

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

# **Biotická elicitace explantátové kultury *Trifolium pratense* L.**

Kateřina Kyprová

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Oponent:

Úvodem své diplomové práce bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení při jejím zpracování. Zároveň děkuji za poskytnutí literárních podkladů a také cenných rad a připomínek.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>7</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L.,<i>Fabaceae</i>) .....</b>	<b>8</b>
3.1.1. Původ rostliny .....	8
3.1.2. Botanický popis rostliny.....	8
3.1.3. Výskyt .....	9
3.1.4. Odrůdy .....	10
3.1.5. Sběr a úprava drogy .....	11
3.1.6. Použití .....	11
3.1.7. Obsahové látky .....	12
3.1.7.1. Flavonoidy .....	12
3.1.7.2. Isoflavonoidy .....	14
<b>3.2. Rostlinné kultury <i>in vitro</i>.....</b>	<b>17</b>
3.2.1. Obecná charakteristika .....	17
3.2.2. Vlastnosti kultur rostlinných explantátů .....	20
3.2.3. Etapy kultivace explantátových kultur .....	21
3.2.4. Podmínky kultivace rostlinných explantátů.....	22
3.2.4.1. Složení živných médií .....	22
3.2.4.2. Fyzikální podmínky kultivace .....	25
3.2.5. Fáze růstu kultury .....	26
3.2.6. Produkce sekundárních metabolitů .....	27
3.2.7. Biotechnologické využití rostlinných explantátových kultur .....	28
<b>3.3. Elicitace .....</b>	<b>29</b>
3.3.1. Charakteristika elicítace .....	29
3.3.2. Elicitory .....	30
3.3.2.1. Biotické elicitory .....	30
3.3.2.2. Abiotické elicitory .....	30

3.3.3. Podmínky elicitace .....	31
3.3.4. Mechanismus účinku elicitoru .....	32
3.3.5. Kyselina jasmínová .....	33
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Použitý materiál, přístroje a pomůcky.....</b>	<b>35</b>
4.1.1. Rostlinný materiál .....	35
4.1.2. Stanovení ztráty sušením.....	35
4.1.3. Chemikálie .....	36
4.1.4. Přístroje a pomůcky .....	37
<b>4.2. Kultivace explantátové kultury .....</b>	<b>38</b>
4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje .....	38
4.2.2. Příprava živného média .....	38
4.2.3. Odvození kalusové kultury, pasážování a kultivace.....	40
<b>4.3. Elicitace .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4. Stanovení obsahu flavonoidů .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů .....</b>	<b>43</b>
4.5.1. Příprava vzorku .....	43
4.5.2. HPLC analýza .....	44
<b>4.6. Statistické vyhodnocení .....</b>	<b>46</b>
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1. Tabulky .....</b>	<b>48</b>
<b>5.2. Grafy .....</b>	<b>51</b>
<b>6. DISKUSE .....</b>	<b>52</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>55</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>56</b>

# 1. ÚVOD

V současné době je věnována velká pozornost biotechnologickému pěstování kultur *in vitro*. Explantátové kultury však nedosahují, až na některé výjimky, tak intenzivní biosyntézy a jejich produkce je nižší než u intaktní rostliny, proto jsou hledány různé techniky, jako jsou např. biotransformace, imobilizace, elicitace a jejich vzájemné kombinace nebo metody genového inženýrství, kterými by se produkce a akumulace sekundárních látek v těchto kulturách zvýšila.

Při procesu elicitace se využívá schopnost rostlin i rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty celou řadou obranných reakcí, na jejichž konci dochází ke zvýšené akumulaci sekundárních metabolitů. Zřejmý je stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s širokým spektrem biologických účinků těchto látek.[1-9]

Velmi nadějným zdrojem těchto sekundárních metabolitů je jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*). Užívá se v lidovém léčitelství zejména proti průjmům, při bronchitidě, při revmatismu, na oteklé lymfatické žlázy a při cukrovce. Zevně pak ve formě koupelí jako kožní dezinfekce na ekzémy a hnisavé rány. Je také pěstován na polích jako hospodářská plodina v různých vyšlechtěných odrůdách. V poslední době se objevuje množství přípravků s obsahem z jetele lučního, které jsou doporučovány ženám na odstranění či zmírnění příznaků menopauzy. Mnohé studie se proto snaží potvrdit toto příznivé působení na postmenopauzální potíže, jejich výsledky ale nejsou jednotné.[10-14]

## **2. CÍL PRÁCE**

**2.1. Seznámit se s metodikou kultivace a elicitace rostlinných explantátových kultur *in vitro*.**

**2.2. Sledovat vliv působení čtyř koncentrací kyseliny jasmínové na produkci sekundárních metabolitů kalusovou a suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. (varietà DO-8)**

# 3. TEORETICKÁ ČÁST

## 3.1. Jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*)

### 3.1.1. Původ rostliny

*Trifolium pratense* L. je značně proměnlivá rostlina, která roste od nížin až do horských oblastí. Rozšířena je téměř v celé Evropě a v západní Asii, kde zasahuje na východ až k Altaji, Bajkalskému jezeru a do Kašmíru. V severní Africe roste v Alžíru. V Severní a Jižní Americe a na Novém Zélandu roste jen zplaněle. V některých oblastech vytváří morfologicky diferencované rasy, označované obvykle jako subspecies nebo variety.[15,16]

### 3.1.2. Botanický popis rostliny

Je to vytrvalá (u některých kulturních forem jen 2 až 3letá) bylina se silným kulovitým kořenem, který sahá i přes 60 cm hluboko do půdy. Z trsnatého oddenku bez výběžků vyrůstá přízemní růžice listů a přímé nebo vystoupavé, jednoduché nebo spoře rozvětvené, 20 až 50 cm vysoké a většinou trochu hranaté lodyhy o 3 až 5 článcích. Jsou bělavě chlupaté nebo téměř lysé, často načervenalé.

Listy jsou trojčetné, spodní dlouze řapíkaté, hořejší s řapíky kratšími až přisedlé, s palisty. Listy jsou složené z lístků v průměru 7-15×15-30 mm velikých, vejčitých až široce elipčitých, skoro celokrajných, na lici lysých a s příčnou bělavou nebo červenohnědou skvrnou ve tvaru půlměsíce. Na spodní straně jsou přisedle



chlupaté a na okraji brvité. Palisty dolních listů jsou kopinaté, u horních listů vejčité a přirostlé k řapíku.

Květy se uspořádávají do hlávek, měřících v průměru 2 až 3 cm. Na jedné lodyze bývají 1-3 květenství, rozmístěna tak, že postraní vyrůstají v paždí listů a hořejší je zdánlivě vrcholové. Tato květenství jsou kulatá nebo vejčitá, polozakrytá velikými palisty podpůrných listů. Skládají se z drobných, červených, karmínově růžových nebo řidčeji vybledlých až bílých kvítků v počtu 30 až 60. Pětčetné kvítky jsou přisedlé, bez listenců, 13 až 18 mm dlouhé, přímé, složené z 10žilného kalichu, který je vně krátce chlupatý a má dolní zub delší, zbarvený bělozeleně nebo načervenalé. Motýlová koruna je z dolejšku srostlá; její horní plátek (pavéza) je delší než oba postranní plátky (křídla) a dva spodní jsou srostlé v člunek. Plodem je drobný, nepukavý, vejčitý, jednosemenný lusk, pevně uzavřený v kalichu. Drobná semena jsou v obrysu nepravidelně ledvinovitá až třírohá, až 2,5 mm dlouhá, s výrazným kořínkem, zřetelně vyznačeným rýhou. Jsou hladká, lesklá, citrónově žlutá až fialově zbarvená.[10,11,15-20]

### **3.1.3. Výskyt**

Jetel luční roste na bohatých, suchých až mírně vlhkých půdách, především na loukách, stráních, v příkopech nebo okrajích cest. Je také pěstován na polích jako hospodářská plodina v různých vyšlechtěných odrudách. Je to významná medonosná rostlina: Dvacet milionů opylených květů dává 1 kg medu a 30 kg semene. Opylení obstarávají hlavně čmeláci a někteří motýli, neboť ostatní hmyz má většinou kratší sosák, než je zapotřebí. Pěstujeme-li jetel na semeno, poskytne nám při prvním sečení méně semene než při druhém, neboť na jaře je ještě málo čmeláků, takže opylení je špatné.[10,11,16,17,19]



### 3.1.4. Odrůdy

V České republice nacházíme tři poddruhy, které bývají někdy hodnoceny jako odrůdy. Radíme tam *Trifolium pratense subsp. pratense*, vytrvalá bylina s významem léčivé rostliny; *subsp. sativum*, většinou 2-3letá bylina, která je významnou hospodářskou plodinou a *subsp. americanum*. Tento posledně jmenovaný vytrvalý poddruh byl k nám dovezen v 80. letech 19. století, ale od jeho pěstování bylo později upuštěno.[15]

### 3.1.5. Sběr a úprava drogy

*Trifolium pratense* kvete od května do října. Jako droga se používají nerozpadlé hlávky – *Trifolii pratensis flos*. (Droga není oficiální v ČL 2005). Sbírají se v počátku květu. Překvetlé jsou bezcenné protože při sušení hnědnou. Květy se mohou jeden den vystavit v jednoduché vrstvě přímému slunci a pak dosušit ve stínu a v průvanu. Přehrabáváním se hlávky snadno rozpadají a dávají bezcennou drť. Správně usušená droga zachová původní barvu nebo trochu ztmavne, ale nesmí být rezavá. Hlavní podmínkou je, aby hlávky zůstaly v celku a nebyly uvnitř suché. Suší-li se uměle, nemá teplota překročit 35 °C. Drogu chráníme při skladování před světlem a vlhkem, rychle podléhá zkáze.[10]

### 3.1.6. Použití

Jetel luční se užívá v lidovém léčitelství zejména proti průjmům, při bronchitidě, při revmatismu, na oteklé lymfatické žlázy a při cukrovce. Zevně pak ve formě koupelí jako kožní dezinfekce na ekzémy a hnisavé rány. Nejčastěji se užívá ve formě nálevu (2 čajové lžičky drogy na šálek vody) k úpravě stolice. Je součástí mnohých potravních doplňků na zmírnění projevů menopauzálních potíží. Dnes se používá jako chuťové a vonné korigens do čajových směsí. Mladé listy jetele jsou podobně jako špenát připravovány jako zelenina.[10,11,20,21]

### 3.1.7. Obsahové látky

Droga je nadějným zdrojem flavonoidů a isoflavonoidů, k dalším obsahovým látkám patří také např. třísloviny, kumariny, saponiny, kyanogenní glykosidy, fenolické glykosidy, barviva, silice, pryskyřice, tanin, organické kyseliny (salicylová, oxalová, kumarová, hroznová) a jiné látky.

