

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### VLIV CHLORIDU RTUŤNATÉHO NA PRODUKCI KUMARINŮ V SUSPENZNÍ KULTUŘE *Angelica archangelica* L.

TOMÁŠ SIATKA<sup>a</sup>, HANA SKLENÁŘOVÁ<sup>b</sup>,  
MARIE KAŠPAROVÁ<sup>a</sup> a PETR SOLICH<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra farmakognosie, <sup>b</sup> Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Universita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
siatka@faf.cuni.cz

Došlo 28.4.10, přijato 13.5.10.

Klíčová slova: *Angelica archangelica*, suspenzní kultura, růst, kumariny, elicitace, rtuť, sekvenční injekční analýza

#### Úvod

Rostliny jsou bohatým zdrojem sekundárních metabolitů, které nacházejí široké uplatnění v medicíně, potravinářství a kosmetice. U mnoha přírodních látek není ekonomicky schůdná chemická syntéza, a musí proto být získávány izolací z volně rostoucích nebo pěstovaných rostlin. Tento způsob má však svá omezení, jako jsou např. sezónnost, závislost na podmínkách prostředí, nebo choroby a škůdci. Slibnou alternativu představují rostlinné explantátové kultury. Jedním z hlavních problémů, který brání jejich širšímu komerčnímu využití, je nízká produkce sekundárních metabolitů kulturami *in vitro*<sup>1,2</sup>. Existuje mnoho faktorů, jež mohou vést ke zvýšení produkce, např. složení kultivačního média, typ a koncentrace růstových regulátorů, prekursorů, světelné podmínky, teplota, imobilizace, elicitace<sup>3–5</sup>.

Elicitace je intenzivně zkoumanou metodou; je založena na faktu, že akumulace mnoha sekundárních látek v rostlinách i explantátových kulturách je součástí jejich obranné reakce vůči působení stresových vlivů – elicitorů. Elicitory se rozdělují na biotické (např. mikroorganismy a jejich součásti) a abiotické (fyzikální, např. záření, nebo chemické, např. těžké kovy). Předpokladem úspěšné elicitace je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru a jeho množství<sup>6,7</sup>. Použití solí těžkých kovů jako elicitorů je z biotechnologického hlediska výhodné pro jejich definovaný charakter, dostupnost a snadnou práci s nimi.

Nedostatek detailních znalostí o biosyntetických drahách a jejich regulaci zatím nedovoluje cíleně zasáhnout do metabolismu rostlinné buňky, a proto je nutné vliv nej-

různějších faktorů na produkci sekundárních metabolitů v explantátových kulturách zkoušet experimentálně. K tomu je zapotřebí citlivá analytická metoda, která umožní jednoduché a rychlé kvantitativní stanovení produkovaných látek ve velkých sériích vzorků. Pro tento účel je velmi vhodná sekvenční injekční analýza (SIA)<sup>8</sup>. SIA systém je tvořen jednorázovým dvousměrným pístovým čerpadlem, vícecestným selekčním ventilem, mísicí cívkou, detektorem a počítačem. Princip SIA spočívá v tom, že jsou zóny nosného média, vzorku a činidel nejprve nasáty do jednorázového systému s využitím selekčního ventilu a pístového čerpadla a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zón a dopravení disperze do detektoru. Doba trvání jednoho měřicího cyklu v SIA většinou nepřesahuje 30 s (cit.<sup>8,9</sup>).

Pro studium faktorů ovlivňujících produkci kumarinů *in vitro* byla založena suspenzní kultura anděliky lékařské; v médiu této kultury je obsažen skopoletin, buňky obsahují skopoletin a skopolin<sup>10</sup>. Cílem této práce bylo sledování vlivu chloridu rtuťnatého jako potenciálního elicitoru na buněčný růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské.

#### Experimentální část

##### Chemikálie

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., hydrogenfosforečnan sodný p.a. (oba Penta, ČR); skopoletin p. (Fluka, ČR); chlorid rtuťnatý p.a., methanol p.a. (oba Lachema, ČR).

##### Přístroje

Analytické váhy A 200S (Sartorius, Göttingen, SRN); laboratorní odstředivka MPW 342 (Med-Instruments, Varšava, Polsko); laboratorní třepačka KS 501 (IKA Labor-technik, Staufen, SRN); pístová pumpa (Alitea Instruments, Seattle, USA); osmicestý selekční ventil (Vici Valco Instruments, Brockville, USA); spektrofluorimetr FS 970 (Schoeffel Instrument Corp., Westwood, USA).

