu se zvyšující se koncentrací síranu vanadylu v médiu, výrazněji opět při kultivaci ve tmě – při koncentraci 500 μmol/l činí při kultivaci na světle snížení nárůstu čerstvé hmotnosti kultury 27 % a suché hmotnosti 38 % ve srovnání s kontrolou, při kultivaci ve tmě je čerstvá hmotnost biomasy snížena o 65 %, suchá o 61 % a lze tedy již hovořit o výrazně negativním působení na kulturu. Ovlivnění produkce kumarinů síranem vanadylu je shrnuto v tabulce 2. Žádná z použitých koncentrací síranu vanadylu nevedla ke stimulaci produkce kumarinů v kultuře andělíky; naopak s jeho rostoucí koncentrací v médiu docházelo postupně k poklesu obsahu kumarinů. Nepotvrdil se tedy příznivý účinek síranu vanadylu na sekundární metabolizmus, pozorovaný například v suspenzních kulturách *Catharanthus roseus* [15] nebo *Taxus media* [6].

Tato práce vznikla díky finanční podpoře výzkumného záměru č. MSM 0021620822.

LITERATURA

1. **Wu, J., Lin, L.:** Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002; 59, 51.
2. **Lee, M. H. et al.:** Proc. Biochem., 2007; 42, 899.
3. **Thanh, N. T. et al.:** Biol. Plant., 2006; 50, 752.
4. **Srivastava, S., Srivastava, A. K.:** Crit. Rev. Biotechnol., 2007; 27, 29.
5. **Chung, B. Y. et al.:** Rad. Phys. Chem., 2006; 75, 1018.
6. **Tanwar, Y. S., Mathur, M., Ramawat, K. G.:** Plant Growth Regul., 2007; 51, 93.
7. **Radman, R. et al.:** Biotechnol. Appl. Biochem., 2003; 37, 91.
8. **Quian, Z. G. et al.:** Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006; 71, 164.
9. **Gadzovska, S. et al.:** Plant Cell Org. Tiss. Cult., 2007; 89, 1.
10. **Zhang, C. H. et al.:** Plant Sci., 2007; 172, 158.
11. **Murashige, T., Skoog, F.:** Physiol. Plant., 1962; 15, 473.
12. **Paseková, H., Polášek, M., Solich, P.:** Chem. Listy, 1999; 93, 354.
13. **Armero, J., Tena, M.:** Plant Sci., 2001; 161, 791.
14. **Villegas, M., Sommarin, M., Brodelius, P. E.:** Plant Physiol. Biochem., 2000; 38, 233.
15. **Tallevi, S. G., DiCosmo, F.:** Planta Med., 1988; 54, 149.
16. **Bonfill, M. et al.:** Plant Physiol. Biochem., 2003; 41, 91.
17. **Szakiel, A. et al.:** Plant Physiol. Biochem., 2003; 41, 271.
18. **Chattopadhyay, S. et al.:** J. Biosci. Bioeng., 2002; 93, 215.
19. **Walker, T. S. Bais, H. P., Vivanco, J. M:** Phytochemistry, 2002; 60, 289.
20. **Ohlsson, A. B., Berglund, T.:** J. Plant Physiol., 1989; 135, 505.

Abstrakta z akcí ČFS v časopisu Česká a slovenská farmacie

Redakce časopisu Česká a slovenská farmacie nabízí možnost zveřejňovat limitované množství abstrakt z odborných akcí pořádaných Českou farmaceutickou společností, například sympozií, seminářů, pracovních dnů apod.

Jednotlivá abstrakta (písmo Courier New, velikost 12, řádkování 2), by neměla přesáhnout 1 rukopisnou stranu formátu A4.

Počet abstrakt předem dohodnou předsedové příslušných sekcí, které akci pořádají, případně osoby zodpovědné za akci s redakcí časopisu, která poskytne i bližší informace.

Lze zveřejnit rovněž na internetových stránkách ČFS (www.cfs-cls.cz)

Kontakt:

doc. RNDr. Pavel Komárek, PhD., vedoucí redaktor, Katedra farmaceutické technologie a kontroly léčiv IPVZ
100 05 Praha 10, Ruská 85, e-mail: komarek@ipvz.cz, tel.: 271 019 278