

OVLIVNĚNÍ PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ V BUNĚČNÉ KULTUŘE *Silybum marianum* PŘÍDAVKEM ELICITORU PARAQUAT

LENKA TŮMOVÁ^a a JIŘÍ TŮMA^b

^a Katedra farmakognosie, Farmaceutická fakulta UK v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,

^b Katedra biologie, Pedagogická fakulta, Universita Hradec Králové, Víta Nejedlého 573, 500 03 Hradec Králové
tumova@faf.cuni.cz

Došlo 17.6.08, přepracováno 17.10.08, přijato 23.10.08.

Klíčová slova: elicítace, flavonoidy, *Silybum marianum*, methylviologen, paraquat

Úvod

Vyšší rostliny jsou nejen důležitým zdrojem potravin, dřeva, vlákniny, olejů, ale také poskytují nejbohatší výběr přírodních látek, z nichž mnohé jsou využívány v medicíně, kosmetice a potravinářství. Odhaduje se, že asi 30 000 známých přírodních produktů je z více než 80 % rostlinného původu a asi třetina vyráběných léčivých přípravků obsahuje biogenní látky rostlinného původu nebo z nich získané deriváty¹. Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky únosnou organickou syntézou a jejich výroba pomocí genového inženýrství v mikrobiálních systémech není zatím řešitelná, protože vznikají mnohostupňovými syntézami. Jednou z možností, jak získat požadované rostlinné látky, je i využití rostlinných explantátových kultur¹. Vzhledem k tomu, že až na výjimky je charakteristickým problémem kultivace rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* nízká produkce sekundárních metabolitů těmito kulturami, jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšené produkce sekundárních látek je metoda elicítace.

Elicítací vyvolaný stres aktivuje obranné reakce rostliny či rostlinného explantátu, které vedou, mimo jiné, ke změně transkripce genů kódujících enzymy ovlivňující biosyntézu sekundárních metabolitů². Elicítace rostlinných kultur za účelem zvýšené produkce sekundárních látek je v současné době studována především pro svoji jednoduchost. Navíc se jedná o metodu ekonomicky výhodnou bez velkých nároků na prostory. Základním předpokladem úspěšné elicítace je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby jeho působení na rostlinnou kulturu *in vitro*. Elicitor stojí na počátku všech obranných reakcí jako spouštěcí faktor².

Cílem práce bylo zjistit vliv potenciálního elicitoru – methylviologenu na produkci flavonolignanů a v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum*.

Methylviologen (paraquat)

