

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VLIV SYNTETICKÉHO BENZYL-SULFANYLPYRIDINOVÉHO DERIVÁTU NA PRODUKCI SUSPENZNÍ KULTURY

Trifolium pratense L.

MARIE KAŠPAROVÁ^a, TOMÁŠ SIATKA^a,
VĚRA KLIMEŠOVÁ^b a JAROSLAV DUŠEK^a

^a Katedra farmakognosie, ^b Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Universita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
kasparova@faf.cuni.cz

Došlo 18.10.11, 20.12.11.

Klíčová slova: elicitor, explantát, fytoalexiny

Úvod

Produkcí sekundárních metabolitů v rostlinách i v rostlinných kulturách *in vitro* je možné stimulovat metodou elicítace. K elicítaci se používají látky se signálním účinkem, tzv. elicitory, které působí jako stresové faktory – spouští obrannou odpověď exponovaných buněk. Dávají podnět k expresi genů, syntéze enzymů a tímto způsobem navozují zvýšení syntézy fytoalexinů i jiných sekundárních metabolitů a látek podílejících se na ochraně rostliny nebo explantátu. Elicitory se rozdělují na biotické (např. mikroorganismy a jejich součásti, fytohormony) a abiotické (fyzikální, např. záření, nebo chemické, např. těžké kovy). Dosavadní poznatky naznačují, že elicítace představuje potenciálně ekonomicky výhodný způsob získávání přírodních látek, který může v budoucnosti nabývat na významu^{1–7}.

U rostlinných kultur *in vitro* jsou v poslední době testovány jako potenciální elicitory také některé nově syntetizované chemické látky, např. alkylsulfanylderiváty pyridinu – slibná potencionální antituberkulotika⁸. 2-(2-Fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid připravený jako antimykobakteriální nebo antifungální sloučenina inhibuje fotosyntézu v chloroplastech špenátu⁹. Působení tohoto syntetického derivátu na rostlinný metabolismus nás vedlo ke sledování jeho elicitačního účinku na produkci flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní kulturou jetele lučního – *Trifolium pratense* (*Fabaceae*). Při elicítaci dochází k posílení transkripce genů fenylpropanového metabolismu, tedy genů kódujících enzymy (fenylalanin-

amoniaklyasa, chalkonsyntasa apod.) nezbytné k syntéze flavonoidů a isoflavonoidů, které jsou řazeny k nejvýznamnějším fytoestrogenům^{10–12}.

Experimentální část

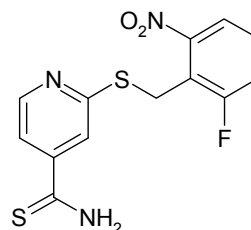
Biologický materiál

K pokusům byla použita dvouletá suspenzní kultura odvozená z klíční rostliny *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus a varieta DO-8, získané ze Šlechtitelské stanice Domoradice v Čechách). Tato kultura (homogenní populace buněk) byla kultivována při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma na roleru (8 ot min⁻¹) v tekutém živném médiu podle Gamborga (B5)¹³ s přidavkem 2 mg l⁻¹ 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 2 mg l⁻¹ 6-benzylaminopurinu. Subkultivační interval byl 14 dní (cit.¹⁴).

Elicítace

K elicítaci suspenzní kultury byl použit elicitor – 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid (*vszorec 1*) o koncentracích 1 μmol l⁻¹, 10 μmol l⁻¹ a 100 μmol l⁻¹ rozpuštěný v 96% ethanolu.

1,00 ml roztoku elicitoru byl přidáván do kultivačního média (objem 25 ml) ve 21. dni kultivace kultury¹⁴. Ke kontrolním kulturám byl přidáván 1,0 ml 96% ethanolu. Délka aplikace elicitoru byla 6, 24, 48 a 168 hodin, potom byly elicítované kultury sklizeny. Kontrolní kultury byly sklizeny po 6 a 168 hodinách, neboť jejich produkce se v krátkých časových intervalech významně nemění. Všechny sklizené buňky byly odděleny od média filtrací za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a usušeny za laboratorní teploty. V usušených buňkách byl stanoven obsah flavonoidů a isoflavonoidů.



