

Wpływ elicytacji UV-B na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* *Lychnis flos-cuculi* L.

Influence of UV-B elicitation on accumulation of secondary metabolites in Lychnis flos-cuculi L. in vitro cultures

Michał P. Maliński, Damian Szmytka, Barbara Thiem

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp. Rośliny wyższe reagują na stres środowiskowy produkcją metabolitów wtórnych o szerokim spektrum aktywności biologicznej w ramach adaptacji. Wiele z tych substancji znajduje zastosowanie w farmacji, kosmetyce czy przemyśle spożywczym. Komercyjna produkcja tych związków przez roślinne kultury *in vitro* stanowi jedno z najważniejszych zastosowań biotechnologii roślin. Kontrolowana ekspozycja rośliny na stresor zwana elicytacją stosowana jest jako wydajna technika biotechnologiczna w celu zwiększenia biosyntezy cennych metabolitów. **Materiał i metody.** Kultury *in vitro* *Lychnis flos-cuculi* elicytowano promieniowaniem UV-B przez 5-30 minut na dobę przez okres 7 dni. Ekstrakty metanolowe z zebranej biomasy poddano wstępnej półilościowej analizie fitochemicznej metodą chromatografii cienkowarstwowej w połączeniu z densytometrią. Oceniono względną zawartość typowych dla gatunku metabolitów, jak polifenole, ekdysteroidy i saponiny triterpenowe. Oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych metodą spektrofotometryczną z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu. **Wyniki.** Wraz ze wzrostem ekspozycji na UV-B zaobserwowano proporcjonalny wzrost poziomu kwasów fenolowych i jednocześnie spadek pozostałych grup metabolitów wtórnych. Zawartość związków fenolowych jest podwyższona w roślinach elicytowanych względem próby kontrolnej. **Wnioski.** Zastosowana technika elicytacji przedstawia metodę zwiększenia biosyntezy kwasów fenolowych w badanym gatunku. Opracowany model elicytacji UV-B może być stosowany do elicytacji innych taksonów, zarówno jako pojedynczy stresor lub w połączeniu z elicytorami biotycznymi. (*Farm Współ* 2021; 14: 175-185), doi: 10.53139/FW.20211422

Słowa kluczowe: elicytacja, roślinne kultury *in vitro*, metabolity wtórne, kwasy fenolowe, UV-B, *Lychnis flos-cuculi*

Abstract

Introduction. Higher plants respond to environmental stress by production of secondary metabolites with wide spectrum of biological activity, as a means of adaptation. Many of these substances find application in pharmaceutical, cosmetic or food industry. Commercial production of these compounds by plant *in vitro* cultures constitutes one of major branches of plant biotechnology. Controlled exposure of a plant to a stressor, called elicitation, is used as an efficient biotechnological technique to increase the biosynthesis of valuable metabolites. **Materials and methods.** *In vitro* cultures of *Lychnis flos-cuculi* were elicited by UV-B radiation, for 5-30 minutes per day during a 7-day period. Methanolic extracts of gathered biomass were subjected to preliminary phytochemical analysis by thin-layer chromatography coupled with densitometry. Levels of secondary metabolites typical to the species were evaluated, such as polyphenols, ecdysteroids and triterpenoid saponins. Using spectrophotometric method based on Folin-Ciocalteu reagent, total phenolic content was measured in the samples. **Results.** Increased exposure to UV-B radiation resulted in proportionally elevated content of phenolic acids and decreased levels of other metabolite classes. The total phenolic content is higher in elicited plants compared to control group. **Conclusions.** The applied elicitation technique constitutes a method to increase the phenolic acid biosynthesis in the presented species. The developed model of UV-B elicitation can be applied to other taxons either as a single stressor or combined with biotic elicitors. (*Farm Współ* 2021; 14: 175-185), doi: 10.53139/FW.20211422

Keywords: elicitation, plant *in vitro* cultures, secondary metabolites, phenolic acids, UV-B, *Lychnis flos-cuculi*

Wstęp

Rośliny produkują liczne metabolity wtórne o specyficznych funkcjach i różnorodnej aktywności biologicznej. Substancje te są bardzo zróżnicowane pod względem chemicznym i znajdują zastosowanie między innymi w farmacji, przemyśle kosmetycznym, spożywczym i perfumeryjnym. Metabolity wtórne to związki gatunkowo specyficzne, mające istotne znaczenie w sferze wzajemnych oddziaływań pomiędzy rośliną a jej często zmiennym środowiskiem. Rośliny są organizmami wrażliwymi na liczne czynniki środowiskowe, a brak możliwości uniknięcia niekorzystnych warunków wymusza na nich szereg reakcji adaptacyjnych, od których zależy ich przetrwanie. Typowym dla roślin mechanizmem obronnym jest akumulacja związków chemicznych o aktywności biologicznej, przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i przeciwwirusowej, zwiększających szansę na przeżywalność. Związki te mają przeważnie charakter metabolitów wtórnych, wykazujących często wartościowe działanie farmakologiczne, a przez to szczególnie pożądanym ze względów komercyjnych [1-3].

Aspekt przemysłowej produkcji szczególnie cennych metabolitów wtórnych przez roślinne kultury *in vitro* stanowi jedno z podstawowych zastosowań biotechnologii roślin. Ma to szczególne znaczenie w przypadku kultur taksonów produkujących związki chemiczne o wysokiej aktywności biologicznej i farmakologicznej, zwłaszcza złożone strukturalnie i trudne do pozyskania drogą konwencjonalnej syntezy chemicznej [4,5]. Przykładem mogą być cenne z terapeutycznego punktu widzenia terpenoidy i alkaloidy terpenowe, jak paklitaksel [6], winkrystyna, winblastyna i katarantyna [7,8] czy artemizynina [9]. Wśród różnych metod biotechnologicznych mających na celu podwyższenie akumulacji metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* znaczącą rolę odgrywa elicytacja biomasy roślinnej. Jest to ekspozycja roślinnego systemu *in vitro* na czynnik stresowy o odpowiednim natężeniu, zwykle niskim, która skutkuje wywołaniem odpowiedzi stresowej i w rezultacie może prowadzić do zwiększenia biosyntezy metabolitów. Dotyczy to szczególnie związków pełniących rolę fitoaleksyn, wytwarzanych w odpowiedzi na stres i poprzez odpowiedź obronną lub adaptacyjną zwiększających szanse rośliny na przetrwanie zagrożenia ze strony mikroorganizmów lub niekorzystnych warunków środowiskowych [1,3,10].

