

**NÉHÁNY *THYMUS* TAXON FITOKÉMIAI JELLEMZŐINEK MEGISMERÉSE  
KROMATOGRÁFIÁS, MIKROBIOLÓGIAI ÉS MOLEKULÁRIS MÓDSZEREKKEL**

Ph.D. értekezés tézisei

**Horváth Györgyi**

Készült a Pécsi Tudományegyetem  
Természettudományi Kar Biológia Doktoriskola  
Botanika Program Taxonómia alprogram keretében

Programvezető: Oroszné dr. Kovács Zsuzsanna  
biol. tud. kand., habil. egy. docens

Témavezető: Dr. Szabó László Gy.  
MTA doktora, egy. tanár



Pécs

2005.

Horváth Györgyi  
munkahely: Pécsi Tudományegyetem ÁOK, Farmakognóziái Tanszék  
e-mail: georgina@gamma.ttk.pte.hu

## RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

<b>GC</b> .....	gázkromatográfia ( <b>G</b> as <b>C</b> hromatography)
<b>GC-MS</b> .....	gázkromatográfia-tömegspektrometria ( <b>G</b> as <b>C</b> hromatography- <b>M</b> ass <b>S</b> pektrometry)
<b>HPLC</b> .....	nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia ( <b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography)
<b>HPLC-MS</b> .....	nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia ( <b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid Chromatography- <b>M</b> ass <b>S</b> pektrometry)
<b>hR<sub>f</sub></b> .....	retenciós faktor x 100
<b>MTT</b> .....	metil-tiazolil-tetrazólium
<b>PCR</b> .....	polimeráz láncreakció ( <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction)
<b>Ph.Hg. VII.</b> .....	Magyar Gyógyszerkönyv, 7. kiadás
<b>RAPD</b> .....	<b>R</b> apid <b>A</b> mplified <b>P</b> olimorphic <b>D</b> NA
<b>TLC</b> .....	vékonyréteg-kromatográfia ( <b>T</b> hin <b>L</b> ayer <b>C</b> hromatography)
<b>UPGMA</b> .....	csoportátlag-eljárás ( <b>U</b> nweighted <b>P</b> air- <b>G</b> roup <b>M</b> ethod with <b>A</b> rithmetic <b>A</b> verages)
<b>UV</b> .....	ultraibolya fénytartomány
<b>UV-VIS</b> .....	ultraibolya-látható fénytartomány

## 1. BEVEZETÉS

A növényekben keletkező vegyületeket két nagy csoportba szokás sorolni, a primer és szekunder anyagok csoportjába. E két csoport megkülönböztetése régi keletű és a mai ismereteink alapján már nem felel meg azoknak a kitételeknek, melyeket annak idején megfogalmaztak. A csoportosítás alapja ugyanis az volt, hogy a primer anyagok létfontosságúak, a szekunder anyagok pedig nem. Ez az osztályozás a mai napig megmaradt.

A legújabb szempontú elkülönítést az ökológiai biokémiai szemlélet hozta. A primer és szekunder elnevezés mellett/helyett egyre inkább az univerzális és speciális folyamatok és anyagok fogalma kezd elterjedni. A hazai biogenetikai osztályozás Vágújfalvi nevéhez fűződik.

A rendszertannak egy viszonylag új és modern ága a növényi kemotaxonómia, mely kémiai jellegeket (primer- és szekunder anyagok, szemantidok) vizsgál és használ a taxonómiában. A műszeres analitikai technikák megjelenése következtében a rendszertannak ez a területe gyors fejlődésnek indult. A növénykémiában a szűrővizsgálat elsődleges célja új, gyógyászatilag hasznosítható növényi anyagok felkutatása. Ehhez nyilvánvalóan sok növényfaj mintáiból készült kivonatokat kell mind kémiailag, mind biológiailag jellemezni. A kémiai jellemzés legegyszerűbb módja a szelektív kivonást követő rétegekromatográfiás sorozatvizsgálat. Ennek során a rétegen elválasztott anyagokat specifikus reagensekkel bizonyos vegyületcsoportokra (pl. terpenoidok, fenoloidok) vizsgáljuk, azaz elvégezzük a fajon belüli egyedek vagy fajok előzetes kémiai összehasonlító vizsgálatát. A módszer optimalizálása lehetővé teszi a szétválasztott vegyületek kvantitatív mérését. A rétegekromatográfia mellett más kromatográfiás módszereket is alkalmazhatunk, pl. GC, HPLC stb. Ma már a módszerekhez a molekulák szerkezetének jellemzését, megismerését szolgáló vizsgáló műszerek csatlakozhatnak, pl. HPLC-MS, GC-MS stb.

A szűrővizsgálatoknak a gyakorlati hasznosságán túl elméleti jelentősége is van, mivel a kapott adatok, kémiai jellemzők felhasználhatók a kemotaxonómiában. Ugyanazon a fajon belül az egyes egyedek speciális anyagaiban genetikailag determinált, jelentős minőségi és mennyiségi eltérések vannak. Ezek a fajon belüli kémiai eltérések képezik az alapját az infraszpecifikus kémiai taxonoknak. Még jelentősebb kémiai eltérések vagy azonosságok lehetnek fajok között (interspecifikus kémiai taxonok).

E disszertációban összegezett munka során *Thymus* taxonokat elemeztünk néhány elválasztástechnikai módszerrel és véleményt alkottunk az eredmények felhasználhatóságára a kemotaxonómiában. Modellnövényként négy olyan *Thymus* taxont választottunk, melyek között van a természetes flórában előforduló (*Th. serpyllum*) és vannak termesztett taxonok (*Th. vulgaris*, *Th. x citriodorus*, *Th. x citriodorus* „Archer's Gold”). A *Thymus* genus a *Lamiaceae* család egyik legjelentősebb nemzetsége. A kakukkfűvek felhasználása széleskörű (gyógyászat, kozmetika, élelmiszeripar, stb.). Ezen kívül sziklakertekben gyakran ültetik némelyiket esztétikai értékük és környezeti jelentőségük miatt. A *Th. vulgaris* és *Th. serpyllum* számos gyógyszerkönyvben (Magyar

Gyógyszerkönyv, Deutsches Arzneibuch, Pharmacopoeia Europea, Pharmacopoeia Helvetica) hivatalos drognövény. Taxonómiai szempontból igen összetett, több „kis” fajból álló fajcsoportot képviselnek. Morfológiai sokféleség jellemző rájuk, áttekintésüket még a taxonok közötti hibridizáció is nehezíti. Ilyen szempontból nem teljesen megismert nemzetségről van szó, mivel rendszerezésük nagyon komplex és bonyolult. Mi sem vállalkoztunk ennek a feladatnak az elvégzésére (a cél a kemotaxonómiai következtetés hitelességére irányult).

Két olyan természetű taxont választottunk (*Th. x citriodorus*, *Th. x citriodorus* „Archer's Gold”), melyek kémiai jellemzésére még kevés vagy semmilyen adat nem állt rendelkezésre. Véleményünk szerint érdemes természetben lévő taxonokkal is foglalkozni, annál is inkább, hiszen kémiai jellemzőik megismerése bővítheti felhasználhatóságuk körét.

A különböző elválasztástechnikai vizsgálatokat négy taxon esetében mikrobiológiai aktivitás szempontjából is értékeltük direkt bioautográfia segítségével. A vizsgálathoz olyan növényi, patogén baktériumokat választottunk, melyeknek növénykórtani szempontból nagy jelentőségük van. Kiemelném az *Erwinia amylovora* baktériumot, mely a világ számos országában jelentős gazdasági károkat okoz. Az általa okozott betegség, közkeletű nevén „tűzhalás” az 1990-es évek végére szinte valamennyi, Magyarországgal határos országban megjelent. 1996 tavaszán a Bács-Kiskun megyei Nyárlőrinc határában egy almaültetvényben a betegség fellépését állapították meg. A betegség azóta az ország egész területére kiterjedt. A védekezésben használt vegyszerek és antibiotikumok a táplálékláncba kerülve komoly problémát okozhatnak, ezért hasznosnak látszik növényi eredetű antimikrobiális anyagok kutatása is.

