

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Explantátová kultura *Trifolium pratense* L.**

Adriana Dudová

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

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

Oponent: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Úvodem své diplomové práce bych ráda poděkovala PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a poskytnutí odborné literatury a ochotu v celém průběhu zpracování diplomové práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

.....  
Adriana Dudová

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	8
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	10
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	11
<b>3.1. <i>Trifolium pratense</i> L. – jetel luční</b> .....	11
3.1.1. Botanický popis.....	11
3.1.2. Výskyt.....	13
3.1.3. Odrůdy.....	13
3.1.4. Sběr a úprava drogy.....	13
3.1.5. Použití.....	14
3.1.6. Obsahové látky.....	14
3.1.6.1. Flavonoidy.....	14
3.1.6.1.1. Obecná charakteristika.....	14
3.1.6.1.2. Chemická struktura.....	15
3.1.6.1.3. Biosyntéza.....	16
3.1.6.1.4. Funkce v rostlinném organismu.....	16
3.1.6.1.5. Terapeutické užití.....	17
3.1.6.2. Isoflavonoidy.....	18
3.1.6.2.1. Obecná charakteristika.....	18
3.1.6.2.2. Chemická struktura.....	19
3.1.6.2.3. Biosyntéza.....	20
3.1.6.2.4. Funkce v rostlinném organismu.....	21
3.1.6.2.5. Terapeutické využití.....	22
<b>3.2. Explantátové kultury</b> .....	23
3.2.1. Obecná charakteristika.....	23
3.2.2. Základní pojmy.....	23
3.2.3. Základní principy.....	25
3.2.4. Kultivace explantátových kultur rostlin <i>in vitro</i> .....	25
3.2.4.1. Odvození explantátové kultury.....	25
3.2.4.2. Buněčné suspenzní kultury.....	26
3.2.4.3. Růst a pasážování suspenzních kultur.....	26

3.2.4.4. Složení kultivačního média.....	27
3.2.4.4.1. Makroelementy.....	28
3.2.4.4.2. Mikroelementy.....	28
3.2.4.4.3. Vitamíny.....	28
3.2.4.4.4. Zdroje uhlíku.....	29
3.2.4.4.5. AMK a další zdroje organického dusíku.....	29
3.2.4.4.6. Nedefinované organické složky.....	29
3.2.4.4.7. Látky používané pro zpevnění média.....	30
3.2.4.4.8. Destilovaná voda.....	30
3.2.4.4.9. Růstové regulátory.....	30
3.2.4.5. Fyzikální podmínky kultivace.....	31
3.2.4.5.1. Osvětlení.....	32
3.2.4.5.2. Teplota.....	32
3.2.4.5.3. Vlhkost vzduchu.....	32
3.2.4.5.4. pH prostředí kultivačního média.....	32
3.2.4.6. Sterilizace.....	32
3.2.5. Využití explantátových kultur.....	33
3.2.5.1. Produkce sekundárních metabolitů.....	34
3.2.5.2. Rozmnožování a šlechtění rostlin.....	35
<b>3.3. Elicitace.....</b>	<b>36</b>
3.3.1. Princip elicítace.....	36
3.3.2. Elicitory.....	36
3.3.2.1. Klasifikace elicitorů.....	36
3.3.2.1.1. Abiotické elicitory.....	36
3.3.2.1.2. Biotické elicitory.....	37
3.3.2.2. Mechanismus účinků elicitorů.....	37
3.3.3. Faktory ovlivňující elicítaci.....	38
<b>3.4. Těžké kovy.....</b>	<b>39</b>
3.4.1. Minerální výživa.....	40
3.4.2. Chrom.....	40
3.4.3. Hliník.....	42
<b>3.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....</b>	<b>43</b>

3.5.1. Princip separace látek.....	43
3.5.2. Kapalinový chromatogram.....	44
3.5.3. Systémy fází pro HPLC.....	45
3.5.3.1. Mobilní fáze.....	45
3.5.3.2. Stacionární fáze.....	45
3.5.4. Využití HPLC.....	46
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1. Použitý materiál, chemikálie, přístroje, pomůcky</b> .....	<b>47</b>
4.1.1. Rostlinný materiál.....	47
4.1.2. Stanovení ztráty sušením.....	47
4.1.3. Chemikálie.....	47
4.1.4. Přístroje a pomůcky.....	48
<b>4.2. Suspenzní kultura <i>Trifolium pratense</i> L. (varieta DO-9)</b> .....	<b>49</b>
4.2.1. Příprava kultivačního média.....	49
4.2.2. Kultivační nádoby a nástroje.....	50
4.2.3. Pasážování a kultivace.....	50
<b>4.3. Elicitace</b> .....	<b>51</b>
4.3.1. Příprava roztoků elicitoru.....	51
4.3.2. Elicitace a odběr kultur.....	51
<b>4.4. Stanovení obsahu flavonoidů</b> .....	<b>52</b>
4.4.1. Princip stanovení.....	52
4.4.2. Postup stanovení.....	52
<b>4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů</b> .....	<b>53</b>
4.5.1. Princip stanovení.....	53
4.5.2. Postup stanovení.....	54
<b>4.6. Statistické vyhodnocení</b> .....	<b>56</b>
4.6.1. Aritmetický průměr.....	56
4.6.2. směrodatná odchylka.....	56
4.6.3. T-test.....	57
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>58</b>
<b>5.1. Tabulky</b> .....	<b>58</b>
<b>5.2. Grafy</b> .....	<b>61</b>

<b>6. DISKUSE</b> .....	64
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	68
<b>8. SEZNAM LITERATURY</b> .....	69
<b>9. ABSTRAKT, ABSTRACT</b> .....	73

# 1. Úvod

Léčivé rostliny jsou již po staletí nenahraditelnou surovinou při léčbě pro lékaře a lékárníky. Připravovaly se z nich masti, kapky, čaje. Postupem času se z rostlin začaly izolovat chemicky čisté látky (sekundární metabolity). Ty se užívají přímo nebo se dále upravují pro přípravu látek nových, které mají ještě lepší terapeutické vlastnosti. (13)

V dnešní době je člověk schopen velkou část přírodních léčivých látek připravit synteticky, ne vždy je to však vhodné z technologických a ekonomických důvodů. V takovém případě je lepší jako zdroj terapeuticky účinných látek použít léčivé rostliny. (41)

Sběr intaktních rostlin však má několik nevýhod. Sběr je ztížen tím, že většina těchto rostlin přichází o své životní prostředí, dochází k jejich úbytku a následně se zvýší i jejich ceny. Pěstování polních monokultur má nevýhodu v tom, že mohou být rostliny napadeny škůdci, různými chorobami. V takovém případě je nutné použít pesticidy, které mohou ovlivnit biosyntézu sekundárních metabolitů. Další stěžejní situací je sezónní pěstování rostlin a nesmí se opomenout obsah účinných látek, který je závislý na klimatických podmínkách (teplota, sluneční svit, srážky), půdních podmínkách, na podmínkách sušení a skladování drog. (11, 41) Tyto problémy vedly k hledání alternativních zdrojů získávání rostlinných metabolitů.

Řešením je využití biotechnologických metod založených na aseptické kultivaci izolovaných částí rostlin *in vitro* - explantátových kultur. Tyto kultivace k získávání sekundárních metabolitů mají několik výhod oproti pěstování intaktních rostlin: syntéza metabolitů probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatu a půdních podmínkách, mohou se vyloučit biologické vlivy (mikroorganismy, hmyz), lze vyselektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů, čímž se může zvýšit produkce a následně snížit výrobní cena. Stimulovat produkci účinných látek (sekundárních metabolitů) lze působením určitého stresu – např. vynechání růstových regulátorů, snížení koncentrace živin v živném roztoku, aplikace prekurzorů či tzv. elicitorů do média (metoda elicitace). (10, 11, 41, 43)

V současné době stoupá zájem o produkci flavonoidů, isoflavonoidů rostlinnými explantáty a to díky jejich známým terapeutickým účinkům (protizánětlivý, antialergický, antitrombotický, vasoprotektivní a estrogenní aktivita). Vhodným zdrojem těchto



sekundárních metabolitů se jeví jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*). Nejčastěji se používá v lidovém léčitelství ve formě nálevu proti průjmům, při bronchitidě, revmatismu, na oteklé lymfatické žlázy a při cukrovce, zevně pak ve formě koupelí jako kožní desinfekce. (42).

Také tato diplomová práce je věnována problematice explantátových kultur. Zabývá se možnostmi zvýšení produkce flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. pomocí abiotické elicitace chloridem hlinitým a chloridem chromitým.

## 2. Cíl práce

1. Seznámit se s metodikou kultivace a elicitace rostlinných explantátových kultur *in vitro*.
2. Pozorovat v uvedených časových intervalech působení různých koncentrací chloridu hlinitého a chloridu chromitého jako potenciálních abiotických elicitorů produkce sekundárních metabolitů v explantátové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9).

## 3. Teoretická část

### 3.1. *Trifolium pratense* L. – jetel luční, *Fabaceae* – bobovité

#### 3.1.1. Botanický popis rostliny

*Trifolium pratense* L. je ve své anatomické stavbě velmi proměnlivý druh. Odlišnosti nalezneme ve vzrůstu rostlin, odění lodyh a dále u palistů podpůrných listů.

Tato bylina se vyskytuje i jako 2-3letá (některé kulturní formy). Celá rostlina dosahuje výšky 20-50 cm. Kořen je mnohohlavý kulovitý, vytváří rozsáhlý kořenový systém sahající do hloubky 0,5 m. Pupy se na kořenovém krčku zakládají v horizontální poloze. Lodyhy vyrůstají z přízemní listové růžice, silné, přímé nebo mající 3-5 článků, vystoupavé až poléhavé, jednoduché nebo spoře rozvětvené, většinou trochu hranaté. Listy jsou trojčetné střídavé, v přízemní růžici dlouze řapíkaté. Jednotlivé lístky mají tvar obvejčitý až široce okrouhlý, s výraznou bělavou skvrnou ve tvaru půlměsíce. Maximální velikost je 15x30 mm. Lodyžní lístky jsou krátce řapíkaté, horní až přisedlé. Čepele lístků jsou na okraji brvité (53, 54, 55, 58)

Obr. 1-3: *Trifolium pratense* L. (*Fabaceae*) (51)



Květenstvím jsou úžlabní hlávky. Jejich průměrná velikost je 2-3 cm. Skládají se z 30-60 květů, které zdánlivě vyrůstají na vrcholu lodyhy. Jsou drobné, na krátké stopce nebo přisedlé, barvy karmínové až masově červené (zřídka bílé). Pětčetné 14-18 mm dlouhé oboupohlavné kvítky jsou bez listenů. Na chlupatém kalichu je možné rozeznat 10 žilek. Koruny jsou na bázi srostlé. Plodem je nepukavý jednosemenný lusk s lehce odděleným váčkem. Semena mají tvar vejčitý až tupě trojhranný, o velikosti 1,5-2,3 mm x 1,2- 2,0 mm. Jsou hladká, lesklá, citrónově žlutá až fialová. Často je spodní část žlutá a horní fialová. (55, 56, 57)

Obr. 4-6: *Trifolium pratense* L. (Fabaceae) (50, 51)



### 3.1.2. Výskyt

Jetel luční roste na loukách, pastvinách, okrajích cest a lesních lemů, pěstuje se na polích. Vyskytuje se od nížin až po nadmořské výšky 2500 m. Je rozšířen téměř po celé Evropě, v západní Asii a severní Indii, zdomácnělý a pěstovaný je také ve východní Asii, v Severní a Jižní Americe, v Austrálii, na Novém Zélandu a v jižní Africe. Nejlépe snáší mírně vlhké prostředí. (50, 53, 54, 59)

### 3.1.3. Odrůdy

*Trifolium pratense* L. se v České republice vyskytuje ve třech poddruzích (někdy označovaných jako odrůdy):

- ✚ ***Trifolium pratense* subsp. *sativum*** – jetel luční setý – obvykle jen 2-3letá bylina, hospodářsky významná pícnina, rostoucí pouze v nižších polohách. Má řídce přitisklé chlupaté až lysé duté lodyhy dorůstající výšky 40-100 cm. Lístky jsou 4-7 cm dlouhé, často mají příčnou skvrnu. Květenství o průměru 3-4 cm jsou po dvou.
- ✚ ***Trifolium pratense* subsp. *pratense*** – jetel luční pravý – vytrvalá bylina používaná jako léčivka. Má hustě přitisklé chlupaté plné lodyhy dorůstající výšky 10 - 40 cm. Lístky dosahují délky 1 - 3 cm. Květenství jsou přisedlá, obvykle jednotlivá o průměru 2 - 3,5 cm.
- ✚ ***Trifolium pratense* subsp. *americanum*** – jetel luční americký- vytrvalá bylina, která k nám byla dovezena v 80. letech 19. století ze Severní Ameriky, nyní se však u nás nepěstuje. Vyznačuje se rezavě chlupatými lodyhami. Lístky má pouze 2 – 4 cm dlouhé, u horních listů kopinaté, špičaté. Květenství jsou přisedlá o průměru 2 - 4 cm.  
(54)

### 3.1.4. Sběr a úpravy drogy

Jetel luční kvete od května do října. Sběr se provádí hned v počátku května. Sbírají se nerozpadlé červené květní hlávky, z nichž se při sběru odstraňují palisty podpůrných listů. Překvetlé hlávky se nesbírají, při sušení by hnědly a takové jsou bezcenné.

Suší se v jednoduché vrstvě, buď jeden den vystavené přímému slunci a pak se dosuší ve stínu a v průvanu nebo se mohou sušit uměle, teplota ale nesmí překročit 35°C.

Nepřehrabáváme, hlávky se snadno rozpadají a stává se tak z nich bezcenná drť. Správně usušenou drogu lze poznat podle toho, že zachovala původní barvu nebo jen trochu ztmavla, ale nesmí být rezavá. Hlávky musí být v celku a nesmí být uvnitř suché.

Při skladování chráníme drogu před světlem a vlhkem. (53)

### **3.1.5. Použití**

Jetel luční se v lidovém léčitelství používá nejčastěji jako ve formě nálevu jako antidiarhoikum, diuretikum, expektorans a při bronchitidě, při cukrovce, zevně k obkladům při oteklých lymfatických žlázách při příušnicích, také ke koupelím při revmatismu a jako kožní desinficiens na ekzémy a hnisavé rány.

Díky účinkům svých obsahových látek (flavonoidů a isoflavonoidů) se používá i do potravních doplňků při menopauze, hepatoprotektivních potravních doplňků a potravních doplňků na snížení krevního tlaku. Účinky jsou prý také protirakovinné, antivirotické, detoxikační. (53, 60, 61)

### **3.1.6. Obsahové látky**

Spektrum obsahových látek *Trifolium pratense* L. je rozsáhlé. Zahrnuje flavonoidy, isoflavonoidy, fenolické glykosidy, saponiny, kyanogenní glykosidy, kumariny, třísloviny, minerální kyseliny, organické kyseliny, silice, barviva, salicyláty,  $\beta$ -sitosterol, lecitin, cholin, vitamíny (vitamín A, C, B - komplex), hořčík, vápník, železo.

