



## Elicytacja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin z gatunku *Ammi visnaga*

Aleksandra Królicka, Ewa Łojkowska

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG, Gdańsk

### Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* culture of *Ammi visnaga*

#### Summary

*Ammi visnaga* (*Umbelliferae*) are subtropical annual plants, which contain two groups of pharmaceutically important substances: furanochromones and piranocoumarins. In order to check the possibility of the production of secondary metabolites, *in vitro* cultures of callus and cell suspension were established. The study was concentrated on the induction of production of secondary metabolites by exposing callus and cell suspension cultures to abiotic elicitors: acetylsalicylic acid, jasmonic acid and suspension of silicon dioxide and biotic elicitors: autoclaved lysates of *Enterobacter sakazaki* and scleroglucan. Thin layer chromatography of methanol extracts of cultures of *A. visnaga* did not indicate high induction of secondary metabolites production. Treatment of the callus cultures of *A. visnaga* with acetylsalicylic acid or jasmonic acid induce accumulation of furanochromone – visnagin and piranocoumarin – samidin. Exposing the callus and cell suspension cultures to the suspension of silicon dioxide indicated an induction of accumulation of furanochromone – keloglucoside. Further research will concentrate on quantitative determination of the level of accumulated compounds.

#### Adres do korespondencji

Ewa Łojkowska,  
Zakład Ochrony  
i Biotechnologii Roślin,  
Katedra Biotechnologii,  
Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii UG i AMG,  
ul. Kładki 24,  
80-822 Gdańsk;  
e-mail:

lojkowski@biotech.univ.gda.pl

#### Key words:

*Ammi visnaga*, abiotic and biotic elicitors, secondary metabolites.

## 1. Wstęp

Jednym z wielu interesujących pod względem farmakologicznym taksonów jest rodzaj *Ammi* z gatunkami: *Ammi majus* i *Ammi visnaga*. W nasionach *A. visnaga* (aminek egipski) gromadzone są substancje czynne z grupy furanochromonu i piranokumaryn, wykorzystywane do produkcji leków. Aminiek egipski występuje w rejonie od Wysp Kanaryjskich po Iran, w Argentynie, Australii i Nowej Zelandii (1). W Polsce gatunek ten jest uprawiany, ale wydajność plonowania jest bardzo niska ze względu na zbyt krótki okres wegetacji oraz wysoką podatność na infekcje bakteryjne i grzybowe.

Spośród związków z grupy furanochromonu (benzo- $\gamma$ -pironu) w nasionach aminka egipskiego gromadzone są: kelina, kelinol, kelol, wisnagina, ammiol i wisamiol. Obok tej grupy związków występują pochodne kumaryny (benzo- $\alpha$ -pironu) – piranokumaryny: wisnadyna i samidyna (2). Kelina jest najważniejszym farmakologicznie związkiem pozyskiwanym z nasion *A. visnaga*. Skutecznie zmniejsza stany skurczowe w obrębie dróg moczowych, naczyń mózgowych i wieńcowych (3).

Hodowle roślinne prowadzone w warunkach *in vitro* stwarzają szerokie możliwości produkcji substancji farmakologicznie czynnych (4-8). Jedną z możliwości podwyższania zawartości aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin leczniczych jest indukcja produkcji tych związków przez zastosowanie elicytorów (9-11). Celem badań przedstawianych w tym opracowaniu było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy w kulturach kalusa i zawiesiny komórkowej *Ammi visnaga* można uzyskać akumulację farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych pod wpływem stosowania elicytorów abiotycznych i biotycznych.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Kultury kalusa i zawiesiny komórkowej

Nasiona *Ammi visnaga* uzyskano z Ogrodu Roślin Leczniczych Katedry Biologii i Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu. Regenerację kultur *in vitro* oraz optymalny wzrost kalusa *A. visnaga* uzyskano na pożywce stałej Murashige i Skoog (MS) z dodatkiem regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin (5,0 mg/l IAA + 1,0 mg/l BAP lub 2,5 mg/l NAA + 1,0 mg/l KIN). W przypadku zawiesiny komórkowej największy przyrost masy uzyskano na pożywce płynnej MS zawierającej auksyny i cytokiny w następujących stężeniach: 0,1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP lub 0,1 mg/l GA<sub>3</sub> + 1,0 mg/l BAP (12).