A fitokémiai és mikrobiológiai vizsgálatok mellett molekuláris biológiai módszerekkel is próbálkoztunk. A RAPD-markeres polimorfizmus alkalmazásával genetikai különbözőség és/vagy hasonlóság állapítható meg taxonok között. Így DNS szinten kaphatunk információkat, melyek megerősíthetik az említett módszerekkel nyert adatok értékelhetőségét.

Vékonyréteg-kromatográfiás és molekuláris biológiai vizsgálatainkat a Pécsi Tudományegyetem Növénytani Tanszékén végeztük. A mikrobiológiai vizsgálatok a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológia és Immunitástani Intézetében, a gázkromatográfiás analízisek pedig a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetében történtek. A HPLC mérésekre a Szegedi Tudományegyetem Farmakognózia Intézetében, majd a pécsi Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetében került sor.

## 2. CÉLKITŰZÉS

A kutatás során szándékunkban állt egy olyan komplex vizsgálat sorozat elvégzése, mely által lehetővé válik a kiválasztott *Thymus* taxonok minél szélesebb körű, ma használatos módszerekkel történő jellemzése.

A következő célokat tűztük ki:

- a kiválasztott taxonok összehasonlítása összillóolaj tartalom meghatározás (Ph.Hg. VII. szerint) alapján

- a mintákból izolált illóolajok és kivont flavonoid-aglikonok vékonyrétegen történő elválasztása alapján a taxonok összehasonlítása
- az illóolaj minták vékonyréteg-kromatográfias és gázkromatográfias módszerrel történő vizsgálatának összehasonlítása
- a minták értékelése a taxonómiai jelentőségű fenolkarbonsavak (rozmarinsav és kávésav) TLC-vel kapott mintázatának jellemzése
- HPLC alkalmazása a fenoloid-összetétel megállapítására
- az antimikrobás hatás megállapítására alkalmas direkt bioautográfia optimalizálása és alkalmazása növénypatogén baktériumokra
- a kivonatokban és az illóolajokban azonosított komponensek baktériumellenes hatásának vizsgálata direkt bioautográfiával
- a taxonok DNS-szintű összehasonlító jellemzése RAPD-PCR technikával

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1 Mintagyűjtés – Mintaelőkészítés

Vizsgálatainkban négy különböző *Thymus* taxont (*Thymus vulgaris* L., *Th. serpyllum* L., *Th. x citriodorus* (Pers.) Schreb., *Th. x citriodorus* „Archer's Gold”) használtunk. A növényeket a Hegede Kertészettől (Helvécia) szereztük be, melyeket 2000 tavaszán a Pécsi Tudományegyetem Botanikus Kertjében (déli kitettséggű területen) ültettük el. A növéymintákat (föld feletti virágzó hajtást) 2001, 2002 júniusában és 2003 augusztusában gyűjtöttük be. A begyűjtés során ügyeltünk arra, hogy a mintavételezés reprezentatív legyen. Begyűjtés után a mintákat szobahőmérsékleten szárítottuk 5 napon keresztül, majd a feldolgozásig papírzacskókban száraz, hűvös helyen tároltuk. Közvetlenül a mintaelőkészítések előtt őröltük meg a mintákat kávédarálóval (V. szitaméret). A PCR vizsgálatok esetében további *Thymus* taxonokat (*Thymus odoratissimus*, *Th. praecox*, *Th. serpyllum*) vizsgáltunk, melyeket a budakalászi Gyógynövénykutató Intézettől kaptunk 2003-ban.

A kivonatok elkészítése a vizsgálandó komponensek és az alkalmazott módszerek különbözősége miatt eltérő volt egymástól. A vizsgálatokhoz kizárólag analitikai tisztaságú oldószereket használtunk.

#### 3.2 Illóolaj kivonás, összillóolaj tartalom meghatározás

Az illóolaj kivonás a VII. Magyar Gyógyszerkönyv (1986) szerint előírt illóolaj-tartalom meghatározó készülékben történt vízgőzdesztillációval. A *Thymus vulgaris*-hoz és a *Th. x citriodorus*-hoz képest a másik két növény esetében szemmel láthatóan kevesebb volt a mérőcsőben összegyűlt desztillátum 3 óra után. Ezért az illóolaj térfogatának leolvasását úgy könnyítettük meg, hogy a mérőcsőben összegyűlt illóolajhoz 0,5 ml n-pentánt mértünk. A kapott térfogatot a n-pentán térfogatával korrigáltuk. Az összillóolaj tartalmat a szárított drog 100,0 g-ja vonatkoztatva ml-ben fejeztük ki (ml/100 g).

### 3.3 Vékonyréteg-kromatográfia

Minden rétegekromatográfias vizsgálathoz szilikagél 60 F<sub>254</sub> típusú (Merck) vékonyréteg kromatografáló lapot használtunk. A réteglapokat mindig párhuzamosan készítettük elő, mivel egyik részét vékonyréteg-kromatográfias, másik részét direkt bioautográfias vizsgálatokra használtuk fel. E célból a mintafelvitel előtt valamennyi vékonyréteget 120 °C-on, 3 órán át szárítószekrényben hőkezeltünk, hogy a szilikagélhez kötött vizet eltávolítsuk, megelőzve, hogy a direkt bioautográfia során a szilikagél pezsegen és leváljon az alumíniumlemez hordozóról. A 120 °C-on történő szárítás azért is szükséges, hogy ezzel sterilizáljuk a bioautográfias célra felhasználandó rétegeket. A denzitometriás mérések minden esetben CAMAG TLC Scanner II típusú denzitométerrel történtek. Négy párhuzamosan elkészített lemezről végeztük a vizsgálatokat.

#### 3.3.1 Illóolajok vizsgálata

Az illóolaj tartalom meghatározásoknál nyert illóolajat használtuk fel a vizsgálatokhoz. A három évben begyűjtött mintákat vizsgáltuk. A n-pentánban felvett illóolajokból vákuumdesztillációval a pentánt eltávolítottuk. A tiszta illóolajokból 20 µl-t 1,0 ml etanolban oldottuk fel. Az etanolos törzsoldatot használtuk a vizsgálatokhoz. A minták mellé összehasonlítás céljából standard anyagokat (timol, karvakrol, linalool, borneol, eukaliptol, citral, geraniol) vittünk fel üvegapilláris (Minicaps) segítségével. A kifejlesztést toluol – etilacetát 93:7 arányú eleggyel végeztük. Az elválasztás után alkoholos, vanillin – kénsavas előhívóoldatba (Ph.Hg. VII. szerinti) merítettük a megszáradt réteglapokat. Előhívás után 30 perc múlva 500 nm-en mértünk denzitometriás módszerrel. Az illóolaj minták esetében még további oldószerek elegyeit (pl. metanol – hexán, etilacetát – metanol – kloroform stb.) is kipróbáltuk, azzal a céllal, hogy a timol-karvakrol komponenseket el tudjuk választani.

#### 3.3.2 Rozmarinsav és kávésav kimutatása és mennyiségi meghatározása

A vizsgálatokhoz a három évben begyűjtött mintákból metanolos extrakcióval készített kivonatokat használtuk fel. A minták mellé összehasonlítás céljából standard anyagokat (rozmarinsav, kávésav) vittünk fel üvegapilláris (Minicaps) segítségével. A kifejlesztést toluol – etilformiát – hangyasav 50:40:10 arányú eleggyel végeztük. A kifejlesztés után 30 perc múlva 325 nm-en mértünk denzitométerrel. Előhívó reagenst nem használtunk.