##### Biologický materiál

K pokusům byla použita suspenzní kultura odvozená ze vzrostného vrcholu *Angelica archangelica* L.; kultura byla kultivována v tekutém živném médiu podle Murashigeho a Skooga<sup>11</sup> (MS) s přidavkem 2 mg l<sup>-1</sup> kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové a 0,4 mg l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinu; kultivace probíhala ve tmě nebo na světle (světelná perioda 16 h světo/8 h tma) na roleru (8 ot min<sup>-1</sup>); subkultivační interval byl čtrnáct dní<sup>10</sup>.

Pro sledování vlivu rtuťnatých iontů byla kultura přesazována do MS médií s přidavkem chloridu rtuťnatého v koncentraci 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50 a 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  média. Kultivace v MS médiu bez přidavku chloridu rtuťnatého sloužila jako kontrola. Po čtrnáctidenní kultivaci byly kultury sklizeny. Buňky byly odděleny od média odsátím za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a zváženy pro zjištění čerstvé hmotnosti, poté byly usušeny za laboratorní teploty 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. Všechny experimenty byly uskutečněny ve třech opakováních. Statistické vyhodnocení vlivu elicitoru na suspenzní kulturu anděliky lékařské bylo provedeno t-testem rozdílů průměrů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

#### Parametry SIA systému pro stanovení kumarinů

Stanovení kumarinů bylo prováděno fluorimetricky technikou sekvenční injekční analýzy. Podmínky stanovení byly následující: nosný proud – voda, průtoková rychlost 3  $\text{ml min}^{-1}$ , mísící cívka 1,5 ml, dávkovaný objem vzorku 40  $\mu\text{l}$ , dávkovaný objem fosforečnanového tlumivého roztoku o koncentraci 0,066  $\text{mol l}^{-1}$  a pH 6 byl 100  $\mu\text{l}$  (fluorescence kumarinů s ionizovatelnou fenolickou skupinou závisí na pH; pH 6 bylo zvoleno jako hodnota, kolem níž se obvykle pohybuje pH živného média po kultivaci rostlinných buněk), excitační vlnová délka 345 nm, emisní vlnová délka 390 nm. Kvantifikace byla provedena metodou vnějšího standardu – kalibrační křivky skopoletinu. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu koncentrací 0,1 až 7,5 mg skopoletinu  $\text{l}^{-1}$  s korelačním koeficientem  $R = 0,99992$  a limitem detekce (LOD pro 3  $S/N$ ) 7  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Opakovatelnost metody jako relativní směrodatná odchylka osmi opakování byla 1,13 %. Obsah kumarinů v médiu byl vyjadřován v mg skopoletinu na litr média, v buňkách

v mg skopoletinu na g sušiny. Metoda umožňuje provést asi 50 stanovení za hodinu.

#### Příprava vzorků

Usušené buňky byly po rozdrobnění v třecí misce třikrát extrahovány směsí stejných objemových dílů methanolu a fosforečnanového tlumivého roztoku o koncentraci 0,066  $\text{mol l}^{-1}$  a pH 6 vždy 15 min na třepače ( $150 \text{ ot min}^{-1}$ ) při laboratorní teplotě. Získané výluhy byly spojeny, doplněny extrakční směsí na 25 ml, odstředěny 10 min při  $3000 \text{ ot min}^{-1}$  a použity pro stanovení obsahu kumarinů. V médiích bylo stanovení kumarinů prováděno přímo.

#### Výsledky a diskuse

Chlorid rtuťnatý byl testován jako potenciální elicitor produkce kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské v rozmezí koncentrací 0,5 až 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Elicitory mohou negativně ovlivnit vitalitu rostlinných buněk *in vitro*, a proto byla sledována i toxicita chloridu rtuťnatého pro kulturu hodnocením účinku na nárůst biomasy na konci čtrnáctidenní kultivace. Kultury byly kultivovány ve tmě a na světle, protože světelné podmínky mohou mít výrazný vliv na růst explantátových kultur a tvorbu sekundárních metabolitů<sup>12,13</sup>.

