

PŮVODNÍ PRÁCE

Efekt troch rôznych elicitorov na produkciu sanguinarínu suspenznými kultúrami nízko-morfínovej odrody maku siateho (*Papaver somniferum* L.)

ANDREA BALAŽOVÁ, VÍTAZOSLAVA BLANÁRIKOVÁ, FRANTIŠEK BILKA, ANDREA BILKOVÁ, HANA KIŇOVÁ SEPOVÁ

Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Slovenská republika

Došlo 7. června 2011 / Prijato 7. července 2011

SÚHRN

Efekt troch rôznych elicitorov na produkciu sanguinarínu suspenznými kultúrami nízko-morfínovej odrody maku siateho (*Papaver somniferum* L.)

Práca sa orientuje na hodnotenie efektu troch rôznych elicitorov na produkciu sanguinarínu suspenznými kultúrami odvodenými z nízko-morfínovej odrody maku siateho. Ako elicitory sa použili CdCl_2 , metyljazmonát a homogenát z fytopatogénnej huby *Botrytis cinerea*, ktoré sa aplikovali do živného média 11-dňových suspenzných kultúr. Efekt elicitorov na tvorbu sanguinarínu sa monitoroval po 24, 48 a 72 h ich pôsobenia. Najvyššia produkcia sanguinarínu sa pozorovala po 48 h expozícii biotickým elicitorom z *Botrytis cinerea*, ktorý zvýšil tvorbu sanguinarínu v suspenzných kultúrach 5,3-krát. V prítomnosti $1 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CdCl}_2$ sa obsah sanguinarínu v suspenzných kultúrach zvyšoval lineárne a po 72 h bol 2,3-krát vyšší ako v neelicitovaných kultúrach. Suspenzné kultúry maku po elicitácii metyljazmonátom reagovali miernym nárastom produkcie sanguinarínu po 24 a 48 h. Výrazné zvýšenie tvorby tohto sekundárneho metabolitu sa v bunkách suspenzných kultúr zistilo až po jeho 72 h pôsobení a produkcia sanguinarínu bola 3-krát vyššia ako v neelicitovaných kultúrach.

Kľúčové slová: sanguinarín – metyljazmonát – *Botrytis cinerea* – CdCl_2 – elicitácia – mak siaty

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 237–240

SUMMARY

The effect of three different elicitors on sanguinarine production in suspension cultures of a low-morphine variety of the opium poppy (*Papaver somniferum* L.)

This paper is focused on the evaluation of the effect of three different elicitors on sanguinarine production in suspension cultures derived from a low-morphine variety of the opium poppy. The elicitors CdCl_2 , methyl jasmonate and a homogenate from the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* have been administered into the growth media of 11-day-old suspension cultures. Their effect on the production of sanguinarine was monitored after 24, 48 and 72 h of exposure. The highest sanguinarine production was observed after 48 h of exposure to the biotic elicitor *Botrytis cinerea*, which increased the sanguinarine production 5.3-times. In the presence of CdCl_2 at a concentration of 1 mmol.l^{-1} the content of sanguinarine increased linearly in suspension cultures and after 72 h of elicitation it was 2.3-times higher than in the

Adresa pro korespondenci:

PharmDr. Andrea Balažová, PhD.
Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv FaF UK
Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: balazova@fpharm.uniba.sk

non-elicited cultures. Opium poppy suspension cultures responded to methyl jasmonate elicitation by a moderate increase in sanguinarine production after 24 and 48 h. A significant increase in the production of this secondary metabolite in cell suspension cultures was observed after 72 h of exposure and it was 3-times higher than the production of sanguinarine in non-elicited cultures.

Key words: sanguinarine – methyl jasmonate – *Botrytis cinerea* – CdCl_2 – elicitation – opium poppy

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 237–240

Má

Úvod

Alkaloidy sú rôznorodou skupinou sekundárnych metabolitov, obsahujúcich dusík a nachádzajúcich sa v asi 20 % rastlinných druhov. Väčšina biochemického výskumu v oblasti rastlinných sekundárnych metabolitov sa zameriava hlavne na šesť skupín alkaloidov, a to benzylozochinolinové, monoterpénové indolové, tropánové, purínové, pyrolizidínové a chinolizidínové alkaloidy ¹⁾. Vďaka ich výrazným biologickým účinkom sú alkaloidy dlho využívané ako liečivá, stimulanty, narkotiká a jedy. Najmä farmakologické atribúty a sociálno-ekonomický význam alkaloidov maku siateho (*Papaver somniferum* L.) boli ocenené už dávnymi civilizáciami ²⁾. Rastlina maku siateho zostáva aj v súčasnej dobe jediným komerčným zdrojom pre izoláciu analgetického morfinu, antitusického kodeínu a tebaínu, používaného na prípravu semi-syntetického oxykodónu ³⁾. Globálny dopyt po opiátoch na báze morfinu sa z roka na rok zvyšuje ⁴⁾, čo vedie k hľadaniu nových zdrojov pre ich izoláciu. Sľubnými sa ukazovali *in vitro* kultúry maku siateho. Veľkým sklamaním však bolo zistenie, že dediferencované bunky maku siateho nie sú schopné tvoriť morfin ⁵⁾, a preto sú ako zdroj pre izoláciu morfinových alkaloidov nevyužiteľné.