#### 3.3.3 Flavonoid-aglikonok vizsgálata

A három évben begyűjtött mintákból készített etilacetátos kivonatokat használtuk fel a vizsgálatokhoz. A kivonás során savas hidrolízist végeztünk. A kifejlesztés általunk optimalizált oldószereleggyel (kloroform – acetonitril – etilacetát – hangyasav 80:5:10:5) történt. Előhívószerként Naturstoff-polietilén-glikol (Wagner et al. 1983) reagenst alkalmaztunk. Előhívás után 30 perc múlva 366 nm-en mértünk denzitométerrel.

### 3.3.4 Direkt bioautográfias vizsgálatok

A vizsgálatokhoz a következő baktérium törzseket használtuk: *Erwinia amylovora* (fertőzött alma mintából izolált), *Erwinia amylovora* (fertőzött naspolya mintából izolált), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (fertőzött paradicsomból izolált), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (fertőzött paprikából izolált), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (fertőzött burgonyából izolált), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (fertőzött burgonyából izolált), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (fertőzött babból izolált). A direkt bioautográfias vizsgálat kivitelezésének folyamata 3 fő részre tagolható. Először reagens baktérium szuszpenziót készítettünk, majd a vékonyréteg-kromatográfias kiértékeléshez a réteglapokat, melyeket belemerítettük a reagens baktérium szuszpenzióba, majd megfestettünk dehidrogenáz aktivitást detektáló reagenssel. A reagens baktérium szuszpenzió elkészítéséhez a tesztbaktériumokat 100,0 ml Bouillon-féle tápoldatban szaporítottuk 24 órán át 28°C-on folyamatos rázatással (60 rpm). Ezután egy olyan baktérium szuszpenziót állítottunk elő, melynek optikai denzitása 600 nm-en 0,4 volt. Az elkészített réteglapokat belemerítettük 50,0 ml reagens baktérium szuszpenzióba 10 másodpercre, majd 2 perces szárítás után párakamrába helyeztük 28°C-ra 17 órára. Az inkubálás után a réteglapokat MTT vizes oldatába merítettük 10 másodpercre. A festés után a rétegeket visszahelyeztük párakamrába 28°C-ra 4 órára. Majd a rétegeket 70 %-os etanollal kimostuk, 5 percig szárítottuk. A folyamat végén a réteglapokat azonnal lefotóztuk.

### 3.4 Fenoloidok vizsgálata HPLC-vel

A 2003 augusztusában begyűjtött mintákból készített metanolos (nem hidrolizált) és 2 N kénsavval történt savas hidrolízis utáni metanol – víz – ecetsavas kivonatokat egyaránt megvizsgáltuk. A méréseket Perkin Elmer Series 200 készüléken végeztük el, LiChospher RP18, 5 µm-es szemcseméretű állófázissal töltött, 250 x 4,6 mm-es oszlop alkalmazásával. A mozgó fázis áramlását 0,7 ml/perc, az injektálási térfogatot 20 µl, az oszloptér hőmérsékletét 45°C értékre állítottuk be. A gradiens elúció során „A” eluensként metanol – víz – ecetsav 10:88:2, „B” eluensként metanol – víz – ecetsav 90:8:2 arányú elegyét és „C” eluensként metanolt alkalmaztunk. Az alábbi gradiens programmal dolgoztunk: 0-15 perc: 85%-15%-0%, 15-18 perc: 70%-30%-0%, 18-30 perc: 60%-40%-0%, 30-35 perc: 0%-100%-0%, 35-37 perc: 0%-85%-15%, 37-48 perc: 0%-70%-30%, 48-50 perc: 85%-15%-0%. Detektálás: fenolkarbonsavak esetében 280 nm, flavonoidok esetében pedig 360 nm, valamint a standard anyagok esetében diódasoros detektorral UV-VIS spektrumokat (200-500 nm) vettünk fel csúcstisztaság-vizsgálat céljából. Kvalitatív azonosítás külső standardok alkalmazásával, retenciós idők és UV-VIS spektrum alapján történt.

### 3.5 Illóolaj gázkromatográfias vizsgálata

A három évben begyűjtött mintákból Ph.Hg. VII. szerinti készülékben történt az illóolaj kivonás. Az illóolajmintákból a vizet 10-10 ml pentánnal kirázva és 0,5 g vízmentes nátrium-szulfáton szűrve mentesítettük. A méréseket FISIONS GC 8000 (Carlo Erba) készüléken végeztük, Rt-βDEXsm



állófázisú, 30 m x 0,25 mm-es, 0,25 µm-es filmvastagságú kapillárkolonna alkalmazásával. A nitrogén vivógáz áramlását 6,8 cm<sup>3</sup>/perc értékre állítottuk be. Programozott és izoterm hőmérsékleti munkamódszer kombinálásával dolgoztunk, az injektált oldat térfogata 0,8 µl, az injektor hőmérséklete 210°C volt. A detektálás lángionizációs detektorral történt. Az illóolajok jellemző komponenseit az illóolaj főkomponensére, illetve egy megadott „belső standardra” vonatkoztatott relatív retenciójuk meghatározásával azonosítottuk. A komponensek százalékos értékelése területnormalizációval történt.

### 3.6 RAPD-PCR vizsgálatok

A vizsgálatokhoz szükséges növényi DNS-t „friss” (fagyasztott) kakukkfű mintákból izoláltuk DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) segítségével. A DNS mintákat az izolálás után tisztítottuk. A kapott DNS termék mennyiségét 1 %-os agaróz gélen futtattuk és a minták sáverősségéből következtítettünk a bennük lévő DNS koncentrációjára. A DNS mennyiség tesztelésére a RAPD reakciókat különböző DNS hígításokkal végeztük. Optimális hígításnak tekintettük azt az eredményt, amelynél a gélen látható mintázat a legmegfelelőbbnek (értékelhetőnek) tűnt. A *Thymus vulgaris*, *Th. serpyllum*, *Th. x citriodorus*, *Th x citriodorus* „Archer’s Gold” esetében a 20-szoros, a *Th. odoratissimus* esetében a 30-szoros, a *Th. praecox* esetében az 50-szeres, a két budakalászi *Th. serpyllum* esetében a 40-szeres hígítások voltak használhatók a PCR reakciókhoz. A további vizsgálatokban ezekkel a templát hígításokkal dolgoztunk.

A megfelelő DNS templát hígítás kiválasztása után a RAPD-PCR-hoz szükséges reakcióelegyet mértük össze. A reakciókat a megbízható eredményesség érdekében háromszoros ismétlésben végeztük. A RAPD analízist 86 dekamer primerrel (pl. OPA, OPB, OPI stb.) (Operon Technologies, Alameda, CA.) végeztük. A PCR csöveket PTC-200-as típusú Termocyclerbe (Perkin Elmer, USA) helyeztük és elindítottuk a programot. Az alkalmazott program (RAPD 2) a következő volt: 1. ciklus 94 °C 2 perc, 2. ciklus 94 °C 10 másodperc, 3. ciklus 36 °C 30 másodperc, 4. ciklus 72 °C 1 perc, 5. ciklus 35-ször 2-3-4-es lépések, 6. ciklus 72 °C 2 perc. A program végén az elegyhez 5 µl 2 x STOP oldatot mértünk, majd 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk a mintákat 110 V-on 2 órán át. Az elektroforézis után a géleket azonnal lefényképeztük UV fény alatt BioDoc-It System (UVP Inc., Kalifornia) géldokumentációs berendezéssel. A lefotózott gélképeket UP-895CE típusú video graphic printerrel (Sony, Japán) nyomtattuk ki. Az amplifikációs termékek bázispár hosszúságát a mintákkal együtt futtatott 100 bp-os DNS Ladder Plus (Fermentas) segítségével tudtuk megállapítani.