Vzorec 1. 2-(2-Fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid

Stanovení flavonoidů

Flavonoidy byly stanoveny spektrofotometricky dle Českého lékopisu 2009 po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v bezvodé kyselině mravenčí¹⁵. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny t-testem pro minimálně 3 členy souboru a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$.

Stanovení isoflavonoidů

Ke stanovení isoflavonoidů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorometrickou detekcí¹⁶. Podmínky HPLC stanovení byly následující: kolona Lichrospher RP-18 (250 × 4 mm, velikost částic 5 μm) s předkolonou ze stejného materiálu; eluce: lineární gradient mobilní fáze A (methanol) ve fázi B (voda s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné) 30–80 % od 0 do 9 minut byl následován isokratickou elucí mobilní fázi ve složení 80 % fáze A ve fázi B od 9 do 15 minut; rychlost eluce 1,1 ml min^{-1} ; detekce při vlnové délce 260 nm. Standardy: genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A. Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou meto-

dou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny t-testem pro minimálně 3 členy souboru a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$.

Příprava vzorků: usušené buňky byly po rozmělnění v třecí misce (asi 0,200 g) dvakrát extrahovány 10 ml 80% methanolu na vodní lázni pod zpětným chladičem 30 minut. Získané výluhy byly spojeny a doplněny extrakční směsí na objem 25,0 ml. Přibližně 2,0 ml výluhu byly filtrovány přes mikrofiltr (0,45 μm) do označených zkumavek a analyzovány metodou HPLC.

Výsledky a diskuse

Syntetický derivát 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid byl testován jako potenciální elicitor biosyntézy isoflavonoidů a flavonoidů suspenzní kulturou jetele lučního. Úspěšná elicítace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor a pro každou explantátovou kulturu. V této práci byla sledována koncentrace a doba působení elicitoru. Koncen-

Tabulka I

Vliv elicítace na obsah flavonoidů v suspenzní kultuře jetele lučního (varietá Tempus)

Koncentrace elicitoru [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Doba elicítace [h]	Obsah flavonoidů ^a [mg g^{-1} sušiny]
0	6	0,21 ± 0,03
	24	0,21 ± 0,03
	48	0,21 ± 0,03
	168	0,24 ± 0,05
1	6	0,20 ± 0,04
	24	0,37* ± 0,01
	48	0,66* ± 0,03
	168	0,36 ± 0,04
10	6	0,24 ± 0,06
	24	0,90* ± 0,02
	48	1,13* ± 0,02
	168	0,76* ± 0,04
100	6	0,42* ± 0,07
	24	0,44* ± 0,03
	48	0,95* ± 0,02
	168	0,35 ± 0,04

^a Hodnoty představují průměr ± směrodatná odchylka ($n = 3$); hodnoty označené hvězdičkou jsou statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolní kulturou bez elicitoru ($\alpha = 0,05$)

Tabulka II

Vliv elicítace na obsah flavonoidů v suspenzní kultuře jetele lučního (varietá DO-8)

Koncentrace elicitoru [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Doba elicítace [h]	Obsah flavonoidů ^a [mg g^{-1} sušiny]
0	6	0,71 ± 0,02
	24	0,71 ± 0,02
	48	0,71 ± 0,02
	168	0,73 ± 0,03
1	6	0,72 ± 0,01
	24	0,73 ± 0,03
	48	0,75 ± 0,06
	168	0,17 ± 0,04
10	6	0,79* ± 0,02
	24	1,09* ± 0,03
	48	1,10* ± 0,02
	168	0,91* ± 0,05
100	6	0,87* ± 0,03
	24	1,14* ± 0,04
	48	1,41* ± 0,02
	168	1,28* ± 0,05

^a Hodnoty představují průměr ± směrodatná odchylka ($n = 3$); hodnoty označené hvězdičkou jsou statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolní kulturou bez elicitoru ($\alpha = 0,05$)

Tabulka III

Vliv elicítace na obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře jetele lučního (varietá Tempus)