In vitro kultúry maku siateho produkujú iný farmakologicky významný alkaloid – sanguinarín, ktorý našiel svoje uplatnenie aj v terapeutickú praxi ^{6,7)}. Až na výnimky, charakteristickým problémom rastlinných *in vitro* kultúr je nízka produkcia sekundárnych metabolitov. Podmienky zabezpečujúce zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov (alkaloidov, terpenoidov, fenolických látok) *in vitro* kultúrami, možno regulovať rôznymi spôsobmi ako napr. zmenou zloženia rastového média, úpravou pH, teploty, svetelného režimu a tiež využitím elicitorov ⁸⁾. Elicitácia je jedným z efektívnych biotechnologických postupov na zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov. Okrem biotechnologického významu, našla elicítácia využitie aj pri štúdiu obranných a signalizačných dráh pri interakciách rastlina – stresor v podmienkach *in vitro* ⁹⁾.

Cieľom našej práce bola evaluácia efektu vybraných typov elicitorov na produkciu sanguinarínu suspenznými kultúrami nízko-morfinovej odrody maku siateho s použitím spektrofotometrie.

POKUSNÁ ČASŤ

Príprava a kultivácia suspenzných kultúr maku siateho

Kalusové kultúry sme odvodili zo stonkových častí sterilne vyklíčených klíčnych rastlín maku siateho cv. Gerlach. Semená sme po odmastení 70% etanolom sterilizovali 15% roztokom prípravku Savo (20 min) a po viacnásobnom opláchnutí sterilnou destilovanou vodou sme ich umiestnili na agarové živné médium podľa Murashige a Skoog ¹⁰⁾ (MS) bez rastových regulátorov. Po dosiahnutí primeranej veľkosti sme rezky použili na odvodenie kalusu. Kalusy sme kultivovali na modifikovanom živnom médiu MS obohatenom o kinetín (0,3 mg.l⁻¹) a kyselinu α -naftyloctovú (2,0 mg.l⁻¹).

Suspenzné kultúry sme pripravili z kalusových kultúr, ktoré sme za aseptických podmienok preniesli do tekutého živného média MS rovnakého zloženia na akom sa kultivovali kalusy. Kultiváciu sme realizovali v kultivačnej miestnosti na trepacom zariadení (150 kmitov.min⁻¹) pri teplote 24–26 °C, relatívnej vlhkosti vzduchu 75–80 % a difúznym osvetlením.

Aplikácia elicitorov do živného média

Na elicítáciu sme použili 11-dňové suspenzné kultúry, ktoré sme elicitovali CdCl_2 , metyljasmonátom (MJ) a hydrolyzátom z mycélia fytopatogénnej huby *Botrytis cinerea*. Výsledná koncentrácia elicitorov v živnom médiu bola 1 mmol.l⁻¹ CdCl_2 , 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MJ a hydrolyzáta z *Botrytis cinerea* (glukózový ekvivalent 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) sme pridávali v objeme 1 ml na 60 ml živného média. Elicitory sme aplikovali za aseptických podmienok v boxe s laminárnym prúdením vzduchu a banky sme následne umiestnili na trepacie zariadenie (150 kmitov.min⁻¹). Dĺžka pôsobenia elicitorov bola 24, 48 a 72 h. Po ich uplynutí sme bunky filtráciou oddelili od živného média a skladovali pri -20 °C.