Wśród czynników stresowych można wyróżnić elicytory biotyczne i abiotyczne. Elicytory biotyczne stanowią związki chemiczne produkowane przez organizmy żywe (grzyby, bakterie, owady), np. białka i produkty ich hydrolizy, makrocząsteczki w rodzaju chityny czy całe fragmenty struktur komórkowych. Czynniki te wprowadzane są do kultury w celu symulacji ataku danego organizmu. Druga grupa obejmuje czynniki chemiczne, np. kationy metali ciężkich, oraz fizyczne, w tym stres termiczny, stres osmotyczny i promieniowanie UV. Niekiedy jako odrębną grupę wyróżnia się endogenne cząsteczki sygnałowe charakterystyczne dla roślin, odpowiedzialne za przekaz sygnału stresowego (jasmoniany, salicylany) [4,7].

Spektrum emisyjne słońca obejmuje, poza zakresem światła widzialnego odpowiedzialnego za przebieg fotosyntezy, niewidoczne promieniowanie podczerwone (IR) i nadfioletowe (UV). Najbardziej destruktywne dla biomolekuł promieniowanie UV-C (10-280 nm) jest zatrzymywane niemal całkowicie przez warstwę ozonową. Względnie niskoenergetyczny zakres UV-A (320-400 nm) dociera do powierzchni ziemi wywołując u organizmów żywych proste reakcje obronne, zwłaszcza zmiany w pigmentacji sprzyjające jego absorpcji (zarówno u roślin i zwierząt). Zakres UV-B (280-320 nm) jest pochłaniany przez atmosferę jedynie częściowo i przez to jest, w warunkach naturalnych, w największej mierze odpowiedzialny za zmiany fizjologiczne w organizmach żywych [11]. Emisja wysokoenergetycznych kwantów ultrafioletu przez słońce doprowadziła do powstania u roślin omawianego mechanizmu obronnego. Najprostszą strukturalnie grupą metabolitów wtórnych zdolną do absorpcji UV są kwasy fenolowe i flawonoidy, a także inne polifenole. Odpowiedź wywołana przez ekspozycję na promieniowanie UV jest złożona. Wzrasta poziom stresu oksydacyjnego, aktywacji podlegają wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne oraz liczne czynniki transkrypcyjne. To z kolei skutkuje zmianą profilu syntetyzowanych metabolitów wtórnych [3,7] i może zwiększać poziom fitoaleksyn – polifenoli, terpenoidów, alkaloidów, steroli oraz innych związków zawierających odpowiedni chromofor (umożliwiający absorpcję promieniowania UV) lub redukujących stres oksydacyjny.

Celem podwyższenia akumulacji metabolitów wtórnych w roślinach, w procesie elicytacji stosuje się 2 zakresy promieniowania: UV-B i UV-C, zarówno w modelu *in vivo*, jak również *in vitro* [3,12].

Wykorzystanie promieniowania UV-B i UV-C jako elicytorów w roślinnych kulturach *in vitro* jest szeroko opisywane w literaturze naukowej jako efektywna metoda zwiększenia produkcji metabolitów wtórnych o charakterze fitoaleksyn [5-7,13].

Firletka poszarpana (*Lychnis flos-cuculi* L., ang. *Ragged Robin*) jest byliną z rodziny *Caryophyllaceae*. Badany gatunek charakteryzuje się obecnością znacznych ilości strukturalnie zróżnicowanych saponozydów triterpenowych z grupy oleananu, wyróżniającą się zawartością ekdysteroidów, C-glikozyli flawonoidowych i kwasów fenolowych, co zostało opisane w pracy przeglądowej na temat tego taksonu [14]. Chociaż omawiany gatunek nie ma zastosowania leczniczego poza nielicznymi doniesieniami z medycyny tradycyjnej, stanowi on potencjalne źródło wymienionych metabolitów wtórnych o znanych aktywnościach biologicznych i farmakologicznych. Wszystkie wymienione grupy związków pełnią rolę w obronie roślin przed stresorami. Saponozydy stanowią naturalną obronę rośliny przed infekcjami grzybiczymi, odstraszają też roślinożerne ssaki [15]. Ekdysteroidy jako analogi owadzych hormonów rozwoju powodują szereg zaburzeń hormonalnych u owadów i innych bezkręgowców [16]. Flawonoidy i kwasy fenolowe chronią roślinę przed infekcjami bakteryjnymi, pochłaniają promieniowanie UV, ponadto przeciwdziałają stresowi oksydacyjnemu zmniejszając wolne rodniki [17,18].

Niniejsza praca przedstawia efekty ekspozycji mikrorozmnażanych *Lychnis flos-cuculi* L. na promieniowanie z zakresu UV-B, w warunkach kultury *in vitro*. Celem pracy była ocena wpływu promieniowania UV-B jako elicytora abiotycznego na akumulację metabolitów wtórnych charakterystycznych dla gatunku.

Materiały i metody

Kultury *in vitro*

Materiał badawczy stanowiły rozmnażane klonalnie rośliny *L. flos-cuculi*, z zastosowaniem wcześniej opisanej metody mikrorozmnażania poprzez pobudzanie rozwoju pąków bocznych [19]. Kultury utrzymywano w pokoju hodowlanym (fitotronie), w temperaturze $21 \pm 1^\circ\text{C}$ i fotoperiodzie 16/8 godz. z fluorescencyjnym oświetleniem o natężeniu $55 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$. Kultury pędowe wyprowadzono z nasion, na pożywce Murashige i Skooga (MS) [20] bez dodatku regulatorów wzrostu. Źródłem eksplantatów były wierzchołki pędów 30-dniowych siewek wykładanych na agarową pożywkę MS, suplementowaną cytokininą

– benzyloaminopuryną (BAP, $1,0 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$) i auksyną – kwasem indolilo-3-octowym (IAA, $0,1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$). Uzyskane potomne pędy ukorzeniono na pożywce MS uzupełnionej auksyną IAA ($0,2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$). W wyniku wcześniej opracowanej, wydajnej metody klonalnego rozmnażania *in vitro* otrzymano rośliny potomne wyrównane fenotypowo, o stałej wielkości genomu [18]. Tak otrzymane kultury poddano elicytacji promieniowaniem UV-B w warunkach aseptycznych (komora laminarna). Do doświadczenia pobrano wyrównane rośliny o długości pędów ok. 3 cm, w jednakowym stadium rozwoju. Po 7-dniowym cyklu naświetlania przez 30, 15, 10 lub 5 minut na dobę oceniano morfologię roślin.