Z hlediska potenciálního využití jako léčiv se jeví nejzajímavější skupinou látek isoflavonoidy s fytoestrogenní aktivitou (formononetin, biochanin A, daidzein a genistein). Dále jsou zastoupeny isoflavonoidy genistin, kumestrol, ononin, trifoliol.[22,23]

#### 3.1.7.1. Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny.

Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany). Vyskytují se jen v rostlinné říši, a to nejčastěji flavany, řidčeji isoflavany. Neoflavany se vyskytují vzácně a nemají terapeutický význam. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavonoidy dělí do několika skupin (flaveny, flavany, flavanony, flavanoly, flavanonoly, flavandioly, flavony, flavonoly). Flavonoly jsou nejhojnější skupinou flavonoidů zastoupených v ovoci a zelenině, kvercetin a kemferol jsou jejich nejběžnější zástupci.

Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují ve své molekule necukernou součást (aglykon) a cukernou složku. Volné aglykony se vyskytují pouze zřídka. V některých případech (při technologickém zpracování při

vyšších teplotách a v kyselém prostředí) může docházet k hydrolýze glykosidů a vzrůstu koncentrace aglykonů.

Flavonoidy se v rostlinách vyskytují rozpuštěné v buněčné šťávě vakuoly, lipofilnější methoxylové deriváty se nacházejí v silicích. V živém rostlinném organismu se účastní oxidačně redukčních pochodů. Další funkcí flavonoidů v rostlinách je vábení opylovačů a ochrana před UV zářením.

Aglykony flavonoidních glykosidů jsou produkty, které vznikají dvěma hlavními cestami. Šesti-uhlíkový fragment  $C_6-C_3-C_6$  sloučenin je odvozen z acetátového metabolismu a zbývající devíti-uhlíková část z kyseliny šikimové. Jednotka  $C_6-C_3$  ve formě kyseliny skořicové je spojena se třemi molekulami acetátu za vytvoření meziprojektu chalkonu, z něhož vzniká potom flavanon. Deriváty se tvoří zavedením nebo odstraněním hydroxylových skupin. Flavanonoly vznikají zavedením hydroxylové skupiny do polohy 3, dehydrogenace poloh 2 a 3 vede ke vzniku flavonolů. Glykosylace nastává v pozdním stadiu tvorby flavonoidu.

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemorhagicky a antiedematosně (P-vitamínový účinek). Jsou inhibitory hyaluronidasy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi, jsou proto podpůrnými prostředky při léčení infekčních nemocí. Mají i hepatoprotektivní účinek a také zabraňují nepříznivému účinku slunečního záření. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S ionty  $Ca^{2+}$  tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Napomáhají regeneraci vitamínu E, zvyšují hladinu vitamínu C a  $\beta$ -karotenu a snižují hladinu sérových triglyceridů. Mají též vlastnosti choleretické, cholagogní a spasmolytické. Účinné jsou glykosidy i aglykony. Používají se v čistém stavu, častěji ale jako drogy nebo jejich extrakty.

Flavonoidy jsou významnou součástí antioxidačního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (železo, měď). Antioxidační aktivita je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace. Optimální radikálově likvidační vlastnosti byly nalezeny pro o-dihydroxy strukturu

v kruhu B, 2,3 dvojnou vazbu a 4-oxo funkční skupinu v kruhu C a 3 a 5-hydroxy skupiny na kruzích A a C. Tuto strukturu mají právě flavonoly.

Zdá se, že přírodní flavonoidy s popsányými vlastnostmi mohou významným způsobem působit při prevenci chorob mající svůj původ v oxidačním poškození biologických struktur (ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění). Vhodný způsob stravování a příjem potravin s vyšším obsahem flavonoidů by mohl pomoci při léčbě těchto chorob a předcházet jim.[24-26]

### 3.1.7.2. Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou taxonomicky úzce rozšířeny v přírodě na rozdíl od ostatních všudypřítomných flavonoidů. Isoflavonoidy se vyskytují v převážné většině v rostlinách bobovitých (*Fabaceae*).

Nejbohatším zdrojem je sója luštinatá (*Glycine max*, *Fabaceae*). Dalšími významnými zdroji jsou jetel luční (*Trifolium pratense*, *Fabaceae*), jetel plazivý (*Trifolium repens*, *Fabaceae*) a tollice vojtěška (*Medicago sativa*, *Fabaceae*). Z dalších čeledí třídy dvouděložných, u kterých byly objeveny isoflavonoidy, můžeme zmínit zejména *Rubiaceae* a *Passifloraceae*, popřípadě *Moraceae*, *Myristicaceae*, *Rosaceae* a *Scrophulariaceae*. Ovšem výskyt isoflavonoidů v těchto čeledích je ojedinělý a potvrzen u jednoho rodu či druhu. Nově pak byly isoflavonoidy nalezeny v rybízu (*Ribes sp.*, *Grossulariaceae*) a jiném drobném ovoci. Z jednoděložných rostlin je nejbohatším zdrojem isoflavonoidů oddenek rodu *Iris* (*Iridaceae*) a také listy *Patersonia* (*Iridaceae*). Objeveny byly také v čeledi *Zingiberaceae*. [27]

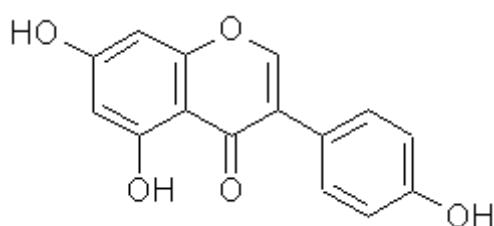
O významu isoflavonoidů v rostlině se zatím příliš neví. Pravděpodobně jsou produkovány jako odpověď na infekci patologickým agens (fytoalexiny) a mohou tak představovat jeden z obranných mechanismů rostliny. [28] Isoflavonoidy lze izolovat z většiny rostlinných tkání; v klíčcích, mladých výhoncích a pupenech se vyskytují více. Z toho se usuzuje, že by mohly zasahovat do regulace fyziologických procesů důležitých pro rostlinný růst. [29,30]

Isoflavonoidy patří mezi skupinu flavonoidů, strukturně se ovšem od ní liší základním 1,2-difenylpropanovým skeletem ( $C_6C_3C_6$ ). Isoflavonoidy jsou strukturně více rozmanité než ostatní skupiny flavonoidů a tvoří několik skupin, které se liší stupněm oxidace pyranového kruhu.[27]

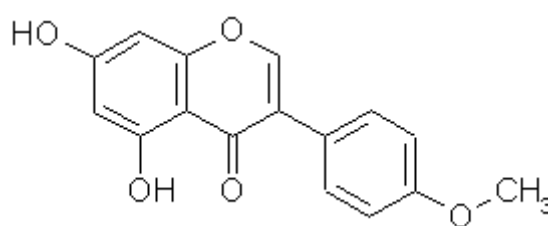
Nejčastěji se vyskytující skupinou těchto sekundárních metabolitů rostlin jsou isoflavony, které se v rostlině nacházejí častěji ve volné formě a méně často glykosidicky vázané. Nejvýznamnějšími zástupci z více než 360 zatím popsáných isoflavonů jsou genistein, daidzein, formononetin a biochanin A.[31]

V rostlinách vznikají kondenzací polyacetátu a aromatických aminokyselin, které jsou syntetizovány biosyntetickou cestou kyseliny šikimové.[27]

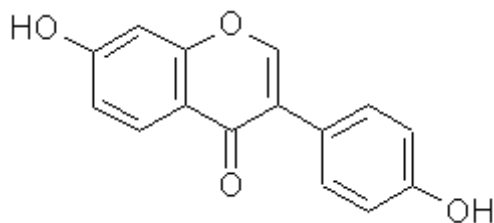
### **Struktury nejvýznamnějších isoflavonoidů**



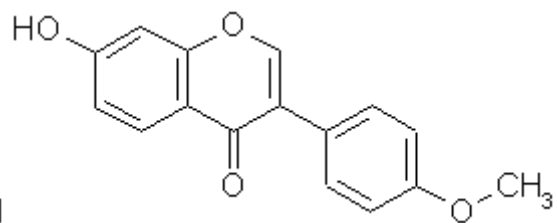
genistein



biochanin A



daidzein



formononetin

Isoflavonoidy jsou molekuly se schopností vázat se na estrogenní receptory a patří k nejlépe probádaným fytoestrogenům. V rostlinách účinkují jako antioxidanty, neboť jsou schopny inhibovat tvorbu superoxidových anionů. I když jsou isoflavony nazývány fytoestrogeny, nejsou totožné s estradiolem a nevykazují schopnosti buněčné proliferace. Často bývají rovněž označovány přívlastkem anti-aging, a to pro svoji schopnost ochránit samu rostlinu od agresivního slunečního záření. Toto tvrzení je podpořeno pozorováním, že rostliny ve vysokohorských oblastech mají větší obsah isoflavonů.[32]

Isoflavony kromě antioxidační aktivity vykazují aktivitu na estrogenových, progesteronových či androgenních receptorech, a to s různou afinitou i vnitřní aktivitou, což pravděpodobně stojí v pozadí jejich vyšší bezpečnosti v porovnání s klasickými přípravky s obsahem pohlavních hormonů.[32] Někdy se také označují jako selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERM). Dnes rozlišujeme dva typy estrogenních receptorů (ER); ER- $\alpha$  – nachází se převážně v děloze, mléčných žlázách a hypofýze a ER- $\beta$  – exprimován v řadě tkání jako například v mozku, kostech, močovém měchýři a thymu.[32,33]

Účinek isoflavonoidů se neprojevuje pouze prostřednictvím estrogenních receptorů, ale mohou ovlivňovat různé enzymy, syntézu proteinů, transport vápníku, oxidaci lipidů, diferenciaci buněk nebo účinek růstových faktorů.

Isoflavonoidy mohou mít pozitivní vliv na srdeční onemocnění působením na estrogenní receptory, ale také snižováním koncentrace lipidů a lipoproteinů v plazmě. Isoflavony sóji mohou stabilizovat LDL lipoproteiny proti oxidaci, o níž se předpokládá, že probíhá v arteriích a je považována za jednu z možných příčin vzniku aterosklerózy. Na lipidové spektrum mají příznivější vliv spíše nižší dávky než příliš vysoké dávky isoflavonů. V prevenci aterosklerózy hrají významnou roli isoflavonoidy i vzhledem ke zlepšení vazodilatace u žen v postmenopauze.