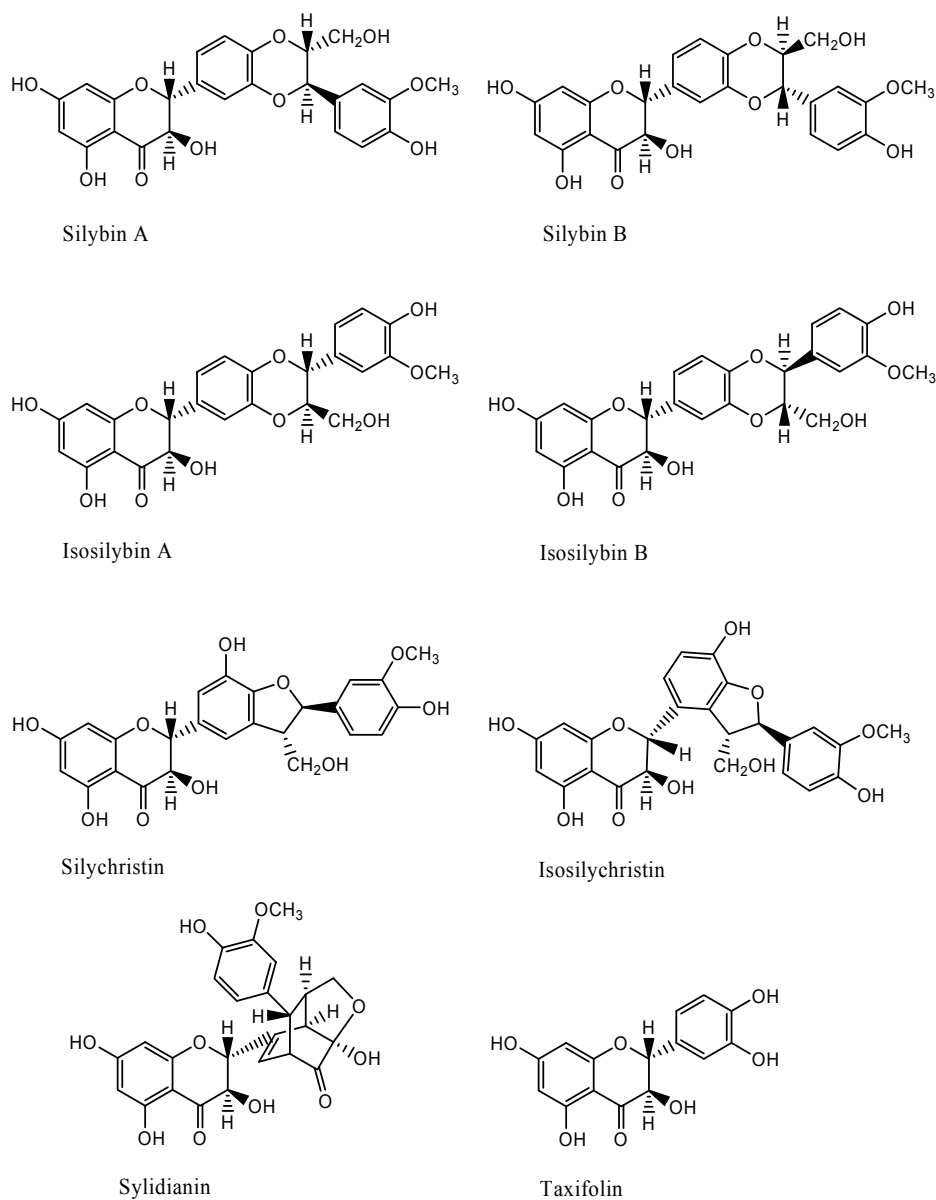
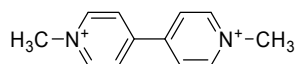
Methylviologen neboli paraquat lze zařadit mezi bipyridilové herbicidy, které jsou využívány jako kontaktní herbicidy či vysušovačla polí. Základní mechanismus působení oxidativního stresu bipyridilů je dán tím, že po jejich působení dochází ke vzniku volných hydroxylových radikálů, které jsou toxické a reagují s membránovými lipidy (peroxidace lipidů)³. Působením methylviologenu se zvyšuje v rostlinách či kulturách *in vitro* množství aktivních forem kyslíku (ROS). Jako zdroj ROS je často používán ke sledování působení oxidačního stresu na rostliny a může tudíž ovlivnit produkci sekundárních látek⁴.

Vliv methylviologenu byl testován na kultuře *Silybum marianum in vitro*. Jako droga se používá v terapii *Cardui mariae fructus* (usušený zralý plod druhu *Silybum marianum* (L.) GAERTN.). Musí obsahovat nejméně 1,0 % silymarinu, počítaného jako silybin⁵.

Obsahové látky a terapeutické účinky *Silybum marianum*

Hlavními obsahovými látkami *Silybum marianum* je skupina flavonolignanů komplexně nazývaná silymarin (1,5–3 %). Silymarin je isomerní směs obsahující silybin, isosilybin (1:1 směs diastereoisomerů), silychristin a silydianin. Další významné flavonolignany identifikované v *Silybum marianum* jsou 2,3-dehydrosilybin, 2,3-dihydrosilychristin, dále flavonoidy jako taxifolin, apigenin a jeho 7-*O*-glukosid, 7-*O*-glukuronid, 4,7-diglukosid, dále kaemferol, jeho 7-*O*-glukosid a 3-sulfát, luteolin a jeho 7-glukosid. Z dalších látek byly prokázány sitosterol a jeho glukosid, polyacetyleny, kyselina fumarová⁶.