A primerekkel kapott polimorf sávokat egy bináris, prezencia-abszencia típusú adatmátrixba rögzítettük [(1) – az adott pozícióban jelenlévő sáv, (0) – az adott pozícióban hiányzó sáv]. A távolság mátrixot az UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) módszerrel klaszteranalízisre használtuk a SYN-TAX 5.0 programcsomag (Podani 1993) felhasználásával. Az adatokból a program segítségével kiszámoltuk a taxonok egymáshoz viszonyított genetikai távolságát Jaccard index alapján.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 Összillóolaj tartalom

A 2001-ben gyűjtött minták illóolaj tartalma (ml/100 g): *Thymus vulgaris* – 0,63, *Th. serpyllum* – 0,13, *Th. x citriodorus* – 0,36, *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” – 0,23. A 2002-ben gyűjtött minták illóolaj tartalma (ml/100 g): *Thymus vulgaris* – 0,56, *Th. serpyllum* – 0,09, *Th. x citriodorus* – 0,3, *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” – 0,19. A 2003-ban gyűjtött minták illóolaj tartalma (ml/100 g): *Thymus vulgaris* – 0,49, *Th. serpyllum* – 0,06, *Th. x citriodorus* – 0,29, *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” – 0,16.

### 4.2 Illóolaj vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálata

Alkoholos vanillin-kénsavas előhívás után a rétegeken a vegyület szerkezetétől függően eltérő számú és színű komponenset tudtunk detektálni. Az illóolajok mellé felcseppentett standard anyagok segítségével egyértelműen tudtuk azonosítani a különböző kemotípusokat. A 2001., 2002. és 2003. évi minták esetében hasonló eredményeket kaptunk. A *Thymus vulgaris*, *Th. serpyllum* és *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” esetében mind a három évben a timol-karvakrol, míg a *Th. x citriodorus* esetében a geraniol volt a főkomponens. A  $hR_f$  értékek nem különböztek jelentős mértékben ugyanannál, de különböző években begyűjtött mintáknál.

A timol-karvakrol komponensek elválasztása esetén az optimalizálás nem volt eredményes, mivel a különböző oldószer kombinációk alkalmazásával sem tudtuk elválasztani a mintákban a két komponenset. A következő oldószerkelegyek esetében különösen nem volt megfelelő az elválasztás, mivel a komponensek a fronthoz közel futottak, ezért magas volt a  $hR_f$  értékük: aceton – hexán (1:1), etanol – hexán (1:1), etilacetát – hexán – kloroform (2:8:10), acetonitril – hexán (1:1), etilacetát – hexán (1:1), etilacetát – hexán (8:2).

### 4.3 Illóolaj gázkromatográfiás vizsgálata

Illóolaj vizsgálataink eredménye alapján három különböző kemotípust tudtunk elkülöníteni. A három különböző évben begyűjtött minták összetétele hasonló volt, elsősorban az egyes komponensek mennyiségi arányaiban volt különbség.

A *Thymus vulgaris* esetében mind a három évben a timol (2001. évi mintánál 37,1 %, 2002. évi mintánál 45,6 %, 2003. évi mintánál 34,7 %) volt a főkomponens az illóolajnak. Mellette még a p-cimol (27,4-32,9 %),  $\gamma$ -terpinén (1,31-9,42 %) és a karvakrol (3,03-4,63 %) voltak a jellemző komponensek. Ezen kívül egyéb minor komponenseket is sikerült azonosítani, mint pl. az  $\alpha$ -pinént,  $\beta$ -pinént, kamfént, limonént, linaloolt, borneolt, bornil-acetátot,  $\beta$ -kariofillént.

A *Thymus serpyllum* illóolaj összetétele hasonló volt a *Th. vulgaris*éhoz. Fő komponense az olajnak szintén a timol volt (2001. évi mintánál 17 %, 2002. évi mintánál 32,8 %, 2003. évi mintánál 53,7 %). A timol mellett jellemző komponensek voltak a p-cimol,  $\gamma$ -terpinén, cisz-linalooloxid,

linalilacetát, bornil-acetát,  $\beta$ -kariofillén és a karvakrol. A  $\beta$ -pinén, kamfén és limonén komponensek kis mennyiségben voltak kimutathatók. A 2001. évi mintában 0,05 %-ban eukaliptolt sikerült azonosítani.

A *Th. x citriodorus* esetében mind a három évben a geraniol (2001. évi mintánál 43 %, 2002. évi mintánál 39,2 %, 2003. évi mintánál 37,8 %) volt a legnagyobb mennyiségben jelen az olajban. A fő komponens mellett az olajban levő citrál komponens jelenlétével magyarázható a növény jellegzetes – citromra emlékeztető – illata. A citrált két izomerpárjának (transz, citrál A = geraniál + cisz, citrál B = nerál) keverékeként azonosítottuk az illóolajban. A timol mindhárom évben 1 % alatt volt jelen a mintákban. A 2001. évi olajban nem volt értékelhető mennyiségben jelen az  $\alpha$ -pinén,  $\beta$ -pinén és a kamfén. A geraniol, nerál és geraniál komponensek mellett egy aciklusos monoterpént, a nerolt sikerült kimutatni a 2002. és 2003. évi mintákban.

A *Thymus x citriodorus* „Archer's Gold” illóolajánál már nem tapasztaltuk a jellegzetes, citromos illatot, melyet a vizsgálatok alá is támasztottak. Az illóolajból ugyanis nem volt kimutatható sem a geraniol, sem a citrál. Illóolaj összetételében inkább a *Th. vulgaris*hoz és *Th. serpyllum*hoz volt hasonló. A fő komponens azonban nem a timol, hanem a karvakrol volt (2001. évi mintánál 55,1 %, 2002. évi mintánál 43,5 %, 2003. évi mintánál 68,3 %). A timol csak a 2001. és 2003. évi mintákban volt jelen 1 % alatti mennyiségben, a 2002. évi mintában nem volt kimutatható. A karvakrol mellett a p-cimol és a  $\gamma$ -terpinén jelenléte volt jellemző. A többi minor komponens mindig 10 % alatti mennyiségben fordult elő.

#### **4.4 Rozmarinsav és kávésav vékonyréteg-kromatográfiás kimutatása és mennyiségi meghatározása**

Vékonyréteg-kromatográfiás és denzitometriás módszer segítségével rozmarinsavat és kávésavat tudunk kimutatni és mérni mind a négy *Thymus* taxonból. A mennyiségi mérések alapján megállapítható, hogy a kávésav kisebb mennyiségben volt jelen a mintákban, mint a rozmarinsav. A két komponens  $R_f$  értékében (rozmarinsav: 38, kávésav: 57) mutatkozó 19-es különbség megfelelő elválasztást jelent. A két fenolsavnak UV által indukált kék fluoreszcenciájuk van, vagyis az emisszió semmilyen előhívószert nem igényelt. A rozmarinsav mennyisége 1,96 – 10,09  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , a kávésav mennyisége 0,05 – 0,2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  között változott a különböző években begyűjtött mintáknál. A rozmarinsav mennyisége a 2003-ban gyűjtött *Thymus x citriodorus* „Archer's Gold” esetében volt a legnagyobb (10,09  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). A kávésav mennyisége a 2002-ben gyűjtött *Th. vulgaris* esetében volt a legtöbb (0,22  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Általánosságban elmondhatjuk, hogy a 2003-as minták esetében volt mindig a legnagyobb a rozmarinsav mennyisége, a kávésav már nem mutatott ennyire egységes képet. A rozmarinsav a 2001-es mintáknál a *Th. x citriodorus* (5,34  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), a 2002-es mintáknál a *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” (4,96  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), a 2003-as mintáknál a szintén a *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” esetében volt a legtöbb (10,09  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). A kávésav mennyisége a 2001-es mintáknál a *Th. serpyllum* és a *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” (0,09 – 0,09  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), a 2002-es mintáknál a *Th.*

*vulgaris* (0,2 µg/mg) és a 2003-as mintáknál szintén a *Th. vulgaris* (0,15 µg/mg) esetében volt a legnagyobb.