Izolácia, identifikácia a stanovenie obsahu sanguinarínu

Obsah sanguinarínu sme stanovili ako v neelicitovaných, tak aj v elicitovaných suspenzných kultúrach. Na

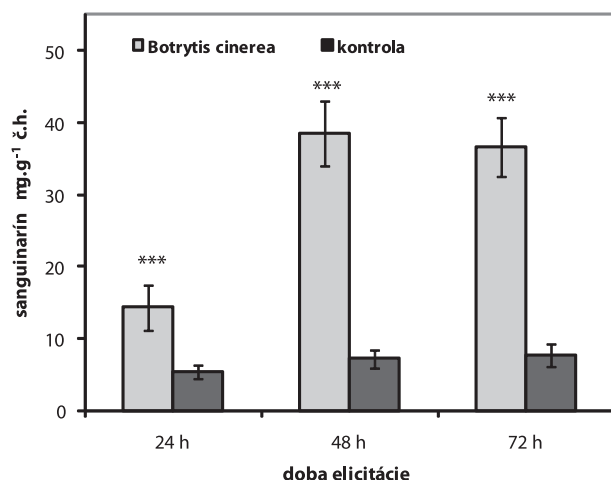
izoláciu, identifikáciu a kvantitatívne stanovenie sanguinarínu v bunkách suspenzných kultúr sme použili postup podľa Balažová a kol.¹¹⁾

Štatistika

Hodnoty uvádzame ako priemery z piatich paralelných experimentov s príslušnými hodnotami smerodajných odchýlok. Na vyhodnotenie experimentov sme použili Studentov nepárový t-test v programe STABEX/ EXCEL. Za hladinu štatistickej významnosti sme zvolili $p < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

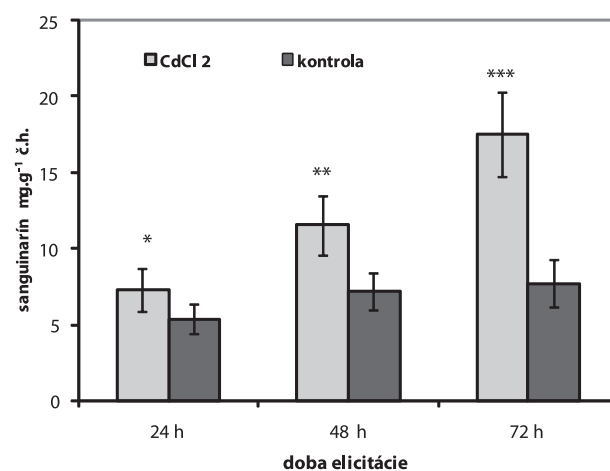
Za účelom izolácie morfinu sú pre farmaceutický priemysel zaujímavé odrody s vysokým obsahom morfinu. Odrody s nízkym obsahom morfinu sú určené pre produkciu semien a využitie v potravinárskom priemysle¹²⁾. Aj keď tieto odrody majú nízky obsah morfinu, môžu sa použiť pre experimentálne práce súvisiace s produkciou iných typov benzylozochinolíkových alkaloidov, ako napr. sanguinarínu, ktoré sú tiež využiteľné vo farmaceutickej praxi. Tvorba sekundárnych metabolitov samotný-



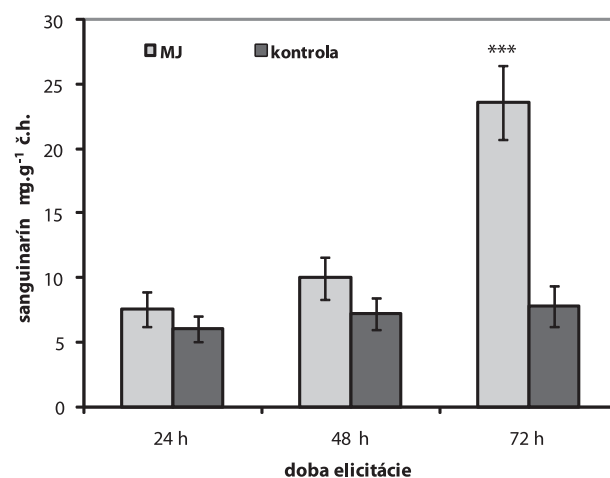
Obr. 1. Obsah sanguinarínu v suspenzných kultúrach maku siateho po elicitácii 1 ml homogenátu *Botrytis cinerea* ($n = 5$, *** $p < 0,001$)

mi bunkami suspenzných kultúr závisí od dĺžky ich kultivácie, tiež od časti rastliny, z ktorej sú odvodené, ako aj od použitej odrody¹³⁾.

V našej práci sme použili suspenzné kultúry maku siateho cv. Gerlach, ktorý patrí medzi slovenské nízko-morfínové odrody s 0,38% obsahom morfinu v sušine tobolek¹⁴⁾. Na stimuláciu tvorby sanguinarínu v bunkách suspenzných kultúr maku sme použili tri rôzne elicitory, z ktorých chlorid kademnatý¹⁵⁾ a metyljazmonát sa radia do skupiny abiotických elicitorov, kým *Botrytis cinerea* je elicitorom biotickým¹⁶⁾. Suspenzné kultúry maku siateho po ovplyvnení rôznymi elicitorami akumulujú v bunkách benzofenantridínový alkaloid sanguinarín^{7, 16, 17)}.