U silymarinového komplexu byla prokázána antioxidační, antihepatotoxická, antiflogistická a protialergická aktivita. Hepatoprotektivní účinky se projevují u alkoholem indukované, akutní a chronické virové hepatitidy, hepatitidy navozené organickými látkami, toxiny a drogami⁷. Dále byly prokázány účinky antitumorové. Se stabilizací buněčných membrán souvisí antialergická aktivita (stabilizuje buněčnou stěnu žírných buněk), což souvisí s antioxidačním účinkem silymarinu, jeho schopností vychytávat volné radikály a inhibovat lipidovou peroxidasu⁷. Působí jako choleretikum a slabé spasmolytikum. Silymarin se dobře vstřebává z trávicí soustavy a rychle se vylučuje žlučí (max. hladina asi 1 h po podání). Vlivem zpětné resorpce z tlustého střeva se silymarin zadržuje v enterohepatálním oběhu a tím je podmíněn jeho ochranný účinek proti hepatotoxinům a při jaterních cirhózách⁸. V nedávné době byly přesně určeny struktury silybinu A a B a popsány některé zcela nové mechanismy účinků na signální procesy ve zdravých a nádorových buňkách⁹.

Obr. 1. Chemická struktura hlavních složek silymarinového komplexu⁶

PQ (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium ion)

Obr. 2. Chemická struktura methylviologenu (paraquat)⁴

Experimentální část

Materiál a metody

Přístroje

Kolona LiChrospher RP-18 250-4, sorbent Li Chrospher 5 μm ; mikrofiltry (0,45 μm), Tessek, ČR; předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5 μm ; pumpa Jasco PU-2089 Plus, Japonsko; termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko.

Chemikálie

Methanol HPLC grade, Merck, Německo; methanol p.a., Penta, ČR; methylviologendichlorid hydrát, Sigma-Aldrich, ČR; Silymarin p.a., Sigma-Aldrich, ČR.

Biologický materiál

Byla použita tkáňová kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Silybum marianum* (L.) Gaertn. v 34.–40. pasáži.

Pasážování a kultivace

V prostředí laminárního boxu bylo do sterilizovaných Erlenmayerových baněk přeneseno inokulum (část kalusu z předchozí kultivace) na můstek z filtračního papíru (u kalusové kultury) nebo přímo do živného media Murshigeho a Skooga (MS)¹¹ (u suspenzní kultury, po mechanickém rozmělnění kalusu). Baněk s naočkovanými kulturami byly opět uzavřeny hliníkovou folií. Kultivace probíhala za normálního světelného režimu (16 h světlo, 8 h tma). Kultura rostla po dobu 30 dnů při 25 °C. Suspenzní kultura byla kultivována na třepačce (120 ot min⁻¹) za stejných světelných a teplotních podmínek.

Elicitace kalusových kultur

Jako elicitor byl použit roztok methylviologendichlorid dihydrátu v ethanolu, ve třech koncentracích, a to:

$$c_1 = 10,0 \text{ mg}/100 \text{ ml} \ (2,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}),$$

$$c_2 = 1,0 \text{ mg}/100 \text{ ml} \ (2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}),$$

$$c_3 = 0,1 \text{ mg}/100 \text{ ml} \ (2,19 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}).$$

Na základě vyhodnocení růstové a produkční křivky tkáňové kultury *Silybum marianum* v předchozí studii¹² byl zvolen optimálním dnem k aplikaci elicitoru 30. den po subkultivaci. Po 30 dnech od subkultivace byl do 30 baněk pipetován vždy 1 ml elicitoru. Elicitor byl přidáván za aseptických podmínek pomocí sterilních nástrojů. Kalusy byly z baněk odebírány v šesti časových intervalech od aplikace elicitoru po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách.

Tkáňové kultury byly po uvedené době z baněk vyjmuty a usušeny na filtračním papíru za laboratorní teploty. Získané usušené kalusy byly rozetřeny v třecí misce a použity ke stanovení obsahu flavonolignanů. Jako kontrola byla zvolena tkáňová kultura pěstovaná bez přídavku elicitoru.

Bylo sledováno i vylučování metabolitů do živného média. Vzorky média nebyly odebírány pravidelně. Odebrané médium (6 ml) bylo odpařeno na vakuové odparce a získaný odparek byl rozpuštěn v 6 ml methanolu a analyzován.