Významné jsou také účinky antibakteriální, insekticidní, imunosupresivní, antifungální.[27]



## 3.2. Rostlinné kultury *in vitro*

Vyšší rostliny jsou důležitými zdroji léčivých látek. Jednou z možností, jak se vyhnout obtížím se zajištěním těchto látek, je kultivace rostlinných tkání a buněk *in vitro*. Využití kultur *in vitro* lze rozdělit na dvě oblasti, ve kterých je nejintenzivněji prováděn výzkum, který má i své praktické uplatnění. Jde o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin a o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami, kterou lze ovlivnit například využitím prekurzorů požadovaných metabolitů, biotransformací nebo procesem elicítace. Využití kultur *in vitro* jako zdroje důležitých rostlinných metabolitů pro farmacii, potravinářství, kosmetiku a zemědělství se jeví velmi perspektivní.[34,35]

### 3.2.1. Obecná charakteristika

- ❖ **Kultivace *in vitro*** - pěstování rostlinného materiálu v podmínkách co nejúplněji definovatelných po stránce chemické i fyzikální a zabráňujících nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organizmy a buňkami.
- ❖ **Rostlinný explantát** - každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů, odebraný buď z intaktní rostliny nebo z již existující kultury s cílem pěstovat jej v podmínkách *in vitro*.
- ❖ **Intaktní rostlina** - původní rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách.
- ❖ **Kultura rostlinných explantátů** - rostlinné explantáty pěstované po určitou dobu v podmínkách *in vitro*. Kultury rostlinných explantátů lze podle morfologické charakteristiky zařadit do některé z následujících pěti kategorií:
  1. Kultura orgánová - orgánové systémy, orgány resp. jejich základy nebo části pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje diferenciaci a částečně zachovává i jejich stavbu a funkci.

2. Kultura tkáňová - do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně, pomnožované buď na polotuhých či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě.

3. Kultura suspenzní - volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendovány v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.

4. Kultura buněčná - volné jednotlivé buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotekuté půdě nebo na nosiči nasyceném živnou půdou.

5. Kultura protoplastů - kultura buněk zbavených buněčných stěn, kde buněčný obsah je obalen nikoliv pevnou buněčnou stěnou, ale jen pružnou elastickou plasmalemmou.

- ❖ **Primární explantát** - rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny.
- ❖ **Primární kultura** - kultura primárních explantátů.
- ❖ **Subkultivace, pasážování** - přenos celé kultury nebo její části (inokula) do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat nebo zesílit růst kultury po další subkultivační interval. Subkultivační interval je doba mezi dvěma pasážováními. Subkultivační číslo udává kolikrát byla kultura pasážována.
- ❖ **Rozpadavost kultur** - schopnost tkáňových či suspenzních kultur spontánně se rozpadat na buněčné shluky a volné buňky, schopné dalšího růstu, resp. pomnožování.
- ❖ **Kalus, zával, svalec** - v původním významu neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny, v přeneseném významu pletivo, které vzniká na povrchu nenádorových primárních explantátů a je schopné subkultivace.
- ❖ **Kalusová kultura** - kultura kalusu in vitro.

- ❖ **Totipotence** – schopnost rostlinných buněk kultivovaných in vitro obnovit v průběhu diferenciačních procesů specializované funkce a postupně regenerovat ve fertilní rostlinu; umožňuje realizace genetických změn vyvolaných v jednotlivých buňkách na úrovni celého organismu.
  
- ❖ **Diferenciace** – chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech spočívající v aktivaci či inaktivaci určitých genů, jimiž se odlišily od tzv. eumeristemického stavu a získaly jinou specializaci. Opačný proces je nazýván dediferenciace.[36,37]

### 3.2.2. Vlastnosti kultur rostlinných explantátů

- Rostlinné kultury lze odvodit z buňky či komplexu buněk pletiva kteréhokoliv orgánu rostlinného těla (s výjimkou některých velmi specializovaných buněk, např. sítkovice, sklereidy).
- Kulturu lze pěstovat *in vitro* za vhodných kultivačních podmínek neomezeně dlouho.
- Tkáňová a suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje, ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter, není však homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciaci.
- Suspenzní kultury jsou tvořeny volnými buňkami a jednotlivými buněčnými shluky, poměr volných buněk a buněčných shluků se v průběhu kultivace může měnit; rozpadavost kultury je zřejmě geneticky podmíněna a lze ji ovlivnit složením média a kultivačními podmínkami.
- Buňky tkáňových ani buněčných kultur nejsou schopny tvořit jednovrstevnou kulturu (monolayer), neuchycují se na tuhé ani polotuhé podklady.
- Řada rostlinných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách, často velmi jednoduchých.
- Explantátové orgány, resp. orgánové základy v kultuře *in vitro* mohou dorůstat.
- Orgánové, tkáňové ani buněčné kultury nejsou schopny bez poškození podstoupit konzervaci mrazem.
- Vhodnou kombinací růstově aktivních látek a ostatních složek kultivačního média lze v kulturách indukovat histogenezi nebo organogenezi, takto je možné odvodit z jediné somatické buňky životaschopnou rostlinu.[36]

### 3.2.3. Etapy kultivace explantátových kultur

Cílem práce je získat sterilní rostlinný materiál s vysokou produkcí metabolitů. Prvním krokem je výběr vhodné matečné rostliny. Výchozí rostlina by měla být zdravá a pěstovaná v optimálních podmínkách. Nejlepších výsledků je dosaženo, je-li explantát odebrán z rostliny v aktivní fázi růstu a nebo ze zásobních orgánů. Z povrchově sterilní nebo asepticky pěstované rostliny se fragment některého orgánu umístí do kultivační nádoby s vhodným sterilním živným médiem a inkubuje se při teplotě 23 – 28 °C. Typ vývoje explantátu a intenzita proliferace je ovlivněna kultivačními podmínkami a složením média. Po několika týdnech se objeví primární kalus, který je schopen se rozmnožovat na novém médiu.

Získaný kalus je schopen neomezené proliferace na vhodném médiu po odstranění zbytku výchozího orgánu. U prvních pasáží se mohou objevit morfologické a morfogenetické změny. Teprve po větším počtu pasáží se získá stabilní a homogenní rostlinný materiál, ovšem pouze za předpokladu přísného dodržování konstantních podmínek kultivace, jako je složení a zpracování živné půdy, teplota, osvětlení, prostředí a pravidelnost pasáží.

Z kalusové kultury lze enzymatickým nebo mechanickým způsobem odvodit kulturu suspenzní. V prvním případě se používají vhodné pektinázy, ve druhém pomaloběžné rolery a třepačky.

Pro úspěšnou kultivaci rostlinných kultur je důležité najít optimální složení živného média a připravit vhodné fyzikální podmínky.[36,37]

### 3.2.4. Podmínky kultivace rostlinných explantátů

Optimální růst, ale i produkce sekundárních metabolitů jsou ovlivněny volbou vhodných podmínek.

#### 3.2.4.1. Složení živných médií

Složky živných půd se podle množství v půdě resp. svého charakteru nebo fyziologických účinků rozdělují do následujících skupin:

- ❖ **Makroelementy** – jsou nezbytné pro kultivaci intaktních rostlin. Jedná se o dusík, síru, fosfor, hořčík, vápník, draslík. Přidávají se do živné půdy ve formě solí, jejich koncentrace v médiu je vyšší než  $30 \text{ mg.l}^{-1}$ .
- ❖ **Mikroelementy** – zahrnují železo, bor, mangan, jod a molybden; v mnoha případech jsou také nepostradatelné měď a zinek. Význam niklu, kobaltu a hliníku pro růst kultivovaných rostlinných tkání je zatím sporný.
- ❖ **Zdroje organického uhlíku** – cukry, alkoholy, organické kyseliny. Jsou základní stavební jednotkou pro nově vznikající pletiva. Pro většinu rostlinných kultur je nejvhodnější sacharóza v koncentraci 2 – 5 %. Alkoholy nemají pro tkáňové kultury takový význam jako cukry. Jako uspokojující zdroj uhlíku může sloužit glycerin. Jiné alkoholy jsou již méně účinné, některé jsou neúčinné nebo jsou dokonce toxické (propanol, butanol). Ani organické kyseliny nejsou ideální; příznivý vliv na růst kultur byl zjištěn jen u kyseliny jablečné.
- ❖ **Prostředky pro odpěňování živných půd** - jsou rostlinné oleje - sójový, řepkový, kokosový, slunečnicový, hořčičný, dále živočišné tuky - lůj, dezodorizovaný rybí tuk, tekutá frakce vepřového sádla a silikonové oleje - jako vodná emulze s obsahem 10% silikonu. Tyto prostředky jsou důležité především ve výrobě.

- ❖ **Vitamíny** – jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi vitamíny nejčastěji používané v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myoinositol. Thiamin se používá obvykle v koncentraci 0,1 – 10,0 mg.l<sup>-1</sup>. Je součástí většiny médií a je pro růst tkáňových kultur nepostradatelný.

V kultivačních médiích se někdy používají další vitamíny jako biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin a další. Jejich přítomnost v médiích však není většinou nezbytná.

- ❖ **Aminokyseliny** – slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Jejich přirozené směsi (např. hydrolyzát kaseinu) působí příznivě na růst a vývoj explantátu, podporují také organogenezi. Dodávají se do živných médií především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů.
- ❖ **Nedefinované směsi přírodních látek** – růst explantátové kultury je možné stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktů z banánů, koňského kaštanu, vlašského ořechu, kukuřice, pšenice, pomerančové či rajčatové šťávy. V současné době se dává přednost definovaným kombinacím látek a tím se přechází ke skutečně syntetickým médiím.[36]
- ❖ **Látky používané pro zpevnění média** – pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar, který má oproti jiným látkám řadu výhod. Agarové gely jsou při kultivačních teplotách stabilní, nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhost svarového gelu je možno regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty fixovat na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pění, čedičové vatě nebo perforovaném celofánu.[37]

❖ **Růstové regulátory** – rostlinné buňky jsou při pěstování *in vitro* většinou závislé na přítomnosti růstových regulátorů, protože syntéza endogenních růstových regulátorů (fytormonů) není pro zajištění růstu dostatečná. Pro účely kultivace lze růstové regulátory rozdělit do tří základních skupin:

- **Auxiny:** mezi auxiny používané v tkáňových kulturách rostlin patří především kyselina  $\beta$ -indolyloctová (IAA), kyselina  $\beta$ -indolyl-4-másečná (IBA), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina  $\alpha$ -naftyloctová ( $\alpha$ -NAA). V kultivačním médiu jsou používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk. V některých případech k indukci tvorby prýtu a zejména kořenů.
- **Cytokininy:** nejdůležitějšími přírodními cytokininy jsou zeatin a 6-izopentenylaminopurin a syntetickými 6-furfurylaminopurin (kinetin) a 6-benzylaminopurin (BA). Používají se ke stimulaci buněčného dělení a k indukci tvorby axilárních prýtů.
- **Gibereliny:** hlavními zástupci jsou kyselina giberelová (GABA) a giberelin. Přidávají se do média většinou za účelem stimulace růstu buněčných kultur, kalusů a zakrslých rostlin. [36,37]



### 3.2.4.2. Fyzikální podmínky kultivace

Jedním z předpokladů úspěšného pěstování rostlin *in vitro* je jejich adaptabilita na podmínky kultivace dané kultury. Z fyzikálních faktorů sem lze zařadit osvětlení, teplotu, pH živného média atd.