Vliv chloridu rtuťnatého na růst kultury je shrnut v tabulce I. Jeho přidavek do média v koncentraci 0,5 až 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  neovlivnil ve srovnání s kontrolní kulturou růst při kultivaci ve tmě ani na světle; koncentrace 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  byla pro kulturu letální. Tolerance ke rtuťnatým iontům závisí na rostlinném druhu<sup>14</sup>. Např. v suspenzní kultuře *Sesbania drummondii* vedla koncentrace chloridu rtuťnatého 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  k redukci nárůstu biomasy<sup>15</sup>, pro suspenzní

Tabulka I  
Vliv chloridu rtuťnatého na růst suspenzní kultury anděliky lékařské

Koncentrace $\text{HgCl}_2$ [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	Kultivace ve tmě <sup>a</sup>		Kultivace na světle <sup>a</sup>	
	čerstvá hmotnost [g]	suchá hmotnost [mg]	čerstvá hmotnost [g]	suchá hmotnost [mg]
0	6,25 ± 0,14	381 ± 8	5,25 ± 0,15	380 ± 10
0,5	6,33 ± 0,05	376 ± 3	5,48 ± 0,11	370 ± 7
1	6,33 ± 0,23	376 ± 4	5,62 ± 0,23	372 ± 8
2	6,47 ± 0,02	377 ± 3	5,15 ± 0,52	372 ± 4
5	6,43 ± 0,11	372 ± 1	5,48 ± 0,20	379 ± 7
10	6,29 ± 0,12	374 ± 2	5,24 ± 0,11	369 ± 3
20	6,54 ± 0,23	371 ± 4	5,32 ± 0,07	352 ± 18
50	6,11 ± 0,24	361 ± 12	5,52 ± 0,27	363 ± 9
100	0,44 ± 0,03	36 ± 2	0,53 ± 0,02	41 ± 1

<sup>a</sup> Hodnoty představují průměr ± směrodatná odchylka ( $n = 3$ )

Tabulka II

Vliv chloridu rtuťnatého na obsah kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské

Koncentrace HgCl <sub>2</sub> [μmol l <sup>-1</sup> ]	Kultivace ve tmě <sup>a</sup>		Kultivace na světle <sup>a</sup>	
	buňky [mg g <sup>-1</sup> sušiny]	médium [mg l <sup>-1</sup> ]	buňky [mg g <sup>-1</sup> sušiny]	médium [mg l <sup>-1</sup> ]
0	0,51 ± 0,02	1,31 ± 0,12	0,62 ± 0,01	2,75 ± 0,05
0,5	0,50 ± 0,02	1,59 ± 0,10*	0,74 ± 0,01*	3,43 ± 0,02*
1	0,50 ± 0,01	1,59 ± 0,10*	0,75 ± 0,02*	3,08 ± 0,17*
2	0,49 ± 0,01	1,73 ± 0,08*	0,66 ± 0,04	3,06 ± 0,17*
5	0,52 ± 0,01	1,38 ± 0,05	0,67 ± 0,01*	3,04 ± 0,14*
10	0,53 ± 0,02	1,75 ± 0,12*	0,70 ± 0,03*	2,93 ± 0,09*
20	0,52 ± 0,01	2,23 ± 0,05*	0,89 ± 0,01*	4,46 ± 0,07*
50	0,42 ± 0,06	2,21 ± 0,23*	0,86 ± 0,04*	4,28 ± 0,12*
100	0,12 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,50 ± 0,07

<sup>a</sup> Hodnoty představují průměr ± směrodatná odchylka ( $n = 3$ ); hodnoty označené hvězdičkou jsou statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolní kulturou bez chloridu rtuťnatého ( $\alpha = 0, 05$ )

kulturu *Arachis hypogaea* byla koncentrace 1000 μmol l<sup>-1</sup> letální<sup>16</sup>.

Výsledky působení chloridu rtuťnatého na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* jsou uvedeny v tabulce II. Při kultivaci ve tmě nedošlo ke zvýšení obsahu kumarinů v buňkách; v médiu množství kumarinů stoupalo s rostoucí koncentrací rtuťnatých iontů k maximu při 20 μmol l<sup>-1</sup> (kumariny zvýšeny o 70 % ve srovnání s kontrolní kulturou). Při kultivaci na světle zvyšoval chlorid rtuťnatý obsah kumarinů v buňkách i v médiu, nejvíce v koncentraci 20 μmol l<sup>-1</sup> (zvýšení o 44 % v buňkách a o 62 % v médiu v porovnání s kontrolou). Podobně jako v kultuře *Angelica archangelica* stimuloval chlorid rtuťnatý produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Ipomoea batatas*<sup>17</sup>. Rozdílná reaktivita vůči elicitoru v závislosti na světelných podmínkách kultivace byla pozorována např. v suspenzních kulturách *Digitalis lanata*<sup>13</sup> nebo *Hypericum perforatum*<sup>18</sup>.

## Závěr

Závěrem lze konstatovat, že chlorid rtuťnatý je vhodným elicitorem pro stimulaci produkce kumarinů v suspenzní kultuře anděliky lékařské. Pro stanovení kumarinů byla vypracována jednoduchá a rychlá fluorimetrická sekvenční injekční analýza, která bude využita v dalších experimentech, zkoumajících možnosti ovlivnění produkce kumarinů v explantátových kulturách.