Elicitace suspenzních kultur

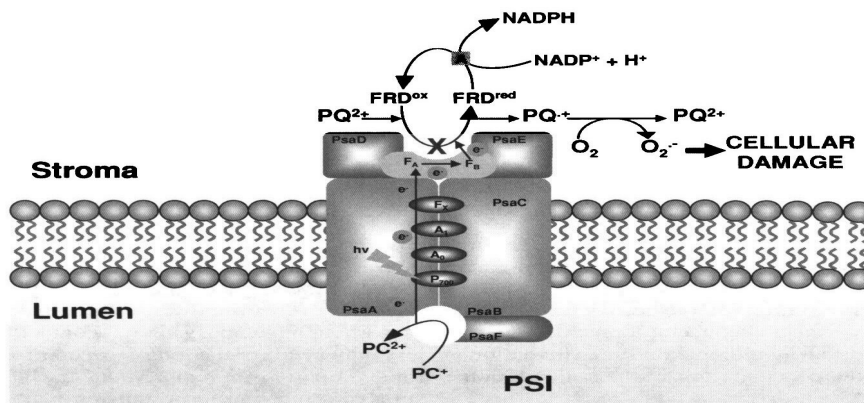
Suspenzní kultury byly získány mechanickým rozmělněním kalusu ve 30 ml živného média. Tyto kultury byly kultivovány 30 dnů na třepačce 120 ot min⁻¹, která zabezpečovala promíchávání a provzdušňování živné půdy. Elicitace suspenzních kultur a jejich následné zpracování bylo stejné jako u kultur kalusových.

Stanovení obsahu flavonolignanů v kalusu**Parametry HPLC analýzy**

HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250 × 4 (5 μm) s ochranou předkolonkou. K detekci byl použit DAD detektor (190 až 450 nm). Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 288 nm. Objem nástřiku byl 20 μl. Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově, z 0 % methanolu v čase $t = 0$ do 50 % methanolu v čase $t = 5$ min. Následovala isokratická eluce 50% methanolem do času $t = 25$ min. Mobilní fáze obsahovala jako pufr vždy 0,15 % kyseliny fosforečné. Průtok byl 1,4 ml min⁻¹. Standardy: Silymarin p.a., Sigma-Aldrich, ČR.

Validace HPLC analýzy

Instrumentální validace byla zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco), a to normou ISO 9001



Obr. 3. Mechanismus herbicidního účinku methylviologenu⁴; PSI – fotosystém 1, PC – plastocyanin, FRD – feredoxin, PQ – plastoquinon, NADP – nikotinamidadeninindukleotid, NADPH – nikotinamidadeninindukleotid redukovaný, Cellular damage – poškození buňky

(International Organization for Standardization).

Způsobnost chromatografických systémů byla navíc ověřena testem opakovaného nástřiku – tzv. testem na přesnost (provedeno vždy šest nástřiků týž vzorkem, vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a testem linearity (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu r , která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékopisu, 3. vydání: *Asymetrie píku a počet teoretických pater*¹³. Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry: Správnost metody – jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem)^{14,15}. Kvantitativní limit – jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %)^{14,15}.

Byl použit standard silymarinu, který obsahoval průměrně 5,230 % taxifolinu, 24,731 % silychristinu, 3,094 % silydianinu, 23,831 % silybinu A, 30,009 % silybinu B, 7,159 % isosilybinu A a 2,216 % isosilybinu B (uvedená procenta jsou vypočtena jako poměr plochy příslušného píku k celkové ploše všech píků ve standardu). Kalibrační přímky pro jednotlivé látky byly sestaveny metodou nejmenších čtverců, a to na základě analýz standardu silymarinu a výpočtu jejich množství z průměrného obsahu. Opakovatelnost metody (měřeno na standardu silymarinu) jsme charakterizovali směrodatnou odchylkou ($s_x = 0,0009$), která dosahovala výše 0,9 % průměrné hodnoty. Odchylka byla pod limitem dovolené diference pro opakovatelnost metody ($R_{max} = 0,00664$), na hladině významnosti $P = 0,95$.

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. U této metody byly meze detekce následující: taxifolin 0,0005 %, silychristin 0,0001 %, silydianin 0,0006 %, silybin A 0,0001 % silybinu B 0,0001 %, isosilybin A 0,0005 % a isosilybin B 0,0010 %.