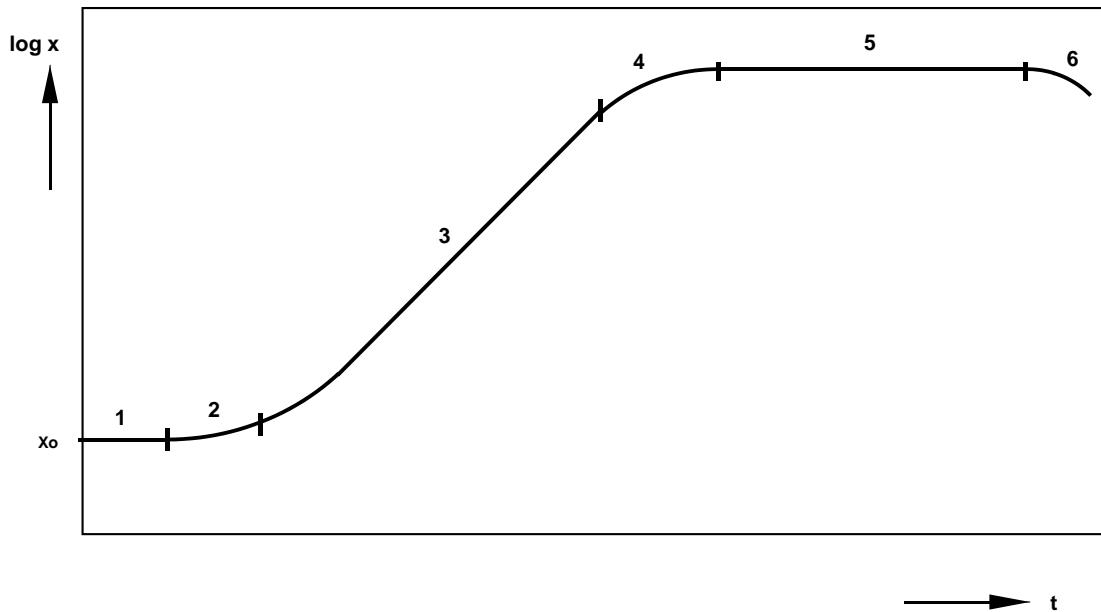
- ❖ **Světlo** – působením světla často dochází v intaktních rostlinách i tkáňových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a k akumulaci sekundárních metabolitů. Stejný vliv má i světlo na orgánovou diferenciaci. Světlo může být také induktorem některých biosyntéz, např. syntézy flavonoidů a anthokyanů. Pozitivní vliv světla byl dále prokázán u kultur produkujících digitoxin a diosgenin. Je znám i vliv světla o různých vlnových délkách na produkci sekundárních metabolitů.
- ❖ **Teplota** – kultivační teplota je jedním z faktorů, který ovlivňuje průběh kultivace tkáňových kultur. Většinou je empiricky zvolena v těsném rozmezí okolo 25°C. Její hodnota má vliv na rychlost růstu kultury a její zvýšení může indukovat organogenezi. Pokud je teplota příliš nízká, rychlost metabolismu se zpomalí až zastaví, pokud je teplota vysoká, dojde k poškození buněk.
- ❖ **Acidita živného média** – u rostlinných tkání není bezpodmínečně nutná přesná hodnota pH živného média. Optimální hodnota pH závisí na typu kultury. Pro většinu kultur *in vitro* se doporučuje hodnota pH od 5,5 do 6,0. Na tyto hodnoty se v případě potřeby upravují půdy přísadou hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové.[36]

### 3.2.5. Fáze růstu kultury

Rostlinná kultura během růstu prochází několika fázemi. Jednotlivé fáze jsou charakterizovány růstovou křivkou, která vyjadřuje závislost koncentrace biomasy na čase. Délka fáze závisí na složení živného média, fyzikálních faktorech a na typu a stáří buněk, jejich množství a genetickém vybavení.[36,37]

1. **lag fáze** – období přizpůsobení se naočkovaných buněk novému prostředí. Po umístění buněk do živného média je jejich koncentrace po určitou dobu konstantní nebo může přechodně klesnout.
2. **fáze zrychlení (akcelerační)** – všechny důležité enzymové reakce postupně dosahují maximálních konstantních rychlostí a přecházejí do ustáleného stavu.
3. **exponenciální fáze** – buňky rostou stále stejnou maximální rychlostí, buňka se z hlediska chemického složení nemění. Fáze trvá tak dlouho, pokud mají buňky dostatečné množství živin a pokud není růst kultury inhibován produkty vlastního metabolismu.
4. **fáze zpomalení (deklinační)** – s postupným vyčerpáním živin a hromaděním metabolických produktů dochází k poklesu růstové rychlosti. V této fázi se může tvar růstové křivky velmi lišit, což záleží na typu rostlinné kultury.
5. **stacionární fáze** – populace buněk dosahuje maximální a po určitou dobu konstantní velikosti, doba této fáze závisí stejně jako u předchozí fáze na způsobu měření koncentrace buněk. Maximální dosaženou koncentraci buněk určuje řada faktorů: počáteční koncentrace energetického zdroje, zdroje dusíku a stopových prvků, koncentrace kyslíku, způsob úpravy pH během kultivace.
6. **fáze odumírání** – pro průběh fáze neexistuje žádné pravidlo, odumírání může být pomalé nebo rychlé, spojené nebo nespojené s autolýzou buněk.

## Růstová křivka



**Fáze růstové křivky:** x – koncentrace biomasy; jednotlivé fáze: 1) lag fáze, 2) akcelerační fáze, 3) exponenciální fáze, 4) deklinační fáze, 5) stacionární fáze, 6) fáze odumírání

### 3.2.6. Produkce sekundárních metabolitů

Vyšší rostliny jsou bohatými zdroji léčivých látek. Jednou z možností, jak se vyhnout obtížím se zajištěním těchto látek, by mohlo být zavedení systému buněčných kultur pro jejich produkci.

**Hlavní výhody buněčné kultivace** oproti kultivaci celé rostliny jsou následující [34]:

- Sekundární metabolity mohou být produkovány za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických změnách nebo půdních podmínkách.

- Rostlinné explantáty jsou pěstovány sterilně, bez použití ochranných prostředků a hnojiv.
- Buňky jakékoliv rostliny, bez ohledu na její geografický původ, mohou být snadno pěstovány k získání jejich specifických metabolitů.
- Automatická kontrola buněčného růstu a racionální regulace metabolických procesů může přispět ke snížení pracovních nákladů a zvýšení produktivity.

### **3.2.7. Biotechnologické využití rostlinných explantatových kultur**

V posledních letech nastal významný pokrok ve vývoji nových technik, kterými je možné dosáhnout zvýšení produkce a akumulace sekundárních přírodních látek v buněčných kulturách *in vitro*. Jde například o elicitaci, biotransformaci, imobilizaci.

Úspěšných výsledků ve využívání rostlinných buněčných kultur pro tvorbu sekundárních přírodních látek bylo také dosaženo zejména postupy založenými na manipulacích se složením živného média, dále díky rozvoji metod klonování.

Perspektivní je i přenos rostlinných genů, které kódují enzymy katalyzující reakce biosyntézy sekundární látky do bakteriální buňky nebo do buňky mikroskopických hub.

Přes dosažené úspěchy zůstává stále nevyřešena celá řada problémů, které stojí v cestě využití tkáňových kultur pro produkci sekundárních metabolitů. Zřejmě nejvýznamnějším je nízký obsah žádaných látek, kombinovaný s často se vyskytující nestabilitou produkce.[34]

## 3.3. Elicitace

### 3.3.1. Charakteristika elicítace

Jednou z metod, které lze využít ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinách, je metoda elicítace, při které jsou využívány obranné reakce rostlin v podmínkách *in vitro*. Elicitací vyvolaný stres aktivuje obranné reakce rostliny nebo rostlinného explantátu, které vedou mimo jiné ke změně transkripce genů kódující enzymy ovlivňující biosyntézu sekundárních metabolitů.[3,38]

Jako stres se označují všechny faktory, které vyvolávají odchylky od fyziologického standardu a také určitým způsobem zatěžují organismus. V okamžiku, kdy je tkáňová kultura vystavena stresu, zahájí jako obrannou odpověď syntézu tzv. fytoalexinů. Jde o nízkomolekulární látky sekundárního metabolismu, které se ve zdravé rostlině nevyskytují, nebo jen ve velmi nízkých koncentracích. V současné době je známo více než 300 fytoalexinů, které po chemické stránce patří mezi velmi různorodé typy sloučenin. Např. u rostlin čeledi Fabaceae převažují flavonoidy a isoflavonoidy, u jiných čeledí to mohou být seskviterpeny (*Solanaceae*), diterpeny (*Poaceae*), furanokumariny (*Apiaceae*) či stilbeny (*Vitaceae*). Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanismům toxického působení fytoalexinů.[3]

### 3.3.2. Elicitory

Elicitory jsou signální látky, jejichž původ je biologický či nebiologický. Mají schopnost dát podnět k aktivaci genů, které jsou nezbytné pro syntézu fytoalexinů. Elicitory aktivují určité enzymy, které katalyzují tvorbu antimikrobiálně působících sekundárních látek (fytoalexinů) i jiných stresových látek s charakterem sekundárních metabolitů.[38]

#### 3.3.2.1. Biotické elicitory

Jde o organické látky se signálním účinkem. Řadíme mezi ně:

- celé intaktní patogenní i nepatogenní organismy nebo jejich části: viry, bakterie (např. *Pseudomonas*), houby (např. *Candida*, *Aspergillus*), kvasinky, mykoplazmata
- organické molekuly parazitických organismů: oligosacharidy, glykoproteiny, mastné kyseliny
- endogenní konstitutivní elicitory: organické molekuly pocházející z buněk napadené rostliny: chitosan, oligogalakturonidy, kyselina jasmínová, kyselina salicylová[38]

#### 3.3.2.2. Abiotické elicitory

Jde o chemické a fyzikální vlivy, které stresují rostlinu a spouštějí tvorbu fytoalexinů. Výhoda abiotických elicitorů spočívá v tom, že jsou chemicky zcela definované, lze je přesněji dávkovat a jsou zpravidla finančně dostupné.[38]  
Řadíme mezi ně:

- soli těžkých kovů:  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{PbNO}_3$
- inhibitory látkové výměny: kyselina trichloroctová, 2,4-dinitrofenol

- fyzikální vlivy: UV záření, gama záření, změny pH a osmotického tlaku
- detergenty
- rostlinné ochranné prostředky: pesticidy[3]

### 3.3.3. Podmínky elicítace

Základním předpokladem úspěšné elicítace je nutné splnění určitých podmínek:

- volba vhodného elicitoru
- doba působení elicitoru na kulturu
- optimální koncentrace elicitoru
- volba vhodného rostlinného explantátu pro kultivaci
- volba vhodného média a jeho složení
- stáří kultury
- růstová fáze kultury

Volba vhodného elicitoru pro elicítaci určité kultury je nejdůležitější podmínkou úspěšné elicítace.[39]

Poznatky o procesu elicítace, který podmiňuje tvorbu a akumulaci sekundárních přírodních látek v rostlinných buněčných kultur, lze shrnout následovně:

- tvorba sekundárních přírodních látek po působení elicitoru se vyskytuje především v buňkách, které se nacházejí na konci růstové fáze
- nastává v průběhu několika hodin po působení elicitoru (12-48 hodin)
- probíhá v buňkách suspendovaných v růstovém médiu, tak i v kalusu
- sekundární přírodní látky jsou přítomny v buňkách i v médiu
- elicítaci můžeme opakovat, aniž nastává poškození buňky[34]

### 3.3.4. Mechanismus účinku elicitoru

Na základě dosavadních znalostí se předpokládá, že elicitory indukovaná produkce a akumulace fytoalexinů a jiných stresových metabolitů rostlinnými kulturami *in vitro* je regulována stejnými mechanismy jako v případě intaktní rostliny.[38]

Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (označovaných také jako druzí poslové; second messenger). Ti pak přenášejí signály v buňce transdukčními signálními cestami, což vede ke genové expresi a biochemickým změnám. Přenos extracelulárního signálu do intracelulárního signálního systému a následně k DNA v jádře je možný více systémy.[3]

Byly nalezeny některé komponenty signálního transdukčního řetězce, které pomáhají přenosu signálu přes membránu do buňky. Jedná se o G-protein, vápenaté ionty, proteinkinázy.