Z hlediska využití *Trifolium pratense* L. v terapii se jeví jako nejzajímavější skupina isoflavonoidů zahrnující biochanin A a formononetin, které se vyskytují v největší míře. Dále jsou zde zastoupeny daidzein, genistein, genistin, koumestrol, ononin, trifoliol. (62)

#### **3.1.6.1. Flavonoidy**

##### **3.1.6.1.1. Obecná charakteristika**

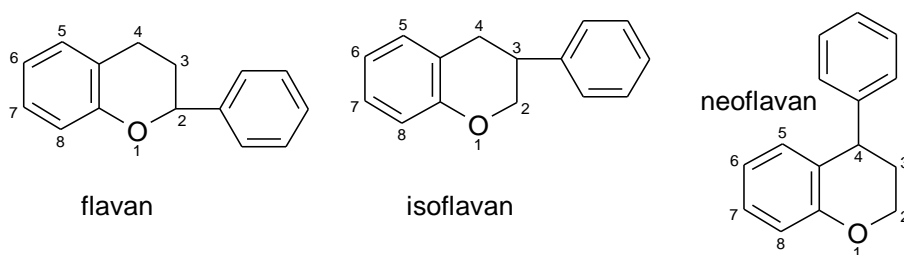
Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. Dnes jich známe asi 4000 a stále jsou objevovány další nové sloučeniny. Jedná se o ve vodě rozpustná barviva, zodpovědná za barvu květů, plodů a někdy i listů. Uložení flavonoidů

v rostlinném organismu je druhově závislé. Všeobecně však platí, že ve vodě rozpustné glykosidy jsou nejčastěji uloženy ve vakuolách. Mohou být ukládány pouze do buněk epidermis listu nebo současně do epidermis mezofylu listu. V obou typech tkání se mohou kumulovat odlišné typy flavonoidů. Aglykony nejčastěji nacházíme v kutikule listu, protože jsou lipofilnější (hydroxylové skupiny ve struktuře sloučeniny jsou částečně nebo úplně methylované), proto lépe rozpustné ve voskové vrstvě na povrchu listu. V květech jsou flavonoidy uloženy v epidermálních buňkách. Vyskytují se také v oplodí plodů a semenech, dokonce i v pylových zrnech. Ve vnější vrstvě buněk stěny pylového zrna byly flavonolové glykosidy dokázány v roce 1970 Wiermannem. (62, 63)

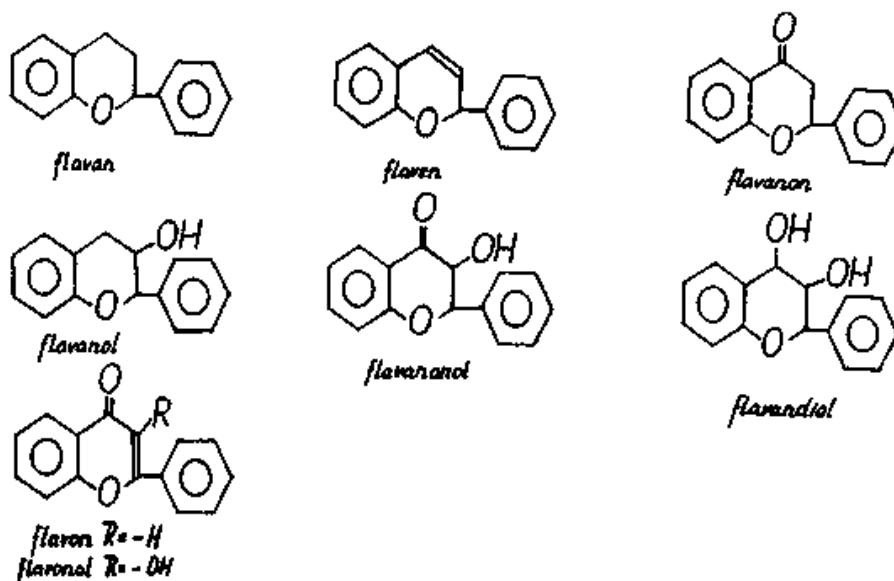
### 3.1.6.1.2. Chemická struktura

Flavonoidy jsou deriváty kyslíkaté heterocyklické sloučeniny fenylchromanu. Základem struktury je chroman a podle polohy, ve které je arylovaný se rozlišují: flavany (aryl v poloze 2), isoflavany (aryl v poloze 3) a neoflavany (aryl v poloze 4). (62, 64, 65)

Obr. 7-9: Základní struktury flavonoidů (64)



Obr. 10: Flavany se dále dělí do několika skupin podle oxidace pyranového kruhu (64)



### 3.1.6.1.3. Biosyntéza

Aglykony flavonoidů vznikají oběma hlavními cestami vedoucími k syntéze aromatických látek v biologických systémech. Jeden 6uhlíkový fragment se odvozuje z acetátového metabolismu a zbývající 9uhlíková část z kyseliny šikimové. Meziproduktem je 15uhlíkový chalkon (vznikající z kyseliny skořicové spojením se třemi molekulami acetátu), ze kterého vzniká flavanon. Flavanony mají vztah k dalším skupinám flavonoidů, a to k flavonům, chudším o dva atomy vodíku.

Deriváty se tvoří zavedením nebo odstraněním hydroxylových skupin. Flavanonoly vznikají zavedením hydroxylové skupiny do polohy 3, hydrogenace poloh 2 a 3 vede ke vzniku flavanolů. (64)

### 3.1.6.1.4. Funkce v rostlinném organismu

Flavonoidy jsou buď barevné, nebo nejsou barevné a plní pouze funkci kopigmentů (přispívají k zbarvení). (65) V některých případech flavonoidy absorbují záření blízké UV a vzniklá barva je vnímána pouze hmyzem. Dále jsou přítomny také v kutikule listů a epidermálních buňkách, kde chrání pletiva před ničivým účinkem UV záření.



Další hlavní funkce můžeme rozdělit do následujících kategorií:

- ✚ **Barviva** – je známo, že různá barva nebo vůně přitahují jiný typ opylovačů. Dalo by se říci, že vztah mezi barvou a opylovačem je alespoň částečně závislý na obsahu flavonoidů. Z pozorování vyplynulo, že hmyz je citlivý na barvu flavonů a flavonolových glykosidů absorbujících blízko 350 nm a na žluté flavonoidy jako chalkony, aurony, 3-deoxyanthokyaniny nebo flavonoly s hydroxylovou nebo methoxylovou skupinou v poloze 6, 8. Na základě barevného vidění hmyzu se zajistilo, že motýli si libují v růžové nebo bílé barvě, včely preferují žlutou a pro ptáky je atraktivní červená.
- ✚ **Antioxidanty** – Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosilace. Optimální radikálově likvidační vlastnosti byly nalezeny pro o-dihydroxy strukturu v kruhu B, 2,3 dvojnou vazbu a 4-oxofunkční skupinu v kruhu C a 3, 5 hydroxy skupiny na kruzích A a C. Tuto strukturu mají právě flavonoly. Flavonoidy chrání rostlinu před nadměrným UV zářením, při kterém se uvoňuje velké množství reaktivních forem kyslíku. Zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (měď, železo). Vzhledem k převážné lokalizaci flavonoidů ve vakuole je nepravděpodobné, že by přímo zasahovaly proti vysoce reaktivním formám kyslíku, který je stabilní a je schopen difundovat přes membránu.
- ✚ **Fytoalexiny** - jsou nízkomolekulární látky s antimikrobiální aktivitou, které jsou syntetizovány po napadení mikroorganismy.
- ✚ **Inhibitory enzymů** – studie dokázaly, že flavonoidy inhibují např. malátdehydrogenázu nebo glutamátdekarboxylázu. (63)

#### 3.1.6.1.5. Terapeutické využití

Biologicky účinné jsou glykosidy a aglykony. Mohou se používat v čistém stavu, ale častěji ve formě drog nebo extraktů. V živých organismech se zapojují do oxidačně-redukčních procesů, mají schopnost normalizovat permeabilitu kapilár a odstraňovat jejich lomivost. Pravděpodobně díky svému působení na metabolismus arachidonové kyseliny

vykazují protizánětlivou a antialergickou aktivitu, dále vasoprotektivní a antitrombotické účinky. (62, 63)

Flavonoidy dále vykazují tyto účinky:

- ✚ Estrogenní aktivita
- ✚ Antihepatotoxická aktivita
- ✚ Antifertilitní aktivita
- ✚ Antimikrobiální a antivirální systém
- ✚ Spasmolytická aktivita
- ✚ Antiflogistická aktivita
- ✚ Diuretická aktivita
- ✚ Efekt na vaskulární systém
- ✚ Antimutagenní aktivita

Přírodní flavonoidy mohou významným způsobem působit při prevenci chorob, které mají svůj původ v oxidačním poškození biologických struktur (kardiovaskulární onemocnění, ateroskleróza). Vhodným způsobem stravování a příjem potravin s vyšším obsahem flavonoidů by mohl pomoci při léčbě a předcházení těchto chorob. Zvýšení příjmu antioxidantů touto cestou je zřejmě vhodnější než podávání samotných antioxidačních preparátů jako vitamín C a E. (62, 63)

### **3.1.6.2. Isoflavonoidy**

#### **3.1.6.2.1. Obecná charakteristika**

Isoflavonoidy patří mezi sekundární metabolity rostlin. Spolu s lignany, kumestany a stilbeny tvoří skupinu významných fytoestrogenů. Fytoestrogeny jsou látky rostlinného původu schopné se vázat na estrogenní receptory a tak interferovat s funkcí endogenních estrogenů (spolu s estrogeny nebo při estrogenním deficitu působí jako slabší agonisté, při vysokých dávkách mohou působit i jako antagonisté) v organismu živočichů konzumujících rostlinnou stravu. (14, 66, 67)

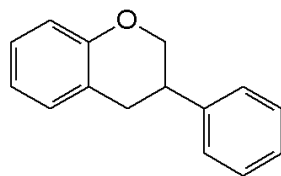
Isoflavonoidy se ve větším množství vyskytují především v rostlinách čeledi *Fabaceae*. V rostlinách se nacházejí ve formě volné jako aglykony nebo vázané na cukry jako glykosidy. (69)

Nejvýznamnějším zdrojem isoflavonoidů je sója a sojové produkty. V našich podmínkách je nejvyšší výskyt v červeném jeteli a vojtěšce. Dalšími zdroji jsou červená vinná réva, jahody, rýže, česnek, lékořice, rybíz, datle. (68)

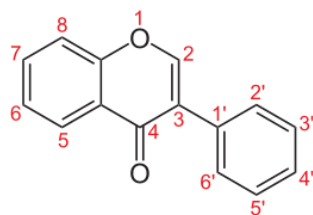
### 3.1.6.2.2. Chemická struktura

Základ chemické struktury isoflavonoidů tvoří fenylchroman, který má v poloze C-3 chromanového cyklu připojen aromatický substituent. (70) Fenolové jádro v molekule umožňuje vazbu na estrogení receptor. (67)

Obr. 11: **3-fenylchroman (isoflavan)** (70)

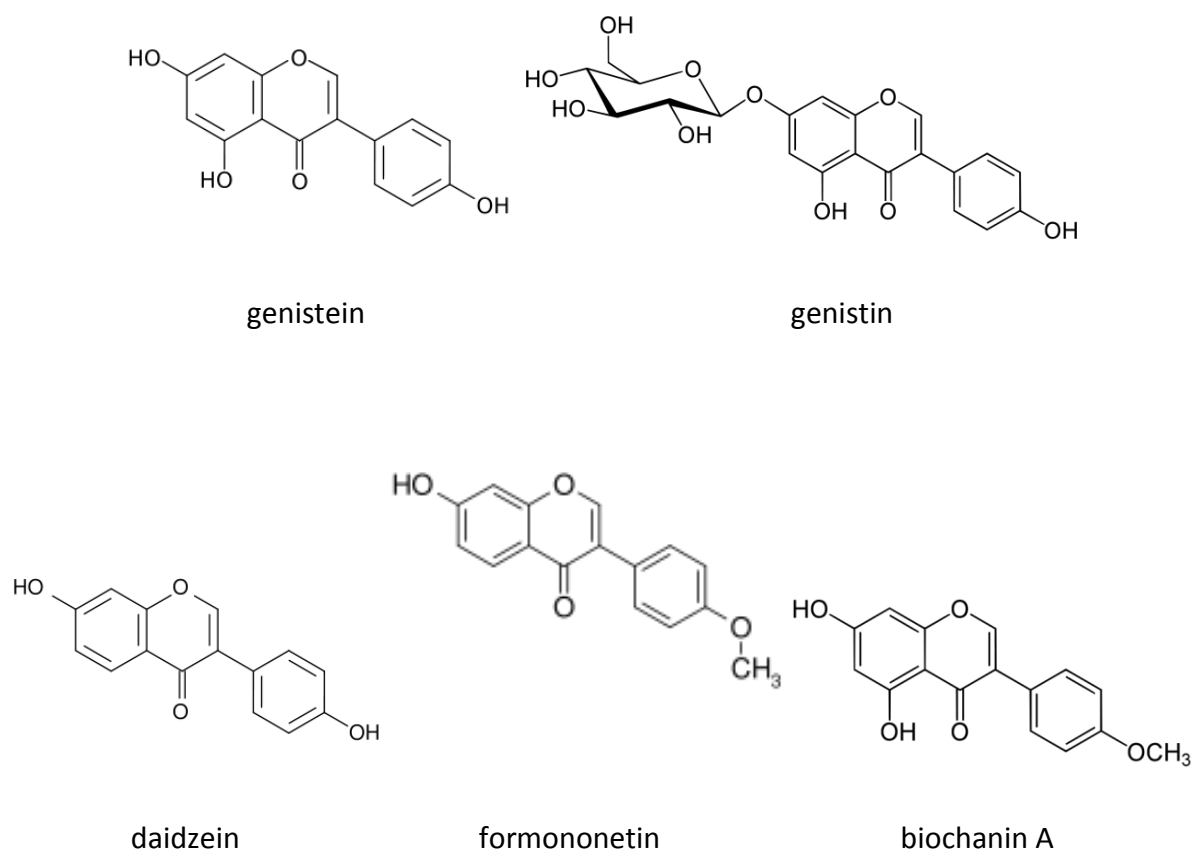


Významnou skupinou isoflavonoidů jsou isoflavony. Základní strukturu tvoří isoflavan. (70)



Obr. 12: **isoflavan** (70)