Tabulka I

Obsah flavonolignanů (%) v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Elicitor: methylviologen (MV)

Koncentrace methylviologenu [mol l^{-1}]	Doba odběru [h]	Obsah flavonolignanů [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota test. kritéria
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	OK ^a	0,0008	0,0001	–
	6	0,002	0,0004	3,7283
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	OK ^a	0,0008	0,0001	–
	6	0,0100	0,0024	5,2633
	12	0,0030	0,0003	7,9046
	24	0,0040	0,0024	1,8044
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	OK ^a	0,0008	0,0001	–
	6	0,0040	0,0004	9,4779
	12	0,0030	0,0005	5,4828
	24	0,0040	0,0006	7,3522
	48	0,0040	0,0004	9,4779
	72	0,0070	0,0004	21,9996
	168	0	0	0

^aOK – kontrola v době 0 h. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení

Postup stanovení

Sušené vzorky kalusů a suspenzí kultur (300 až 500 mg) byly po rozdrobnění v třecí misce dvakrát extrahovány vždy 10 ml methanolu po dobu 10 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Oba extrakty byly spojeny a doplněny na 20 ml. Po filtraci přes mikrofiltr (0,45 μm) bylo asi 1,7 ml roztoku převedeno do zkumavky a analyzováno metodou HPLC. Vzorky média byly nejprve vysušeny na vakuové odparce a poté rozpuštěny v methanolu a po filtraci převedeny do zkumavek a analyzovány metodou HPLC. Obsah flavonolignanů byl vztažen na suchou hmotnost kultury *in vitro*. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení.

Výsledky a diskuse

Ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah flavonolignanů byl použit t-test rozdílů dvou průměrů. Pro zvolenou hladinu významnosti $P=0,05$ a pro 4 stupně volnosti $v=4$ je kritická hodnota testovacího kritéria 2,78.

V kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. došlo ke statisticky významnému nárůstu obsahu flavonolignanů pouze po 6 hodinové elicitaci methylviologenum

o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a to o 1250 %. Po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách se obsah flavonolignanů zvýšil jen nepatrně nebo naopak významně poklesl (tab. I). U zbývajících testovaných koncentrací elicitoru při aplikaci k suspenzní kultuře byl nárůst produkce flavonolignanů minimální.

V suspenzní kultuře *Silybum marianum* byla produkce flavonolignanů po aplikaci u všech tří koncentrací methylviologenum nepatrná, jen jednou dosáhla stejné produkce ve srovnání s kontrolním vzorkem, a to po 6 hodinové elicitaci methylviologenum o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (tab. II). Gallová¹² detegovala v kalusové kultuře *Silybum marianum* pouze silychristin. Řimáková¹⁶ našla v kalusových kulturách *Silybum marianum* po elicitaci prekurzorem konyferylalkoholem taxifolin a silydianin a to silydianin u kontrolních vzorků i v živném médiu, taxifolin pouze v živném médiu. Po elicitaci suspenzní kultury *Silybum marianum* chitosanem nebyla detegována žádná ze složek silymarinového komplexu. V kontrolních vzorcích média byl však detegován taxifolin. V buňkách kontrolních vzorků kalusové kultury ani v kalusové kultuře *Silybum marianum* Řimáková¹⁶ neprokázala po elicitaci UV zářením žádnou ze složek silymarinového komplexu, jen vysoké koncentrace fenolových kyselin.

V této studii byla detegována v kalusové kultuře kro-

Tabulka II

Obsah flavonolignanů (%) v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Elicitor: methylviologen (MV)

Koncentrace methylviologenum [mol l ⁻¹]	Doba odběru [h]	Obsah flavonolignanů [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	0K	0,0040	0,0004	–
	6	0	0	0
	12	0,0020	0,0004	4,3815
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0,0030	0,0006	1,7715
	168	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	0K	0,0040	0,0004	–
	6	0,0040	0,0003	5,3717
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0,0010	0,0004	6,7331
	168	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	0K	0,0040	0,0004	–
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0,0010	0,0003	7,8779
	72	0,0020	0,0003	5,2786
	168	0,0010	0,0002	8,3236

Tabulka III

Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v kalusové kultuře *Silybum marianum* při použití různých koncentrací elicitoru methylviologenu (MV)