Przygotowanie aparatury do elicytacji promieniami UV-B

Na potrzeby eksperymentu skonstruowano aparaturę do elicytacji kultur. Zestaw składał się z umocowanej na metalowym statywie lampy z odbłyśnikiem umożliwiającej emisję promieniowania UV bezpośrednio na rośliny i przeznaczony był do zainstalowania w komorze laminarnej. Jako źródło promieniowania UV-B zastosowano specjalistyczną lampę Philips Broadband TL/12 RS o mocy 20 W, o spektrum emisyjnym w zakresie 290-315 nm, z maksimum przypadającym na długość fali 305 nm. Lampa została zawieszona na statywie w odległości 30 cm od naświetlanych roślin (zdzjęcie 1).

Proces elicytacji roślinnych kultur

Na podstawie piśmiennictwa opracowano model elicytacji młodych roślin *L. flos-cuculi* w warunkach *in vitro*. Rozmnożone klonalnie rośliny podzielono na sześć grup: cztery grupy badane: UV30, UV15, UV10, UV5 – czas elicytacji promieniami UV-B, odpowiednio 30, 15, 10 i 5 minut na dobę, przez 7 kolejnych dni oraz dwie grupy kontrolne: PK30 – kultury nienaświetlane, otwierane na 30 minut (próba negatywna) i PK0 – kultury nienaświetlane, pozostawione w zamkniętym naczyniu, w fitotronie.

Naczynia z kulturami umieszczano w warunkach sterylnych w komorze laminarnej i traktowano promieniowaniem UV według powyższego schematu przez 7 kolejnych dni. Jedną z grup kontrolnych (PK0) pozostawiono w warunkach pokoju hodowlanego. Druga grupa stanowiła kontrolę negatywną (PK30), wystawianą w kabinie laminarnej na 30 min./dobę bez ekspozycji na UV-B. Po ostatnim naświetlaniu rośliny



Zdjęcie 1. Aparatura do elicytacji kultur *in vitro* promieniami UV-B (konstrukcja własna)

Photo 1. Equipment for UV-B elicitation of *in vitro* cultures (self-made)

przeniesiono do fitotronu na 24 godz., na czas potencjalnych zdarzeń komórkowych w roślinach (reakcja na elicytor, kaskada sygnałowa, ekspresja genów i synteza metabolitów) przed zbiorem biomasy. Eksperyment przeprowadzono w dwóch powtórzeniach; użyto 108 roślinek namnożonych wcześniej w kulturze *in vitro*.

Ekstrakcja biomasy roślinnej

Po zakończonym eksperymencie, części pędowe roślin z każdej grupy badanej zebrano i oczyszczono. Biomagę wysuszone w 40°C, rozdrobniono, a następnie poddano trzykrotnej, 1-godzinnej ekstrakcji metanolem w temperaturze 85°C. Uzyskane wyciągi zagęszczono na wyparce rotacyjnej i rozpuszczono w metanolu. Próbkę o jednolitym stężeniu 0,1 g × ml⁻¹ przeznaczono do półilościowych analiz chromatograficznych, w związku z czym nakładano je na płytki chromatograficzne w jednakowej objętości 2 μl.

Wstępna analiza fitochemiczna metodą chromatografii cienkowarstwowej z analizą densytometryczną

Do badań metabolitów wtórnych w analizowanych próbkach zastosowano chromatografię cienkowar-

stwową (TLC) na żelu krzemionkowym, w różnych układach chromatograficznych. Chromatogramy wywoływano odczynnikami charakterystycznymi dla poszczególnych grup związków. Do wizualizacji związków fenolowych użyto 0,1% roztworu NA (*Naturstoffreagenz A*, difenyloboran 2-etanolaminy). Triterpenoidy, w tym saponiny, wywołano 1% roztworem waniliny i 5% H₂SO₄ w temperaturze 105°C. Obecność i tożsamość ekdysteroidów stwierdzono na podstawie R_f wzorców i absorpcji promieniowania UV na płytkach TLC z indykatozem fluorescencji F₂₅₄. Analizy polifenoli i ekdysteroidów oparto na metodzie zastosowanej w poprzednich pracach [19,21]. Chromatogramy w świetle widzialnym oraz UV 254 i 366 nm udokumentowano skanerem Reprostar (CAMAG) z funkcją densytometru, z zastosowaniem pakietu oprogramowania WinCATS (CAMAG). Wybrane chromatogramy TLC poddano półilościowej analizie densytometrycznej przy pomocy programu VideoScan (CAMAG), co było możliwe dzięki użyciu tych samych rozcieńczeń ekstraktów i identycznej objętości próbek nakładanych na płytkę.

Spektrofotometryczne oznaczanie całkowitej zawartości związków fenolowych

Oznaczenia całkowitej zawartości związków fenolowych (ang. *total phenolic content*) w badanych ekstraktach przeprowadzono metodą spektrofotometryczną, z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu [22]. Jako wzorzec kwasów fenolowych przyjęto kwas galusowy i przy pomocy jego rozcieńczeń wyznaczono krzywą wzorcową o równaniu $Abs = 5,3676 \times c - 0,0008$. Oznaczenia prowadzono z użyciem spektrofotometru Metertech SP-830 przy długości fali 760 nm. Dla każdej próbki wykonano 6 powtórzeń. Wyniki wyrażono w mg ekwiwalentu kwasu galusowego (GAE) na g masy wyciągu.

Analiza statystyczna

Wyniki spektrofotometrycznego oznaczania całkowitej zawartości związków fenolowych poddano analizie statystycznej – jednokierunkowej analizie wariancji (ANOVA) oraz testowi *post-hoc* Duncana. Do ustalenia istotności statystycznej zastosowano wartość $P = 0,05$. Obliczenia przeprowadzono przy pomocy pakietu oprogramowania Statistica 13 (Statsoft).

Wyniki

Skuteczną metodą biotechnologiczną stosowaną w celu zwiększania biosyntezy metabolitów wtórnych w różnych systemach roślinnych jest elicytacja czynnikami stresowymi, w tym ultrafioletem. Niniejsze

badania dotyczą oceny wpływu promieniowania UV-B na kultury *in vitro* *L. flos-cuculi*.