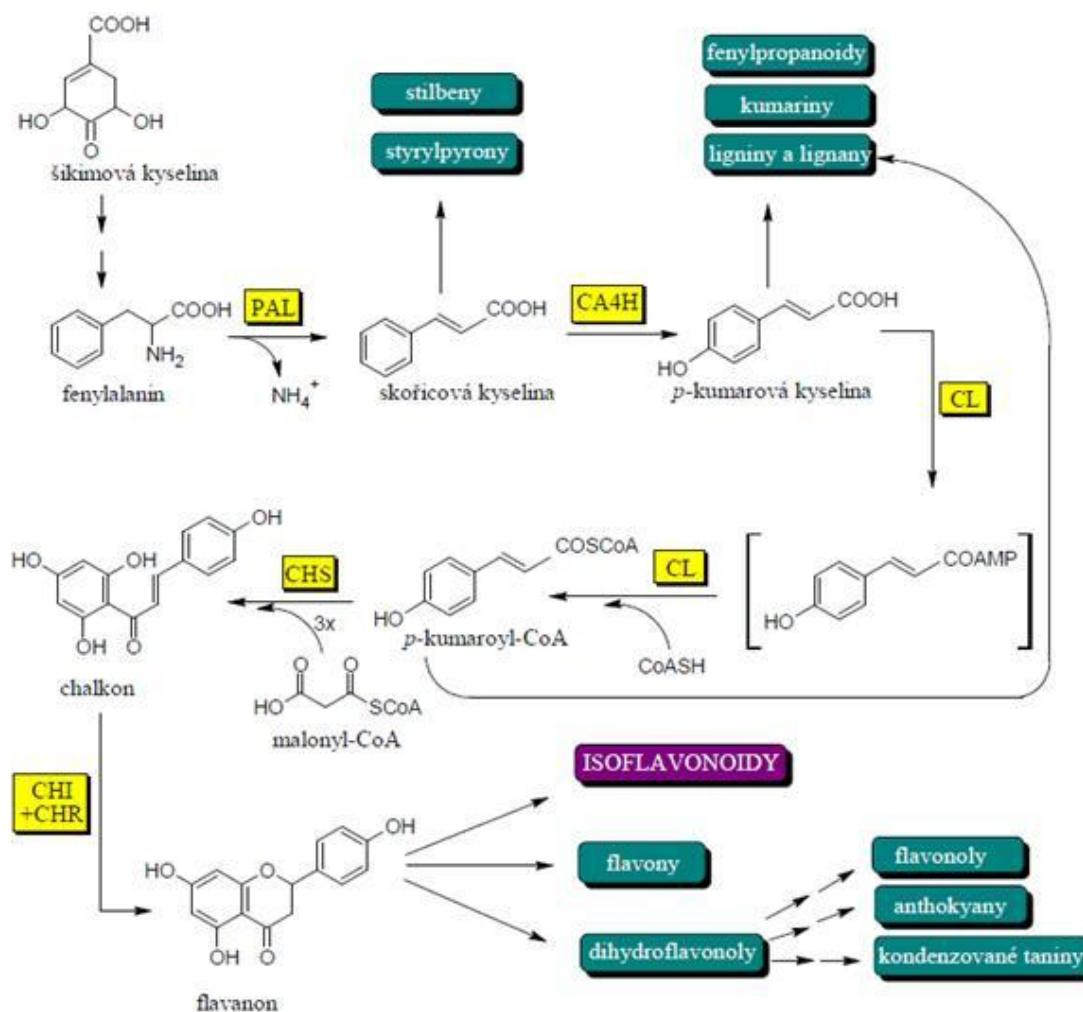
Obr. 13-17: Isoflavon může být dále substituován (65)



### 3.1.6.2.3. Biosyntéza

Isoflavonoidy vznikají v rostlinách stejně jako flavonoidy, kondenzací polyacetátu a aromatických aminokyselin, které jsou syntetizovány biosyntetickou cestou kyseliny šikimové. Ze vzniklých flavanonových meziproduktů jsou syntetizovány migrací arylu katalyzovanou enzymem 2-hydroxyisoflavanonsyntázou. (71)

Obr. 18: Schematické znázornění hlavních větví fenylypropanoidové dráhy.(33)



Schematické znázornění hlavních větví fenylypropanoidové dráhy. Enzymy a jejich kofaktory: PAL, fenylyalaninamoniaklyasa; CA4H, 4-hydroxylasa kyseliny skořicové ( $O_2$ , cytochrom P 450, NADPH); CL, kumaroyl-CoA ligasa (CoASH, ATP); CHS, chalkonsynthasa; CHI, chalkonisomerasa; CHR, chalkonreduktasa. (Nakresleno v programu ACD/ChemSketch podle Buchanan *et al.*, 2002, Winkel-Shirley, 2001)

### 3.1.6.2.4. Funkce v rostlinném organismu

Isoflavonoidy se uplatňují jako mediátory interakcí mezi rostlinou a jejím okolím (patogeny a symbionty), plní funkci obrannou a ochrannou. Mají antioxidační vlastnosti, antiparazitární, antivirové, antibakteriální a fungistické. (67, 72)

### 3.1.6.2.5. Terapeutické využití

Isoflavonoidy jsou látky nesteroidní povahy s estrogením účinkem. Jejich význam roste především se stoupajícím využitím v léčbě klimakterických obtíží (zejména návalů pocení, nespavosti, únavy, změnám nálady, ztráty libida) jakožto alternativy hormonální substituční terapie u žen, které nemohou nebo nechtějí užívat estrogeny. Nejnovější publikace dokládají ochranný účinek pravidelného užívání isoflavonů na karcinom ovaria. (66, 67, 68, 73)

V posledních letech probíhá výzkum inhibičního působení některých isoflavonoidů (např. genistein, biochanin A) na nádorové buňky a již byl prokázán jejich účinek na rakovinu prostaty. Toto protinádorové působení spočívá v inhibici aktivity specifických tyrozinkináz, enzymů potřebných pro zprostředkování účinku růstových faktorů. Tyto růstové faktory produkované nádory podporují novotvorbu cév nutných k výživě rostoucího nádoru. Isoflavonoidy neovaskularizaci inhibují. (67, 72)

Fytoestrogeny zlepšují kognitivní funkce, mají vliv na aktivaci sensorických funkcí jako je hmat, čich, sluch, motorická aktivita. Při dlouhodobém užívání se předpokládá prevence vzniku Alzheimerovy choroby. (67)

Isoflavonoidy dále vykazují tyto účinky:

- ✚ Antioxidační aktivita
- ✚ Antiosteoporotická aktivita
- ✚ Antiatherogenní aktivita
- ✚ Hypocholesteromická aktivita
- ✚ Antivirová, antibakteriální, antifungální aktivita
- ✚ Imunosupresivní aktivita
- ✚ Inhibující angiogeneze

V dnešní době je věnováno mnoho pozornosti fytoestrogenům, neboť by mohly být alternativou v léčbě klimakterického syndromu. Dále by mohly pomáhat při léčbě kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy, nepravidelného krvácení a dokonce i proti zhoubným nádorům. (68, 73, 74)

## 3.2. Explantátové kultury rostlin

Člověk využívá řadu látek obsažených v rostlinách jako farmaka. Požadavky na tyto látky rychle stoupají, proto je nutné hledat alternativní zdroje těchto látek. Jednou z možností je využití explantátových kultur rostlin.(10)

### 3.2.1. Obecná charakteristika

Explantátové kultury rostlin (kultury rostlinných explantátů) znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek. (11)

Výhodou explantátových kultur je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk, a z každé lze vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. Další výhodou je možnost konzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin.(10,12)

Explantátové kultury rostlin se využívají jak při šlechtění rostlin, tak k produkci sekundárních metabolitů. (10)

### 3.2.2. Základní pojmy

Kultivace *in vitro* – pěstování rostlinného materiálu v laboratorních podmínkách na umělých půdách k tomu určených. Podmínky musí být co nejúplněji definovatelné po stránce chemické i fyzikální a musí zabraňovat nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organismy a buňkami.(13)

Rostlinný explantát – je 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*.

Podle původu, morfologické a po případě i anatomické charakteristiky lze kultury rostlinných explantátů rozlišit do pěti kategorií:

1. Kultury orgánové – orgánové systémy, orgány, resp. jejich základy nebo části, napěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a v celku zachovává jejich funkci a stavbu.

2. Kultury tkáňové, resp. pletivové – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy pletiva, pomnožované buď na polotuhých nebo pevných nosičích, nasycených živnou půdou nebo výjimečně v tekuté živné půdě.

3. Kultury suspenzní – volné buňky a buněčné shluky pomnožované v promíchávané a provzdušňované živné půdě.

4. Kultury buněčné, resp. kultury volných buněk – volné jednotlivé a identifikovatelné buňky, respektive jejich nejbližší potomstvo – pomnožované v tekuté nebo polotekuté živné půdě nebo i na nosiči nasyceném živnou půdou.(2)

5. Kultury protoplastů – buňky, které nemají buněčnou stěnu a jejich povrch tvoří pouze cytoplazmatická membrána.(11)

Intaktní rostlina – původní rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách.

Primární explantát – rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny.

Primární kultura – kultura primárních explantátů.

Kalus – v původním slova smyslu neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny. V přeneseném slova smyslu se jedná o pletivo proliferující na povrchu nenádorových primárních explantátů, které je schopné subkultivace.(13)

Kalusová kultura – soubor neorganizovaně rostoucích buněk, které se při izolaci při pravidelném pastování v určitých intervalech mohou kultivovat neomezeně dlouho.(3)

Subkultivace, pasážování – přenos celé kultury nebo její části do čerstvě živné půdy s cílem zachovat, obnovit nebo zesílit růst pro další subkultivační interval.

Subkultivační interval – období mezi dvěma po sobě následujícími subkultivacemi kultury.

Totipotence – schopnost rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* obnovit v průběhu diferenačních procesů specializované funkce a postupně regenerovat ve fertillní rostlinu.(13)



### **3.2.3. Základní principy**

Základem rostlinného organismu, vznikajícího pohlavním rozmnožováním, je jedna buňka – zygota, která vznikne oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou. Zygota obsahuje v jádře kompletní genetickou informaci a v cytoplazmě mechanismy umožňující realizaci této informace. Zygota je totipotentní a mitoticky se dělí. Procesem mitotického dělení vznikají dceřinné buňky, které se dále vyvíjejí a dochází k jejich diferenciaci. Stávají se stavebními jednotkami specializovaných pletiv.

Možnost vegetativního množení rostlin však ukazuje, že rostlinné buňky touto diferenciací nijak nedegenerují, ale jsou schopny dediferenciace a opětného dělení. Buňky diferencovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristematičtých. Proces diferenciaci je totiž založen na diferenční genové aktivitě, kdy se specializace buňky vytváří na základě aktivace či inaktivace určitých genů příslušného rostlinného druhu. V rostlinném organismu je tedy totipotentní nejen zygota a meristematičtá buňka, ale i kterákoli jiná buňka rostlinná. Změnou podmínek, ve kterých se specializovaná rostlinná buňka nachází, je možné v mnohých případech vyvolat dediferenciaci a neorganizovaný růst. Teoreticky je jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem vhodné pro odvození explantátové kultury.(11)

### **3.2.4. Kultivace explantátových kultur in vitro**

#### **3.2.4.1. Odvození explantátové kultury**

Prvním krokem při odvození explantátové kultury je výběr matečné rostliny a části rostlinného těla. Dalšími kroky jsou odebrání fragmentu z matečné rostliny, jeho přenesení na tuhou živnou půdu a inkubace za optimálních podmínek (teplota 23–28 °C, vhodná perioda světlo/tma).

Po několika týdnech se získá soubor nediferencovaných buněk – kalus. Růst kalusu je ve většině případů indukován umístěním explantátu na médium s dostatečně vysokou koncentrací auxinu (1-10 mg/l) v přítomnosti nižší koncentrace cytokininu. Pro nárůst

dostatečného množství buněk ve formě kalusu je nutné opakovaně provést pasážování.(10,11)

Z rozpadavého kalusu (kompaktní kalus není vhodný) lze mechanickým nebo enzymatickým způsobem obnovit kulturu suspenzní. Mechanický způsob spočívá v umístění kalusu na třepačku nebo roller, enzymatický způsob je založen na použití pektinázy jakožto rozvolňovacího činidla. (11)

#### **3.2.4.2. Buněčné suspenzní kultury**

Buněčné suspenzní kultury rostlin představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu. Použití tekutých médií umožňuje buňkám suspenze přímý kontakt s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou jim rychle přístupné.

Pohybem média se dosahuje jeho lepší aerace, zajišťuje se lepší přístup živin k jednotlivým buňkám a napomáhá se rozpadu buněčných shluků, které vznikají při dělení buněk. Pohyb média je zajišťován umístěním kultivačních nádob (např. 100 – 150 ml baňky) na roller (v šikmé rovině se otáčející plocha) nebo na třepačku (pohyb buněk je v horizontální rovině).

Pro kontinuální kultivace buněčných suspenzí se používají různé typy bioreaktorů. Pohyb média je zajišťován míchadlem nebo probubláváním sterilního vzduchu.(11)

#### **3.2.4.3. Růst a pasážování suspenzních kultur**

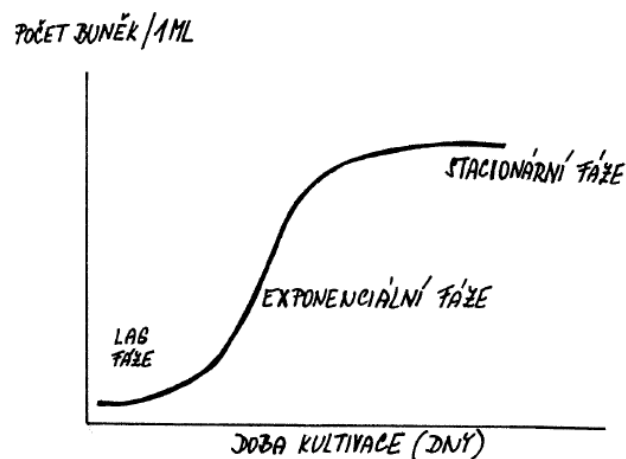
Růst buněčné suspenze probíhá v uzavřeném systému – mění se podmínky kultivace (složení média, hustota buněčné suspenze, atd.), dochází k odčerpání živin.

Růst buněčné kultury v uzavřeném systému je charakterizován růstovou křivkou. Rychlý růst buněk způsobuje rychlé odčerpání živin z kultivačního média a k zajištění stálého růstu je proto nutné buněčné suspenze často pasážovat na čerstvém médiu. Pasážování je také nutné provádět na konci exponenciální fáze růstu, neboť tato fáze je charakteristická aktivním dělením a růstem buněk.

Pasážování buněčné suspenze se provádí tak, že se suspenze centrifuguje ve zkumavce při 200 – 1000xg (5minut), supernatant se odpipetuje a sedimentované buňky se resuspendují v živném roztoku. Nová suspenze se zcedí přes sterilní sítko (velikost pórů 250  $\mu\text{m}$ ), aby se odstranily velké buněčné agregáty, a stanoví se počet buněk v 1 ml suspenze. Suspenze se potom rozpipetuje v určitém objemu (podle počtu buněk v inokulu) do baněk s kultivačním médiem.