Koncentrace elicitoru [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Doba elicítace [h]	Genistin ^a [mg g^{-1} sušiny]	Daidzein ^a [mg g^{-1} sušiny]	Genistein ^a [mg g^{-1} sušiny]
0	6	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,10 ± 0,02
	24	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,10 ± 0,02
	48	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,10 ± 0,02
	168	0,11 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,03
1	6	0,16 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,20* ± 0,01
	24	0,17* ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,12 ± 0,04
	48	0,28* ± 0,02	0,19* ± 0,01	0,11 ± 0,02
	168	0,14 ± 0,2	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,02
10	6	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,10 ± 0,03
	24	0,15* ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,10 ± 0,02
	48	0,22* ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,02
	168	0,21* ± 0,02	0,14 ± 0,03	–
100	6	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,05
	24	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,02
	48	0,15* ± 0,01	0,11 ± 0,01	–
	168	0,18 ± 0,04	0,11 ± 0,02	–

^a Hodnoty představují průměr ± směrodatná odchylka ($n = 3$); hodnoty označené hvězdičkou jsou statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolní kulturou bez elicitoru ($\alpha = 0,05$)

trační rozmezí bylo zvoleno podle obvykle používaných koncentrací u tohoto typu elicitoru^{17–19}. Doby působení elicitoru vycházely z poznatků již provedených pokusů a z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po přidání elicitoru^{3,17,20}.

Nejprve byl zjišťován vliv pyridinového derivátu na produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* (varietá Tempus a varietá DO-8). Z výsledků uvedených v tab. I a II je zřejmé, že použitý elicitor produkci flavonoidů ovlivnil pozitivně. S rostoucí koncentrací elicitoru a dobou aplikace (6, 24, 48 hodin) se elicitační účinek zvyšoval. U variety Tempus maximální obsah flavonoidů (1,13 mg g^{-1} sušiny) vyvolala 48hodinová aplikace koncentrace elicitoru 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$, kdy došlo k statisticky významnému zvýšení produkce o 438 % oproti kontrole. Nejsilnější koncentrace elicitoru již tuto hodnotu nepřekročila. U všech sledovaných koncentrací elicitoru došlo k statisticky významnému zvýšení produkce již po 24hodinovém působení, ovšem nejlepší elicitační účinek měla vždy 48hodinová aplikace elicitoru.

Také u variety DO-8 byl nejlepší elicitační účinek prokázán u všech sledovaných koncentrací po 48hodinové aplikaci elicitoru. Maximální obsah flavonoidů (1,41 mg g^{-1} sušiny) byl zjištěn po 48hodinové aplikaci nejsilnější koncentrace 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$, což představuje statisticky významné zvýšení produkce v porovnání s kontrolou o 99 %.

Dále byl sledován vliv zkoušeného elicitoru na produkci isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense*

(varietá Tempus a varietá DO-8). Z výsledků shrnutých v tab. III a IV vyplývá, že v kontrolních kulturách byl zjištěn nízký obsah isoflavonoidů genistinu, daidzeinu a u variety Tempus i genisteinu. Formononetin a biochanin A nebyl prokázán v žádné kultuře. Sledovaná elicítace byla u obou variet nejúspěšnější po aplikaci nejslabší koncentrace, přičemž s rostoucí délkou aplikace (6, 24, 48 hodin) se elicitační účinek zvyšoval. Maximální obsah genistinu (0,28 mg g^{-1} sušiny a 0,20 mg g^{-1} sušiny) a daidzeinu (0,19 mg g^{-1} sušiny a 0,18 mg g^{-1} sušiny) byl zjištěn shodně u obou variet po 48hodinové aplikaci koncentrace 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$. U variety Tempus došlo tak ke statisticky významnému zvýšení produkce genistinu a daidzeinu oproti kontrole o 180 % a 46 %, u variety DO-8 o 122 % a 80 %. Nejvyšší produkce genisteinu (0,20 mg g^{-1} sušiny) byla zaznamenána u variety Tempus také u koncentrace 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ již po 6hodinovém působení, což představuje 100% statisticky významné zvýšení oproti kontrole. Silnější koncentrace elicitoru (10 a 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$) stimulovaly produkci genistinu a daidzeinu pouze u variety Tempus, uvedená maxima isoflavonoidů ovšem překonána nebyla.