Ocena morfologiczna elicytowanych roślin wykazała, że długość ekspozycji i moc promieniowania UV-B nie wpłynęły negatywnie na ich żywotność i prawidłową budowę pędów. Nie stwierdzono istotnych różnic między roślinami traktowanymi promieniami UV-B, a roślinami z prób kontrolnych (zdjęcie 2).

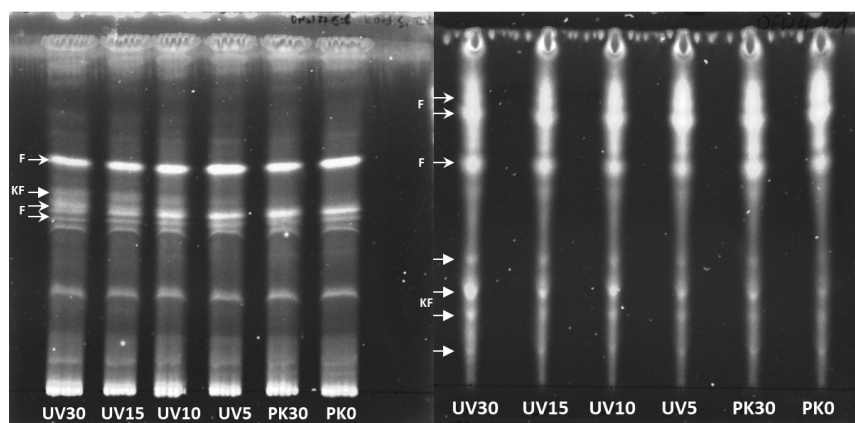
Odmienne przedstawiają się wyniki ilościowych analiz TLC oraz analizy densytometrycznej, które wykazały wyraźne różnice w poziomie metabolitów wtórnych w badanych wyciągach. Porównanie chromatogramów rozwiniętych w kilku układach wskazuje na zróżnicowaną intensywność większości plam odpowiadających kwasom fenolowym, wskazując na ich wyższą zawartość w ekstraktach z roślin poddanych elicytacji UV-B, proporcjonalnie do czasu ekspozycji (ryciny 1 i 2). Natomiast, pasma flawonoidów są mniej intensywne w wyciągach z elicytowanych roślin, co sugeruje negatywny wpływ irradacji UV-B na biosyntezę tej grupy związków (rycina 1).

Chromatogram i densytogram przedstawione na rycinie 2 wyraźnie wskazują na zwiększoną zawartość kwasów fenolowych o następujących współczynnikach opóźnienia: $Rf_a = 0,8$; $Rf_b = 0,62$; $Rf_c = 0,45$; $Rf_d = 0,37$ w próbkach z roślin elicytowanych w porównaniu do próby kontrolnej. Ponadto zauważono pasmo kwasu fenolowego o $Rf = 0,62$ w próbce negatywnej (PK30), bardziej intensywne niż w próbce kontrolnej (PK0) i próbce poddanej względnie krótkiej ekspozycji



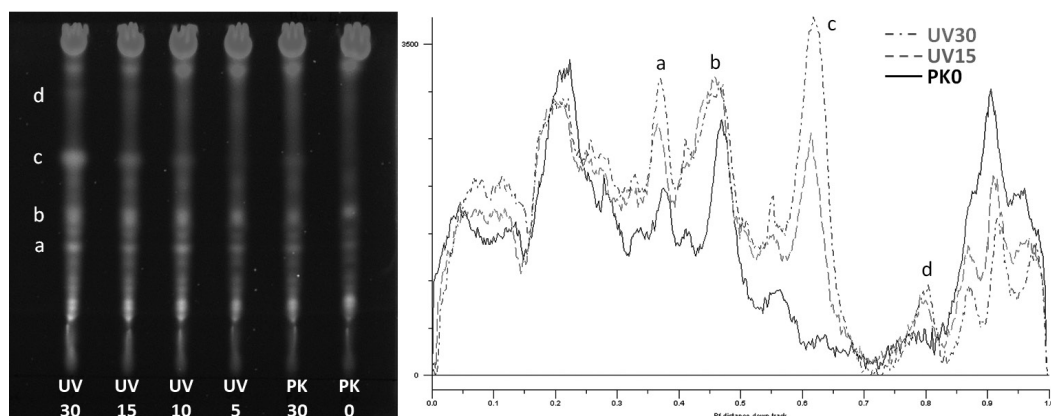
Zdjęcie 2. Morfologia roślin po zakończeniu eksperymentu: a) próba kontrolna (PK0), w warunkach pokoju hodowlanego; b) rośliny elicytowane 15 minut na dobę przez 7 kolejnych dni (UV15); c) rośliny elicytowane 30 minut na dobę przez 7 kolejnych dni (UV30).

Photo 2. Plant morphology after the experiment: a) control group (PK0), left undisturbed in phytotron conditions; b) plants elicited for 15 minutes daily, for 7 consecutive days (UV15); c) plants elicited for 30 minutes daily, for 7 consecutive days (UV30).



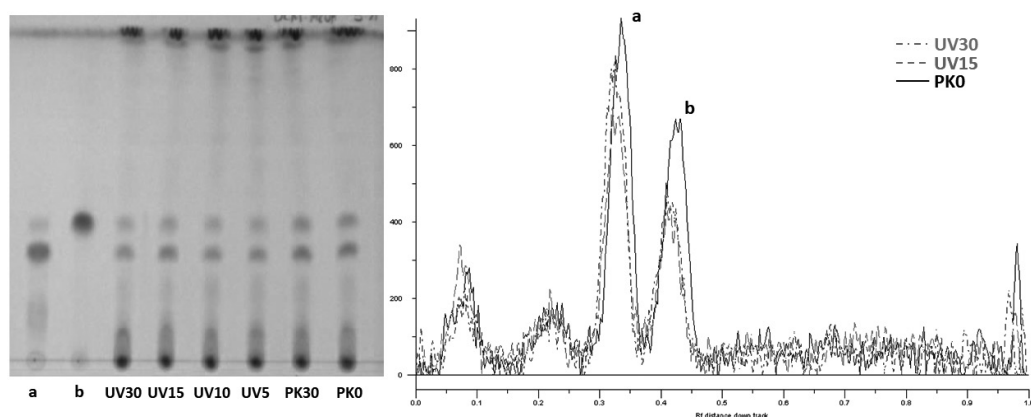
Rycina 1. Chromatogramy TLC przedstawiające obecność związków fenolowych. Faza stacjonarna: żel krzemionkowy. Fazy rozwijające: octan etylu – metanol – woda (77:15:8); octan etylu – kwas mrówkowy – woda (4:1:1). Obserwacja po wywołaniu 0,1% NA w UV 366 nm. Strzałkami oznaczono pasma fenolokwasów (KF) i flawonoidów (F). Próbkki: ekstrakty z kultur elicytowanych przez 30, 15, 10 i 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); kontrola negatywna, nienaświetlana, naczynie otwarte przez 30 min (PK30); próba kontrolna rosnąca w warunkach pokoju hodowlanego (PK0).