Koncentrace MV [mol l ⁻¹]	Doba odběru [h]	TAX ^b [%]	SILCHR ^c [%]	ISO B ^d [%]	Silymarin komplex
	OK ^a	0	0	0	0
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	6	0	0,002	0	0,002
	12	0	0	0	0
	24	0,001	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0,011	0	0	0
	168	0	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	6	0	0,008	0,002	0,01
	12	0,016	0,003	0	0,003
	24	0	0,004	0	0,004
	48	0	0	0	0
	72	0,002	0	0	0
	168	0,002	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	6	0,001	0,004	0	0,004
	12	0	0,003	0	0,003
	24	0,001	0,004	0	0,004
	48	0	0,004	0	0,004
	72	0	0,007	0	0,007
	168	0	0	0	0

^a OK – kontrola v době 0 h. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení, ^b TAX – taxifolin, ^c SILCHR – silychristin, ^d ISO B – isosilybin B

mě taxifolinu, silychristinu ještě další složka silymarinového komplexu – isosilybin B a to pouze v nepatrném množství (0,002 %) po 6 hodinovém působení elicitoru methylviologenu o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ (tab. III).

V suspenzní kultuře byly zjištěny tyto složky silymarinového komplexu: isosilybin A (po působení methylviologenu (MV) 12 hodin o koncentraci $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ a po působení 72 hodin MV o koncentraci $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹), isosilybin B (po 12 h působení MV o $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ a po 48 h působení MV o $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹), silybin A (po 72 h působení MV o $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹) a silychristin (po 6 a 72 h působení MV o $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹), dále pak taxifolin (u všech tří koncentrací MV). Všechny složky byly zastoupeny pouze v minimálních množstvích, podrobněji tab. III a IV.

V kontrolních vzorcích suspenzní i kalusové kultury *Silybum marianum* nebyl taxifolin zaznamenán vůbec, pouze v kontrolách suspenzních kultur bylo detegováno nepatrné množství silybinu A a B. Všechny složky silymarinového komplexu zjištěné jak u suspenzních, kalusových kultur, tak v živném médiu byly prokázány pouze v nepatrných množstvích (tab. III, tab. IV).

Při náhodném odběru vzorků média při kultivaci suspenzní kultury byl stanoven pouze silybin A (0,001 %)

po 12 hodinovém působení methylviologenu o koncentraci $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹.

U suspenzních i kalusových kultur *Silybum marianum* po působení různých koncentrací methylviologenu bylo zajímavé zvýšení obsahu taxifolinu. Dá se tedy předpokládat, že methylviologen působí jako stresový faktor vyvolávající zvýšenou tvorbu obranných látek – flavonoidů (v tomto případě taxifolinu). Důvodů nízké produkce flavonolignanů v kultuře *Silybum marianum* může být několik. Jedním z nich mohlo být stáří kultury. V této studii byly použity kalusové a suspenzní kultury v 34.–40. pasáži. Gallová¹² ve své studii použila kalusovou a suspenzní kulturu v 10.–25. pasáži. Obsah flavonolignanů však prokazatelně klesal a již ve 34. pasáži byla jejich produkce nulová. Řimáková¹⁶ použila ve své studii nově odvozenou kulturu a elicitační pokusy byly zahájeny od 5. pasáže. Také Alikardis a spol.¹⁷ ve své studii pozorovali pokles produkce flavonolignanů kulturou *Silybum marianum* v závislosti na jejím stáří. Dalším faktorem mohla být volba živného média nebo volba růstových regulátorů. Podle typu a koncentrace auxinů může docházet k pozitivnímu nebo negativnímu ovlivnění biosyntézy nebo akumulace sekundárních produktů¹⁸. Dalším důvodem mohl být nevhodně zvolený elicitor. Předpokladem

Tabulka IV

Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* při použití různých koncentrací elicitoru methylviologenu (MV)

Koncentrace MV [mol l ⁻¹]	Doba odběru [h]	TAX ^b [%]	SILCHR ^c [%]	SIL A ^d [%]	ISO A ^e [%]	ISO B ^f [%]	Silymarin komplex
	0K ^a	0	0	0	0	0	0
$c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3}$	6	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0,001	0,001	0,002
	24	0,003	0	0	0	0	0
	48	0,002	0	0	0	0	0
	72	0	0	0,003	0	0	0,003
	168	0	0	0	0	0	0
$c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4}$	6	0,003	0,004	0	0	0	0,004
	12	0,002	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0,001	0	0	0	0	0
	72	0	0,001	0	0	0	0,001
	168	0,001	0	0	0	0	0
$c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5}$	6	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0,002	0	0	0	0,001	0,001
	72	0,001	0	0	0,001	0	0,002
	168	0,001	0	0	0	0	0,001