Průběh růstové křivky je charakteristický pomalým růstem buněčné suspenze těsně po naočkování (**lag fáze**), velmi intenzivním nárůstem v **exponenciální fázi** a poklesem popř. úplným zastavením růstu ve **stacionární fázi**. Růst buněk ve stacionární fázi je především limitován nedostatkem živin, které byly vyčerpány z média v průběhu exponenciální fáze.(11)

Obr. 19: Růstová křivka buněčné suspenze (11)



#### 3.2.4.4. Složení kultivačního média

Složení kultivačního média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin.

Kultivační médium obvykle obsahuje tyto složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo jiný zdroj organického dusíku, sacharidy, další nedefinované organické složky, zpevňující látku, růstové regulátory a destilovanou vodu.

Existuje celá řada kultivačních médií, která se liší svým složením, používaná pro různé druhy rostlin a pro různé účely kultivace. Nejčastěji popsaná média jsou: White (1963), Murashige a Skoog (MS, 1962), Gamborg et al. (B5, 1968), Gautheret (1942), Shenk a Hildebrandt (SH, 1968), Nitsch a Nitsch (1969), Lloyd a McCown (1981). Média MS, SH, B5 jsou známá vysokým obsahem makroelementů, ostatní média obsahují makroelementů podstatně méně.(11)

#### **3.2.4.4.1. Makroelementy**

Dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra je šest nejdůležitějších prvků z řady makroelementů dodávaných do kultivačního média. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu.

Kultivační médium by mělo obsahovat aspoň 25-60 mM anorganického dusíku. Pro růst rostlinné buňky je důležité dodávat do kultivačního média dusík pouze v nitrátové formě, ale ještě lepších výsledků růstu je dosaženo je-li dusík do média dodáván společně ve formě nitrátové a amonných solí.

Draslík je do média dodáván ve formě dusičnanů nebo chloridů v koncentraci 20-30 mM.

Optimální koncentrace fosforu, síry, vápníku a hořčíku se pohybuje v rozsahu 1-3 mM.

#### **3.2.4.4.2. Mikroelementy**

Do kultivačního média se přidávají tyto mikroelementy: železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Železo a zinek se do médií dodávají v chelátové formě. Do kultivačního média se někdy dodává kobalt, jód, sodík, chlór, ale jejich přítomnost pro růst explantátové kultury není nutná.

#### **3.2.4.4.3. Vitamíny**

Vitamíny jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Některé vitamíny jsou limitujícím faktorem jejich růstu. K nejčastěji používaným vitamínům v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin, myo-inositol. Thiamin je pro růst tkáňových kultur nepostradatelný. V kultivačních médiích se také někdy používají

vitamíny jako biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin. Přítomnost těchto vitamínů však není nezbytná.

#### **3.2.4.4.4. Zdroje uhlíku**

Nejčastěji použitelným zdrojem uhlíku a energie v kultivačním médiu je sacharóza. Je možné ji nahradit glukózou nebo fruktózou. Používaná koncentrace sacharózy v kultivačním médiu je 2-3%.

Jako další zdroje uhlíku se mohou používat alkoholy (např. glycerin) nebo organické kyseliny.

#### **3.2.4.4.5. Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku**

Přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, přidávají se některé aminokyseliny do kultivačního média za účelem stimulace jejich růstu. Vysoké koncentrace však mohou růst explantátové kultury inhibovat.

Aminokyseliny slouží v živném médiu jako zdroj dusíku nebo jsou přímo využívány k syntéze bílkovin.

Velmi často se používá směs kasein hydrolyzát, L-asparagin, L-glutamin, glycin a adenin.

#### **3.2.4.4.6. Nedefinované organické složky**

Růst explantátové kultury se může stimulovat přidáním organických extraktů jako je např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Je však lepší tyto složky pro kultivaci média vynechat a to z důvodů jejich nedefinovaného složení.

Do média se také někdy dodává aktivní uhlí, které může mít jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů.

Aktivní uhlí má tři základní funkce v živném médiu: absorpce látek inhibující růst (váže toxické fenolické sloučeniny produkované rostoucím explantátem), aktivní uhlí má v tomto případě stimulační efekt.

V případě inhibičního efektu dochází k absorpci růstových faktorů kultivačního média. Při použití aktivního uhlí dochází ke ztmavnutí média.

Aktivní uhlí se před použitím propláchne kyselinou a zneutralizuje.

#### **3.2.4.4.7. Látky používané ke zpevnění média**

Pro zpevnění média se nejčastěji používá agar. Má oproti jiným gelizujícím látkám několik výhod. Za prvé, agarové gely jsou stabilní při teplotách používaných ke kultivaci. Vyplývá to z přípravy agarového gelu, kdy dochází ke smíchání agaru s vodou za vzniku gelu při teplotě 60-100 °C, který tuhne při 45 °C. Za druhé, agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy.

Tuhost agarového gelu lze regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. Obvykle se používá koncentrace média 0,8-1,0%.

Pro zpevnění média lze použít i agarózu.

V případě, kdy není použito pevné médium, je možné explantáty fixovat na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pění, čedičové vatě, perforovaném celofánu nebo raftech, což jsou vyráběné plastové nosiče, do kterých se upevňuje polypropylenová membrána. Explantát se pak pokládá na membránu, která plave na povrchu tekutého kultivačního média.(11)

#### **3.2.4.4.8. Destilovaná voda**

Destilovaná voda pro přípravu živných roztoků musí být prostá pyrogenů a organických nečistot. Může obsahovat jen minimální množství anorganických látek. (14)

#### **3.2.4.4.9. Růstové regulátory**

Růstové regulátory jsou látky přirozené nebo syntetické. Působí stimulačně či inhibičně na růst rostlin.

Každá rostlina je schopna si do určité míry tyto látky syntetizovat sama. Při pěstování explantátových kultur rostlin *in vitro* se růstové regulátory přidávají do kultivačního média. Pro explantátové kultury je důležitá jak koncentrace jednotlivých hormonů, tak i jejich vzájemný poměr.

Růstové regulátory lze rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová.

1. Auxiny – jejich přítomnost je nevyhnutelná pro dělení, růst a diferenciaci buněk. Auxiny jsou tedy používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, k indukci tvorby prýtlů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu prýtlů. Mezi používané auxiny v tkáňových kulturách rostlin patří především kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolylmásečná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina naftyloctová (NAA). IAA představuje nativní auxin, ostatní jsou látky syntetické.
2. Cytokininy – stimulují buněčné dělení a tvorbu axiálních pupenů. Obecně platí, že stimulují metabolismus. Lze říci, že zpomalují stárnutí buněk a zvyšují jejich odolnost proti nepříznivým faktorům prostředí. Mezi cytokininy patří především benzylaminopurin (BAP, jinak benzyladenin BA), 6-dimethylaminopurin (2iP či IPA), furfurylaminopurin (kinetin) a zeatin. Zeatin a 2iP jsou nativní cytokininy, zatímco kinetin a BAP jsou syntetické látky.
3. Gibereliny – jsou látky diterpenové povahy, které stimulují tvorbu hydroláz, proteáz a ribonukleáz. Exogenní aplikace giberelinů stimuluje přírůstek biomasy, zkracuje nebo přerušuje odpočinek, zabraňuje procesu stárnutí a stimuluje růst zakrslých rostlin. Zástupcem giberelinů je kyselina giberelová (Gib A, giberelin).
4. Kyselina abscisová (ABA, dormin) – do kultivačního média se dodává za účelem stimulace i inhibice růstu kalusu (v závislosti na rostlinném druhu), ke stimulaci proliferace prýtlů a k inhibici pozdějších fází embryogeneze. (3, 11, 40)

#### **3.2.4.5. Fyzikální podmínky**

Vedle složení kultivačního média jsou pro růst explantátových kultur rostlin důležité i fyzikální podmínky kultivace – osvětlení, teplota, vlhkost vzduchu, pH prostředí kultivačního média.

#### **3.2.4.5.1. Osvětlení**

Nevhodné podmínky osvětlení negativně ovlivňují regeneraci explantátů. Při nedostatečné délce osvětlení začínají kultury intenzivně nekrotizovat a při nízké intenzitě osvětlení se vytváří méně orgánů. Naopak při vyšší intenzitě osvětlení se potlačí organogeneze a projeví se příznaky chlorózy. (Je to komplexní choroba způsobená přímým nebo nepřímým nedostatkem aktivního železa).

Světlo tedy ovlivňuje jak změny intenzity biosyntézy, tak i akumulaci sekundárních metabolitů v explantátových kulturách. Je nutné pro kultivaci zvolit vhodnou kultivační periodu světlo/tma.

#### **3.2.4.5.2. Teplota**

Optimum pro *in vitro* kultury je zpravidla okolo 23 – 28 °C. Na začátku pěstování je vhodnější použít nižší teploty, které zabezpečí zvýšení životaschopnosti rostlinných explantátů a snižuje možnost šíření infekce.

Příliš nízká teplota inhibuje růst, zpomaluje rychlost metabolismu nebo ho zcela zastaví. Naopak vysoká teplota způsobuje poškození buněk explantátové kultury.

#### **3.2.4.5.3. Vlhkost vzduchu**

Vlhkost vzduchu v kultivační místnosti je nutné hlídat v rozmezí 20 – 98 % podle požadavku dané kultury. (3, 11, 14, 15)

#### **3.2.4.5.4. pH prostředí kultivačního média**

Rostlinné buňky a explantáty v podmínkách *in vitro* vyžadují určitou koncentraci vodíkových iontů /pH/ v prostředí. Obvykle se doporučuje pH 5,5 až 6,0. Hodnoty pH se mohou v případě potřeby upravit přidavkem hydroxidu draselného nebo kyseliny chlorovodíkové. (3, 11)

#### **3.2.4.6. Sterilizace**

Jednou ze základních podmínek úspěšné kultivace explantátových kultur je zajištění sterility po celý průběh kultivace. Je nezbytné se zabývat sterilitou rostlinného materiálu,



kultivačních médií a kultivačního prostředí. Při nedodržení sterility v některém stupni kultivace dojde ke kontaminaci kultur plísněmi nebo bakteriemi.

Ke sterilizaci živných roztoků se používají autoklávování a sterilizace filtrací. Živné roztoky, voda a další stabilní látky mohou být sterilizovány ve skleněných nádobách uzavřených uzávěrem (vata, plastová víčka, alobal). Živné roztoky se autoklávují při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa. Doba sterilizace je závislá na objemu roztoku. Tlak by neměl přesáhnout 140 kPa, protože vyšší tlak vede k rozkladu sacharidů. Termolabilní složky živných roztoků (aminokyseliny, vitamíny, gibbereliny, některé vitamíny) se sterilizují filtrací přes membránové filtry, jejichž velikost je menší než 0,2 μm.

Ke sterilizaci rostlinných materiálů nelze použít vysokých teplot, proto se používají různé dezinfekční roztoky. Tyto roztoky nesmějí poškodit rostlinná pletiva a musí ničit plísně a bakterie. Sterilní materiál k založení tkáňové kultury se získává tímto způsobem: opláchnutí explantátů v roztoku detergentů (např. Tween, Jar), omytí vodou (10 až 30 minut), ponoření do dezinfekčního roztoku, slití dezinfekčního roztoku a opláchnutí explantátu nejméně 3x ve sterilní destilované vodě. K účinnější sterilizaci explantátů a vypírání dezinfekčního roztoku se nádoba s roztokem a explantátem umísťuje na třepačku.(11)

Sterilizace vzduchu v kultivační místnosti je dosažena filtrací vláknitými nebo pórovitými materiály. (2)

Baňky se sterilizují v autoklávu, bioreaktory *in situ* párou procházející pláštěm. (10)

### **3.2.5. Využití explantátových kultur**

Využití explantátových kultur lze rozdělit do dvou základních skupin. Jedná se o produkci sekundárních metabolitů a o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin.

V Evropě je založeno více jak 500 středisek zabývajících se biotechnologickým výzkumem využívání rostlinných kultur *in vitro*. Instituce jsou v 21 zemích Evropy, ale největší pozornost této problematiky je studována v Německu, Holandsku, Francii, Itálii.

Dále jsou pracoviště v Anglii, USA, Kanadě, Japonsku. Lze říci, že každá pátá laboratoř je schopna vyprodukovat více než pět milionů rostlin.(16)

### 3.2.5.1. Produkce sekundárních metabolitů

Vyšší rostliny jsou bohatými zdroji léčivých látek. Pěstování těchto rostlin bývá doprovázeno mnoha komplikacemi, proto je výhodné získávat sekundární metabolity z buněčných kultur *in vitro*.

Hlavní výhody buněčné kultivace oproti kultivaci celé rostliny jsou následující:

1. Využívané složky mohou být produkovány za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických změnách nebo půdních podmínkách.
2. Pěstované buňky mohou být zbaveny mikrobů a hmyzu.
3. Buňky kterékoliv rostliny, bez ohledu na geografický původ, mohou být pěstovány k získání jejich specifických metabolitů.
4. Automatizací buněčného růstu a regulací metabolických procesů může klesat výrobní cena a stoupat produktivita.(16)
5. V explantátových kulturách je možné selektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů.
6. Kultivace probíhá za aseptických podmínek, jsou proto vyloučeny bakteriální a houbová onemocnění, která napadají intaktní rostliny. U explantátových kultur se nepoužívají ochranné prostředky proti škůdcům a hnojiva. (11)
7. Získání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk.(10)

Budoucnost průmyslového využití buněčných kultur pro produkci přírodních látek v bioreaktorech závisí na vývoji postupů a technologií zkracujících periodu fermentace a zvyšujících výtěžek. Perspektivní je i přenos rostlinných genů, které kódují enzymy katalyzující reakce biosyntézy sekundární látky do bakteriální buňky mikroskopických hub.(16)

### 3.2.5.2. Rozmnožování a šlechtění rostlin

Buněčné kultury mají využití nejen ve výzkumu, ale i v zemědělství. Zde buněčné kultury slouží k množení, šlechtění a ozdravování rostlin. (13, 17)

Z různých aplikací jsou nejdůležitější:

1. Regenerované rostliny – jejich tvorba umožňuje využití polymorfismu ve šlechtitelském programu a selekce produkčních klonů na úrovni izolované buňky.
2. Genové inženýrství – zavedení nových vlastností do rostliny.
3. Vegetativní množení – umožňuje rychlé získání tisíců shodných rostlinných jedinců (gerbery, orchideje, karafiáty).
4. Fúze protoplastů – u téhož nebo různého druhu umožňuje tvorbu somatických hybridů s vlastnostmi epigenetické povahy z jiného druhu (rezistence, přenos samčí cytoplazmatické sterility, atd.)
5. Pylové kultury – umožní získání haploidních rostlin a od nich odvozených čistých linií pro šlechtitelské účely (rýže, obilí).
6. Meristémové kultury – umožní získání ozdravených rostlin (karafiáty, brambory). Z kultur lze získat rostliny prosté bakteriálních, virových a houbových nákaz. Infekce je eliminována již při zakládání kultury. Následné kontaminaci se může zabránit přidáním antibiotik a antivirotik do média. Virózu můžeme také potlačit vyšší teplotou, která je ještě snášena rostlinnou buňkou, ale pro viry je již letální.