#### 4.5 Flavonoid-aglikonok kimutatása vékonyréteg-kromatográfiával

A 2001., 2002. és 2003. évi minták esetében hasonló eredményeket kaptunk. A  $hR_f$  értékek nem különböztek jelentős mértékben ugyanannál, de különböző években begyűjtött mintáknál. Előhívás után természetes fényben és UV 366 nm alatt is megvizsgáltuk a réteglapokat. A vizuális értékelés és a denzitometriás mérések alapján azt tapasztaltuk, hogy a naringenin és az apigenin kis mennyiségben van jelen a mintákban. A luteolin és az eriodiktiol viszont mind a négy taxonban nagyobb mennyiségben fordult elő. A következő tájékoztató  $hR_f$  értékeket mértük az egyes azonosított komponensekre: luteolin – 21, apigenin – 35, naringenin – 48, eriodiktiol – 32. Az apigenint csak a *Thymus serpyllumban* sikerült kimutatni.

#### 4.6 Fenoloidok vizsgálata HPLC-vel

A flavonoid-aglikonok TLC vizsgálatának eredményeit részben alátámasztják a HPLC vizsgálatok, de figyelembe kell venni, hogy a rétegekromatográfia esetében etilacetátban, míg a HPLC-nél metanolban, illetve metanol-víz-ecetsav elegyében oldottuk fel a mintákat. Mérési tapasztalataink alapján tudjuk, hogy az etilacetát gyors párolgása miatt nem alkalmas a HPLC-s vizsgálatokhoz, mert a komponensek gyorsan „jönnek le az oszlopról”, elválasztásuk, felbontásuk (rezolúció) nem megfelelő.

A *Thymus vulgaris* esetében a nem hidrolizált mintában 7 komponenst tudtunk azonosítani. A fenolkarbonsavak közül a kávéssav és a rozmarinsav egyaránt kimutatható volt. A metanolos kivonatban a fő komponens a rozmarinsav, melynek az általunk alkalmazott eluensrendszer esetén 24 perc körüli a retenciós ideje. A kávéssav kisebb retenciós idővel, kb. 11 perc, jellemezhető. A TLC-s vizsgálatoknál említettük, hogy a rozmarinsav nagyobb mennyiségben volt jelen a mintákban, mint a kávéssav. Ezt a megállapításunkat a HPLC vizsgálatok is igazolták. Két ismeretlen flavonoidot és egy flavonolt, valamint 33 perc körüli retenciós időnél a naringenint sikerült kimutatni UV-VIS spektrum alapján. A savas hidrolízis után előállított mintában már 9 komponenst azonosítottunk. 6 perces retenciós időnél a p-hidroxibenzoésavat, 27 percnél egy flavonoid-aglikont, az eriodiktiolt sikerült kimutatni. A rozmarinsav és a kávéssav mellett az UV-VIS spektrum alapján 3 fenolkarbonsavat azonosítottunk. A naringenint viszont nem tudtuk a hidrolizált mintában elválasztani.

A *Thymus serpyllum* esetében a nem hidrolizált mintában 8 komponenst azonosítottunk. Ezek közül 3 flavonol, 3 flavonoid és 1 fenolkarbonsav típusú. A rozmarinsav a fő komponense volt a kivonatnak. A kávéssavat azonban nem sikerült kimutatni. A hidrolizált mintában 11 komponenst azonosítottunk. A nem hidrolizált mintához képest egy flavonol típusú komponens jelent meg 9 percnél. A *Th. vulgarishoz* hasonlóan a p-hidroxibenzoésav itt is jelen volt a mintában. A főkomponens szintén a rozmarinsav, de mellette 11 percnél a kávéssav is elvált. A rozmarinsav mellett

az eriodiktiolt azonosítottuk jelentős mennyiségben. Emellett még a luteolin és az apigenin is elvált a mintában.

A *Thymus x citriodorus* esetében a nem hidrolizált mintában 7 komponenst azonosítottunk (3 flavonol, 2 flavonoid, 2 fenolkarbonsav). A rozmarinsav főkomponense volt a mintának. A kávéssavat a *Th. serpyllum*hoz hasonlóan nem sikerült kimutatni a metanolos mintában. A hidrolizált kivonatban 13 komponenst tudunk meghatározni, köztük a rozmarinsavat és a kávéssavat. Egy eddig ismeretlen fenolkarbonsav 31 perces retenciós időnél nagy mennyiségben elvált a mintában. A 3. legnagyobb csúcs a kromatogramon a p-hidroxi-benzoésavé. Az ismeretlen flavonol és flavonoid komponensek mellett azonban két aglikont, az eriodiktiolt és az apigenint azonosítani tudtuk a spektrum alapján. A 19 perces retenciós idejű fenolkarbonsav a ferulasav.

A *Thymus x citriodorus* „Archer's Gold” esetében a nem hidrolizált mintában 6 komponenst sikerült azonosítani. A rozmarinsav most is fő komponens volt. A kávéssavat nem sikerült kimutatni. 3 flavonolt és 1 flavonoidot az UV-VIS spektrum alapján határoztunk meg. A hidrolizált mintában 12 komponens jól elvált egymástól. A fő komponens rozmarinsav mellett jelentős mennyiségben a p-hidroxi-benzoésav, valamint egy ismeretlen fenolkarbonsav jellemezte a mintát. Sikerült a kávéssavat, az eriodiktiolt és az apigenint azonosítani. A nem hidrolizált mintákat összehasonlítva elmondhatjuk, hogy a *Th. serpyllum*, *Th. x citriodorus* és a *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” metanolos kivonatainak HPLC-s „ujjlenyomata” hasonló. A naringenint egyedül a *Th. vulgaris*ban tudunk kimutatni. A hidrolizált mintáknál is elsősorban a *Th. serpyllum*, *Th. x citriodorus* és a *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” kromatogramja hasonló egymáshoz. Az apigenint ebből a három taxonból sikerült kimutatni. Az eriodiktiol azonban mind a négy taxonnál, a hidrolizált mintáknál jelen volt.

#### 4.7 Direkt bioautográfiás vizsgálatok

Vizsgálataink kezdetén sikeresen optimalizáltuk a módszert a növénypatogén baktériumokra. Számukra a 26-28 C° inkubációs hőmérséklet bizonyult megfelelőnek. A 0,4 extinkció eléréséhez az inkubáció idejét 24 órára kellett növelni a reagens baktérium szuszpenzió elkészítésekor. A baktérium szuszpenzióba és az MTT vizes oldatába merítés esetén elegendő volt a 10 másodperc. A tesztbaktériumok közül a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* törzsek és a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bizonyult a legérzékenyebbnek a bioautográfiás rendszerben. Az MTT vizes oldatába merítés után ezeknél a törzseknél a gátlási zónák, a sötétkék háttérhez képest, már 2 órás inkubációs idő után jelentkeztek. Az *Erwinia* törzsek esetén azonban az egyértelmű eredményekhez kb. 24 órás inkubálás szükséges. A rétegek kiértékelése vizuálisan, a gátlási zónák átmérőjének mérésével történt. Az eltérés a párhuzamos mérések között nem volt jelentős ( $\pm 1$  mm).

A kontrollként rétegre felvitt gentamicin (2  $\mu$ g) mind a 8 baktérium törzssre gátló hatással volt. A legnagyobb gátlási zónát (5 mm) a *Pseudomonas* törzs esetében tapasztaltunk. A *Xanthomonas* törzseknél 4 mm, az *Erwinia* törzseknél 3 mm gátlási zónát mértünk.