Z výsledků je zřejmé, že u sledované suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. je produkce isoflavonoidů nízká. Jedním z důvodů může být to, že se jedná o teprve dvouletou, rychle rostoucí suspenzní kulturu a ta většinou akumuluje jen malé množství metabolitů. Produkci však může zvýšit vliv určitého stresu – např. snížení koncentrace živin v roztoku, vynechání růstového regulátoru nebo apli-

Tabulka IV

Vliv elicitace na obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře jetele lučního (varieta DO-8)

Koncentrace elicitoru [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Doba elicitace [h]	Genistin ^a [mg g^{-1} sušiny]	Daidzein ^a [mg g^{-1} sušiny]
0	6	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02
	24	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02
	48	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02
	168	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,03
1	6	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01
	24	0,18* ± 0,03	0,10 ± 0,04
	48	0,20* ± 0,02	0,18* ± 0,02
	168	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,03
10	6	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,02
	24	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,01
	48	0,09 ± 0,04	–
	168	–	–
100	6	0,02 ± 0,03	0,10 ± 0,04
	24	0,02 ± 0,02	–
	48	–	–
	168	–	–

^a Hodnoty představují průměr ± směrodatná odchylka ($n = 3$); hodnoty označené hvězdičkou jsou statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolní kulturou bez elicitoru ($\alpha = 0,05$)

kace elicitoru do média, což se u sledovaného elicitoru potvrdilo zvýšením produkce flavonoidů a isoflavonoidů a to shodně vždy po jeho 48hodinové aplikaci.

Také u jiných nově syntetizovaných chemických látek byl prokázán silný elicitální účinek a bylo zjištěno, že vyvolávají obranné rostlinné reakce, včetně zvýšení koncentrace peroxidu vodíku a v menší míře i ostatních aktivních forem kyslíku a aktivace enzymu fenylalaninamoniaklyasy. Například v suspenzní kultuře *Taxus chinensis* substituované benzothiodiazoly způsobily téměř 40% nárůst produkce taxinu C v porovnání s dříve často používaným elicitorem methyljasmonatem¹⁹. Podobně také fluorované deriváty kyseliny jasmonové²¹ a chlorované pyridinové deriváty lze hodnotit jako vhodné chemické indukční signály biosyntézy taxinů¹⁸. Další nově syntetizované látky typu substituovaných pyrazin-2-karboxamidů použité jako elicitory u kalusových a suspenzních kultur *Ononis arvensis*, *Silybum marianum* a *Genista tinctoria* významně ovlivnily produkci flavonoidů, isoflavonoidů a flavolignanů. Nejvyšší zvýšení produkce flavonoidů o 900 % bylo zjištěno u kalusové kultury *Ononis arvensis*^{17,22,23}.

Závěr

Ze všech dosažených výsledků je zřejmé, že testovaná látka 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid se projevila jako účinný elicitor fenypropanového metabolismu. Potvrdilo se, že nově syntetizované chemické látky mohou působit jako slibné elicitory pro indukci sekundárního metabolismu v rostlinných explantátových kulturách.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře výzkumného záměru MŠMT ČR reg. č. MSM 0021620822.