Obr. 2. Obsah sanguinarínu v suspenzných kultúrach maku siateho po elicitácii 1 mmol.l⁻¹ CdCl₂ ($n = 5$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)



Obr. 3. Obsah sanguinarínu v suspenzných kultúrach maku siateho po elicitácii 100 μmol.l⁻¹ metyljazmonátom (MJ) ($n = 5$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)

Aplikáciou 1 ml homogenátu z fytopatogénnej huby *Botrytis cinerea* do živného média sa zvýšila produkcia sanguinarínu suspenznými kultúrami maku siateho už po 24 h. Počas 72 h elicitácie sme najvyšší obsah sanguinarínu stanovili po 48 h ($38,53 \pm 4,45 \mu\text{g.g}^{-1}$ d.h.). Produkcia sanguinarínu sa v bunkách zvýšila 5,3-krát oproti neelicitovaným kultúram. Elicitované bunky si zvýšenú produkciu sanguinarínu zachovali aj po 72 h ($36,65 \pm 4,17 \mu\text{g.g}^{-1}$ d.h.) od aplikácie elicitora (obr. 1). V 10-dňových suspenzných kultúrach odvodených od farmaceuticky významnej odrody maku siateho Lazúr, sa po elicitácii homogenátom z *Botrytis cinerea* zvýšila produkcia sanguinarínu 9-krát po 48 h jeho pôsobenia¹¹⁾. Avšak obsah sanguinarínu u odrody Lazúr¹¹⁾ bol aj po elicitácii nižší ako u testovanej odrody Gerlach. Rovnako ako suspenzné kultúry maku siateho, aj suspenzné kultúry iných rastlín z čeľade *Papaveraceae* (*Eschscholtzia californica*) zvyšujú produkciu sanguinarínu po elicitácii biotickým elicitorom¹⁸⁾.

Abiotické elicitory CdCl₂ a MJ, na rozdiel od elicitora biotického, stimulovali tvorbu sanguinarínu s rôznym

časovým odstupom. V suspenzných kultúrach vystavených vplyvu $1 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CdCl}_2$ sme pozorovali lineárny vzostup produkcie sanguinarínu. Obsah tohto alkaloidu sa v elicitovaných kultúrach zvýšil 1,3-násobne po 24 h, po 48 h to bol 1,6-násobok a najvyšší obsah sme stanovili po 72 h ($17,52 \pm 2,75 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1} \text{ č.h.}$), čo je 2,3-krát viac ako v neelicitovaných kultúrach (obr. 2). Podobne ako v prípade suspenzných kultúr maku siateho, aj v *in vitro* kultúrach *Catharanthus roseus* a *Gloriosa superba* sa zvýšila tvorba ajmalicínu¹⁵⁾ a kolchicínu¹⁹⁾ po elicitácii CdCl_2 . Optimálnymi koncentráciami CdCl_2 , ktoré stimulujú tvorby sekundárnych metabolitov v rastlinných suspenzných kultúrach sú koncentrácie do 1 mmol.l^{-1} ^{15,19)}.

Metyljazmonát, ktorý sa spolu s kyselinou jazmónovou priamo zúčastňuje transdukčných procesov²⁰⁾, sme do živného média aplikovali vo výslednej koncentrácii $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. V porovnaní s kultúrami elicitovanými CdCl_2 sme v kultúrach elicitovaných metyljazmonátom pozorovali len mierne zvýšenú tvorbu sanguinarínu po 24 a 48 h jeho pôsobenia. Po 72 h elicitácie sa obsah sanguinarínu signifikantne zvýšil ($23,62 \pm 2,87 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1} \text{ č.h.}$) a celková produkcia tohto alkaloidu stúpila trojnásobne oproti tvorbe v neelicitovaných kultúrach (obr. 3). Podobný priebeh produkcie sanguinarínu sa pozoroval aj u suspenzných kultúr *Eschscholtzia californica* po elicitácii metyljazmonátom¹⁸⁾. Tento oneskorený vzostup tvorby sanguinarínu sa vysvetľuje nízkou aktivitou dihydrobenzofenantridínoxidázy (DBOX), ktorá katalyzuje konverziu dihydrosanguinarínu na sanguinarín a jej expresia nebola indukovaná v metyljazmonátom elicitovaných suspenzných kultúrach *Eschscholtzia californica*¹⁸⁾.