Figure 1. TLC plates demonstrating the presence of the phenolic compounds. Stationary phase: silica gel. Mobile phases: ethyl acetate – methanol – water (77:15:8); ethyl acetate – formic acid – water (4:1:1). Observed after derivatization in 0,1% NA under UV 366 nm. Arrows point to phenolic acid (KF) and flavonoid (F) bands. Samples: extracts from cultures elicited for 30, 15, 10 and 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); negative control unexposed to ultraviolet but open for 30 min (PK30); control group left undisturbed in phytotron conditions (PK0).



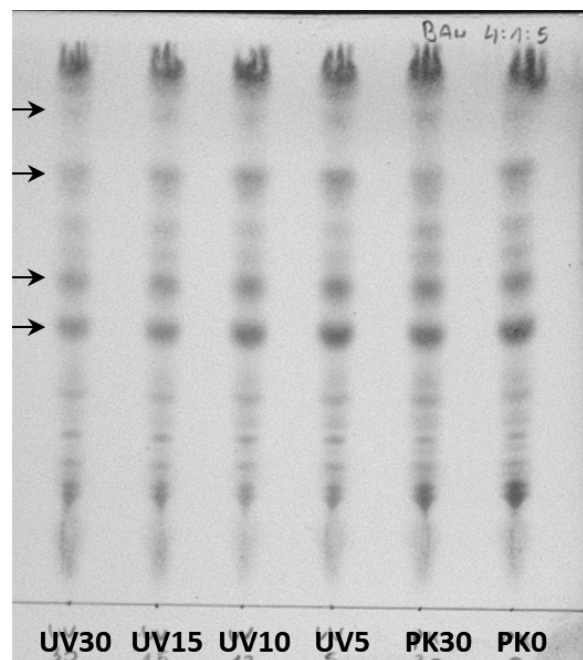
Rycina 2. Chromatogram TLC na obecność kwasów fenolowych, wraz z densytogramem dla prób UV30 i UV15 względem próby kontrolnej UV0. Faza stacjonarna: żel krzemionkowy. Faza rozwijająca: butanol – kwas octowy – woda (4:1:5). Obserwacja w UV 366 nm. Próbkki: ekstrakty z kultur elicytowanych przez 30, 15, 10 i 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); kontrola negatywna, nienaświetlana, naczynie otwarte przez 30 min (PK30); próba kontrolna rosnąca w warunkach pokoju hodowlanego (PK0). Literami oznaczono pasma fenolokwasów najbardziej różniące się intensywnością: a ($R_f = 0,37$), b ($R_f = 0,45$), c ($R_f = 0,62$), d ($R_f = 0,8$).

Figure 2. TLC plate demonstrating phenolic acids, with densitogram showing UV30 and UV15 samples compared to PK0 control group. Stationary phase: silica gel. Mobile phase: n-butanol – glacial acetic acid – water (4:1:5). Observed under UV 366 nm. Samples: extracts from cultures elicited for 30, 15, 10 and 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); negative control unexposed to ultraviolet but open for 30 min (PK30); control group left undisturbed in phytotron conditions (PK0). Letters denote bands of phenolic acids most differing in intensity: a ($R_f = 0.37$), b ($R_f = 0.45$), c ($R_f = 0.62$), d ($R_f = 0.8$).



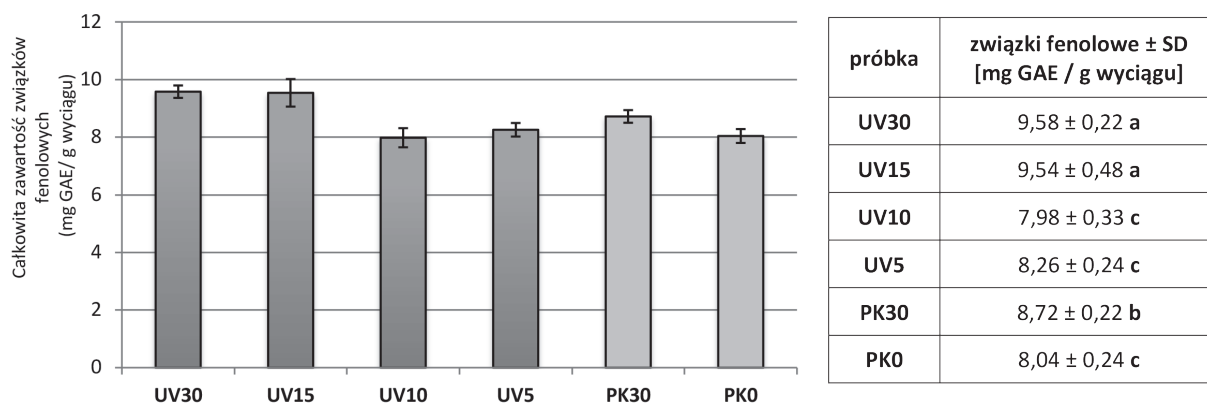
Rycina 3. Chromatogram TLC na obecność ekdysteroidów wraz z densytogramem dla prób UV30 i UV15 względem próby kontrolnej UV0. Faza stacjonarna: żel krzemionkowy z indykatozem fluorescencji F254. Faza rozwijająca: dichlorometan-metanol (5:1). Obserwacja w UV 254 nm. Próbkki: ekstrakty z kultur elicytowanych przez 30, 15, 10 i 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); kontrola negatywna, nienaświetlana, naczynie otwarte przez 30 min (PK30); próba kontrolna rosnąca w warunkach pokoju hodowlanego (PK0). Ekdysteroidy: a – 20-hydroksyekdyson ($R_f = 0,33$), b – polipodyna B ($R_f = 0,43$).

Figure 3. Thin-layer chromatogram demonstrating ecdysteroid content, with densitogram showing UV30 and UV15 samples compared to PK0 control group. Stationary phase: silica gel with F254 fluorescence indicator. Mobile phase: dichloromethane – methanol (5:1). Observed under UV 254 nm. Samples: extracts from cultures elicited for 30, 15, 10 and 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); negative control unexposed to ultraviolet but open for 30 min (PK30); control group left undisturbed in phytotron conditions (PK0). Ecdysteroids: a – 20-hydroxyecdysone ($R_f = 0.33$), b – polypodine B ($R_f = 0.43$).