## **2.2. Elicytory zastosowane do indukcji produkcji metabolitów wtórnych w kulturach kalusa i zawiesiny komórkowej *A. visnaga***

Elicytory dodawano do pożywek, na których rosły 4-tygodniowe kultury kalusa lub 3-tygodniowe kultury zawiesiny komórkowej.

### **2.2.1. Elicytory abiotyczne**

Kwas acetylosalicylowy (Polf) rozpuszczano w jałowej wodzie destylowanej i dodawano do pożywek do końcowego stężenia 1,0 mg/l pożywki. Kwas jasmonowy (Sigma) stosowano w stężeniu 1,5 mg/l pożywki. 6 g granulatu SiO<sub>2</sub> (Silica gel, Sigma) zawieszano w 100 ml H<sub>2</sub>O (Millipor), autoklawowano (0,7 atm/20 min) i zawiesinę dodawano do pożywek tak aby końcowe stężenie wynosiło 2,5 ml/l pożywki.

### **2.2.2. Elicytory biotyczne**

48-godzinne kultury bakterii z gatunku *Enterobacter sakazaki* rosnące na pożywce LB w temperaturze 37°C lizowano toluenem, a następnie autoklawowano (1,0 atm/30 min). Uzyskiwano zawiesinę zdegradowanych komórek bakteryjnych. 1 g skleroglukanu ( $\beta$ -1,3-glukan) izolowanego ze ścian komórkowych grzybów *Sclerotinia gluconicum* rozpuszczano w 100 ml ciepłej, jałowej wody. Oba preparaty dodawano do pożywek, tak aby końcowe stężenie wynosiło 2,5%.

## **2.3. Analiza metabolitów wtórnych zawartych w tkankach *A. visnaga***

Ekstrakcję ciągłą substancji zawartych w kulturach kalusa i zawiesiny komórkowej *A. visnaga* prowadzono w aparacie Soxhleta, stosując kolejno następujące rozpuszczalniki: eter, chloroform i metanol. Frakcje metanolowe były odparowywane do sucha i rozpuszczane w metanolu (3 g suchej masy/5 ml metanolu). Otrzymane ekstrakty nanoszono na płytki Kiesel gel 60G (Merck), a następnie rozwijano w układzie chloroform: metanol (98 : 2) w pionowej komorze Chropa. Chromatogramy odczytywano w świetle UV przy długości fali 365 nm.

### 3. Wyniki

#### 3.1. Wpływ elicytorów na wzrost kultur kalusa i zawiesiny komórkowej

W pierwszym etapie badań określano wpływ stosowanych elicytorów na tempo wzrostu kultur kalusa i zawiesiny komórkowej. Elicytory abiotyczne: kwas acetylosalicylowy i jasmonowy stymulowały około dwukrotne tempo wzrostu kalusa. Uzykiwano 120 mg suchej masy kalusa w ciągu osiemnastu dni hodowli w warunkach kontrolnych i około 240 mg w przypadku zastosowania każdego z wymienionych elicytorów. Także zastosowanie elicytorów biotycznych: zawiesiny autoklawowanych komórek bakterii *E. sakazaki* i skleroglukanu indukowało wzrost kalusa. Natomiast zastosowanie zawiesiny granulatu SiO<sub>2</sub> wyraźnie hamowało tempo wzrostu kalusa; uzyskiwano zaledwie około 40 mg suchej masy kalusa po osiemnastu dniach hodowli.

W przypadku zawiesiny komórkowej kwas acetylosalicylowy i jasmonowy indukował wzrost kultur; średnio obserwowano około dwukrotne przyspieszenie tempa wzrostu. Podobnie jak w przypadku kalusa zawiesina granulatu SiO<sub>2</sub> wyraźnie hamowała wzrost i podziały kultur komórek.