*Tato práce vznikla díky finanční podpoře výzkumného záměru MŠMT ČR reg. č. MSM 0021620822 a projektu SVV-2011-263-004.*

## LITERATURA

1. Simões C., Bizarri C. H. B., Cordeiro L. S., de Castro T. C., Coutada L. C. M., da Silva A. J. R., Albarello N., Mansur E.: *Plant Physiol. Biochem.* 47, 895 (2009).
2. Kolewe M. E., Gaurav V., Roberts S. C.: *Mol. Pharmaceutics* 5, 243 (2008).
3. Matkowski A.: *Biotechnol. Adv.* 26, 548 (2008).
4. Georgiev V., Ilieva M., Bley T., Pavlov A.: *Acta Physiol. Plant.* 30, 581 (2008).
5. Farkya S., Bisaria V. S., Srivastava A. K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 504 (2004).
6. Křížková S., Adam V., Kizek R.: *Chem. Listy* 103, 559 (2009).
7. Georgiev M. I., Weber J., Maciuk A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 809 (2009).
8. Valach M., Šturdík E.: *Chem. Listy* 103, 208 (2009).
9. Paseková H., Polášek M., Solich P.: *Chem. Listy* 93, 354 (1999).
10. Siatka T., Kašparová M.: *Čes. Slov. Farm.* 57, 17 (2008).
11. Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
12. Engelmann N. J., Reppert A., Yousef G., Rogers R. B., Lila M. A.: *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 98, 147 (2009).
13. Ohlsson A. B., Berglund T.: *J. Plant Physiol.* 135, 505 (1989).
14. Patra M. Sharma A.: *Bot. Rev.* 66, 379 (2000).
15. Israr M., Sahi S. V.: *Plant Physiol. Biochem.* 44, 590 (2006).
16. Xu Y., van Huystee R. B.: *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 32, 319 (1993).

17. Smith R. A., Drummond S., Haines A., Porter J. R., Hock R. S.: *Biotechnol. Lett.* 23, 1397 (2001).
18. Walker T. S., Bais, H. P., Vivanco, J. M.: *Phytochemistry* 60, 289 (2002).

**T. Siatka<sup>a</sup>, H. Sklenářová<sup>b</sup>, M. Kašparová<sup>a</sup>, and P. Solich<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>Department of Pharmacognosy, <sup>b</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové): **Effects of Mercury(II) Chloride on Production of Coumarins in *Angelica archangelica* L. Cell Suspension Cultures**

Elicitation is one of the methods for stimulation of secondary metabolism in plant cell cultures. The present study tested HgCl<sub>2</sub> solutions (0.5–100 μM) as an elicitor of the production of coumarins in angelica cell cultures. The

HgCl<sub>2</sub> toxicity was examined by evaluating its effect on cell growth (characterized by fresh and dry biomass at the end of a two-week subculture). Cultivations were performed in the dark or in light. The content of coumarins was determined fluorometrically by sequential injection analysis. The culture growth was not adversely affected by Hg concentrations up to 50 μM; the 100 μM concentration was lethal, independently of light conditions. HgCl<sub>2</sub> stimulated production of coumarins. In the dark, the amount of coumarins in the medium increased with increasing Hg concentrations up to 20 μM (the coumarin contents in the medium increased by 70 % compared with control) while it was not influenced in cultured cells. In light, HgCl<sub>2</sub> enhanced accumulation of coumarins both in the medium and cells; the highest yields were obtained at a Hg concentration of 20 μM. The content of coumarins increased by 62 % and 44 % in the medium and in cells, respectively.

---

---

## Vážení autoři, redakce Chemických listů na základě podnětů autorů nabízí novou službu

Vzhledem k množství rukopisů, které přicházejí do redakce, se čekací doba na vytištění prodlužuje až na **1,5 roku**. Pokud chcete tuto dobu zkrátit, nabízíme Vám následující nadstandardní službu:

**vytištění Vašeho příspěvku do dvou měsíců od skončení jeho recenzního a redakčního řízení.**

Za tuto nadstandardní službu Vám budeme účtovat dodatečné publikační náklady – 1000 Kč za jednu tiskovou stránku Chemických listů.

Podrobnější informace poskytnete technická redaktorka Ing. Řápková na tel. čísle 221 082 370, příp. 222 220 184 nebo na e-mailové adrese chem.listy@csvts.cz

Urychlete publikování Vašich prací **o více než jeden rok!**

---

---