Předpokládá se, že molekuly biotického elicitoru interagují se specifickými membránovými receptory. Obsazení receptoru může vést k aktivaci G-proteinu, k otevření vápenatých kanálů a k rychlému influxu vápenatých iontů do buňky.[40] G-protein leží na vnitřní straně plazmatické membrány. Po navázání elicitoru na vazebné místo receptoru se mění konformace receptoru a v tomto stavu váže na své intracelulární části G-protein.

Aktivaci G-proteinu je umožněn vstup vápníku do buňky přes vápníkový kanál. Extracelulární vápník je považován za signál, který přináší informaci o poranění dovnitř buňky. Další předpokládaný zdroj vápenatých, který pochází z intracelulárních organel (mitochondrie, endoplasmatické retikulum), přenáší informace v buňce. Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  se uvnitř buňky váží na bílkovinu kalmodulin, která má čtyři vazebná místa pro vápenaté ionty a narůstající komplex kalcium-kalmodulin moduluje mnoho fyziologických procesů. Vzniklý komplex ovlivňuje aktivitu určitých proteinkináz.



Zvýšení koncentrace vápenatých iontů v cytozolu, a tím i aktivace proteinkináz může být dosaženo i jinými cestami. Přenos signálu může být zprostředkován pomocí fosfoinositolového systému, při kterém hydrolýzou lipidů plazmatické membrány jsou generovány dvě signální sloučeniny: inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol, které za účasti iontů vápníku aktivují proteinkinázy a posléze i expresi genů.

Některé pokusy dokazují, že velmi častým a rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je také tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku vyvolané elicitory. Zvýšené množství peroxidu je možné zjistit po 5 až 10 minutách působení elicitoru. Kromě možného přímého účinku mohou reaktivní kyslíkové deriváty ovlivňovat expresi genů i nepřímo – způsobují totiž peroxidaci membránových lipidů, což vede ke zvýšení syntézy stresových fytohormonů (kyseliny jasmínové), jejichž signální funkce jsou již známy.[3]

U abiotických elicitorů ovšem nedochází k vazbě na specifický receptor, ale např. těžké kovy pravděpodobně spouštějí peroxidaci lipidů membrány, a tak dochází ke zvýšení propustnosti membrány pro vápenaté ionty.[38] Ionty těžkých kovů vyvolávají aktivaci transkripce několika genů tvorbu fytochelatinů. Jsou to malé peptidy syntetizované z glutathionu, které inaktivují těžké kovy tvorbou komplexů.[41]

### **3.3.5. Kyselina jasmínová**

K endogenním signálním látkám rostlinných obraných reakcí, které se podílejí na změnách v genové expresi, patří kyselina jasmínová, její prekurzory a deriváty, což potvrdily experimenty zabývající se genetickým a biochemickým rozborem signálních cest.

Kyselina jasmínová a její methylester jsou přirozenými hormonálními regulátory, které kontrolují stárnutí rostlin a indukují procesy probíhající po poranění rostlin, v případě exogenní aplikace mohou působit také jako elicitory.[42]

Methyljasmonát indukuje sekundární metabolismus řady rostlinných suspenzních kultur, např. *Coleus blumei*, *Catharanthus roseus*, *Rubia tinctorium*, *Alcanna tinctoria*, *Farsetia aegyptia*. [43-47]

Také v suspenzní kultuře *Taxus cuspidata* byl sledován vliv methyljasmonátu na akumulaci protirakovinné látky paklitaxelu.[48] U suspenzní kultury *Taxus chinensis* 100  $\mu$ M methyljasmonátu indukuje produkci taxanového diterpenu taxuynaninu C.[49] V suspenzních kulturách *Silybum marianum* přidání methyljasmonátu zvýšilo akumulaci silymarinu.[50]

Kyselina jasmínová indukuje zvýšenou produkci antrachinonů a zvýšený růst buněk v suspenzní kultuře *Morinda elliptica*. [51] Přidání kyseliny jasmínové ke kultuře kořenových vlásků druhu *Azadirachta indica* způsobilo nárůst produkce azadirachtinu, který se používá jako ekologický, přírodní pesticid.[52]

V explantátové kultuře *Ononis arvensis* L. se maximální produkce flavonoidů projevila po 12 hodinové aplikaci 4,8 mM roztoku kyseliny jasmínové, kdy u suspenzní kultury došlo ke zvýšení produkce o 38 % a u kalusové kultury o 55%. [53]

Příkladem úspěšné elicítace je také experiment, kde byla kyselina jasmínová použita ve čtyřech koncentracích u tkáňové kultury *Rheum palmatum* L. Doba elicítace byla 6 až 48 hodin. Maximální obsah anthracenových derivátů u kalusové kultury se projevila po 12 hodinové aplikaci nejsilnější koncentrace 5 mM a u suspenzní kultury po 48 hodinové aplikaci koncentrace 0,05 mM.[54]

# 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1. Použitý materiál, přístroje a pomůcky

### 4.1.1. Rostlinný materiál

K pokusům uvedeným v této práci byla použita explantátová kultura, odvozená ze sterilní klíčící rostliny jetele lučního *Trifolium pratense L.*, *Fabaceae* (varieta DO-8). Semena byla získaná ze Šlechtitelské stanice Domoradice. Elicitace byla provedena u dvouleté kalusové a suspenzní kultury.

### 4.1.2. Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do váženky, předem vysušené 2 hodiny při 105 °C, byly odváženy asi 2,000 g explantátové kultury. Váženka s obsahem byla zvážena a sušena 2 hodiny v sušárně při 105 °C. Po vysušení a vychladnutí v exsikátoru byla zvážena. Ztráta sušením byla vztažena na navážku explantátové kultury a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením 5,69 % je aritmetickým průměrem ze tří stanovení.[56]

### 4.1.3. Chemikálie

- ❖ 6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno
- ❖ Dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno
- ❖ Dusičnan draselný *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Ethanol 96%, Lachema, Brno
- ❖ Chloramin B, Lachema, Brno
- ❖ Chlorid kobaltnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Chlorid pyridoxinia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- ❖ Chlorid thiaminia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- ❖ Chlorid vápenatý *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Jodid draselný *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová č., Lachema, Brno
- ❖ Kyselina boritá *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Kyselina chlorovodíková *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Kyselina jasmínová *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Kyselina mravenčí bezvodá *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Kyselina nikotinová č., Lachema, Brno
- ❖ Kyselina octová bezvodá *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Kyselina octová ledová *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Kyselina šťavelová č., Lachema, Brno
- ❖ Methanol *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Molybdenan sodný *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Myoinositol č., Sigma, St. Louis
- ❖ Sacharóza *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Síran amonný *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Síran hořečnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Síran manganatý *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Síran měďnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Síran zinečnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Síran železnatý *p.a.*, Lachema, Brno

#### 4.1.4. Přístroje a pomůcky

- ❖ Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen
- ❖ Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
- ❖ Horkovzdušný sterilizátor HS 31A, Chirana, Brno
- ❖ Box s laminárním prouděním Fatran LF, Žilina
- ❖ Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- ❖ Třepačka Unimax 2010, Heidolph
- ❖ Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
- ❖ Chromatografická sestava Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), Merck, Darmstadt
- ❖ Kolona LiChrosper RP-18 250x4 (5 $\mu$ m) s předkolonkou, Merck, Darmstadt

## 4.2. Kultivace explantátové kultury

### 4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje

Ke kultivaci explantátových kultur bylo použito nádobí z varného skla značky SIAL, které je dostatečně odolné vůči vodě, chemikáliím a rozdíům teplot. Kalusové kultury byly kultivovány na můstcích z filtračního papíru vložených do 100 ml Erlenmeyerových baněk. Suspenzní kultury byly kultivovány ve 250 ml varných baňkách z téhož skla.

Kovové nástroje byly opláchnuty 96% ethanolem a po zabalení do hliníkové fólie sterilizovány 2 hodiny v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200 °C. Pipety s kouskem vaty vloženým do jejich horního konce byly také sterilizovány v hliníkové fólii 15 min při teplotě 121 °C v autoklávu.

### 4.2.2. Příprava živného média

Pro kultivaci tkáňových kultur bylo použito živné médium podle Gamborga, které má následující složení:[55]

$\text{KNO}_3$	2 500,00	$\text{mg.l}^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	150,00	$\text{mg.l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	250,00	$\text{mg.l}^{-1}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134,00	$\text{mg.l}^{-1}$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150,00	$\text{mg.l}^{-1}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,84	$\text{mg.l}^{-1}$

Na <sub>2</sub> EDTA	37,34	mg.l <sup>-1</sup>
KI	0,75	mg.l <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,00	mg.l <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	10,00	mg.l <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	2,00	mg.l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,25	mg.l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025	mg.l <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025	mg.l <sup>-1</sup>
myoinositol	100,00	mg.l <sup>-1</sup>
kyselina nikotinová	1,00	mg.l <sup>-1</sup>
pyridoxin	1,00	mg.l <sup>-1</sup>
thiamin	10,00	mg.l <sup>-1</sup>
sacharosa	30 000,00	mg.l <sup>-1</sup>

Jako stimulátor růstu byla použita 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina v kombinaci s 2 mg.l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinem.[23]

Půda připravená pro kultivaci byla rozlita po 30 ml do Erlenmeyerových baněk s papírovými můstky pro kultivaci kalusových kultur a po 25 ml do varných baněk připravených pro kultury suspenzní. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 min při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa.

### 4.2.3. Odvození kalusové kultury, pasážování a kultivace

Semena *Trifolium pratense* L. byla chemicky sterilizována nejprve ponořením na 3 minuty do 70% lihu, dále ponořením na 2 minuty do 10% vodného roztoku chloraminu a nakonec vložena na 10 minut do 2% chloraminu. Mezi každou lázní byla semena důkladně opláchnuta sterilní vodou. Vysterilizovaná semena byla vysévána na můstky z filtračního papíru do Erlenmeyerových baněk s 30 ml živného média podle Gamborga. Po týdnu kultivace při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma byly získány sterilní klíční rostliny.