Rycina 4. Chromatogram TLC na obecność saponin triterpenowych. Faza stacjonarna: żel krzemionkowy. Faza rozwijająca: butanol – kwas octowy – woda (4:1:5). Obserwacja w świetle widzialnym po wywołaniu 1% waniliną i 5% H_2SO_4 . Próbkki: ekstrakty z kultur elicytowanych przez 30, 15, 10 i 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); kontrola negatywna, nienaświetlana, naczynie otwarte przez 30 min (PK30); próba kontrolna rosnąca w warunkach pokoju hodowlanego (PK0).

Figure 4. Thin-layer chromatogram demonstrating triterpenoid saponins. Stationary phase: silica gel. Mobile phase: n-butanol – glacial acetic acid – water (4:1:5). Observed in visible light after derivatization with 1% vanillin and 5% H_2SO_4 . Samples: extracts from cultures elicited for 30, 15, 10 and 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); negative control unexposed to ultraviolet but open for 30 min (PK30); control group left undisturbed in phytotron conditions (PK0).



Rycina 5. Całkowita zawartość związków fenolowych w badanych ekstraktach, wyrażona jako ekwiwalent kwasu galusowego (GAE) w mg na g suchego wyciągu. Próbki: ekstrakty z kultur elicytowanych przez 30, 15, 10 i 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); kontrola negatywna, nienaświetlana, naczynie otwarte przez 30 min (PK30); próba kontrolna rosnąca w warunkach pokoju hodowlanego (PK0). Między wartościami średnimi oznaczonymi tą samą literą nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic przy $P = 0,05$ z użyciem testu Duncana.

Figure 5. Total phenolic content in tested samples, expressed as gallic acid equivalent (GAE) in mg per gram of dry extract. Samples: extracts from cultures elicited for 30, 15, 10 and 5 min (UV30, UV15, UV10, UV5); negative control unexposed to ultraviolet but open for 30 min (PK30); control group left undisturbed in phytotron conditions (PK0). Mean values with the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ using Duncan's Multiple Range test.

(UV5). Utrata wilgotności w PK30 prowadzi do zmian w poziomie metabolitów wtórnych porównywalnych do efektów elicytacji UV-B przez 10 minut. Ma to prawdopodobnie związek z wysoką wrażliwością roślin *in vivo* i kultur pędowych firletki na zmiany wilgotności.

Negatywny wpływ elicytacji UV-B na zawartość ekdysteroidów przedstawia rycina 3. Densytogram ukazuje znacznie niższy poziom 20-hydroksyekdysonu i polipodiny B w ekstraktach z elicytowanych kultur względem próby kontrolnej. Spadek zawartości obu związków jest proporcjonalny do ekspozycji na ultrafiolet. Podobną zależność dotyczącą saponin triterpenoidowych obrazuje rycina 4. Szarogranatowe i purpurowe pasma triterpenoidów są mniej intensywne na chromatogramach w próbkach ekstraktów z dłuższej elicytowanych kultur. Wąskie, różnobarwne pasma o współczynniku $R_f < 0,5$ są również bardziej wyraźne w próbie kontrolnej niż w próbkach elicytowanych roślin.

Oznaczanie całkowitej zawartości związków fenolowych

Wyniki oznaczeń spektrofotometrycznych całkowitej zawartości związków fenolowych przedstawia

rycina 5. Zawartość tych związków jest wyraźnie zwiększona o około 20% w próbkach sporządzonych z kultur elicytowanych 15 i 30 minut względem prób kontrolnych. Wzrost ten jest istotny statystycznie. Widoczna jest również niewielka różnica między próbkami kontrolnymi – kontrola negatywna PK30 (brak ekspozycji na UV z jednoczesną utratą wilgotności) wskazuje na istotny statystycznie wzrost zawartości polifenoli względem kontroli PK0.

Dyskusja

Różne czynniki stresowe, aktywując szlaki biosyntetyczne metabolizmu wtórnego, powodują większą produkcję i akumulację obronnych związków chemicznych (fitoaleksyn) w komórkach roślinnych. Przy względnie niskim natężeniu stresora uruchomione zostają mechanizmy adaptacyjne polegające na aktywacji ekspresji genów i biosyntezie metabolitów wtórnych. Zbyt silny czynnik stresowy, przewyższający możliwości adaptacyjne rośliny, prowadzi do uszkodzeń makromolekuł i struktur komórkowych, związane z tym załamanie metabolizmu i zaburzenia morfologii, do obumarcia włącznie [3,7].

Elicytacja promieniowaniem UV-B szeregu roślinnych systemów *in vivo* i *in vitro*, opisywana w licznych pracach, wykazała wzrost biosyntezy metabolitów wtórnych z różnych grup chemicznych, zwykle proporcjonalny do czasu ekspozycji w zakresie eustresu. Przy bardzo intensywnej irradacji (dystres) odnotowywano postępujący spadek zawartości metabolitów i zaburzoną morfologię roślin, co wskazuje na konieczność dobrania odpowiedniego natężenia elicytora i czasu ekspozycji w celu uzyskania optymalnego zwiększenia biosyntezy metabolitów wtórnych i parametrów wzrostu [2,11].

W przedstawionym badaniu, dobór odpowiedniej mocy lampy oraz jej ustawienie został oparty o dane z pracy Felipe i wsp. [12]. Ponadto, wstępne badania własne kultur *L. flos-cuculi*, pozwoliły wyznaczyć optymalne parametry doświadczenia: długość czasu naświetlania, odległość lampy od naświetlanych roślin, ocenę morfologiczną prób. Na tej podstawie do eksperymentu użyto lampy o mocy 20 W, o spektrum emisyjnym obejmującym większość zakresu UV-B, ustawionej nad roślinkami w odległości 30 cm. Przegląd prac opisujących zastosowanie ultrafioletu w procesie elicytacji kultur *in vitro* pozwolił zaplanować schemat i przebieg doświadczenia [2,13,23].