(13)

### **3.3. Elicitace**

Jednou z možností zvýšení produkce sekundárních metabolitů explantátové kultury je využití metody elicítace. (11)

#### **3.3.1. Princip elicítace**

Elicítace je proces založený na signálem (elicítorem) indukované expresi genů a následně dojde ke zvýšení syntézy sekundárních metabolitů v rostlinách nebo explantátových kulturách *in vitro*. (18)

#### **3.3.2. Elicitory**

Elicitory jsou signální látky různého původu, které působí jako aktivátory enzymů v pletivech rostlin nebo stimulují syntézu těchto enzymů. Elicitory působí jako stresový faktor, který vyvolává obranou reakci buněk založenou na produkci sekundárních metabolitů. (11)

##### **3.2.2.1. Klasifikace elicitorů**

Elicitory lze rozdělit podle různých hledisek, např. na chemické a fyzikální nebo biotické a abiotické. (11)

###### **3.2.2.1.1. Abiotické elicitory**

Jsou to chemické a fyzikální vlivy stresující rostlinu a vyvolávají tak tvorbu fytoalexinů, což jsou nízkomolekulární antimikrobiální látky, které jsou syntetizovány a akumulovány v rostlinách po napadení mikroorganismy. Slouží jako aktivní obranné látky, postinfekční metabolity rostliny. U nestresované rostliny se fytoalexiny nacházejí v malém množství nebo vůbec. Mají lipofilní charakter umožňující přestup plazmatickou membránou patogenů. Výhodou abiotických elicitorů je schopnost chemické identifikace. Lze je tedy aplikovat v přesně definovaných množstvích. (18, 19, 20)

#### Řadíme k nim:

1. Soli těžkých kovů
2. Detergenty
3. Rostlinné ochranné prostředky (pesticidy)
4. Inhibitory látkové výměny (kyselina trichloroctová, 2,4-dinitrofenol)
5. Fyzikální vlivy (změny pH, UV záření, změny osmotického tlaku, mechanická poranění)

#### **3.2.2.1.2. Biotické elicitory**

Biotické elicitory jsou organické sloučeniny nebo přímo organismy, které spouštějí tvorbu fytoalexinů již při nepatrných koncentracích.

#### Patří k nim:

1. Organické molekuly parazitických mikroorganismů (glykoproteiny, oligosacharidy, polypeptidy).
2. Celé intaktní patogenní i nepatogenní organismy nebo jejich části (viry, bakterie, mykoplasmata, kvasinky).
3. Endogenní konstitutivní elicitory – organické molekuly pocházející z buněk napadené rostliny (kyselina salicylová, chitosan, oligogalakturonidy). (20)

#### **3.3.2.2. Mechanismus účinku elicitoru**

Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory většinou neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí tzv. druhých poslušných messenger - přenašeči signálů (G-proteiny, Ca<sup>2+</sup>-proteiny, proteinkinasy). Ti pak pomocí transdukčních signálních cest v buňce přenášejí signály, což vede k expresi genů a biochemickým změnám.

Molekuly biotického elicitoru jsou rozpoznávány specifickými receptory v plazmatické membráně. Po obsazení tohoto receptoru dojde k aktivaci G-proteinu, otevření Ca<sup>2+</sup>-kanálu a rychlému influxu vápenatých iontů do buňky.

Extracelulární vápník je považován za signál, které dovnitř buňky přináší informaci o poranění buňky. Z intracelulárních organel (mitochondrií, endoplazmatického retikula) přichází další zdroj  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Jednou z cest vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do cytoplazmy je přes plazmatickou membránu. Následně dojde ke změně membránového potenciálu, tím se aktivuje napětově závislý  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilní kanál, který zvyšuje koncentraci cytosolových  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Když dojde ke zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v intracelulárním prostoru na hodnotu 1  $\mu\text{M}$ , naváže se kalcium na kalmodulin. Tato bílkovina má čtyři vazebná místa pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a vzniklý komplex ovlivňuje aktivitu některých proteinkináz.

Další způsob přenosu signálů je zprostředkován pomocí fosfoinositolového systému. Kdy dochází k hydrolýze lipidů plazmatické membrány za vzniku dvou signálních molekul – diacylglycerolu a inositol-1,4,5-trifosfátu. Tyto látky vedou k aktivaci proteinkináz a expresi genů.

Velmi častým a neobyčejně rychlým způsobem přenosu signálů je tvorba superoxidu a jiných aktivních forem kyslíku vyvolaná elicitory (hydroxylové radikály, hydrogen peroxidy). Existuje jak přímé působení peroxidu vodíku na expresi genů, tak i nepřímé působení. V tomto případě dochází nejdříve k peroxidaci lipidů v membránách, vzniknou kyselina jasmonová a methyljasmonát a tyto látky pak teprve ovlivňují transkripci. (18)

U abiotických elicitorů nedochází k vazbě na specifický receptor. Abiotické elicitory (např. těžké kovy) tedy působí jiným mechanismem. Vyvolávají peroxidaci lipidů membrány, tím dochází ke zvýšení propustnosti membrány pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, které následně vnikají do buňky a zprostředkují expresi genů. (18, 19)

### 3.3.3. Faktory ovlivňující elicítaci

Mezi hlavní faktory ovlivňující vliv elicitoru na kultury *in vitro* a zároveň na produkci sekundárních metabolitů touto kulturou jsou:

1. Podmínky pěstování kultury – osvětlení, teplota, složení kultivačního média.
2. Stáří kultury
3. Doba působení elicitoru- ovlivňuje aktivitu metabolických enzymů kultury a liší se podle druhu rostliny. Optimální doba působení elicitoru se zjišťuje empiricky.

4. Koncentrace elicitoru – ovlivňuje intenzitu odpovědi a efektivní dávku, která se liší podle druhu rostliny. Optimální koncentrace elicitoru se zjišťuje empiricky.

5. Specifita elicitoru – stejný elicitor může stimulovat sekundární metabolismus různých rostlinných kultur. Elicitace jednotlivých kultur různými elicitory má za následek akumulaci stejných látek, které jsou pro danou rostlinu typické. Obecně lze říci, že typ sekundárního metabolitu je typický pro danou rostlinnou kulturu, ale není závislý na volbě elicitoru.

6. Načasování působení elicitoru – uvádí se, že nejvhodnější doba k aplikaci elicitoru je během exponenciální fáze růstu, kdy je většina enzymatických pochodů dostatečně aktivní, aby odpověděla na přítomnost elicitoru. (21)

### 3.4. Těžké kovy

Ke kovům se řadí asi 80 prvků periodické soustavy prvků, z nichž přibližně 30 je označováno jako těžké kovy, ale ne všechny mají biologický význam. Na základě jejich rozpustnosti ve fyziologických podmínkách může být dostupných pro žijící buňky 17 těžkých kovů, které mohou mít také význam pro organismus a ekosystém. (18, 22, 81)

Vzhledem k tomu, že na rozdíl od organických látek kovy nikdy nedegradují, je třeba počítat s jejich postupnou akumulací v životním prostředí. Představují vážnou hrozbu pro rostliny, živočichy, člověka. Některé rostliny fungují jako hyperakumulátory specifických těžkých kovů, jiné mohou působit jako bioindikátory, proto v odolnosti rostlin těžkých kovů existují velké rozdíly. (22)

Těžké kovy jsou kovové prvky s velkou hustotou (obvykle větší než  $5 \text{ g/cm}^3$ ) a s velkou relativní atomovou hmotností. (9)

Mezi těžké kovy patří některé biogenní stopové prvky (Cu, Co, Zn, Mo, Mn, Fe) nutné pro výživu rostlin, dále prvky působící na rostliny víceméně toxicky, stresově (Cd, Pb, Sb, Ag, Hg). (23)

#### **Mechanismy toxicity těžkých kovů můžeme rozdělit do tří skupin:**

**1. Produkce reaktivních forem kyslíku autooxidací** – Vnik těžkých kovů do buňky způsobí postupnou redukci molekulárního kyslíku z vody na reaktivní formy kyslíku. Tyto reaktivní formy mohou vést k nespecifické oxidaci proteinů a membránových lipidů, nebo mohou

způsobit poškození DNA. Tento mechanismus je typický pro přechodné kovy jako např. železo, měď.

**2. Blokování esenciálních funkčních skupin v biomolekulách** – Kadmium a některé další kovy, které se nezapojují do oxidačně-redukčních dějů (rtuť) způsobují přechodnou ztrátu glutathionu a inhibici antioxidantních enzymů, zvláště glutathion-reduktázy.

**3. Vytlačení základních kovových iontů z biomolekul** – mnoho enzymů obsahuje kov v pozici důležité pro jejich aktivitu. Nahrazení jednoho kovu jiným obvykle vede k inhibici, či ztrátě enzymové aktivity. Bivalentní kationy jako  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  nahrazují  $\text{Mg}^{2+}$  v ribuloze-1,5 bifosfát-karboxyláze/oxygenáze, což vede ke ztrátě její aktivity. Záměna  $\text{Ca}^{2+}$  za  $\text{Cd}^{2+}$  v proteinu kalmodulinu, důležité části buněčné signalizace, vede k inhibici kalmodulin-závislé fosfodiesterázové aktivity v ředkvičce. Tento mechanismus se vyskytuje u různých druhů těžkých kovů. (81)

### 3.4.1. Minerální výživa

Pro vývoj rostliny je minerální výživa důležitá zejména tím, že asimilace iontů – jejich přeměna ve struktury a účast v procesech rostliny, jsou nezbytné ve vývojových procesech.

Kvalitativně odpovídá obsah prvků v rostlinách jejich výskytu v kořenovém substrátu. Nepřítomnost prvku v půdě a okolní atmosféře znamená i jeho nepřítomnost v rostlině. (18)

Rostliny využívají minerální výživu jako:

1. kofaktory enzymů
2. posly k přenosu signálů
3. osmotika
4. substráty v biochemických reakcích

### 3.4.2. Chrom

#### Chemické vlastnosti chromu a jeho účinek na živočišný a rostlinný organismus

Chrom je prvkem zařazeným do VI. vedlejší podskupiny Mendělejevovy periodické soustavy prvků pod atomovým číslem 24, s atomovou hmotností 51,996. Je to stříbrolesklý tvrdý kov, chemicky mimořádně odolný, o teplotě tání 1300 °C a teplotě varu 2300 °C. (9, 24).



Patří ke stopovým prvkům, které mají význam pro metabolismus sacharidů a lipidů, potencuje účinek inzulínu. (9)

Prostřednictvím potravin přijímá člověk 0,03-0,2 mg chromu denně. V pitné vodě je chrom obsažen v množství nižším než  $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Kontaminace vzduchu je různá; na venkově koncentrace chromu nepřekračuje  $10 \text{ ng.m}^{-3}$ , v městských centrech dosahuje až  $300 \text{ ng.m}^{-3}$  (25).

Malé množství anorganického chromu je absorbováno z gastrointestinálního traktu, organicky vázaný chrom je absorbován mnohem snadněji a ve větším množství. Chrom rozptýlený ve vzduchu je při vdechnutí absorbován jen nepatrně, a to v závislosti na rozpustnosti sloučeniny, ve které se vyskytuje. Chrom neprostupuje neporušenou pokožkou, i když delší kontakt může vyvolat senzibilizaci. Při transportu krví je trojmocný chrom vázán na siderofylin, čtyřmocný pak na globin. Chrom je kumulován v játrech a ledvinách, a je vylučován močí s relativně krátkým biologickým poločasem.

Akutní forma otravy se vyskytuje jen zřídka a projevuje se těžkým zánětem gastrointestinálního traktu, vyplývajícím z postupné nekrózy jater a ledvin. Dlouhodobá expozice šestimocným chromem vyvolá kontaktní dermatitidy, ulcerózy nosní sliznice a vzácněji i astma. Alergie na chrom byla zjištěna asi u 10 % osob trpících kožními chorobami. Při dlouhodobém působení chromu v nerozpustné formě byl zjištěn vysoký výskyt plicních nádorů (nemoci z povolání).

Hodnocení z hlediska mutagenity ukazuje, že šestimocný chrom je výrazně aktivnější než chrom trojmocný. Bylo prokázáno, že trojmocný chrom není schopen prostupu celulární bariérou. Předpokládá se, že sloučeniny chromu patří do skupiny mutagenů způsobujících pouze přechodné mutace.

Hygienickými průzkumy a experimenty na zvířatech bylo prokázáno, že deriváty chromu, zejména minimálně rozpustné šestimocné soli, mohou indukovat vznik nádorů v místech kumulace. V lidském organismu jde zejména o dýchací trakt, hrozí nebezpečí vzniku rakoviny plic, hrtanu a nosních dutin.

Experimenty prováděné se značeným  $\text{Cr}^{+3}$  ukazují, že téměř žádný anorganický chrom neprochází placentární bariérou (25).

Rostliny vyskytující se na půdách s vyšším obsahem kovů, mají vyvinuté fyziologické mechanismy umožňující jim tolerovat toxické účinky kovů. Tyto mechanismy nejsou založeny

na potlačení příjmu kovů, ale jsou výsledkem vnitřní detoxikace. Z tohoto hlediska byly formulovány dvě základní hypotézy detoxikačního principu – vylučování a akumulace (26).

Některé rostliny například *Ocimum adsendens* kumulují chrom v tak vysoké míře, že mohou být použity jako indikátory znečištění. Toxicita chromu závisí rovněž na hodnotě pH. Chrom přidáný do neutrální půdy je toxičtější než v půdě kyselé (27).