#### 3.2. Analiza fitochemiczna materiału roślinnego

Chromatografia cienkowarstwowa wyciągu metanolowego z nasion aminka egipskiego, z których wyprowadzono kultury *in vitro*, pozwoliła na stwierdzenie obecności w ekstrakcie furanochromonów: keliny i wisnaginy, oraz piranokumaryn: wisnadyny. Poza nimi obserwowano obecność 4 innych nie zidentyfikowanych związków o wartościach R<sub>F</sub> odpowiednio: 0,35; 0,45; 0,51; 0,53 i fluorescencji w świetle UV odpowiednio: żółtej, białej, fioletowej oraz białej. Stwierdzono, że nasiona wykorzystane do założenia kultur *in vitro* zawierały mniejszą ilość związków farmakologicznie czynnych niż wskazywałyby na to badania Borkowskiego (13).

W ekstraktach z kultur kalusa *A. visnaga* nie poddanych elicytacji stwierdzono obecność wisnaginy i samidyny, nie wykrywano natomiast keliny. Na uwagę zasługuje fakt gromadzenia w kalusie w stosunkowo dużych ilościach nowych, nie zidentyfikowanych w nasionach, związków o wartości R<sub>F</sub> 0,20; 0,80 i 0,95, wykazujących w świetle UV żółtą, niebieską i fioletową fluorescencję.

Kultury kalusa hodowane z dodatkiem elicytorów abiotycznych: kwasu acetylosalicylowego i jasmonowego akumulowały większe niż hodowla bez elicytorów ilości wisnaginy i samidyny. W przypadku kultur z kwasem acetylosalicylowym stwierdzono także obecność w ekstrakcie wisnadyny. W obu ekstraktach stwierdzono pojawienie się kilku nowych, nie obserwowanych wcześniej i nie zidentyfikowanych

związków. Zastosowanie zawiesiny granulatu SiO<sub>2</sub> indukowało gromadzenie keloglukozydu nieobecnego ani w ekstraktach z nasion, ani w nieelicytowanych kulturach kalusa. Zastosowanie elicytorów biotycznych nie wpłynęło na znaczące zmiany jakościowe i ilościowe w składzie furanochromonów i piranokumaryn wytwarzanych w kulturach kalusa.

Chromatografia cienkowarstwowa ekstraktów metanolowych z komórek zawiesiny *A. visnaga* wykazała obecność wisnaginy i samidyny oraz pięciu nowych, nie zidentyfikowanych związków. Dodatek elicytorów nie wpłynął znacząco na zdolność zawiesiny komórkowej do gromadzenia furanochromonów i piranokumaryn. Jedynie w przypadku zastosowania jako elicytora zawiesiny autoklawowanych bakterii *E. sakazaki* stwierdzono znaczną indukcję produkcji nie zidentyfikowanego związku o wartości R<sub>F</sub> 0,80, wykazującego niebieską fluorescencję w świetle UV. Związek ten był obecny w zawieszynie hodowanej bez elicytorów, ale w śladowych ilościach.

#### 4. Dyskusja

W związku z trudnościami w uprawie roślin z gatunku *A. visnaga* w Polsce opracowano metodę hodowli tkanek tego gatunku w kulturach *in vitro*. Przetestowano kilka pożywek i około 60 kombinacji regulatorów wzrostu. W efekcie uzyskano dobrze rosnące kultury kalusa i zawiesiny komórkowej. Stwierdzono, że w uzyskanych kulturach gromadzone są niewielkie ilości metabolitów wtórnych z grupy furanochromonu i piranokumaryn. Na podstawie danych literaturowych wskazuje się, że zawartość metabolitów wtórnych wytwarzanych w kulturach *in vitro* może ulegać zmianom pod wpływem manipulacji składem soli mineralnych i regulatorów wzrostu w pożywce (14-16). W przedstawianych badaniach gatunku różnice w składzie soli i regulatorów wzrostu nie wpływały na istotne zmiany poziomu metabolitów wtórnych.