Spektrum absorpcyjne związków fenolowych, takich jak kwasy fenolowe i flawonoidy, obejmuje zakres ultrafioletu. Najczęstszą odpowiedzią obronną rośliny na wysoką ekspozycję UV jest wzrost syntezy tej grupy związków [4]. Elicytację ultrafioletem, zarówno z zakresu UV-B jak i UV-C, zastosowano z powodzeniem w licznych eksperymentach biotechnologicznych mających na celu zwiększenie produkcji metabolitów wtórnych z różnych klas związków. Naświetlanie UV-B kultur kalusa i kultur zawieszinowych *Echinacea purpurea* doprowadziło do zwiększenia parametrów wzrostu biomasy, zwiększonej akumulacji związków fenolowych, głównie pochodnych kwasu kawowego, oraz wzrostu aktywności antyoksydacyjnej wyciągu z kalusa [23]. Irradiacja roślin z rodzaju *Alternanthera* spowodowała wzrost biosyntezy flawonoidów, beta-cyjanin i betaksantyn, związków zaangażowanych w absorpcję promieniowania UV-B [24]. Znaczny, nawet 3-krotny wzrost akumulacji związków fenolowych zaobserwowano w elicytowanych UV-B kulturach *Deschampsia antarctica*, jedyne gatunku trawy endemicznego dla Antarktyki, a więc obszaru o ubożonej ozonosferze i większej ekspozycji na ultrafiolet [25]. Również w niniejszej pracy skutkiem elicytacji

UV-B był proporcjonalny do ekspozycji wzrost akumulacji kilku kwasów fenolowych. Jednocześnie odnotowano spadek poziomu flawonoidów, jednak oznaczona w elicytowanych roślinach całkowita zawartość związków fenolowych jest wyższa niż w próbce kontrolnej.

Przykładem skutecznej elicytacji zwiększającej poziom innej grupy metabolitów są kultury pędowe *Physalis peruviana*, traktowane UV-B, w wyniku której wykazano zwiększoną aktywność syntazy skwalenu, enzymu niezbędnego dla syntezy triterpenoidów i steroidów. Krótka, 15-minutowa ekspozycja skutkowała 7-krotnym wzrostem biosyntezy związków steroidowych z grupy witanolidów [26]. Korzystny wpływ promieniowania UV-B na produkcję ekdysteroidów, hydrofilowych związków steroidowych, przedstawia praca dotycząca *Pfaffia glomerata* [12]. W elicytowanych roślinach osiągnięto podwyższoną akumulację ekdysteroidów, udowodniono również wpływ UV-B na ekspresję genów odpowiedzialnych za ich biosyntezę. W badaniach własnych nad *L. flos-cuculi*, gatunkiem również bogatym w ekdysterydy, nie udało się doprowadzić do zwiększenia ich akumulacji. Wykazano odwrotną zależność między czasem ekspozycji na ultrafiolet a ich poziomem w biomacie (rycina 3). Elicytacja promieniowaniem UV-B różnych systemów kultur *in vitro* *Catharanthus roseus*, skutkowała znacznym zwiększeniem produkcji winblastyny, winblastyny i katarantyny, cennych terapeutycznie alkaloidów indolowo-terpenowych [7,8].

Głównym szlakiem sygnalizacji odpowiedzialnym za reakcję na promieniowanie UV jest szlak receptora UVR8 (ang. *ultraviolet receptor 8*). Białko to występuje w cytozolu komórki roślinnej jako homodimer, który absorbując ultrafiolet rozpada się na monomery. Ulegają one reakcji z ligazą ubikwityny COP1 (ang. *constitutively photomorphogenic 1*) prowadząc do transdukcji sygnału i aktywacji czynników transkrypcyjnych HY5 (ang. *elongated hypocotyl 5*) oraz HYH (ang. *HY5 homologue*), które z kolei doprowadzają do ekspresji licznych genów kontrolujących biosyntezę metabolitów wtórnych [22]. Ważną rolę w sygnalizacji stresowej odgrywają również jony Ca^{2+} i reagujące na nie kalmoduliny oraz ich analogi (CML, ang. *calmodulin-like proteins*), a także kinazy klasy CDPK (ang. *calcium-dependent protein kinase*) [8].

W pracy zwrócono uwagę na kwestię techniczną dotyczącą elicytacji kultur promieniowaniem UV w warunkach aseptycznych, która wymagała odpowiedniego podejścia metodologicznego. Z uwagi na

silne pochłanianie promieniowania UV przez szkło, konieczne jest zarówno dobranie właściwego naczynia hodowlanego (np. słoika z szerokim otworem), jak i jego otwarcie podczas ekspozycji na ultrafiolet. Wskutek tego wraz z czasem ekspozycji spada wilgotność panująca w naczyniu hodowlanym, czego następstwem może być uszkodzenie rośliny np. przez jej odwodnienie prowadzące do stresu osmotycznego. Dodatkowo proces ten jest przyspieszony przez ciągły przepływ powietrza w komorze laminarnej. Nagłe zmniejszenie wilgotności stanowi zatem dodatkowy czynnik stresowy i potencjalny elicytor. Z tego względu do badań opisywanych w niniejszej pracy włączono grupę kontrolną mającą na celu określenie wpływu utraty wilgotności przez najdłuższy czas przeznaczony na napromieniowanie UV, lecz bez samej irradacji. Uzyskane wyniki sugerują wzrost zawartości niektórych metabolitów wtórnych spowodowany samym spadkiem wilgotności (ryciny 1,2,5). Znaną w biotechnologii roślin reakcją na spadek wilgotności lub powodującą stres osmotyczny elicytację glikolem polietylenowym czy mannitolem jest wzrost syntezy związków fenolowych [4].

Elicytację przeprowadza się często używając kombinacji różnych elicytorów, aby wzmocnić intensywność zabiegu biotechnologicznego. Promieniowanie UV-B stosowano m.in. w połączeniu z jasmonianem metylu [13] lub okresowym podwyższaniem temperatury [26]. Wysoką efektywnością odznacza się również łączenie elicytorów abiotycznych z biotycznymi, wykazującymi zróżnicowaną aktywność wobec tkanek roślinnych i prowokujących reakcje obronne związane z określoną grupą metabolitów wtórnych. Ostateczny efekt działania elicytorów jest ściśle powiązany z fazą wzrostu i wiekiem kultury [1].

Podobne lub nawet wyższe czasy ekspozycji różnych systemów *in vitro* na ultrafiolet stosowano w innych eksperymentach elicytacji, przy porównywalnej mocy lampy (20 W) i umiejscowieniu źródła promieniowania w odległości 30 cm od elicytowanych kultur. Kalus *Echinacea purpurea* naświetlano dziennie przez 2-6 godz. [23]. Kultury korzeni włośnikowych *Salvia miltiorrhiza* poddawano ekspozycji na UV-B przez 40 minut dziennie przez 9 dni [13].