### 3.4.3. Hliník

#### Chemické vlastnosti hliníku a jeho účinek na živočišný a rostlinný organismus

Hliník je prvkem zařazeným do III. A skupiny periodické soustavy prvků pod atomovým číslem 13, s atomovou hmotností 26,9815. Je to stříbrolesklý, měkký kov s malou hustotou. Na vzduchu stálý. Je výborný vodič tepla a elektřiny, kujný a tažný. (28)

Hlinité sloučeniny (hydroxyhlinitan hořečnatý, hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý) se používají jako místně působící antacida, která neutralizují kyselinu chlorovodíkovou vytvořenou a přítomnou v žaludku. Přinášejí úlevu při pálení žáhy, dyspeptických potížích a bolesti. (34) V lékařství se hliník a jeho sloučeniny používají k prevenci hyperfosfatemie při selhávání ledvin, jako adjuvans pro vakcíny a v kosmetice jako antiperspirant. (82)

Sloučeniny tohoto kovového prvku jsou v medicíně součástí některých adstringentních látek. Zvýšené množství hliníku v organismu u hemodialyzovaných pacientů se podílí na poškození kostí. (9)

Tento stopový prvek se vyskytuje hojně v půdě. Po dlouhou dobu byl ve formě, z které se neuvolňoval a nevstupoval do potravinového řetězce. S příchodem kyselých dešťů se rozpustnost hliníkových solí zvýšila a hliník se začal dostávat i do ovzduší. (35)

Trojmocné kationty (Al, La, Gd) jsou fyto toxické. Jejich účinek byl zkoušen u rostliny *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). Přídavek chloridů těchto kationtů (LaCl<sub>3</sub>, GdCl<sub>3</sub>) spouští v rostlinné buňce tvorbu superoxidu. Mnohem vyšší produkci superoxidu spouští AlCl<sub>3</sub> za fyziologického pH 5,8. Bylo prokázáno, že NADPH oxidázy se podílí na vytváření superoxidu a množství vytvořeného superoxidu závisí na dávce elicitoru. Postupné zvyšování koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů v cytosolu bylo změřeno prostřednictvím luminiscence proteinu aequorinu. Hliníkem indukovaný superoxid stimuluje příliv Ca<sup>2+</sup> iontů. Vysoká koncentrace Al se ukázala jako inhibiční pro superoxidem navozený influx Ca<sup>2+</sup> iontů. To vysvětluje

neúčinnost vysokých koncentrací. Inhibiční vliv hliníku na hypoosmolární influx  $\text{Ca}^{2+}$  iontů nebyl prokázán, což znamená, že hliník může být selektivní inhibitor redox-reagujících  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů. (32)

V rostlinné buňce se hliník váže na nukleové kyseliny ve formě fosfátů, čímž ovlivňuje při buněčném dělení průběh replikace. Interferuje s enzymy podílejícími se na fosforylaci cukrů a na ukládání polysacharidů v buněčných stěnách, a tím ovlivňuje permeabilitu membrán (spolu s interakcí s membránovými proteiny, fosfolipidy a lipoproteiny). Hliník se váže na pektiny stěn kořenových buněk, což zamezuje prodlužovacímu růstu kořenů. (30)

Rostliny disponují relativně účinnými obrannými mechanismy vůči toxickému působení hliníku. Jedná se např. o:

- snižování inhibičního vlivu na kalmodulin-dependentní enzymy tvorbou polypeptidů (kyselina polyasparagová, kyselina polyglutamová) schopných vázat hliníkové ionty
- tvorba citrátu a malátu, které převádějí hliník do pevných organických komplexů
- zvýšení pH v okolí kořenů (31)

### **3.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je separační analytická metoda, která našla od 80. let 20. století široké uplatnění v různých oblastech farmaceutické analýzy. (37, 39)

Přednostmi HPLC jsou: možnost využití při analýze rozsáhlého spektra látek, rychlost vlastní analýzy, přesnost, reprodukovatelnost výsledků, citlivost, selektivita a možnost úplné automatizace sériových analýz. Tato metoda umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek ve směsi. (36, 39)

#### **3.5.1. Princip separace látek**

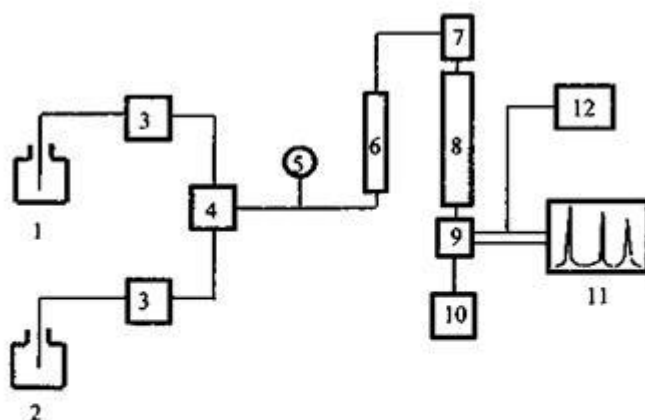
Princip separace spočívá v dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku.

Protože k dělení látek lze u HPLC využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontové výměny, síťového efektu gelu), je možné nalézt

selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech. (37)

### 3.5.2. Kapalinový chromatograf

Obr. 20: Základní části kapalinového chromatografu (37)



**Blokové schéma kapalinového chromatografu**

1,2-mobilní fáze-eluční činidla; 3-vysokotlaká čerpadla; 4-směšovač;  
5-manometr; 6-předkolona; 7-dávkovač; 8-kolona; 9-detektor;  
10-sběrač frakcí; 11-zapisovač; 12-integrátor

Při chromatografii je mobilní fáze čerpána vysokotlakým čerpadlem malou rychlostí (0,1 – 10 ml/min) za vysokého tlaku až 40 MPa.

Při dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší, se používá izokratická eluce jedinou mobilní fází, jejíž složení se během chromatografie nemění. U některých látek však nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, neboť se jednotlivé složky směsi svými elučními parametry významně liší. V tomto případě se využívá gradientová eluce, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak plynulý koncentrační gradient mobilní fáze.

Dávkování roztoku vzorku se provádí buď speciální injekční mikrostříkačkou, nebo dávkovacím kohoutem.

Kolony pro HPLC jsou ocelové nebo skleněné trubice o délce 5 – 30 cm a vnitřním průměru 2 – 8 mm naplněné stacionární fází. Náplň kolony musí být homogenní a rovnoměrná.

Detektory pro HPLC musí být vysoce citlivé a univerzální. Používají se detektory infračervené, refraktometrické, konduktometrické, ultrafialové, fluorimetrické, amperometrické, spektrofotometrické. Nejvíce se využívají detektory spektrofotometrické, které registrují absorpenci eluátu protékajícího kvyetou o vnitřním objemu 10 µl a menším. Umožňují měření při vlnových délkách v oblasti 200–800 nm. Nejvíce informací lze získat spektrofotometrem s diodovým polem (diode array) řízeným počítačem a snímajícím celé absorpční spektrum eluátu každou sekundu. Výsledkem je třírozměrný (3D) chromatogram jako závislost absorpance na vlnové délce a na čase, ze kterého lze rychle identifikovat eluované látky a posoudit jejich čistotu a stanovit jejich obsah.

### **3.5.3. Systémy fází pro HPLC**

Pro účinné dělení látek hraje rozhodující roli náplň komory, tj. kvalita sorbentu, jeho velikost a stejnosměrnost částic, ale i tvar, porozita, struktura.

#### **3.5.3.1. Mobilní fáze**

Mobilní fáze používané při HPLC musí být velice čisté a zbavené rozpuštěných plynů probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku za vakua. Důležitý je výběr mobilní fáze.

Podle rostoucí eluční účinnosti jsou rozpouštědla seřazena do eluotropní řady: heptan<cyklohexan<tetrachlormethan<toluen<éter<chloroform<aceton<acetonitril<ethanol<methanol<kyselina octová.

#### **3.5.3.2. Stacionární fáze**

Jako stacionární fáze, která tvoří náplň kolony, se většinou používají nemodifikované nebo chemicky modifikované mikročástice silikagelu (velikost 3, 5, 10 µm) nebo oxid hlinitý.

Pro polární látky se používá jako sorbent nemodifikovaný silikagel, na jehož volně přístupné skupiny Si-OH na povrchu se polární látky adsorbují prostřednictvím vodíkových vazeb. Pro méně polární látky se používá sorbent oxid hlinitý.

Chemicky modifikované stacionární fáze na bázi silikagelu, které mají podle vázané skupiny různou polaritu (od nepolární až po polární), lze využít pro látky polární i nepolární.

Dále se jako stacionární fáze používají polymerní gely (např. dextran) a chirální stacionární fáze, která umožňuje separaci a stanovení optických izomerů. (37)

#### **3.5.4. Využití HPLC**

1. Kontrolně – analytické hodnocení léčiv (identifikace, čistota, stanovení)
2. Stabilitní studie léčiv (analýza termolabilních látek)
3. Analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu
4. Monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách

Umožňuje analyzovat látky od anorganických iontů až po polymerní sloučeniny a také netěkavé látky.

V praxi má HPLC široké použití. Využívá se k analýze steroidů, vitamínů, pesticidů, cukrů, barviv, léčiv a jejich metabolitů. (37, 38)

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4. 1. Použitý materiál, chemikálie, přístroje, pomůcky

#### 4.1.1. Rostlinný materiál

K experimentům v této práci byla použita explantátová kultura odvozená ze sterilní klíčící rostliny jetele lučního *Trifolium pratense* L. (Fabaceae), varieta DO-9. Semena byla získána ze šlechtitelské stanice Domoradice. Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepačce. Elicitace byla provedena u nově odvozené suspenzní kultury v 9. a 10. pasáži.

#### 4.1.2. Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřena v hmotnostních procentech (m/m).

Postup: 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 teplotě 105 °C. Po vysušení a vychladnutí v exsikátoru byla váženka s obsahem opět zvážena. Ztráta sušením byla vztažena na navážku explantátové kultury a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením 5,58 % je aritmetickým průměrem ze tří stanovení. (1)

#### 4.1.3. Chemikálie

ajatin

6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno

dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno

dusičnan draselný p. a., Lachema, Brno

edetan disodný č., Lachema, Brno

ethanol 96 %

chloramin

chlorid kademnatý p. a., Lachema, Brno

chlorid kobaltnatý p. a., Lachema, Brno

chlorid pyridoxinia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook

chlorid rtuťnatý p. a., Lachema, Brno

chlorid thiaminia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook

chlorid vápenatý p. a., Lachema, Brno

jodid draselný p. a., Lachema, Brno

kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová č., Lachema, Brno

kyselina boritá p. a., Lachema, Brno

kyselina o-fosforečná, Lachema, Brno

kyselina mravenčí p. a., 98 %, Lachema, Brno

kyselina nikotinová č., Lachema, Brno

kyselina octová p. a., 99 %, Lachema, Brno

kyselina octová p. a., 99,8 %, Lachema, Brno

kyselina šťavelová č., Lachema, Brno

methanol p. a., Lachema, Brno

molybdenan sodný p. a., Lachema, Brno

myoinositol č., Sigma, St. Louis

sacharosa 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 200, Sartorius, Göttingen

autokláv PS 20 A, Chirana, Brno

horkovzdušný sterilizátor HS 31 AM, Chirana, Brno

box s laminárním prouděním Fatran LF, výrobné družstvo Pokrok, Žilina

roller, vývojové dílny AV ČR, Praha

třepačka Unimax, 2010, Heidolph



vodní lázeň KL-1, Laboratorní přístroje, Praha

spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge

kapalinový chromatograf Jasco (autosampler AS-2055 Plus, čerpadlo PU-2089 Plus, detektor MD-2015, MD-2020)

kolona LiChrosper RP-18 s ochrannou předkolonkou, Merk, Darmstadt

## 4. 2. Suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9)

### 4.2.1. Příprava kultivačního média

Pro kultivaci tkáňové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) bylo použito živné médium podle Gamborga (B5) následujícího složení: (4)

KNO <sub>3</sub>	2500,00	mg.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	150,00	mg.l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	250,00	mg.l <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134,00	mg.l <sup>-1</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	150,00	mg.l <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,84	mg.l <sup>-1</sup>
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>

Jednotlivé substance kultivačního media byly naváženy na analytických vahách. U složek s nízkou koncentrací byly připraveny zásobní roztoky a z nich se předepsané množství pipetovalo. Všechny složky kultivačního média byly rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněné destilovanou vodou po značku. Až poté byly přidány růstové stimulanty, kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2 mg.l<sup>-1</sup>) a 6-benzylaminopurin (2 mg.l<sup>-1</sup>). (5,6).

Kultivační médium bylo nakonec rozděleno po 25 ml do varných baněk, které byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C při tlaku 0,1 MPa.

#### **4.2.2. Kultivační nádoby a nástroje**

Při kultivaci explantátových kultur bylo použito nádobí z varného skla SIAL, které je odolné vůči vodě, chemikáliím, rozdílům teplot a vyhovuje tedy požadavkům pro kultivaci explantátových kultur. Suspenzní kultury byly kultivovány v 250 ml varných baňkách ze skla SIAL.

Kovové pinzety používané při pasážování byly opláchnuty 96 % ethanolem a zabaleny do hliníkové fólie. Sterilizovaly se v horkovzdušném sterilizátoru 2 hodiny při teplotě 200 °C.

Pipety po zabalení do hliníkové fólie se sterilizovaly v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C při tlaku 0,1 MPa.

#### **4.2.3. Pasážování a kultivace**

Pasážování kultur bylo prováděno odpipetováním části narostlé suspenze do předem připravených baněk s čerstvým médiem. Odpipetování se provádělo v boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen nejméně 1 hodinu germicidní zářivkou. Během tohoto procesu se zachovaly přísně aseptické podmínky, bylo použito sterilní sklo a nástroje.

Suspensní kultura byla kultivována na pomaloběžném rolleru při teplotě 25 °C. Světelná perioda byla dodržována v intervalu 16 hodin světlo/8 hodin tma. Subkultivační interval byl 14 dní. (6).

## 4. 3. Elicitace

### 4.3.1. Příprava roztoků elicitoru

K pokusům byly použity dva elicitory: chlorid hlinitý a chlorid chromitý.

U obou elicitorů byly připraveny čtyři vodné roztoky o následujících koncentracích:

koncentrace I.	100 μmol
koncentrace II.	10 μmol
koncentrace III.	1 μmol
koncentrace IV.	0,1 μmol

Z nejsilnější koncentrace (100 μmol) každého daného elicitoru byly naředěním připraveny roztoky o nižší koncentraci. Všechny roztoky elicitorů byly sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121°C a tlaku 0,1 MPa. Připravené roztoky byly uchovávány v lednici.

### 4.3.2. Elicitace a odběr kultur

Elicitace suspensní kultury byla prováděna jednotlivými koncentracemi elicitoru vždy 21. den kultivace. (6) Veškerá práce byla realizována za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu.

#### Postup elicítace a odběru kultur:

Do 64 baněk byl ke kulturám vždy napipetován 1,00 ml daného vodného roztoku elicitoru o příslušné koncentraci. Byl zde také soubor 8 baněk s kulturami bez elicitoru, který sloužil jako kontrolní vzorek. Do těchto baněk byl přidán 1,00 ml destilované vody. Všechny 72 baněk bylo řádně označeno, pečlivě uzavřeno hliníkovou fólií a kultivováno za již uvedených podmínek.

V intervalu 6, 24, 48 a 168 hodin působení elicitoru byly elicítované kultury odebrány. Odběry kontrolních vzorků byly provedeny po 6 a 168 hodinách. Buňky suspensních kultur

byly odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a sušeny při laboratorní teplotě.