LITERATURA

- Saviranta N. M., Julkunen-Tiitto R., Oksanen E., Karjalainen R. O.: J. Sci. Food Agric. 90, 418 (2010).
- Zhao J.-L., Zhou L.-G., Wu J.-Y.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 137 (2010).
- Goyal S., Ramawat K. G.: Ind. J. Biotechnol. 7, 378 (2008).
- Siatka T., Kašparová M.: Čes. Slov. Farm. 59, 112 (2010).
- Kaimoyo E., Farag M. A., Sumner L. W., Wasmann C., Cuello J. L., VanEtten H.: Biotechnol. Prog. 24, 377 (2008).
- Dvořáková M., Valterová I., Vaněk T.: Chem. Listy 105, 839 (2011).
- Siatka T., Sklenářová H., Kašparová M., Solich P.: Chem. Listy 105, 367 (2011).
- Klimešová V., Kočí J., Zahajská L.: Čes. Slov. Farm. 51, 26 (2002).
- Klimešová V., Svoboda M., Waisser K., Kaustová J., Buchta V., Králová K.: Eur. J. Med. Chem. 34, 433 (1999).
- Jung W., Yu O., Lau S. C., O'Keefe D., Odell J., Fader G., McGonigle B.: Nat. Biotechnol. 18, 208 (2000).
- Zhao J.-L., Davis L. C., Verpoorte R.: Biotechnol. Adv. 23, 283 (2005).
- Beck V., Rohr U., Jungbauer A.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 94, 499 (2005).
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K.: Exp. Cell Res. 50, 151 (1968).
- Kašparová M., Siatka T., Spilková J., Dušek J.: Čes. Slov. Farm. 55, 44 (2006).
- Český lékopis 2009, 1. vydání, str. 1801. Grada, Praha 2009.
- De Rijke E., Joshi H. C., Sanderse H. R., Ariese F., Brinkman U. A. Th., Gooijer C.: Anal. Chim. Acta 468, 3 (2002).
- Tůmová L., Tůma J., Doležal M., Megušar K.: Molecules 15, 331 (2010).
- Qian Z.-G., Zhao Z.-J., Xu Y., Qian X., Zhong J.-J.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 164 (2006).

19. Xu Y., Zhao Z.-J., Qian X., Qian Z.-G., Tian W., Zhong J.-J.: *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8793 (2006).
20. Kašparová M., Siatka T., Dušek J.: *Čes. Slov. Farm.* **56**, 225 (2007).
21. Qian Z.-G., Zhao Z.-J., Xu Y., Qian X., Zhong J.-J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 98 (2005).
22. Doležal M., Tůmová L., Kešetovičová D., Tůma J., Králová K.: *Molecules* **12**, 2589 (2007).
23. Tůmová L., Gallová K., Řimáková J., Doležal M., Tůma J.: *Acta Physiol. Plant.* **27**, 357 (2005).

M. Kašparová^a, T. Siatka^a, V. Klimešová^b and J. Dušek^a (^a*Department of Pharmacognosy*, ^b*Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **The Effect of Synthetic (Benzylsulfanyl)pyridine Derivative on Production of *Trifolium pratense* L. Suspension Culture**

The role of 2-[(2-fluoro-6-nitrobenzyl)sulfanyl]pyridine-4-carbothioamide as a potential elicitor of biosynthesis of flavonoids and isoflavonoids in the red clover suspension cultures was investigated. The maximum content of flavonoids and isoflavonoids increased by 438 % and 180 %, compared with control, on 48-h application of the tested substance at concentrations 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ and 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$, respectively.



Děkan Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
vypisuje výběrové řízení na pozice:
vysokoškolský učitel (lektor) a vědecký pracovník
na Ústavu chemie a biochemie PřF JU (uch.prf.jcu.cz) s nástupem od září 2012
nebo ledna 2013.

Minimální požadavky:

lektor:

- vysokoškolské vzdělání (Mgr., Ing.) v oboru chemie,
- morální bezúhonnost a předpoklady pro práci vysokoškolského učitele

vědecký pracovník:

- vysokoškolské vzdělání (Mgr., Ing., případně vyšší) v oboru chemie se zaměřením na analytickou chemii, ukončené Ph.D. studium výhodou,
- aktivní znalost angličtiny,
- publikační činnost v impaktovaných časopisech
- morální bezúhonnost a předpoklady pro práci vysokoškolského učitele

Pracovní náplň:

lektor:

výuka základních chemických kurzů se zaměřením na analytickou chemii včetně praktických cvičení v českém popřípadě anglickém jazyce, vedení bakalářských a magisterských prací.

vědecký pracovník:

výuka kurzů se zaměřením na analytickou chemii včetně praktických cvičení v českém i anglickém jazyce, vedení bakalářských a magisterských prací, vlastní výzkumná činnost.

Písemné přihlášky přijímá elektronicky do 27. července 2012 personální oddělení Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice. Tel.: 387 772 213, e-mail: osobni@prf.jcu.cz. K přihlášce připojte strukturovaný životopis, kopie diplomů, případně kopii certifikátu znalosti cizího jazyku.