Na tle podobnych eksperymentów, rezultaty elicytacji UV-B kultur *L. flos-cuculi* sugerują znaczną wrażliwość badanego gatunku na czynniki stresowe. Wyniki analiz TLC wskazują, że poziom wielu metabolitów wtórnych charakterystycznych dla firletki poszarpanej (ekdysteroidy, flawonoidy, triterpenoidy) maleje wraz z długością ekspozycji na promieniowanie UV-B. Wyjątek stanowią kwasy fenolowe, których akumulacja w elicytowanych kulturach jest wyraźnie wyższa, proporcjonalnie do ekspozycji, w stopniu statystycznie istotnym.

Stres fotoooksydacyjny występujący w komórkach elicytowanych roślin stwarza zagrożenie dla integralności materiału genetycznego i stanowi obciążenie dla metabolizmu, wyczerpując rezerwy endogennych antyoksydantów. Biorąc pod uwagę rolę kwasów fenolowych jako strukturalnie prostych metabolitów wtórnych o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, zdolnych do zmiatania wolnych rodników i jednocześnie absorbujących ultrafiolet w zakresie bliskim UV-B, zwiększenie biosyntezy tej grupy związków jest zrozumiałe [2,27]. Ponadto, jednym z następstw elicytacji UV-B jest wzrost aktywności enzymu PAL (amoniakoliza fenyloalaniny, ang. *phenylalanine-ammonia lyase*), istotnego w syntezie kwasów fenolowych [7].

Przedstawiona technika elicytacji opisuje metodę zwiększenia biosyntezy kwasów fenolowych w badanym gatunku. Metoda nie prowadzi do zwiększenia akumulacji ekdysteroidów i saponin triterpenoidowych w badanym taksonie. Opracowany model elicytacji UV-B może być jednak zastosowany do elicytacji innych taksonów, zarówno jako pojedynczy stresor lub w połączeniu z elicytorami biotycznymi.

Konflikt interesów /Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji/Correspondence address

✉ Michał P. Maliński

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej

i Biotechnologii Roślin

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Św. Marii Magdaleny 14; 61-861 Poznań

☎ (+48 61) 668 78 47

✉ mpmalinski@ump.edu.pl

Piśmiennictwo/References

1. Szpitter A, Królicka A. Stymulujący wpływ elicytorów biotycznych na produkcję farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach in vitro. *Biotechnologia*. 2005;4(71):82-108.
2. Jansen MAK, Hectors K, O'Brien NM, et al. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci*. 2008;175:449-58.
3. Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biol Res*. 2019;52:39.
4. Smetanska I. Sustainable Production of Polyphenols and Antioxidants by Plant In Vitro Cultures [In:]. Pavlov A., Bley T. [eds]. *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. 2018.
5. Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, Garcia-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 2018;248:1-18.
6. Cusido RM, Onrubia M, Sabater-Jara AB, et al. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnol Adv*. 2014;32(6):1157-67.
7. Naik PM, Al-Khayri J. Abiotic and Biotic Elicitors – Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants. [In:] Shanker AK, Shanker C [ed.] *Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives*. IntechOpen, 2016 <https://doi.org/10.5772/61442>.
8. Ramani S, Chelliah J. UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *BMC Plant Biol*. 2007;7:61.
9. Kayani WK, Kiani BH, Dilshad E, et al. Biotechnological approaches for artemisinin production in *Artemisia*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2018;34:54.
10. Skrzypczak L, Thiem B. Metabolity stresowe roślin wyższych. *Wiad Bot*. 1987;31(3):157-66.
11. Yavas I, Ünay A, Ali S, et al. UV-B Radiations and Secondary Metabolites. *TURJAF*. 2020;8(1):147-57.
12. Felipe SHS, Batista DS, Chagas K, et al. Accessions of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) with contrasting anthocyanin content behave differently in growth, antioxidative defense, and 20-hydroxyecdysone levels under UV-B radiation. *Protoplasma*. 2019;256:1557-71.
13. Halder M, Sarkar S, Jha S. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci*. 2019;19:880-95.
14. Maliński MP, Michalska AD, Tomczykowa M, et al. Ragged Robin (*Lychnis flos-cuculi*) – a plant with potential medicinal value. *Rev Bras Farmacogn*. 2014;24:722-30.
15. Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49:439-62.
16. Das N, Mishra SK, Bishayee A, et al. The phytochemical, biological, and medicinal attributes of phytoecdysteroids: An updated review. *Acta Pharm Sin B*. 2020;11(7):1740-66.
17. Mierziak J, Kostyn K, Kulma A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules* 2014;19: 16240-65.
18. Miguel-Chávez R. Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. [In:] *Phenolic Compounds: Biological Activity*; Soto-Hernandez, M., [Ed.]; InTechOpen: London, UK, 2017.
19. Maliński MP, Kikowska M, Kruszka D, et al. Various in vitro systems of Ragged Robin (*Lychnis flos-cuculi* L.): a new potential source of phytoecdysteroids? *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2019;139:39-52.
20. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*. 1962;15(3): 473-97.
21. Maliński MP, Kikowska MA, Soluch A, et al. Phytochemical Screening, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Biomass from *Lychnis flos-cuculi* L. In Vitro Cultures and Intact Plants. *Plants*. 2021;10:206.
22. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol*. 1999; 299:152-78.
23. Manaf HH, Rabie KAE, Abd El-Aal MS. Impact of UV-B radiation on some biochemical changes and growth parameters in *Echinacea purpurea* callus and suspension culture. *Ann Agric Sci*. 2016;61(2):207-16.
24. Klein FRS, Reis A, Kleinowski AM, et al. UV-B radiation as an elicitor of secondary metabolite production in plants of the genus *Alternanthera*. *Acta Bot Bras*. 2018; 32:615-23.
25. Sequeira A, Tapia E, Ortega M, et al. Production of phenolic metabolites by *Deschampsia antarctica* shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor. *Electron J Biotechnol*. 2012; 15(4):1-8.
26. Sahin G, Telli M, Ünlü ES, et al. Effects of moderate high temperature and UV-B on accumulation of withanolides and relative expression of the squalene synthase gene in *Physalis peruviana*. *Turk J Biol*. 2020;44:295-303.
27. Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol*. 2010;30:161-75.