#### 4.4. Stanovení obsahu flavonoidů

U každého vzorku bylo provedeno stanovení obsahu flavonoidů dle Českého lékopisu 2009 a statistické vyhodnocení výsledků.

##### 4.4.1. Princip stanovení

Obsah flavonoidů se stanoví spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé. (1)

##### 4.4.2. Postup stanovení

###### Základní roztok:

0,200-0,400 g práškové kultury se ve 250 ml baňce smíchá se 40 ml *lihu R 60 % (V/V)* a zahřívá se 10 minut na vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100 ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy ve 250 ml baňce, přidá se 40 ml *lihu R 60 % (V/V)* a zahřívá se 10 minut na vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes vatu do téže odměrné baňky. 250 ml 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 100,00 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 do 25 ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3ml směsi objemových dílů *metanolu 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 s *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 rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny ledové R* (10 + 100) a převede se do 25 ml 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 R* na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance 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:

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

A – absorbance roztoku v maximu při 410 nm

M – hmotnost zkoušené kultury v gramech

Specifická absorbance má hodnotu 405.

## **4. 5. Stanovení obsahu isoflavonoidů**

U vzorků, u nichž byl použit elicitor chlorid hlinitý, bylo provedeno také stanovení obsahu isoflavonoidů (genistinu, genisteinu, daidzeinu, formononetinu) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). (7)

### **4.5.1. Princip stanovení**

Kapalinová chromatografie je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž mobilní fáze je kapalina, která prostupuje stacionární fází naplněnou do kolony. Kapalinová chromatografie je založena zejména na mechanismu absorpce, rozdělování, výměny iontů, vylučování nebo stereochemických interakcích. (1)

## 4.5.2. Postup stanovení

### Příprava vzorku:

Asi 0,2000 g – 0,4000 g u práškové kultury se ve 100ml varné baňce smíchá s 15ml *methanolu 80 %* a extrahuje se 30 minut na vodní lázni při 80 °C pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes malý chomáček vaty do 25ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží k zbytku kultury ve 100ml baňce, přidá se 15ml *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 *metanolem 80%* na 25ml. Roztok se převede přes mikrofiltr do vialek a analyzuje se metodou HPLC.

### Parametry HPLC analýzy:

Chromatograf: Jasco (autosampler AS-2055 Plus, čerpadlo PU-2089 Plus, detektor MD-2015, MD-2020)

Kolona: Kolona LiChrospher RP – 18 (205 x 4mm, velikost částic 5µm) s ochrannou předkolumnou.

Objem nástřiku: 20 µl

Mobilní fáze: fáze A: metanolvý roztok kyseliny o-fosforečné (0,15% m/V)

fáze B: vodný roztok kyseliny o-fosforečné (0,15% m/V )

Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově. V čase t = 9 minut bylo složení 80 % methanolu a 20 % vody. Následovala isokratická eluce stejným složením do času t = 15 minut.

Standardy: genistein, genistin, daidzein, formononetin

Průtok: 1,1 ml/min

Detekce: DAD Jasco MD-2015,  $\lambda$  = 200-650 nm, vyhodnoceno při 260 nm



## 4.6. Statistické vyhodnocení

Získané výsledky obsahu flavonoidů ve sledované kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) byly statisticky vyhodnoceny za použití T-testu, pro zvolenou hladinu významnosti  $p=0,5$ . (8)

### 4.6.1. Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je popisná typická hodnota statistického souboru, který má tzv. Normální (Gaussovo) rozdělení. (9)

Vypočítá se podle vzorce: (8)

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

$\bar{X}$  - aritmetický průměr

$n$  – rozsah souboru

$X_i$  - naměřené hodnoty

### 4.6.2. Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je statistická charakteristika pro měření rozptýlenosti jednotlivých hodnot statistického znaku kolem průměru. (9)

Vypočítá se podle vzorce: (8)

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



$s$  – směrodatná odchylka

$n$  – rozsah souboru

$x_i$  – naměřené hodnoty

$\bar{x}$  - aritmetický průměr

### 4.6.3. T-test

T-test je test významnosti rozdílů dvou průměrů a vypočítá se podle vzorce: (8)

$$s = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

$t$  – testovací kritérium

$\bar{x}_1$  – aritmetický průměr kontrolního souboru

$\bar{x}_2$  – aritmetický průměr pokusného souboru

$n_1$  – počet členů kontrolního souboru

$n_2$  – počet členů pokusného souboru

$s_1$  – směrodatná odchylka kontrolního souboru

$s_2$  – směrodatná odchylka pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší  $t$  rozdělení se stupněm volnosti ( $\mathbf{v}$ ), vypočítáno dle vzorce:  $\mathbf{v} = \mathbf{n}_1 + \mathbf{n}_2 - \mathbf{2}$

Vypočtena hodnota testovacího kritéria ( $\mathbf{t}$ ) se porovnává s příslušnou kritickou hodnotou  $\mathbf{t}(\mathbf{v})_p$  pro vypočtený stupeň volnosti ( $\mathbf{v}$ ) a zvolenou hladinu významnosti ( $\mathbf{p}$ ). Je-li hodnota ( $\mathbf{t}$ ) větší než hodnota  $\mathbf{t}(\mathbf{v})_p$ , je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti ( $\mathbf{p}$ ).

Pro dvě paralelní stanovení obsahu platí, že počet členů souboru kontrolního a pokusného souboru je shodný  $\mathbf{n}_1 = \mathbf{n}_2 = \mathbf{2}$  a počet stupňů volnosti  $\mathbf{v} = \mathbf{2}$ .

Kritická hodnota  $\mathbf{t}(\mathbf{v})_p$  pro  $\mathbf{p}(0,05) = \mathbf{3,182}$ . (8)

## 5. Výsledky

### 5. 1. Tabulky

Tabulka 1: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicitované chloridem hlinitým

Koncentrace elicitoru (μmol)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
0,1	6	<b>0,226</b>	0,006	0,173	0,007	6,181
	24	0,122	0,026	0,173	0,007	1,245
	48	0,145	0,030	0,173	0,007	0,876
	168	0,107	0,018	0,135	0,006	1,429
1	6	0,102	0,010	0,173	0,007	5,828
	24	0,141	0,004	0,173	0,007	4,045
	48	0,151	0,027	0,173	0,007	0,779
	168	0,108	0,016	0,135	0,006	1,549
10	6	0,130	0,002	0,173	0,007	6,299
	24	0,189	0,017	0,173	0,007	0,891
	48	0,055	0,078	0,173	0,007	1,511
	168	0,171	0,025	0,135	0,006	1,406
100	6	0,208	0,026	0,173	0,007	1,334
	24	0,063	0,019	0,173	0,007	5,556
	48	0,125	0,021	0,173	0,007	2,141
	168	<b>0,255</b>	0,030	0,135	0,006	3,877

Zvýrazněné hodnoty obsahu flavonoidů jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly.

**Tabulka 2: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicitované chloridem chromitým**

Koncentrace elicitoru (μmol)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
0,1	6	0,108	0,013	0,173	0,007	4,494
	24	0,147	0,003	0,173	0,007	3,643
	48	0,080	0,015	0,173	0,007	5,654
	168	0,112	0,018	0,135	0,006	1,210
1	6	0,132	0,013	0,173	0,007	2,839
	24	<b>0,185</b>	0,021	0,173	0,007	3,576
	48	0,069	0,010	0,173	0,007	9,169
	168	<b>0,141</b>	0,028	0,135	0,006	3,222
10	6	0,091	0,002	0,173	0,007	11,884
	24	0,107	0,006	0,173	0,007	7,262
	48	0,120	0,033	0,173	0,007	1,576
	168	<b>0,144</b>	0,002	0,135	0,006	4,508
100	6	0,112	0,015	0,173	0,007	3,801
	24	0,093	0,001	0,173	0,007	12,063
	48	0,140	0,064	0,173	0,007	0,508
	168	<b>0,155</b>	0,008	0,135	0,006	4,122

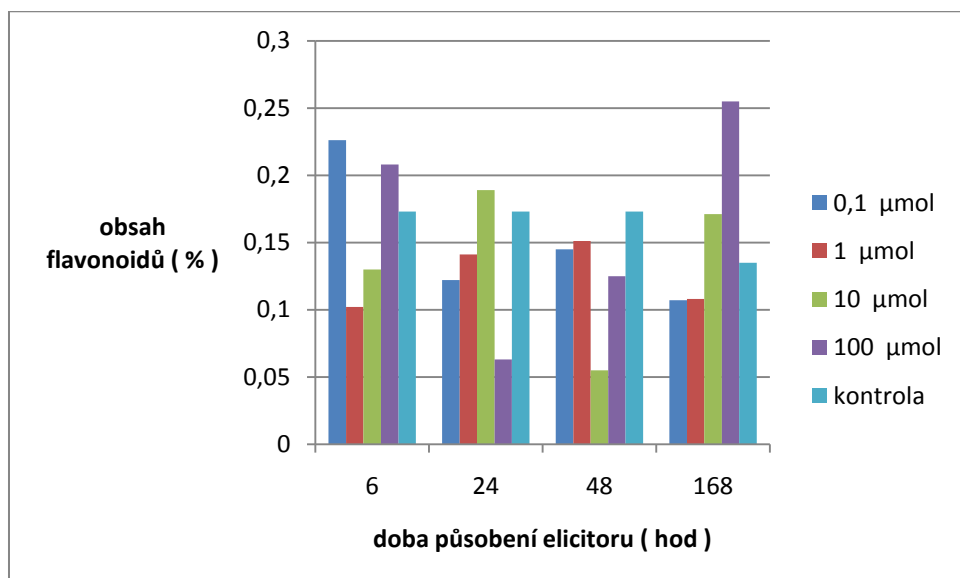
Zvýrazněné hodnoty obsahu flavonoidů jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly.

**Tabulka 3: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicítované chloridem hlinitým**

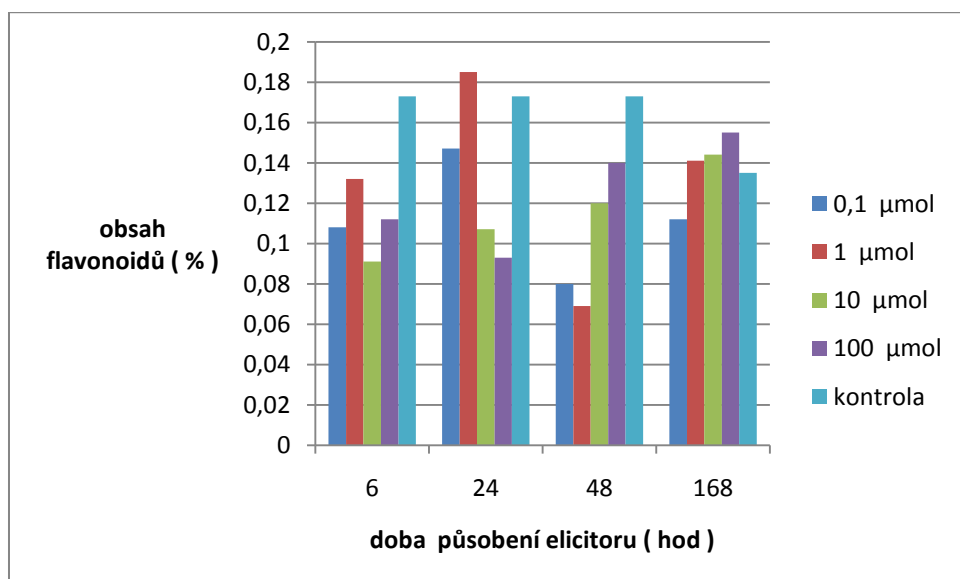
Koncentrace elicitoru ( $\mu\text{mol}$ )	Doba aplikace elicitoru (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)			
		genistin	daidzein	genistein	formononetin
0,1	6	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	48	-	-	-	-
	168	-	-	-	-
1	6	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	48	-	-	-	-
	168	-	-	-	-
10	6	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	48	-	-	-	-
	168	-	0,01	-	-
100	6	-	0,01	0,01	-
	24	-	0,01	-	-
	48	0,01	-	-	-
	168	0,01	-	-	-
kontrola	6	-	0,01	0,01	-
	24	-	0,01	0,01	-
	48	-	0,01	0,01	-
	168	-	0,01	0,01	0,01

## 5. 2. Grafy

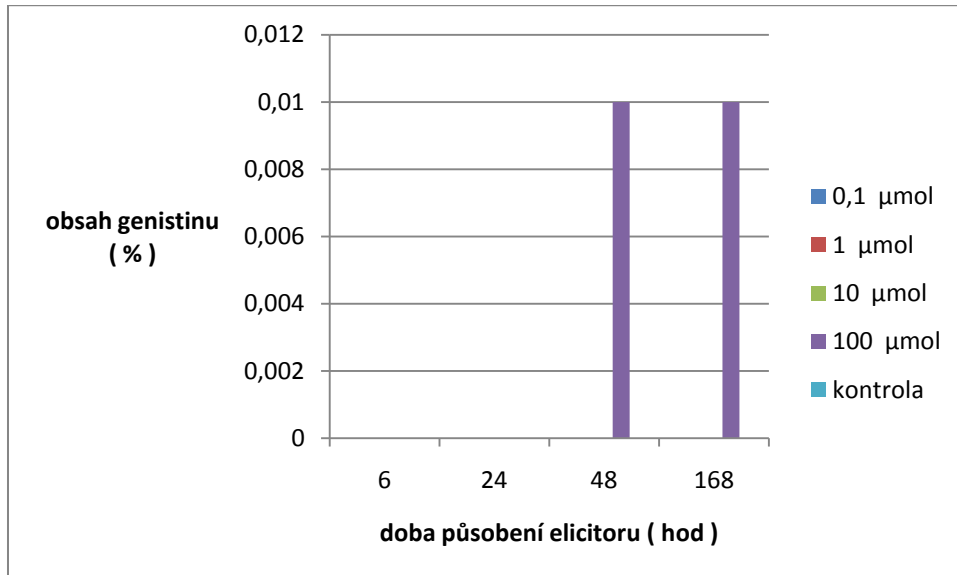
**Graf 1:** Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicítované chloridem hlinitým