Pasážování bylo prováděno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen nejméně 1 hodinu germicidní zářivkou. Při práci byly vždy zachovány přísně aseptické podmínky, bylo použito sterilní sklo a nástroje.

Kalusová kultura *Trifolium pratense* L. byla odvozena ze sterilní klíční rostliny na živném médiu podle Gamborga, při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. K živnému médiu byly přidány růstové stimulatory 2 mg.l<sup>-1</sup> kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 2 mg.l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinu. Subkultivační interval byl 21 dní.

Suspenní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepačce a následně kultivována na pomaloběžném roleru za stejných podmínek jako kultura kalusová. Pasážování bylo prováděno vždy po 14 dnech subkultivace přenesením části narostlé suspenze do baněk s čerstvým médiem.[23]



### 4.3. Elicitace

K elicítaci byly použity roztoky kyseliny jasmínové v 96% ethanolu o koncentraci: 5000  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ .

Elicitace kalusové a suspenzní kultury byla prováděna za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Při elicítaci byl přidáván 1,0 ml elicítoru příslušné koncentrace ke kalusové kultuře i k suspenzní kultuře ve 21. dni kultivace. Ke kontrolním kulturám byl přidáván 1,0 ml destilované vody.[23]

K experimentu bylo vzato 108 kultivačních baněk s kalusovou kulturou. Soubor 12 baněk bez elicítoru sloužil jako kultura kontrolní. Do ostatních 96 baněk s kulturou byl přidán vždy 1,0 ml elicítoru o příslušné koncentraci. Potom byly baňky pečlivě uzavřeny hliníkovou folií a dále kultivovány za již uvedených podmínek. Vznikly tak 4 soubory šesti baněk s elicítovanou kulturou.

Elicitované kultury byly odebírány po 6, 24, 48, 168 hodinách. Odběry kontrolních kultur byly provedeny po 6 a 168 hodinách. U kalusových kultur byly pinzetou vyjmuty kalusy na filtrační papír a sušeny při laboratorní teplotě. U suspenzních kultur byly buňky odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a také sušeny při laboratorní teplotě.

## 4.4. Stanovení obsahu flavonoidů

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé.[56]

Základní roztok: 0,400 g práškové drogy (250) se ve 200ml baňce smíchá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy ve 200ml baňce, přidá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky. 250ml baňka i filtr se promyjí *lihem R 60% (V/V)* a promývací tekutina se přidá do odměrné baňky. Spojené roztoky se zředí *lihem R 60% (V/V)* na 100,0 ml a roztok se zfiltruje.

Zkoušený roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R (10 + 100)* a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R (10 + 100)* a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml roztoku, který obsahuje *kyselinu boritou R (25,0 g/l)* a *kyselinu šťavelovou R (20,0 g/l)* v *kyselině mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

Kontrolní roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R (10 + 100)* a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R (10 + 100)* a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,235}{m}$$

m

v němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

## 4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů

Ke stanovení daidzeinu, genistinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A byla zvolena metoda HPLC.[57]

### 4.5.1. Příprava vzorku

Asi 0,8000 g upráškované kultury se ve 100ml baňce smíchá s 15 ml methanolu 80% a extrahuje se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes malý chomáček vaty do 25ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku kultury ve 100ml baňce, přidá se 15 ml methanolu 80% a extrahuje se ještě jednou 20 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky a spojené extrakty se zředí methanolem 80% na 25,0 ml. Roztok se převede přes mikrofiltr do vialek a analyzuje se metodou HPLC.

#### 4.5.2. HPLC analýza

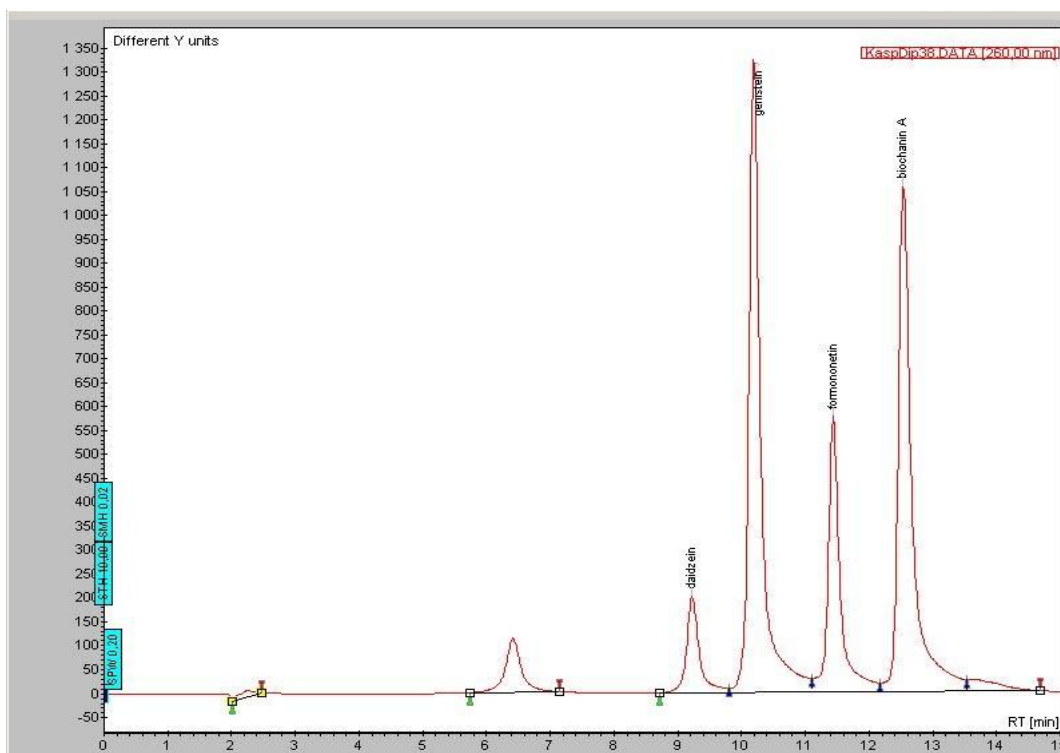
HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolumnovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 $\mu$ m) s ochranou předkolumnou.

Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově. V čase  $t = 0$  bylo složení 30 % methanolu a 70 % vody, v čase  $t = 9$ min 80 % methanolu a 20 % vody. Následovala isokratická eluce stejným složením do času  $t = 15$ min.

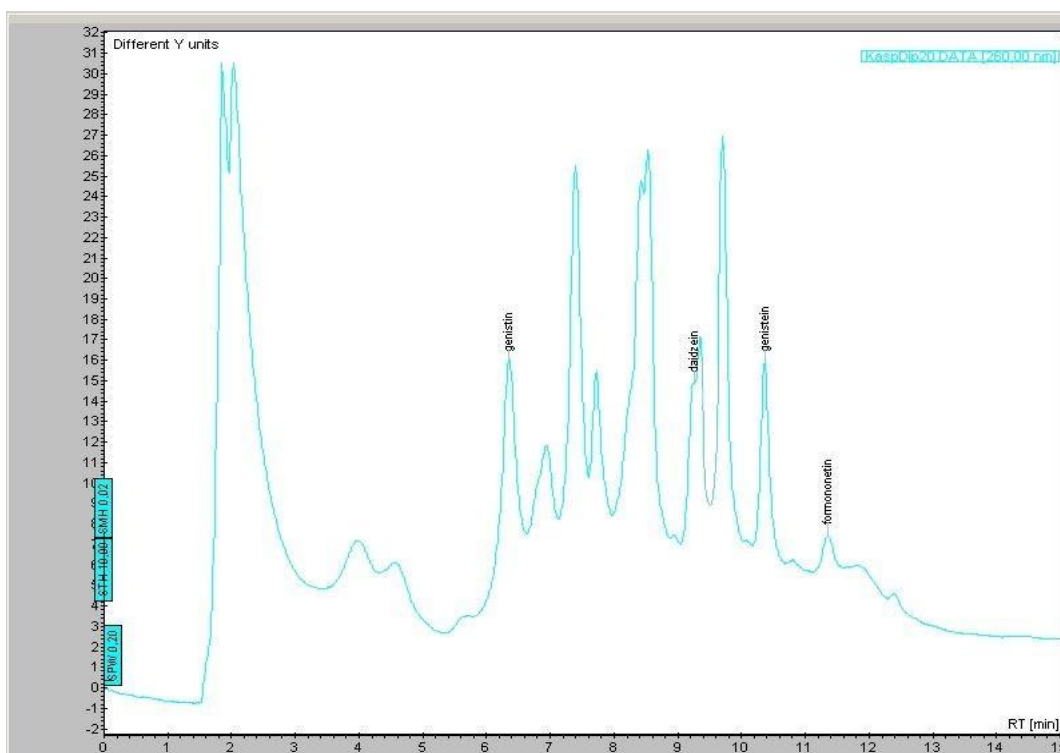
Průtok byl 1,1 ml/min, a mobilní fáze obsahovala jako pufr 0,15 % kyseliny fosforečné.

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 – 650 nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 260 nm. Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

Obr.1. Chromatografický záznam standardů



Obr.2. Chromatografický záznam elicitovaného vzorku



## 4.6. Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování naměřených hodnot obsahu flavonoidů v kulturách *Trifolium pratense* L. bylo provedeno na základě T – testu (test významnosti rozdílu dvou průměrů), pro zvolenou hladinu významnosti  $p = 0,05$ . [58]

### Aritmetický průměr

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

### Směrodatná odchylka

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$n$ .....	rozsah souboru
$x_i$ .....	naměřené hodnoty
$\bar{x}$ .....	aritmetický průměr
$s$ .....	směrodatná odchylka

## T – test

$n_1$ .....	počet členů pokusného souboru
$n_2$ .....	počet členů kontrolního souboru
$\bar{x}_1$ .....	aritmetický průměr pokusného souboru
$\bar{x}_2$ .....	aritmetický průměr kontrolního souboru
$s_1$ .....	směrodatná odchylka pokusného souboru
$s_2$ .....	směrodatná odchylka kontrolního souboru
$t$ .....	testovací kritérium

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \times \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

Testovacímu kritériu přísluší  $t$  rozdělení se stupněm volnosti ( $v$ ) vypočítaného podle vztahu :  $v = n_1 + n_2 - 2$

Kritická hodnota  $t(v)_p$  pro  $p(0,05)$  a  $v(4) = 2,776$

Kritická hodnota  $t(v)_p$  pro  $p(0,05)$  a  $v(3) = 3,182$

Hodnotu testovacího kritéria ( $t$ ) srovnáme s příslušnou kritickou hodnotou  $t(v)_p$  pro vypočítaný stupeň volnosti ( $v$ ) a zvolenou hladinu významnosti ( $p$ ). Je-li hodnota ( $t$ ) větší než hodnota  $t(v)_p$  je rozdíl  $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$  statisticky významný na hladině významnosti.[58]