Teszteltük a rétegekromatográfiás kifejesztések során alkalmazott oldószereket is. Eredményeink szerint a toluol, etilformiát, etilacetát, etanol és kloroform nem volt gátló hatással a tesztbaktériumokra, tehát nem befolyásolják a direkt bioautográfiás detektálást. Ezzel szemben kerülni kell az olyan kifejesztő elegyeket, melyek hangyasavat és/vagy acetonitrilt tartalmaznak, mivel ezek gátolták a baktériumok növekedését. A flavonoid-aglikonok és rozmarinsav-kávésav TLC-s vizsgálata során az általunk használt kifejesztő elegy tartalmazta a hangyasavat és az acetonitrilt, ezért nem tudunk antibakteriális hatást kimutatni. A rozmarinsav és kávésav nem mutatott antibakteriális hatást a növényi baktériumokkal szemben a bioautográfiás rendszerünkben. Az eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy csak az illóolajok és a kifejesztés nélküli flavonoid-aglikonok mutattak gátló hatást. A *Th. vulgaris* esetében az illóolajban csak a timol-karvakrol mutatott antibakteriális hatást mind a 8 törzs esetében. A standard anyagok közül a timol, karvakrol és linalool szintén gátló hatású volt. Nem mutatott gátló hatást a borneol és eukaliptol standard.

A *Th. serpyllum* esetében az illóolajban a timol-karvakrol mutatott gátlást. A *Pseudomonas* és *Xanthomonas* (VES10) törzsek esetében egy ismeretlen komponens is gátló hatású volt. A standardok közül a *Th. vulgaris*hoz hasonlóan a timol, karvakrol és linalool esetében tapasztaltunk gátlási zónát. A *Th. x citriodorus* illóolajában a főkomponens geraniol, valamint a citral mutatott gátló hatást. A standardok közül a timolnak, karvakrolnak, citralnak, geraniolnak és linaloolnak volt gátló hatása. A *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” esetében a *Th. vulgaris*hoz hasonló eredményeket kaptunk.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy az illóolajban a TLC-vel történt elválasztás után azonosított főkomponensek mutattak gátló hatást a direkt bioautográfiás rendszerben. A gázkromatográfiás eredményeink szerint a főkomponensek mellett minor komponensek is előfordulnak az illóolajban. Ezek mennyisége azonban olyan kevés, hogy elválasztás után, bioautográfiásan már nem detektálható antibakteriális hatásuk.

Az autentikus standardok közül a timol (5-9 mm) és karvakrol (5-8 mm) antibakteriális hatása volt a legnagyobb. Ugyanakkor a borneol és eukaliptol esetében még a 20 µg-nál nagyobb koncentrációban sem kaptunk gátlási zónát. A geraniol, linalool és citral egymáshoz hasonló aktivitást mutatott.

A tesztelt flavonoid aglikonok közül a naringenin és eriodiktiol (3-15 mm) baktériumellenes hatása volt a legjelentősebb. A baktériumok közül a naringeninre az *Erwinia amylovora* almából és naspolyából izolált törzse volt a legérzékenyebb, az eriodiktiolra pedig a *Xanthomonas* paradicsomból izolált törzse.

#### **4.8 RAPD-PCR vizsgálatok**

A 8 kakukkfű taxonból sikeresen tudtunk növényi DNS-t izolálni. A legértékesebb RAPD mintázatokat a következő primerekkel kaptunk: OPA-03, OPI-07, OPI-12, OPN-03, OPN-04, OPN-05, OPN-06, OPO-04, OPO-20, OPP-08. Az eredmények kiértékelését ezekkel a primerekkel kapott mintázat alapján végeztük. Megállapíthatjuk, hogy a vizsgált primerek közül az OPN primercsalád

tagjai a leghasználhatóbbak a *Thymus* nemzetség genetikai variabilitásának és polimorfizmusának vizsgálatára.

Az előbb említett 10 primerrel 141 polimorf sávot kaptunk, melyeknek száma a primertől függően változott. A legpolimorfabb mintázatot az OPN-04 primerrel kaptuk, a polimorf sávok száma 21. A legkevesebbet (11 db) az OPN-06 primer esetén tapasztaltunk. Az egyes sávok (v. fragmentum) hosszúsága 400-2000 bázispárig (bp) változott. A RAPD mintázatok kiértékelésénél csak a polimorf sávokat érdemes analizálni (amelyekben különbség van az egyes minták között). Az általunk SYNTAX 5.0 programmal, Jaccard koefficienssel elkészített dendrogram, amely 10 Operon primerrel kapott 141 polimorf fragmentum alapján végezte el a kiértékelést, a 8 taxont 2 alcsoportba sorolta. Az első alcsoportba a 2, 3, 4 és 8-as számú taxonok, a másodikba az 5, 7 és 6-os számú minták tartoznak. Ennek megfelelően az első alcsoportba tartozik a *Thymus serpyllum* (2), *Th. x citriodorus* (3) és *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” (4), melyek az Egyetem Botanikus Kertjéből, valamint a *Th. serpyllum* (8), mely Kesztölcéről származik. A második csoportba a *Th. odoratissimus* (5) (Diósjenő, Nyiredi-rét), a *Th. serpyllum* (7) (Boldogtanya) és a *Th. praecox* (6) (Csövévár) tartozik. Az első alcsoporton belül a *Th. x citriodorus* (3) és a *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” (4) között szorosabb kapcsolat figyelhető meg, 58 %-ban különböznek (42 %-ban hasonlóak). A második alcsoportban is megfigyelhető egy ilyen kapcsolat, mégpedig a *Th. odoratissimus* és *Th. serpyllum* között. 55 %-ban különböznek és 45 %-ban hasonlóak. Az 1-es számú minta, mely a *Th. vulgaris* jelöli, valamennyi taxontól elkülönül.

A RAPD analízissel tehát sikerült mind a 8 taxont megkülönböztetni egymástól. A módszer alkalmas volt a két hibrid – a *Th. x citriodorus* és a *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” – elkülönítésére is. További előnye a módszernek, hogy a morfológiailag nagyon hasonló taxonok között is különbség mutatható ki. Ezt tapasztaltuk a *Th. odoratissimus* és a *Th. praecox*, valamint a három különböző helyről begyűjtött *Th. serpyllum*ok esetében.

## 5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálatainkban a Pécsi Tudományegyetem Botanikus Kertjében található és telepített állományokból 2001, 2002 júniusában és 2003 augusztusában begyűjtött négy *Thymus* taxont (*Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Thymus x citriodorus*, *Thymus x citriodorus* „Archer's Gold”) hasonlítottuk össze különböző fitokémiai (TLC, HPLC, GC), mikrobiológiai (direkt bioautográfia) és molekuláris biológiai (RAPD-PCR) módszerekkel. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz további négy taxont használtunk fel, melyeket a budakalászi Gyógynövény Kutató Intézettől kaptunk. Három vegyületcsoportba (illóolajok, flavonoidok, fenolkarbonsavak) tartozó komponensek kimutatását végeztük el.

A *Thymus* genuszra különösen jellemző a nagyfokú alaktani és fenotípusos hasonlóság, ezért az egyes taxonok egyértelmű elkülönítéséhez és leírásához komplex vizsgálatok szükségesek. A szakirodalmi megállapításokkal eredményeink is összhangban vannak, miszerint a *Thymus* nemzetség

szempontjából kemotaxonómiai értékű az illóolaj összetétel, fenolkarbonsavak (rozmarinsav, kávésav), flavonoid összetétel vizsgálata. Az elválasztástechnikák közül a gyors, egyszerűen kivitelezhető, vizuális értékelésre is alkalmas, kevés anyagi beruházást igénylő rétegekromatográfia továbbra is nélkülözhetetlen.

A direkt bioautográfia egyszerűsége, könnyű kiértékelése és a komplex kivonatok vizsgálhatósága miatt széles körben alkalmazott módszer. Segítségével lehetőség nyílik természetes eredetű kivonatok (pl. illóolajok) mikrobaellenes komponenseinek kimutatására. Kivonataink elválasztására azért is választottuk a vékonyréteg-kromatográfiát, mivel ez az elválasztástechnikai módszer biztosítja a direkt bioautográfias detektálás kivitelezését.