^aOK – kontrola v době 0 h. Získané výsledky jsou průměrem 3 paralelních stanovení, ^bTAX – taxifolin, ^cSILCHR – silychristin, ^dSIL A – silydianin, ^eISO A – isosilybin A, ^fISO B – isosilybin B

úspěšné elicitace je použití vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doba působení. Sánchez-Sampedro a spol.¹⁹ ve své studii dosáhli největší produkce silymarinu použitím elicitoru methyljasmonátu v koncentraci 100 μM, a to o 600 % oproti kontrole. Chen a spol.²⁰ ve své studii sledovali vztah mezi působením reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a produkcí fytoalexinu v kulturách *Salvia miltiorrhiza*. Jako původce superoxidového anionu použili methylviologen. Působení methylviologenu (MV) na rozdíl od působení peroxidu vodíku spustilo produkci fytoalexinu kryptotanshinonu ve všech sledovaných kulturách. Zároveň MV inhiboval tvorbu biomasy a snížil obsah fenolových kyselin.

Práce vznikla díky podpoře Výzkumného úkolu MSM 0021620822 -Výzkum nových lékových struktur.

LITERATURA

- Vodrážka Z.: *Biotechnologie*, str. 7, 63. Academia, Praha 1992.
- Beiderbeck R., Reichling J.: *Biologie* 5, 453 (1989).
- Abdollahi M., Rajnbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A.: *Med. Sci. Monitor.* 10, 141 (2004).
- Ke D. S., Sun G. C., Wang Z. X.: *Plant Growth Reg* 51, 83 (2007).
- Kolektiv autorů: *Český lékopis 2005*. Grada Publishing, Praha 2005.
- Wichtl M.: *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, str. 121. Medfarm, Marburg 1994.
- Kosina P., Bartek J.: *Chem. Listy* 94, 115 (2000).
- Flora M. D. K., Hahn M. D. M., Rosen M. D. H., Banner M. D. K.: *Am. J. Gastroenterol.* 93, 139 (1998).
- Fraschini F., Demartini G., Esposti D.: *Clinic. Drug Investig.* 22, 51 (2002).
- Křen V., Gažák R., Walterová D., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 100, 565 (2006).
- Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant* 15, 473 (1962).
- Gallová K.: *Rigorózní práce*. Universita Karlova, Praha 2003.
- Kolektiv autorů.: *European Pharmacopeia*, 4. vyd. EDQM, Strassburg 2002.
- Kolektiv autorů.: ČSN ISO 3534-1, Statistika-slovník,

- značky, část 1.: Pravděpodobnost a obecné statistické termíny, ČNI, Praha 1994.
15. Kolektiv autorů: Věstník SÚKL 1994.
 16. Řimáková J.: *Disertační práce*. Universita Karlova, Praha 2005.
 17. Alikaris F., Papadakis D., Pantelia K., Kephelas T.: *Fitoterapia* 71, 379 (2000).
 18. Tůmová L., Gallová K., Řimáková J.: *Čes. Slov. Farm.* 53, 135 (2004).
 19. Sánchez-Sampedro M. A., Fernández-Tárrago J., Corchete P.: *J. Biotechnol.* 110, 60 (2005).
 20. Chen H., Chen F.: *Biotechnol. Lett.* 22, 715 (2000).

L. Tůmová and J. Tůma (^a *Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové,* ^b *Department of Biology, Pedagogical Faculty, University, Hradec Králové*): **Affecting Production of Secondary Metabolites in *Silybum marianum* Cell Culture by Paraquat Elicitor Treatment**

Elicitation is one of the methods used for increasing the production or accumulation of secondary metabolites. The present study investigates the effect of time and concentration of methylviologen (paraquat) as abiotic elicitor on the flavonolignan production by *Silybum marianum* callus and suspension cultures. The cultures were cultivated on a Murashige-Skoog medium with addition of 10 mg l^{-1} of 1-naphthylacetic acid. The content of flavonolignans was determined by HPLC. The maximal content of flavonolignans was obtained at the methylviologen concentration in callus cultures $c = 2.19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. The production of flavonolignans in suspension culture was little influenced by elicitation.