

WPŁYW JASMONIANU METYLU NA AKUMULACJĘ METABOLITÓW POLIFENOLOWYCH W WYTRZĄSANYCH KULTURACH *IN VITRO* ODMIAN HODOWLANYCH *HYPERICUM PERFORATUM* L.



Inga Kwiecień, Halina Ekiert

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum,
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków; e-mail: mfekiert@cyf-kr.edu.pl

Szlaki metabolizmu wtórnego roślin mogą być stymulowane przez rożne czynniki pochodzenia egzo- i endogennego. Jednymi z nich są czynniki stresowe, tzw. elicytory. Proces ten wykorzystać można w celu pobudzenia i zwiększenia biosyntezy metabolitów w roślinnych kulturach *in vitro*. W przypadku kultur gatunku o bardzo bogatym składzie chemicznym, jak dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum* L.), można też stymulować biosyntezę wybranej grupy metabolitów.

Ziele dziurawca zawiera przede wszystkim flawonoidy, oraz naftodiantronowe związki antrachinonowe (np. hyperycynę). Ważnymi składnikami są również związki fenolowe - taniny (polimery katechiny) i kwasy fenolowe, a także ksantony. Świeże kwiaty rośliny zawierają hyperforynę (pochodną florglucyny). Wymienionym składnikom towarzyszy ponadto olejek eteryczny. Bogaty skład chemiczny decyduje o bardzo szerokim spektrum aplikacji terapeutycznych rośliny. Znane jest działanie przeciwdepresyjne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, żółciopędne, spazmolityczne oraz ściągające dziurawca. Obecność hyperycyny, uczulającej skórę ludzką na promieniowanie UV, wykorzystuje się w kontrolowanych ilościach w przemyśle kosmetycznym [1,2].

Celem pracy była elicytacja jasmonianem metylu wytrząsanych kultur pędowych trzech odmian hodowlanych Elixir, Helos, Topas, *Hypericum perforatum*. Kultury prowadzono przez okres 3 tygodni, a następnie podłoże suplementowano jasmonianem metylu (50 µM). Po upływie 2, 4 lub 7 dni biomasę zebrano i poddano analizie HPLC w celu oznaczenia zawartości kwasów fenolowych [3].

Materiał i metody:

Kultury *in vitro:*

- typ kultur: wytrząsane kultury mikropędowe odmian hodowlanych *Hypericum perforatum* - Elixir, Helos, Topas
- podłoże wg. Murashige-Skoog'a (MS) [3]
- regulatory wzrostu i rozwoju roślin:
6-benzyloaminopuryna (BAP) - 0,1 mg/l
kwas 1-naftylooctowy (NAA) - 0,1 mg/l
- temperatura: 25 ± 2° C
- cykl hodowlany: 3 tygodnie
- stężenie jasmonianu metylu (JaMe) - 50 µM

Ekstrakcja:

- metanolowe ekstrakty z biomasy zebranej po 2, 4 i 7 dniach od dodania elicytora

Warunki analizy HPLC: [4, zmod.]

- chromatograf: Merck-Hitachi
- kolumna Purospher® RP-18e (250x4 mm, 5µm)
- detektor DAD: L-2455
- pompa z degazerem: L-2130
- termostat: L-2350
- autosampler: L-2200
- układ rozwijający: gradient, metanol : 0,5% kwas octowy, 20:80% do 100:0% (v/v)
- detekcja: długość fali λ=254 nm
(zakres rejestracji widma λ=200-400 nm)
- objętość nastrzyku: 10 µl
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1ml/min
- czas analizy: 90 minut
- temperatura: 25˚C

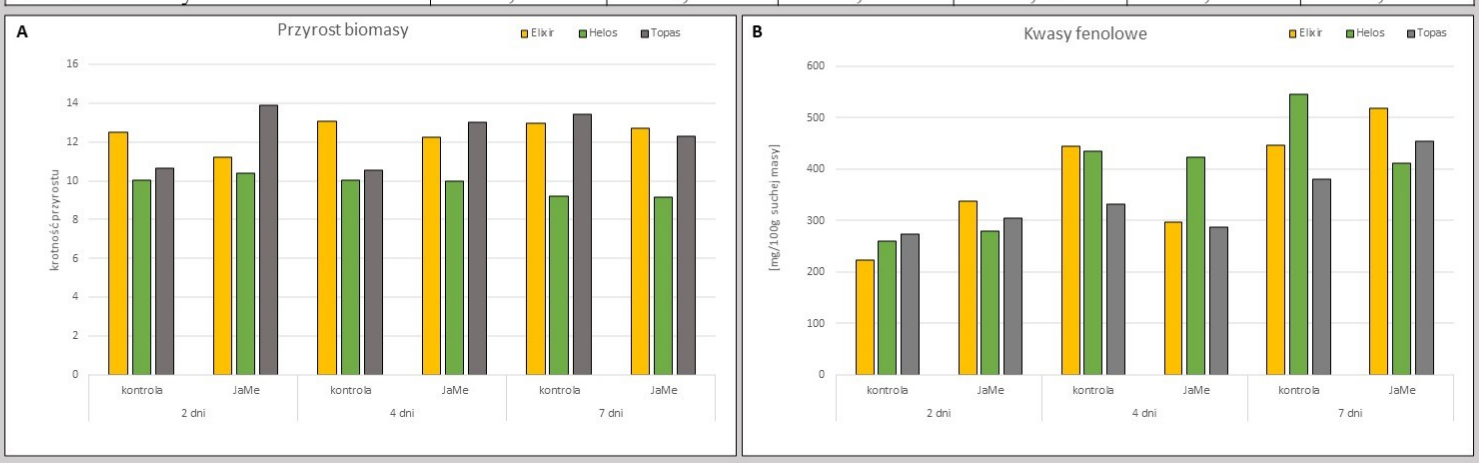
Substancje wzorcowe:

- kwasy fenolowe (25), kwas benzoesowy, kwas cynamonowy, kwas fenylooctowy

Wyniki:

Tabela 1. Zawartość kwasów fenolowych [mg/100 g s.m.] w ekstraktach z biomasy kultur *in vitro* trzech odmian hodowlanych dziurawca zwyczajnego – elicytacja jasmonianem metylu (JaMe)

2 dni	**Elixir**		**Helos**		**Topas**	
	kontrola	JaMe	kontrola	JaMe	kontrola	JaMe
kwas protokatechowy	32,52	44,37	43,93	26,10	41,51	23,94
kwas neochlorogenowy	118,75	160,54	137,25	164,92	138,67	171,09
kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy	21,94	68,99	29,54	38,28	29,57	44,98
kwas chlorogenowy	2,55	25,20	2,97	25,84	3,16	36,25
kwas kryptochlorogenowy	47,37	37,98	45,18	23,85	61,32	27,75
kwas wanilinowy	0,00	0,01	0,19	0,00	0,01	0,71
4 dni	**Elixir**		**Helos**		**Topas**	
	kontrola	JaMe	kontrola	JaMe	kontrola	JaMe
kwas protokatechowy	61,60	22,02	65,03	56,11	49,12	22,65
kwas neochlorogenowy	130,16	142,55	159,96	174,59	122,30	140,48
kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy	177,65	31,05	127,06	99,89	82,90	22,40
kwas chlorogenowy	4,08	42,90	2,92	37,08	5,10	51,37
kwas kryptochlorogenowy	69,90	58,78	78,75	55,99	72,29	48,25
kwas wanilinowy	0,00	0,01	0,34	0,27	0,29	1,44
7 dni	**Elixir**		**Helos**		**Topas**	
	kontrola	JaMe	kontrola	JaMe	kontrola	JaMe
kwas protokatechowy	68,97	54,93	72,14	51,98	57,26	50,17
kwas neochlorogenowy	108,04	130,31	162,35	150,87	124,18	156,22
kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy	192,39	229,99	222,31	125,46	129,14	133,73
kwas chlorogenowy	5,50	67,54	4,64	66,54	3,88	75,78
kwas kryptochlorogenowy	71,50	34,32	83,02	16,03	65,95	36,50
kwas wanilinowy	0,00	0,59	0,82	0,04	0,71	1,25



Ryc. 1. Przyrost suchej biomasy (A) oraz całkowita zawartość kwasów fenolowych (B) w ekstraktach z biomasy kultur *in vitro* trzech odmian hodowlanych dziurawca zwyczajnego – elicytacja jasmonianem metylu (JaMe)

Podsumowanie:

1. Zastosowane warunki eksperymentu tj., stężenie jasmonianu metylu oraz czas hodowli który upłynął od suplementacji pożywki elicytorem, nie wpływały negatywnie na przyrosty biomasy [ryc.1A],

2. We wszystkich metanolowych ekstraktach z biomasy potwierdzono obecność sześciu kwasów fenolowych (kwasu protokatechowego, kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego, kwasu wanilinowego, kwasu chlorogenowego, kwasu neoochlorogenowego oraz kwasu kryptochlorogenowego),

3. Metabolitami, których biosynteza była stymulowana najintensywniej były kwas chlorogenowy i neochlorogenowy (maksymalna zawartość odpowiednio – 75,78 oraz 174,59 mg/100 g suchej masy) [tab.1],

4. Maksymalna całkowita zawartość kwasów fenolowych wyniosła 518 mg/100g s.m. dla odmiany Elixir, 545 mg/100g s.m. dla odmiany Helos oraz 454 mg/100g s.m. dla odmiany Topas [ryc.1B],

5. Wykazano, że elicytacja kultur *in vitro* jasmonianem metylu wpływa na zwiększenie akumulacji kwasów fenolowych w różny sposób, zależnie od odmiany hodowlanej dziurawca.

Bibliografia:
1. Barnes J, Anderson LA, Phillipson D (red) (2007) Herbal medicines. Pharmaceutical Press, London, Chicago; **2.** Kwiecień I, Nicosia N, Ekiert H (2021) w. Medicinal Plants. Domestication, Biotechnology and Regional Importance. Ekiert HM, Ramawat KG, Arora J (red) Springer, 253-291; **3.** Murashige T, Skoog F (1962) Physiol Plant,15: 473-497; **4.** Ellnain-Wojtaszek M, Zgórka G (1999) J Liq Chrom & Rel Tech, 22: 1457-1471.