ZÁVER

Z použitej trojice elicitorov najefektívnejšie stimuloval tvorbu sanguinarínu v suspenzných kultúrach maku siateho homogenát z mycélia fytopatogénnej huby *Botrytis cinerea*. Výsledný efekt metyljazmonátu a CdCl_2 na tvorbu sanguinarínu bol po 72 h ich pôsobenia porovnateľný. Nakoľko bol elicitáčny účinok uvedených abiotických elicitorov slabší v porovnaní s elicitorom biotickým, sú preto tieto elicitory menej vhodné na stimuláciu sekundárneho metabolizmu v suspenzných kultúrach maku siateho. Odroda maku siateho Gerlach sa v podmienkach *in vitro* ukázala ako lepší producent sanguinarínu v porovnaní s odrodou Lazúr, ktorého tzv. maková slama sa používa ako priemyselná surovina pre izoláciu morfinu.

LITERATÚRA

1. **Facchini, P. J., Zenk, K. M., Kutchan, T. M.:** Opium poppy blueprint for an alkaloid factory. *Phytochemistry* 2007; 23, 243–250.
2. **Norn, S., Kruse, P. R., Kruse, E.:** History of opium poppy and morphine. *Dan. Medicinhist. Arbog.* 2005; 33, 171–184.
3. **Facchini, P. J., De Luka, V.:** Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant J.* 2008; 54, 763–784.
4. http://www.incb.org/pdf/technical-reports/narcotic-drugs/2010/NAR_2010_E_Supply.pdf (5. 5. 2011).
5. **Park, S. U., Facchini, P. J.:** Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholtzia californica* Cham., root cultures. *J. Exp. Bot.* 2000; 51, 1005–1016.
6. **Zdařilová, A., Malíková, J., Dvořák, Z., Ulrichová, J., Šimánek, V.:** Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky *in vitro* a *in vivo*. *Chem. Listy* 2006; 100, 30–41.
7. **Zulak, K. G., Khan, M. F., Alcantara, J., Schriemer, D. C., Facchini, P. J.:** Plant Defense Responses in Opium Poppy Cell Cultures Revealed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 2009; 8, 86–98.
8. **Collin, H. A.:** Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Reg.* 2001; 34, 119–134.
9. **Sánchez-Sampedro, A., Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Corchete, P.:** Metabolomic alterations in elicitor treated *Silybum marianum* suspension cultures monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Biotech.* 2007; 130, 133–142.
10. **Murashige, T., Skoog, F.:** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962; 15, 473–497.
11. **Balažová, A., Bilka, F., Blanáriková, V., Pšenák, M.:** Zmeny obsahu sanguinarínu a aktivity polyfenoloxidázy vplyvom fungálneho elicitora v suspenzných kultúrach maku siateho *Papaver somniferum* L. *Čes. Slov. Farm.* 2002; 51, 182–185.
12. **Nadaská, M.:** Pletivová kultúra maku (*Papaver* sp.) a produkcia alkaloidov. *Farm. Obzor* 1991; LX, 221–224.
13. **Šramková, Z., Faragó, J.:** Založenie bunkovej suspenznej kultúry chmeľu obyčajného. *Nova Biotech* 2006; 6, 63–75. http://fpv.ucm.sk/katedry/biotechnolog/journal_nova_biotechnologica/revue_nova_biotechnologica_6_1/sramkova2006.pdf (5. 5. 2011).
14. **Ondrejčák, F.:** Slovenské odrody maku siateho. <http://www.makovepole.sk/index.php/mak-siaty/slovenske-odrody-maku-siateho> (8. 5. 2011).
15. **Zheng, Z., Wu, M.:** Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant Sci.* 2004; 166, 507–514.
16. **Holková, I., Bezáková, L., Bilka, F., Balažová, A., Vanko, M., Blanáriková, V.:** Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. *Plant Physiol Biochem.* 2010; 48, 887–892.
17. **Facchini, J. P., Penzes, C., Johnson, A. C., Bull, D.:** Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiol.* 1996; 112, 1669–1677.
18. **Cho, H. Y., Son, S. Y., Rhee, H. S., Yoon, S. Y. H., Lee-Parson, C. W. T., Park, J. M.:** Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *J. Biotech.* 2008; 137, 117–122.
19. **Ghosh, S., Ghosh, B., Jha, S.:** Aluminium chloride enhances colchicine production in root cultures of *Gloriosa superba*. *Biotech. Letters* 2006; 28, 497–503.
20. **Turner, J. G., Ellis, C., Devoto, A.:** The Jasmonate Signal Pathway. *The Plant Cell Supp.* 2002; 14, 153–164.