Ponieważ uzyskane ilości metabolitów wtórnych nie były zadowalające w następnym etapie zastosowano szereg elicytorów abiotycznych i biotycznych do indukcji akumulacji poszukiwanych związków. W wyniku przeprowadzonych badań w kulturach kalusa, hodowanych z dodatkiem elicytorów abiotycznych, stwierdzono indukcję produkcji wisnaginy, samidyny, keloglukozydu i kilku nowych nie zidentyfikowanych związków. Elicytory biotyczne tylko nieznacznie modyfikowały skład metabolitów z grupy furanochromonów i piranokumaryn uzyskiwanych w kulturach kalusa. Kultury zawiesin komórkowych, poddane elicytacji akumulowały mniejsze ilości metabolitów niż kultury kalusa. Spodziewano się, że w wyniku elicytacji kultur *in vitro* uzyskamy znaczącą indukcję produkcji metabolitów z grupy piranokumaryn i furanochromonów ponieważ naturalny mechanizm obrony przed stresem abiotycznym i patogenami w przypadku roślin z rodziny *Umbelliferae* związany jest z syntezą fitoaleksyn z grupy kumaryn, hydroksykumaryn i furanokumaryn (17,18).

Jakkolwiek kultury kalusa i zawiesiny komórkowej *A. visnaga* są zdolne do produkcji metabolitów wtórnych, wykazanie, że mogą one być źródłem związków far-

makologicznie czynnych dla przemysłu farmaceutycznego wymaga dalszych prac nad optymalizacją warunków hodowli, tak aby uzyskać większą akumulację pożądaných metabolitów, a także zastosowania metod analitycznych takich jak wysoko-sprawna chromatografia cieczowa i chromatografia gazowa do ilościowego oznaczenia ich zawartości.

## Literatura

1. Jędrzejko K., (1997), *Zarys wiedzy o roślinach leczniczych*, Śląska Akademia Medyczna, Katowice.
2. Evans W. C., (1996), *Trease and Evans' Pharmacognosy*, WB Saunders Company Ltd, 421-422.
3. Kohlmünzer S., (1998), *Farmakognozja*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
4. Teutonico R., Knorr D., (1984), *Food Technol.*, 38, 120-127.
5. Akerele O., Heywood V., Synghe H., (1991), *The conservation of medicinal plants*, Cambridge University Press, Cambridge, USA.
6. Furmanowa M., (1992), *Biotechnologia*, 19, 27-36.
7. Segura J., Perez-Bermudez P., (1992), *Biotechnology of medicinal plants*, Eds. Villa T. G., Abalde J. Servicio de Publications. Universidade de Santiago, 667-676.
8. Tumova L., Tuma J., Staňkova J., (1998), *Herba Polon.*, 1, 27-32.
9. Hahlbrock K., (1981), *The biochemistry of plants*, Vol. 7, Academic Press Inc., USA, 425-455.
10. Flores E. H., Filner P., (1985), *Primary and secondary metabolism of cell cultures*, Springer-Verlag, New York, 174-185.
11. Skrzypczak L., Thiem B., (1987), *Wiad. Botan.*, 31, 157-166.
12. Królicka A., Waleron K., Łojkowska E., (1997), *Acta Physiol. Plant.*, 19, 216.
13. Borkowski B., (1974), *Zarys farmakognozji*, PZWL, Warszawa.
14. El-Fitky F. K., Rimmel R. P., Staba E. J., (1989), *Planta Med.*, 55, 446-451.
15. Supniewska J., Dohnal B., (1977), *Acta Soc. Bot. Polon.*, 66, 559-567.
16. Kaul B., Staba E. J., (1967), *Planta Med.*, 15, 145-156.
17. Berenbaum M. R., Zangerl A. R., Nitao J. K., (1984), *Phytochemistry*, 23, 1809-1810.
18. Ingham J. L., (1973), *Phytopathology*, 78, 314-335.

Autorzy dziękują prof. Mariannie Turkiewicz za udostępnienie preparatu skleroglukanu.  
Praca finansowana z projektu KBN 0819/P04/98/15.