A rétegekromatográfias vizsgálatok sokszor tájékoztató jellegű információkat nyújtanak. A tények ismeretében további, jól bevált és megfelelő érzékenységgű kromatográfias módszereket (GC, HPLC) is alkalmaztunk a taxonok összehasonlítására. A kemotaxonómiai értékelésben fontosak a szemantidok (DNS, RNS, fehérjék) vizsgálatával kapott jellemzők is. Az ilyen jellegű vizsgálatok még fontosabbak lehetnek a közeljövőben, a laboratóriumi technikák fejlődése miatt, de morfológiai és fitokémiai vizsgálatokkal együtt szolgáltathatnak igazán hasznos eredményeket a növénytaxonómia számára. Emiatt végeztünk tájékoztató jellegű vizsgálatokat RAPD-PCR technika alkalmazásával.

◆ Mintáink összillóolaj tartalmát vízgőzdesztillációval (Ph.Hg. VII. szerint) kivont illóolaj térfogatával jellemeztük. A négy taxon közül mind a három évben a *Thymus vulgaris* esetében volt a legmagasabb az illóolaj tartalom, de jelentős volt a *Thymus x citriodorus* illóolaj hozama is. A *Thymus serpyllum* és *Thymus x citriodorus* „Archer's Gold” esetében alacsonyabb illóolaj tartalmat mértünk. Mind a négy taxonnál a 2003. évi mintáknál voltak a legalacsonyabbak az értékek, mely azzal is magyarázható, hogy a mintákat augusztusban, a növények utóvirágzási állapotában gyűjtöttük be. Természetesen fontos szerepe van az ökológiai tényezőknek is az illóolaj összetétel szempontjából.

◆ Az illóolajok vékonyréteg-kromatográfias elválasztásánál és detektálásánál az irodalomban megadott toluol – etilacetát 93:7 arányú elegye és az alkoholos vanillin-kénsavas előhívó „részben” megfelelőnek bizonyult. A vizsgálatok alapján két kemotípust különítettünk el (*Thymus vulgaris*, *Th. serpyllum*, *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” – timol+karvakrol, *Th. x citriodorus* – geraniol+citral kemotípus). Az alkalmazott kifejlesztő eleggyel viszont nem vált el a két fenolos komponens (timol, karvakrol) a mintákban. Ezért további oldószerek elegyeit is kipróbáltuk, de az optimalizálás nem járt kellő eredménnyel.

◆ Az illóolajok gázkromatográfias vizsgálata esetén, megfelelő kapilláris oszlop és paraméterek alkalmazásával, a főkomponensek mellett kisebb mennyiségű minor komponenseket és izomerpárokat is sikerült azonosítani. A kvalitatív vizsgálatokkal három kemotípust különböztettünk meg (*Th. vulgaris*, *Th. serpyllum* – timol, *Th. x citriodorus* – geraniol és citral (neral + geranial), *Th. x citriodorus* „Archer's Gold” - karvakrol kemotípus). A gázkromatográfias mérések segítségével pontosabb képet kaptunk a taxonok illóolaj összetételéről.



◆ A rozmarinsav és kávésav kimutatását sikeresen végeztük el rétegekromatográfia alkalmazásával. Mindkét vegyületet ki tudtuk mutatni a kivonatokban és vizuális értékeléssel is megállapítható volt, hogy a rozmarinsav nagyobb mennyiségben volt jelen a mintákban, mint a kávésav. A denzitometriás mérések is ezt igazolták.

◆ A flavonoid-aglikonok közül a luteolint, apigenint, naringenint és eriodiktiolt sikerült rétegekromatográfiával kimutatni. Az eriodiktiol és luteolin foltja egyértelműen jól látszott a réteglapon Naturstoff-polietilén-glikol előhívó alkalmazása után. Vizuális értékelés alapján megállapítottuk, hogy az apigenin és naringenin kisebb mennyisége jellemző a vizsgált taxonokra. Az elválasztást általunk optimalizált kifejesztő eleggyel (kloroform – acetonitril – etilacetát – hangyasav 80:5:10:5) végeztük.

◆ A flavonoidok HPLC vizsgálatánál rozmarinsavat és kávésavat minden esetben sikerült kimutatni. A HPLC mérések során több komponenst tudtunk azonosítani külső standardok UV-VIS spektruma alapján (diódasoros detektor alkalmazásával), mint rétegekromatográfiával, tehát az optimalizált módszer jól alkalmazható a taxonok összehasonlítására és elkülönítésére .

◆ A növénypatogén baktériumokra optimalizált direkt bioautográfias rendszerben az illóolajok, valamint az illóolaj komponensek közül, a timol, karvakrol, linalool, citral és geraniol mutattak gátló hatást, a borneol és eukaliptol viszont nem. A rozmarinsav és kávésav sem mutatott aktivitást. A flavonoidok közül a luteolin, apigenin kissé, a naringenin és eriodiktiol erősen gátolta a tesztbaktériumok szaporodását. A direkt bioautográfia módszere tehát alkalmas növényi kivonatok mikrobiológiai aktivitásának tesztelésére optimalizált körülmények között.

◆ A molekuláris biológiai vizsgálatok során sikeresen izoláltunk és tisztítottunk DNS-t a „friss” (nem szárított) növényi mintáinkból, melyeket RAPD-PCR technikához használtunk fel. A molekuláris vizsgálatok eredményeit mindig óvatosan kell értékelni, az eredmények háttérben gyakran bonyolult összefüggések állnak. A módszert a jövőben további kutatásokra tartom érdemesnek.

Az általunk alkalmazott módszerek közül feltétlenül kiemelnénk a direkt bioautográfias és RAPD-PCR technikák eredményeit. Továbbá a *Thymus x citriodorus* „Archer's Gold” hibridforma ilyen jellegű komplex vizsgálatával – szakirodalmi tájékozottságunk szerint – még nem foglalkoztak.

⇒ Munkám során a következő új eredményeket értem el:

1. *Thymus* taxonok azonosítására és elkülönítésére alkalmas kiegészítő módszernek bizonyult a direkt bioautográfia. Az antibakteriális timol és karvakrol, valamint a minor komponensek (linalool, citral) a gazdasági jelentőségű kórokozó baktériumok (pl. *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora subsp. carotovora*, *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*, *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*) növekedését eltérő mértékben gátolják, vagyis a bioautográfia során tapasztalt antibakteriális tulajdonságok alkalmasak a differenciálás alátámasztására.

2. A TLC-vel és GC-vel kimutatott illóolaj-komponensek alkalmasak a taxonok azonosítására és differenciálására (timol domináns a *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, karvakrol domináns a *Thymus x citriodorus* „Archer's Gold”, geraniol-citral domináns a *Thymus x citriodorus*).
3. A HPLC-vel és TLC-vel kimutatott fenoloidok (rozmarinsav, kávésav, luteolin, apigenin, naringenin, eriodiktiol) alkalmasak az illóolajra jellemző fitokémiai markerek kiegészítésére és a taxonómiai jellemzést megbízhatóbbá teszik.
4. RAPD alkalmazásával több dekamer primerrel (OPA, OPB, OPI, OPN, stb.) sikerült a vizsgált *Thymus* taxonokat megbízhatóan azonosítani és jellemezni. A molekuláris markerek összhangban vannak az általam azonosított fitokémiai markerek differenciáló jellegével.