# 5. VÝSLEDKY

## 5.1. Tabulky

Tabulka 1. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) elicitované kyselinou jasmínovou

Koncentrace elicitoru (μM)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
5000	6	0,079	0,0113	0,068	0,0073	1,156
	24	<b>0,092</b>	0,0029	0,068	0,0073	4,321
	48	0,089	0,0059	0,068	0,0073	2,630
	168	0,023	0,0029	0,094	0,0098	7,714
500	6	<b>0,112</b>	0,0052	0,068	0,0073	6,943
	24	0,070	0,0032	0,068	0,0073	0,283
	48	0,056	0,0054	0,068	0,0073	1,541
	168	0,024	0,0021	0,094	0,0098	7,708
50	6	<b>0,091</b>	0,0049	0,068	0,0073	3,700
	24	0,083	0,0118	0,068	0,0073	1,529
	48	0,057	0,0019	0,068	0,0073	2,062
	168	0,042	0,0085	0,094	0,0098	4,744
5	6	0,044	0,0106	0,068	0,0073	2,637
	24	<b>0,085</b>	0,0038	0,068	0,0073	2,921
	48	0,059	0,0031	0,068	0,0073	1,276
	168	0,024	0,0043	0,094	0,0098	7,366



Tabulka 2. Produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varietá DO-8) elicitované kyselinou jasmínovou

Koncentrace elicitoru (μM)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Elicitace	Kontrola
		Obsah (%)	Obsah (%)
5000	6	<b>0,078</b>	0,057
	24	0,056	0,057
	48	0,057	0,057
	168	0,020	0,034
500	6	<b>0,083</b>	0,057
	24	0,064	0,057
	48	0,039	0,057
	168	0,021	0,034
50	6	<b>0,076</b>	0,057
	24	0,058	0,057
	48	0,039	0,057
	168	0,040	0,034
5	6	<b>0,081</b>	0,057
	24	0,043	0,057
	48	0,020	0,057
	168	0,014	0,034

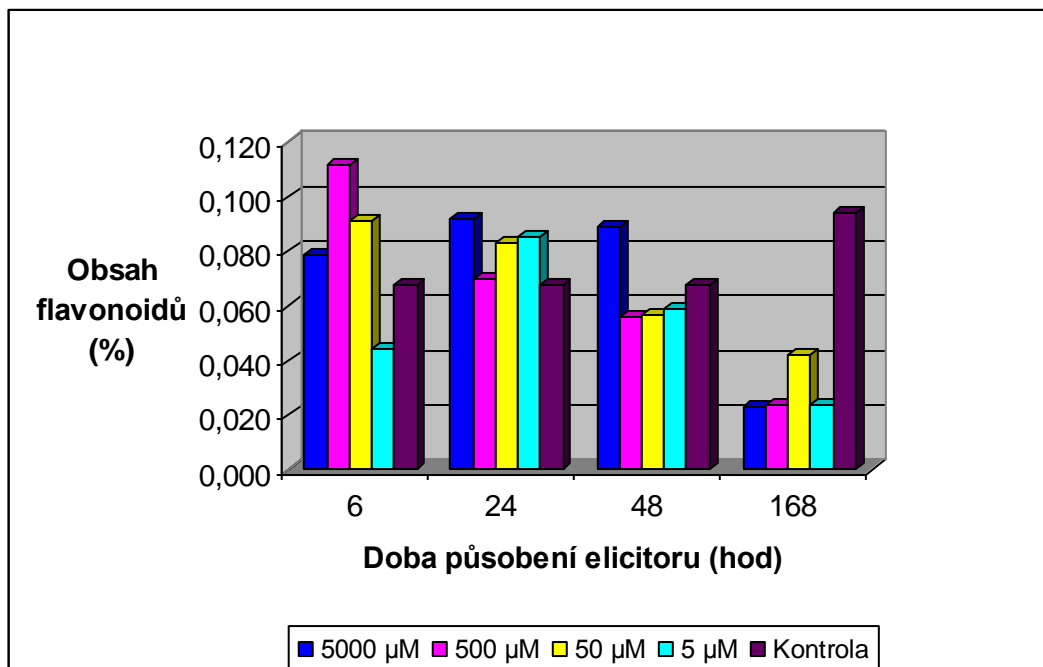
Zvýrazněné hodnoty obsahu flavonoidů jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly,  $p = 0,05$ .

Tabulka 3. Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varietá DO-8) elicitované kyselinou jasmínovou

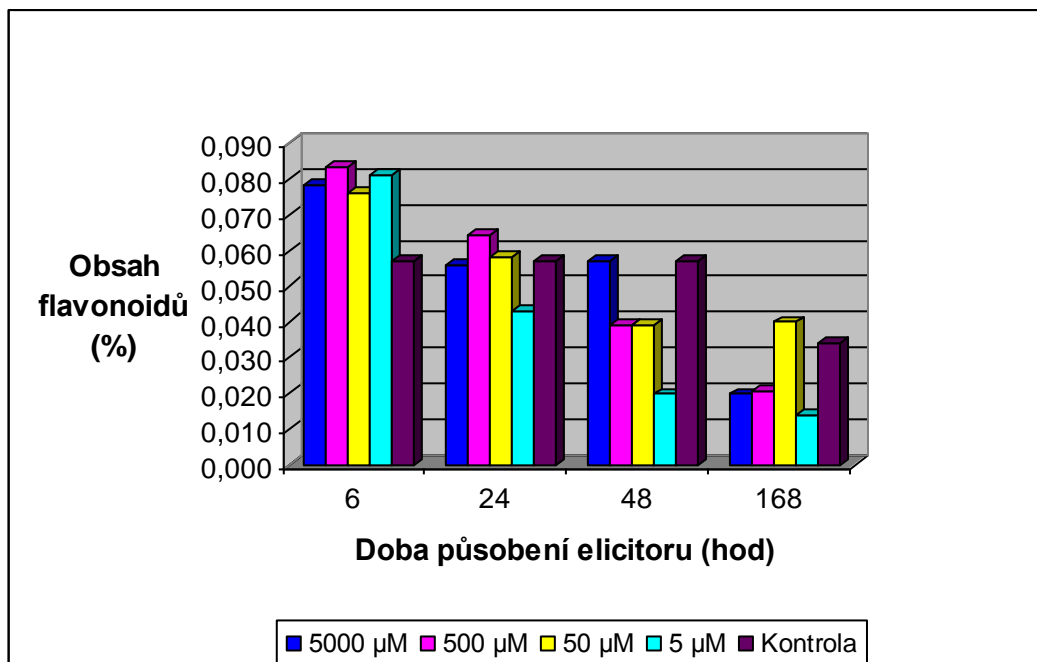
Koncentrace elicitoru (μM)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)			
		genistin	daidzein	genistein	formononetin
kontrola	6	0,11	0,04	0,01	0,03
	24	0,11	0,04	0,01	0,03
	48	0,11	0,04	0,01	0,03
	168	0,05	0,03	0,01	0,02
5000	6	0,09	0,03	0,01	0,04
	24	0,11	0,02	–	0,01
	48	0,15	0,03	0,02	0,03
	168	0,01	0,03	–	0,04
500	6	0,23	0,09	0,01	0,02
	24	0,18	0,06	0,01	0,02
	48	0,06	0,05	0,02	0,04
	168	–	0,01	–	0,04
50	6	0,24	0,07	0,01	0,03
	24	0,10	0,03	0,01	0,02
	48	0,06	0,03	0,01	0,02
	168	–	0,02	0,05	0,01
5	6	0,15	0,04	0,01	–
	24	0,11	0,04	0,01	0,02
	48	0,09	0,04	0,01	0,03
	168	0,01	0,02	–	0,03

## 5.2. Grafy

Graf 1. Suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. elicitovaná kyselinou jasmínovou



Graf 2. Kalusová kultura *Trifolium pratense* L. elicitovaná kyselinou jasmínovou



## 6. DISKUSE

Problematika zvýšení produkce terapeuticky významných sekundárních metabolitů v kulturách in vitro je jednou z intenzivně sledovaných oblastí v oboru farmaceutické biotechnologie. A konkrétně metoda elicitace explantátových kultur je metodou velmi nadějnou.

V současné době je zřejmý stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s širokým spektrem biologických účinků těchto sekundárních metabolitů.[4-9] Velmi nadějným zdrojem těchto přírodních látek je jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*). Je používán v lidovém léčení a jako hospodářská plodina. V poslední době se objevuje množství přípravků s obsahem z jetele lučního, které jsou doporučovány ženám na odstranění či zmírnění příznaků menopauzy. Mnohé studie se proto snaží potvrdit toto příznivé působení na postmenopauzální potíže, jejich výsledky nejsou ale jednotné.[12-14]

U suspenzní a kalusové kultury *Trifolium pratense* L (varieta DO-8) byl sledován vliv biotického elicitoru kyseliny jasmínové na produkci flavonoidů a isoflavonoidů.

K endogenním signálním látkám rostlinných obranných reakcí patří totiž také kyselina jasmínová, její prekurzory a deriváty, což potvrdily experimenty zabývající se genetickým a biochemickým rozbořením signálních cest.[59] Kyselina jasmínová je přirozeným hormonálním regulátorem, který kontroluje stárnutí rostlin a indukuje procesy probíhající po poranění rostliny, v případě exogenní aplikace může působit také jako elicitor.[42]

Úspěšná elicitace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor a pro každou explantátovou kulturu. Jedná se např. o koncentraci a dobu působení elicitoru. Z těchto důvodů byly zkoušeny lihové roztoky kyseliny jasmínové o koncentraci 5000  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ , které byly zvoleny v rozmezí koncentrací obvykle používaných u tohoto typu elicitoru.[45,60,61]

Sledované doby působení elicitoru (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z poznatků již provedených pokusů [54,62,] a z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po přidání elicitoru.[63-66]

Kontrolní kultury byly odebrány po 6 a 168 hodinách, neboť jejich produkce se v takto krátkých časových intervalech významně nemění.

Dalším faktorem, který může ovlivnit úspěšnost elicítace, je fyziologický stav kultury, respektive její růstová fáze. Z předcházejících pokusů vyplývá [23], že pro elicítaci suspenzní i kalusové kultury *Trifolium pratense* L. je optimální 21. den subkultivace, a proto elicítace kultury byla provedena v tomto dni kultivace.

Z výsledků biotické elicítace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (tab. č. 1, graf č. 1) kyselinou jasmínovou je zřejmé, že produkce flavonoidů byla ovlivněna pozitivně. Maximální obsah (0,112 %) byl zjištěn po 6hodinovém působení koncentrace 500  $\mu\text{M}$ , což představovalo statisticky významné zvýšení v porovnání s kontrolní kulturou o 65 %.

Kladně lze hodnotit také nejsilnější koncentraci 5000  $\mu\text{M}$ , která ve všech časových intervalech (s výjimkou 168hodinové aplikace) vyvolala zvýšení produkce oproti kontrole. Z výsledků dále vyplývá, že ze sledovaných časových intervalů je nejvhodnější 6hodinová a také 24hodinová aplikace elicitoru, ovšem s delší dobou aplikace je vliv elicítace již negativní. Nejdélejší 168hodinové působení všech koncentrací elicitoru produkci flavonoidů v porovnání s kontrolou významně snížilo.

V případě biotické elicítaci kalusové kultury *Trifolium pratense* L. (tab. č. 2, graf č. 2) je nutné uvést, že na rozdíl od suspenzní kultury rostla tato kultura velmi pomalu a tak pro experimenty bylo získáno jen malé množství materiálu (omezený počet vzorků na stanovení obsahu flavonoidů)

Z výsledků vyplývá, že nejlepší elicitační účinek prokázala podobně jako u suspenzní kultury koncentrace 500  $\mu\text{M}$ , která po 6hodinové aplikaci vyvolala maximální obsah flavonoidů (0,083 %) v elicítované kultuře a došlo k zvýšení produkce o 46 % oproti kontrole. Také 24hodinová aplikace způsobila zvýšení produkce, ale delší působení elicitoru již vedlo k poklesu produkce vůči kontrole.

Za nejlepší dobu aplikace elicitoru lze opět jako u suspenzní kultury považovat 6 hodin a dále 24 hodin, neboť v těchto časových intervalech všechny koncentrace kyseliny jasmínové (s výjimkou 24hodinového působení koncentrace 5  $\mu\text{M}$ ) zvýšily produkci flavonoidů vzhledem ke kontrole.

Porovnáme-li produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L., je zřejmé, že vyšší obsah sledovaných metabolitů byl zaznamenán v kultuře suspenzní než kalusové. Jedním z důvodů může být to, že u suspenzní kultury je zajištěn větší kontakt buněk s přidávaným elicitem. Dále lze uvést, že vliv elicítace na produkci flavonoidů z hlediska koncentrace a délky aplikace elicitoru se zdá být až na některé výjimky u obou způsobů kultivace explantátových buněk obdobný. Se snižující se koncentrací elicitoru a s délkou aplikace pozitivní vliv elicítace klesá.

V suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicítované kyselinou jasmínovou byla sledována metodou HPLC také produkce isoflavonoidů. V kontrolní kultuře byly zjištěny isoflavonoidy genistin, daidzein, genistein a formononetin (tab. č. 3). Kladně lze hodnotit, podobně jako v případě ovlivnění produkce flavonoidů, zejména 6hodinovou aplikaci koncentrace 500  $\mu\text{M}$ , která zvýšila ve srovnání s kontrolou obsah daidzeinu o 125 % a genistinu o 109 %. Zvýšení produkce těchto dvou isoflavonoidů vyvolala také 6hodinová aplikace koncentrace 50  $\mu\text{M}$ . Delší působení tohoto elicitoru vedlo již k snížení obsahu. Produkci genisteinu o 400 % zvýšila naopak až 168hodinová aplikace této koncentrace elicitoru a formononetinu o 100 % 168hodinová aplikace koncentrace 500 a 5000  $\mu\text{M}$ . U nejnižší koncentrace kyseliny jasmínové pozitivní elicitační účinek prokázán nebyl.

Využití kyseliny jasmínové jako biotického elicitoru lze na základě literárních zdrojů dokumentovat na řadě příkladů [43-54], které jsou uvedeny v teoretické části této práce. Také výsledky našich pokusů naznačují, že sledovaný elicitor ovlivnil produkci flavonoidů a isoflavonoidů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L. pozitivně, a proto by tato kultura mohla být dobrým experimentálním systémem pro další studie těchto významných přírodních látek.

## 7. ZÁVĚR

Výsledky této práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Nejvyšší obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. vyvolala 6hodinová elicitace 500  $\mu\text{M}$  roztokem kyseliny jasmínové, kdy došlo k statisticky významnému zvýšení produkce o 65 % oproti kontrolní kultuře.
- 2) Maximální obsah flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. vyvolala opět 6hodinová elicitace 500  $\mu\text{M}$  roztokem kyseliny jasmínové, kdy došlo k statisticky významnému zvýšení produkce o 46 % v porovnání s kontrolní kulturou.
- 3) Ze čtyř sledovaných koncentrací kyseliny jasmínové produkci sekundárních metabolitů v suspenzní a kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. nejlépe ovlivnila koncentrace 500  $\mu\text{M}$ .
- 4) Za nejlepší dobu aplikace elicitoru kyseliny jasmínové lze považovat u suspenzní i kalusové kultury 6 hodin, neboť v tomto časovém intervalu všechny koncentrace kyseliny jasmínové (s výjimkou působení 5  $\mu\text{M}$  u suspenzní kultury) zvýšily produkci flavonoidů vzhledem ke kontrole.
- 5) Pomocí metody HPLC bylo zjištěno, že explantátová kultura *Trifolium pratense* L. obsahuje isoflavonoidy: genistin, daidzein, genistein a formononetin. Biotická elicitace kyselinou jasmínovou tuto produkci ovlivnila pozitivně.
- 6) Bylo potvrzeno, že kyselina jasmínová patří k významným signálním látkám rostlinných obranných reakcí, které vedou ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů.

## 8. SEZNAM LITERATURY

1. Castaneda, P., Perez, L.: *Phytochemistry* 42, 595 (1996)
2. Mahady, G. B., Liu, C.: *Phytochemistry* 48, 93 (1998)
3. Procházka, S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha 1998, s. 412, 424, 425
4. Luczkiewicz, M., Glód, D.: *Plant Sci.* 165, 1101 (2003)
5. Thiem, B.: *Plant Sci.* 165, 1123 (2003)
6. Lozovaya, V. V. et al.: *Plant Physiol. Biochem.* 42, 671 (2004)
7. Federaci, E. et al.: *Phytochemistry* 64, 717 (2003)
8. Li, W. et al.: *Phytochemistry* 58, 595 (2001)
9. Fedoreyev, K. et al.: *Fitoterapia* 71, 365 (2000)
10. Korbelář, J., Endris, Z.: *Naše rostliny v lékařství*, Avicenum, Praha 1981, s. 178
11. Gran, J., Jung, R., Munker, B.: *Bobulovité užitkové a léčivé rostliny*, Ikar, Praha 1996, s. 102
12. Ren, M. Q. et al.: *Eur. J. Nutr.* 40, 135 (2001)
13. Knight, D. C., et al.: *Climacteric* 2, 79 (1999)
14. Baber, R. J. et al.: *Climacteric* 2, 85 (1999)
15. Slavík, B. et al.: *Květena České republiky*, Academia, Praha 1995, s. 474
16. Pilát, A., Ušák, O.: *Atlas rostlin*, SPN, Praha 1964, s. 37
17. Hron, F., Zejbrlík, O.: *Rostliny polí a zahrad*, SPN, Praha 1974, s. 192
18. <http://rostliny.prirodou.cz>, 17. 11. 2006
19. <http://botanika.borec.cz>, 17. 11. 2006
20. Kresánek, J.: *Atlas léčivých rostlin a lesných plodov*, Osveta, Martin 1982, s. 192-193
21. <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/135877-jetel-lucni>, 17. 11. 2006
22. Wu, Q. et al.: *J. Chromatogr. A* 1016, 195 (2001)
23. Kašparová, M. et al.: *Čes. slov. Farm.*, 55, 44 (2006)
24. Hubík, J. et al.: *Obecná farmakognosie II., Sekundární látky*, SPN, Praha 1989, s. 31-34
25. <http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/texty/flavon.htm>, 17. 11. 2006
26. <http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html>, 17. 11. 2006



27. <http://faf.vfu.cz/html/txts/isoflav/vseobvlst.html>, 17. 11. 2006
28. Bruneton, J.: Pharmacognosy, Lavoisier Publ., Paris 1999, s. 172
29. Kaufman, P. B. et al.: J. Alter. Complem. Med. 3, 7 (1997)
30. Adlelercreutz, H., Mazur, W.: Ann. Med. 29, 95 (1997)
31. Mazur, W., Adlelercreutz, H.: Pure Appl. Chem. 70, 1759 (1998)
32. <http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=583>, 17. 11. 2006
33. <http://menostop.sweb.cz/>, 17. 11. 2006
34. Dušek, J. et al.: Čes. slov. Farm., 45, 204 (1996)
35. Kašparová, M., Dušek, J.: Čes. slov. Farm., 48, 132 (1999)
36. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1992, s. 9, 10, 38, 84-97
37. Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1995, s. 13-21, 50-54, 79-82
38. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie 3, 188 (1989)
39. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie 5, 453 (1989)
40. Gelti, A., Higgins, V. J.: Plant Physiol. 113, 269 (1997)
41. Kneer, R., Zenk, M. H.: Phytochemistry 44, 69 (1997)
42. Gundlach, H. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2389 (1992)
43. Szabo, E., Thelen, A., Petersen, M.: Plant Cell Rep. 18, 485 (1999)
44. Vazquez-Flota, F. A., DeLuca, V.: Phytochemistry 49, 395 (1998)
45. Mantrova, O. V. et al.: Rus. J. Plant Physiol. 46, 248 (1999)
46. Urbanek, H. et al.: Plant Cell Rep. 15, 637 (1996)
47. Al-Gendy, A. A., Lockwood, G. B.: Fitoterapia 76, 288 (2005)
48. Mirjalili, N., Linden, J. C.: Biotechnol. Prog. 12, 110 (1996)
49. Hao-Di, D. et al.: Biochem. Eng. J. 26, 145 (2000)
50. Sánchez-Sampedro, M. A. et al.: J. Biotechnol. 119, 60 (2005)
51. Chong T. M. et al.: Proc. Biochem. 40, 3397 (2005)
52. Satdive, R. K. et al.: J. Biotechnol. 128, 281 (2007)
53. Tůmová, L., Zápalková, L.: Čes. slov. Farm. 51, 96 (2002)
54. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek J.: Čes. slov. Farm., 52, 148 (2003)
55. Gamburg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: Exp. Cell Res. 50, 151 (1968)
56. Kolektiv autorů: Český lékopis 2005, Grada, Praha 2005, s. 162, 1368
57. Martin, J.: Osobní sdělení, UK Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2007

58. Klemera, P., Klemerová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacii*, Karolinum, Praha 1993, s. 30, 80
59. Nürnberger, T., Scheel, D.: *Trends Plant Sci.* 6, 372 (2001)
60. Tebayashi, S. et al.: *Phytochemistry* 54, 387 (2000)
61. Rijhwani, S. K., Shanks, J. V.: *Biotechnol. Prog.* 14, 442 (1998)
62. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.* 53, 252 (2004)
63. Tebayashi, S., Ishihara, A., Iwamura, H.: *J. Exp. Bot* 52, 681 (2001)
64. Tůmová, L., Blažková, R.: *Čes. slov. Farm.* 51, 44 (2002)
65. Tůmová, L., Poustková, J., Tůma, J.: *Acta Pharmaceutica* 51, 159 (2001)
66. Repcak, M., Imrich, J., Franková, M.: *J. Plant Physiol.* 158, 1085 (2001)