Mindezek alapján érdemesnek tartom a felhasznált fitokémiai, mikrobiológiai és molekuláris módszerek komplex alkalmazását növénytaxonómiai kérdések megoldásában. Különösen olyan rendszertani kategóriák elkülönítésére tartom hasznosnak, amelyek mikrobiológiai szempontból aktívak, de a módszer alkalmas lehet egyéb bioaktív (pl. mitogén, sejtvonalakra toxikus vagy citosztatikus) és fitotaxonómiai értékű vegyület kimutatására is. Elképzelhetőnek tartom azt is, hogy a kidolgozott komplex módszerrel, megfelelő fajgyűjteményre alapozva és másokkal együttműködve el lehet végezni a *Thymus* taxonok rendszertani újraértékelését.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### I. Disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények:

1. **Horváth Gy**, Botz L, Kocsis B, Lemberkovics É, Szabó L Gy (2004): Antimicrobial natural products and antibiotics detected by direct bioautography using plant pathogenic bacteria. *Acta Bot. Hung.* 46 (1-2): 153-165
2. **Horváth Gy**, Szabó L Gy, Lemberkovics É, Botz L, Kocsis B (2004): Characterization and TLC-bioautographic detection of essential oils from some *Thymus* taxa. Determination of the activity of the oils and their components against plant pathogenic bacteria. *J. Planar Chromatogr.* 17: 300-304, **IF**: 1,047
3. **Horváth Gy**, Szabó L Gy, Lemberkovics É: Essential oil composition of three cultivated *Thymus* chemotypes from Hungary. (közlésre elfogadva – *J. Essent. Oil Res.*), **IF**: 0,278

### II. Disszertáció alapjául szolgáló konferencia poszterek, közlemények és előadások:

1. **Horváth Gy** (2000): Növényi kivonatok tesztelése az *Erwinia amylovora* növényi, patogén baktérium ellen direkt bioautográfia módszerével. *Botanikai Közlemények* 86-87: 257
2. Botz L, Nagy S, Kocsis B, **Horváth Gy** (2000): Planar chromatographic aspects of direct bioautography. In: *Proceedings International Symposium of Planar Chromatography*, (ed.) Nyiredy Sz., pp. 77-87
3. **Horváth Gy** (2000): Növényi kivonatok tesztelése az *Erwinia amylovora* növényi, patogén baktérium ellen direkt bioautográfia módszerével. Magyar Biológiai Társaság Botanikai Szakosztály 1361. szakülés, Budapest, 2000. április 17.
4. **Horváth Gy**, Kocsis B, Nagy S, Botz L (2001): Szekunder növényi metabolitok vizsgálata direkt bioautográfiával. *Botanikai Közlemények* 88: 198-199
5. **Horváth Gy**, Kocsis B, Botz L, Szabó L Gy (2001): Szekunder növényi metabolitok vizsgálata direkt bioautográfiával. Magyar Biológiai Társaság Botanikai Szakosztály 1368. szakülés, Budapest, 2001. március 19.
6. **Horváth Gy**, Lemberkovics É (2001): Néhány *Thymus* species illóolajának gázkromatográfiás elemzése. A Magyar Gyógyszerészeti Társaság (MGYT) Gyógynövény Szakosztálya és a Magyar Biológiai Társaság Botanikai Szakosztályának közös rendezvénye 1377. szakülés, Budapest, 2001. december 10.
7. **Horváth Gy**, Botz L, Kocsis B, Lemberkovics É, Németh J, Szabó L Gy (2002): Direct bioautography detection by plant pathogenic bacteria. In: *Proceedings International Symposium of Planar Chromatography*, (ed.) Nyiredy Sz, pp. 255-263; *Planar Chromatography*, May 2002, Hévíz (poszter bemutatás)

8. Botz L, Nagy S, **Horváth Gy**, Szabó L Gy, Kocsis B (2002): Optimization of direct bioautography process. In: Proceedings International Symposium of Planar Chromatography, (ed.) Nyiredi Sz, pp. 131-140
9. **Horváth Gy**, Kocsis B, Botz L, Németh J, Szabó L Gy (2002): Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioautography. Proceeding of the 7<sup>th</sup> Hungarian Congress on Plant Physiology, Jun 2002, Szeged, S3-PO3 (poszter bemutatás); Acta Biol Szeged 46 (3-4): 145-146
10. **Horváth Gy**, Botz L, Kocsis B, Németh J, Szabó L Gy (2002): New aspects of classification of *Thymus* taxa with GC and bioautography. 13<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Greece, Hersonissos, 1-6 September 2002, P484 (poszter bemutatás), Abstract: 716
11. **Horváth Gy** (2002): *Thymus* taxonok vizsgálati módszerei a kemotaxonómia szemszögéből. A Magyar Tudomány Napja 2002, MTA Pécsi Területi Bizottsága, Biológiai Szakbizottság rendezvénye. A PTE Növénytaxonómia – Vegetációtudományi Doktori Program kutatási eredményei, PAB székház, Pécs, 2002. november 8.
12. **Horváth Gy** (2003): *Thymus* kemotípusok megismerésének újabb lehetőségei. MTA Pécsi Területi Bizottsága, Biológiai Szakbizottságának ülése Prof. Dr. Rácz Gábor 75. születésnapja alkalmából, Farmakognózia Tanszék – „Nendtvich Tamás terem”(Pécs, Rókus u.), 2003. november 21.
13. **Horváth Gy** (2003): Néhány *Thymus* kemotípus illóolajának gázkromatográfiás vizsgálata és antibakteriális hatásának tanulmányozása direkt bioautográfiával. Az MKE Analitikai Szakosztály Szerves Analitikai Szakcsoportjának rendezvénye – Fiatal kémikusok előadói napja, Budapest, 2003. november 25.

### III. Egyéb közlemények:

1. Miklós E J, Botz L, **Horváth Gy**, Farkas Á, Dezső Gy, Szabó L Gy (2001): Atropine and scopolamine in leaf and flower of *Datura arborea* L. International J Hort Sci 7 (2): 61-64
2. Botz L, Kovács O Zs, Miklós E J, **Horváth Gy**, Szabó L Gy (2001): Translocation of exogen phenoloids and alkaloids in acceptor plant – histo- and phytochemical characteristics. Acta Bot Hung 43 (1-2): 79-93
3. **Horváth Gy**, Miklós E J, Botz L, Szabó L Gy (2001): Allelokémiai stresszorok felvétele és a formaldehid interreláció akceptor növényben. Gyógyszerészet 45: 261
4. Szabó L Gy, Botz L, Kovács O Zs, Dezső Gy, Farkas Á, **Horváth Gy**, Papp N, Pozsonyi K, Balogh L (2002): Fitokémiai habitus és életstratégia. In: Magyar Botanikai Kutatások az Ezredfordulón – Tanulmányok Borhidi Attila 70. születésnapja tiszteletére, (ed.) Salamon A É, pp. 235-253
5. **Horváth Gy**, Farkas Á, Szabó L Gy (2004): Flavonoids, chalcones and phenylpropanoids in apple and pear flowers. International J Hort Sci 10 (2): 35-38

#### IV. Egyéb konferencia poszterek és előadások:

1. Farkas Á, **Horváth Gy**, Kovács O Zs, Botz L, Szabó L Gy (2000): Phenolic compounds in flowers of *Rosaceae* taxa. 12<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Budapest, 21-25 August 2000, Abstract SO3-19 (poster): s45
2. **Horváth Gy**, Botz L, Tyihák E, Kátai Gy, Szabó L Gy (2000): Is formaldehyde as an allelopathic factor? 5<sup>th</sup> International Jubilee Conference on Role of Formaldehyde in Biological Systems, Methylation and Demethylation Processes, Sopron, 9-13 October 2000 (poszter bemutatás)
3. **Horváth Gy**, Miklós E J, Botz L, Szabó L Gy (2001): Allelokémiai stresszorok felvétele és a formaldehid interreláció akceptor növényben. A gyógynövénykutatás aktuális kérdései: növénykémia, alkaloidkémia, kemotaxonómia, Szeged, 2001. október 19-20.
4. **Horváth Gy**, Botz L, Szabó L Gy (2003): Effect of salicylic acid on the level of formaldehyde and its potential generators in *Thymus* plants. 6<sup>th</sup> International Jubilee Conference on Role of Formaldehyde in Biological Systems, Methylation and Demethylation Processes, Pécs, 13-16 October 2003 (poszter bemutatás)