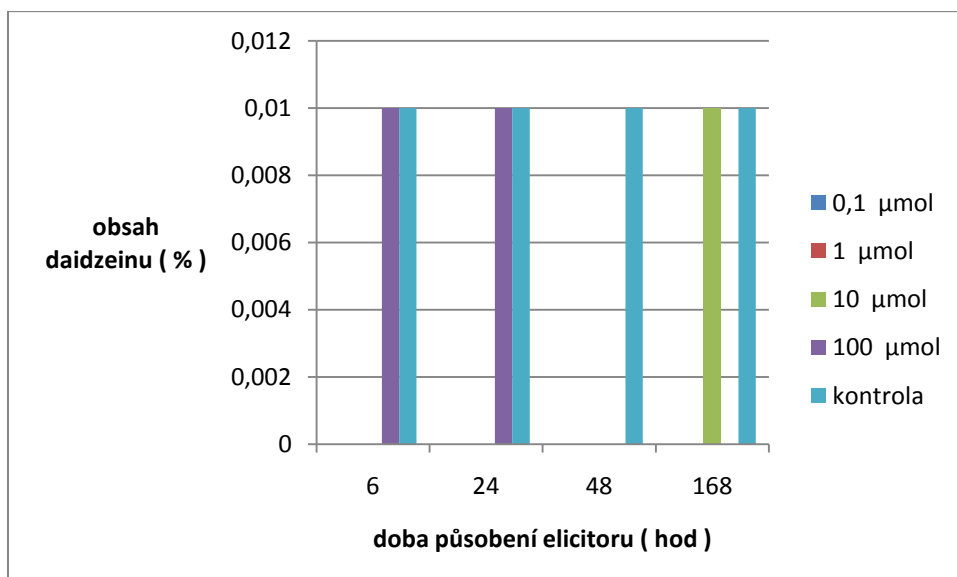
**Graf 2:** Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicítované chloridem chromitým



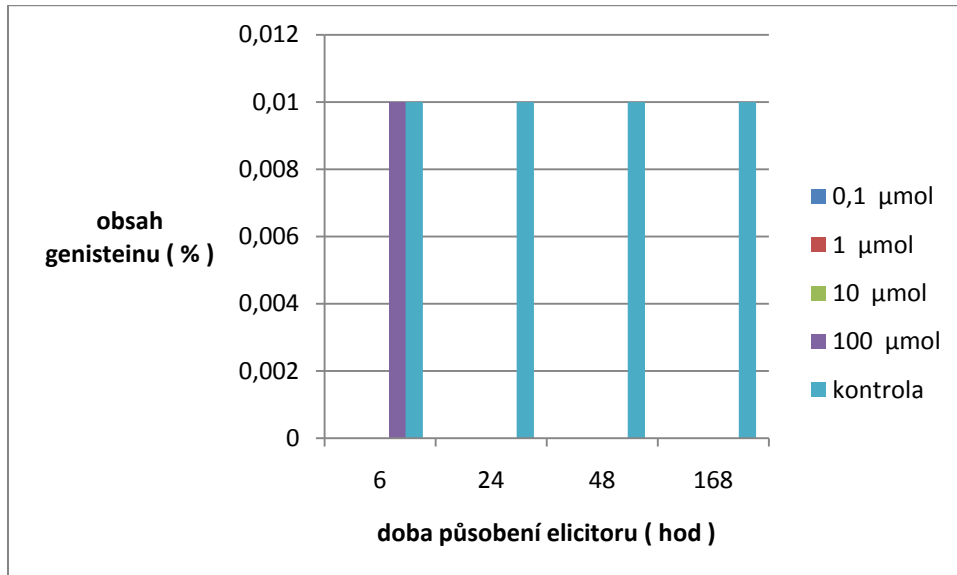
**Graf 3: Produkce isoflavonoidu genistinu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicítované chloridem hlinitým**



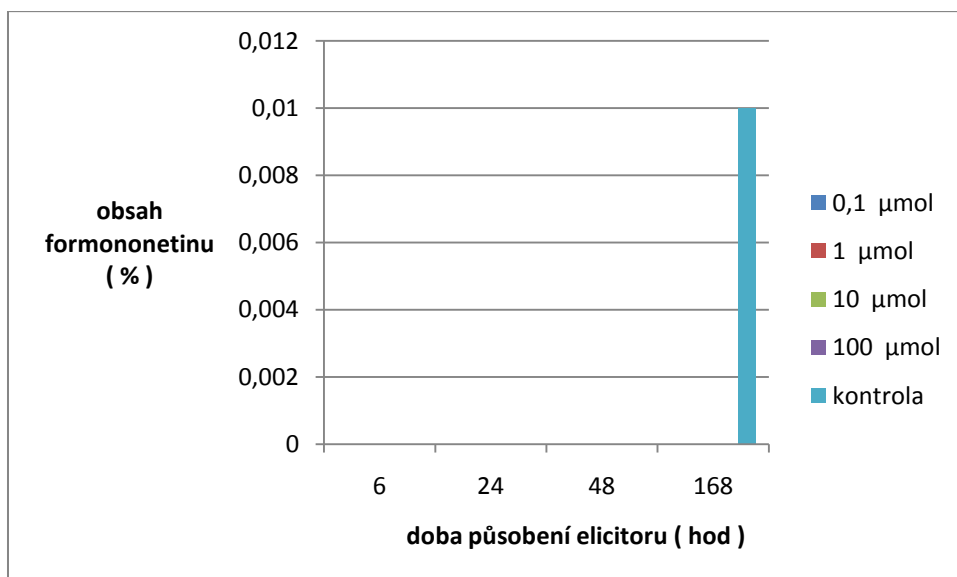
**Graf 4: Produkce isoflavonoidu daidzeinu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicítované chloridem hlinitým**



**Graf 5: Produkce isoflavonoidu genisteinu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicitované chloridem hlinitým**



**Graf 6: Produkce isoflavonoidu formononetinu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (DO-9) elicitované chloridem hlinitým**



## 6. Diskuse

Látky rostlinného původu nacházejí široké uplatnění v medicíně, kosmetice a potravinářství. Mezi významné látky sekundárního metabolismu patří flavonoidy a isoflavonoidy. S rostoucím významem těchto látek stoupá i potřeba hledat jejich alternativní zdroje. Vhodným zdrojem se jeví vedle intaktních rostlin i explantátové kultury rostlin.

Zatímco produkce sekundárních metabolitů rostlinami v podmínkách *in vivo* není konstantní, ale závisí na celé řadě faktorů, u kultur rostlinných explantátů *in vitro* lze volbou vhodných kultivačních podmínek produkci žádaných látek ovlivnit.

Jedním ze způsobů, jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů explantátovou kulturou rostlin, je využití metody elicitace. Tato metoda je založena na signálem (elicitorem) indukované expresi genů, což vede následně ke zvýšení syntézy sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro*. Příkladem abiotických elicitorů jsou soli těžkých kovů. (5, 10, 11, 18, 43)

V důsledku znečišťování životního prostředí se jak do ovzduší, tak do půdního roztoku uvolňují ionty těžkých kovů, které představují potenciální hrozbu různých suchozemských a vodních organismů. Vystavení rostlin vysoké koncentraci těžkých kovů má vliv na jejich růst a rozvoj. Dochází k fyziologickým změnám ve fotosyntéze, dýchání, enzymové aktivitě, k změnám v lipidové struktuře a distribuci makro a mikroelementů na buněčné úrovni. Výzkum, ale poukazuje i na skutečnost využití těžkých kovů jako abiotických faktorů. (80)

Hlinité a chromité ionty patří k abiotickým elicitorům ze skupiny těžkých kovů. Prokázalo se, že u řady suspenzních kultur mohou navodit zvýšení syntézy sekundárních metabolitů, jejich nevýhodou je však výrazné toxické působení na rostlinné buňky projevující se i útlumem produkce. Určitou roli může mít např. to, že  $Al^{3+}$  ionty a  $Cr^{3+}$  ionty (podobně jako většina ostatních trojmocných iontů) mohou být jedním z inhibitorů vápenatých kanálů, resp. vápenatých iontů, které pomáhají přenosu signálu produkovaného elicitorem přes membránu do buňky (75). To potvrdil např. experiment, kde po 20 minutové aplikaci 100  $\mu M$  roztoku hlinitých iontů došlo v kultuře *Secalece reale* L. k rychlému a dlouhodobému poklesu hladiny cytoplazmatického vápníku v buňkách až o 46 %. (76)

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv působení čtyř koncentrací chloridu hlinitého a chloridu chromitého v různých časových intervalech na produkci flavonoidů v explantátové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) a u elicitoru chloridu hlinitého



i na produkci isoflavonoidů (genistinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu) v téže kultuře. Použité koncentrace vodných roztoků elicitorů chloridu hlinitého a chloridu chromitého byly následující: 0,1 μmol, 1 μmol, 10 μmol, 100 μmol. (44, 45)

Sledované doby působení elicitoru (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po elicitaci explantátových kultur těžkými kovy. Vzorky kontrolních kultur byly odebírány po 6 a 168 hodinách, neboť produkce sekundárních metabolitů se v tak krátkých časových intervalech významně nemění. (5, 43, 46)

Z předcházejících pokusů (6) se jako nejvhodnější den pro elicitaci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. jeví 21. den subkultivace. Proto byla elicitace kultury provedena v tomto dni kultivace.

Z výsledků elicitace explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) chloridem hlinitým (tab. 1, graf 1) je patrné, že nejlepší elicitální účinky měla nejsilnější koncentrace elicitoru. Maximální produkce flavonoidů (0,255 %) byla zaznamenána při působení elicitoru o koncentraci 100 μmol po dobu 168 hodin, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 89 % oproti kontrole. Statisticky významné zvýšení obsahu flavonoidů bylo zaznamenáno také po 6hodinové aplikaci koncentrace 0,1 μmol. Ve zbývajících časových intervalech byla produkce ovlivněna již negativně. Podobně i další koncentrace elicitoru (1 μmol a 10 μmol) způsobily jen statisticky nevýznamné zvýšení (24hodinová a 168hodinová aplikace koncentrace 10 μmol) nebo pokles sledované produkce.

U explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicítované chloridem hlinitým byl metodou HPLC sledován také vliv na produkci isoflavonoidů genistinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu (tab. 3, grafy 3-6). Z údajů v tabulce a z grafů vyplývá, že tato elicitace chloridem hlinitým není pro ovlivnění produkce isoflavonoidů touto explantátovou kulturou vhodná, pouze v případě genistinu nejsilnější koncentrace elicitoru po 48hodinové a 168hodinové aplikaci jeho produkci stimulovala (v kontrolní kultuře nebyla přítomnost genistinu detekovaná).

Z výsledků elicitace explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) chloridem chromitým (tab. 2, graf 2) je zřejmé, že maximální obsah flavonoidů (0,185 %) byl zjištěn při působení elicitoru o koncentraci 1 μmol po dobu 24 hodin, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 7 %. Nejvyšší statisticky významné zvýšení produkce o 15 % oproti kontrole lze zaznamenat až po 168hodinovém působení nejsilnější koncentrace

100  $\mu\text{mol}$ , tedy stejně jako v případě elicitoru chloridu hlinitého. Také u koncentrací 1  $\mu\text{mol}$  a 10  $\mu\text{mol}$  nejdelší 168hodinová aplikace vyvolala statisticky významné zvýšení produkce. Nejslabší koncentrace elicitoru (0,1  $\mu\text{mol}$ ) ve všech sledovaných časových intervalech působila negativně.

Porovnáme-li oba použité elicitory (chlorid hlinitý a chlorid chromitý), zjistíme, že v obou případech byl nejlepší elicitační účinek zaznamenán po 168hodinovém působení nejsilnější koncentrace 100  $\mu\text{mol}$ , kdy došlo k statisticky významnému zvýšení produkce oproti kontrole. V případě chloridu hlinitého o 89 %, v případě chloridu chromitého o 15 %. Jako vhodnější elicitor se tedy jeví chlorid hlinitý.

Také v případě elicítace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. varieta Tempus roztokem chloridu hlinitého je zřejmé, že nejvyšších hodnot obsahu flavonoidů bylo dosaženo u všech sledovaných koncentrací elicitoru po jejich nejdelší aplikaci (168 hodin) a bylo tak zjištěno statisticky významné zvýšení produkce oproti kontrolní kultuře. Maximální obsah flavonoidů (0,276%) byl zaznamenán po aplikaci koncentrace 100  $\mu\text{mol}$  a 168hodinovém působení elicitoru, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 283 % v porovnání s kontrolní kulturou. (47)

Příkladem úspěšné abiotické elicítace hlinitými ionty může být také elicítace explantátové kultury *Rheum palmatum* L., kdy po 6hodinové aplikaci 100  $\mu\text{mol}$  koncentrace chloridu hlinitého bylo zjištěno maximální 60% zvýšení produkce anthracenových derivátů oproti kontrole (48). Pozitivní vliv hlinitých a kademnatých iontů na produkci sekundárních metabolitů byl zjištěn také u explantátové kultury *Ononis arvensis* L., kde byla stimulována akumulace flavonoidů. (43, 49)

Hlinité ionty byly též úspěšně použity u suspenzní kultury *Angelica archangelica* L., a to jak na růst buněk, tak i na produkci kumarinů v těchto buňkách. Kultury byly kultivovány ve tmě i na světle. Nejlepších výsledků bylo dosaženo ve tmě při použití hlinitých iontů koncentrace 1000  $\mu\text{mol}$ . Množství kumarinů se zvýšilo na 33% v médiu a 24% v buňkách oproti kontrole. Naopak při kultivaci za světla produkce kumarinů nebyla ionty hliníku zvýšena. (78)

Pozitivní vliv hlinitých iontů na produkci kolchicinu byl zjištěn u kořenové kultury *Gloriosa Superba*. Při použití koncentrace 125 mmol  $\text{AlCl}_3$  se zvýšil intracelulární obsah kolchicinů v kořenové kultuře na 63%. U této kultury byly použity i jiné elicitory, které dosáhly též dobrých výsledků, např. maximálního uvolnění kolchicinů do média bylo

získáno 10 mmol koncentrací CdCl<sub>2</sub>. Zatímco kasein, kvasinkový extrakt a nitráty stříbra nemají významný efekt na růst a akumulaci kolchicinů v kořenové kultuře *Gloriosa Superba*. (79)

Vysvětlení uvedených výsledků není jednoduché. Byly popsány různé mechanismy, jimiž reaguje rostlinná buňka na zvýšenou koncentraci kovových iontů ve svém prostředí. Může docházet např. ke zvýšení aktivity antioxidantních enzymů, vyšší tvorbě fytochelatinů, aminokyselin (např. cysteinu, histidinu), organických kyselin (např. kyseliny citronové, kyseliny jablečné) ale také i sekundárních metabolitů, čehož by se mohlo využít v podmínkách *in vitro* pro stimulaci sekundárního metabolismu. (77)

## 7. Závěr

Byly sledovány chlorid hlinitý a chlorid chromitý jako potenciální abiotické elicitory produkce flavonoidů a isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9). Dosažené výsledky lze shrnout následovně:

1. Nejlepší elicitální účinky byly zjištěny při působení chloridu hlinitého o koncentraci 100  $\mu\text{mol}$  po dobu 168 hodin, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů o 89 % oproti kontrole a kdy byl stanoven nejvyšší obsah flavonoidů (0,255 %).
2. Chlorid chromitý způsobil nejvyšší, statisticky významné zvýšení produkce flavonoidů o 15 % oproti kontrole po 168hodinovém působení koncentrace 100  $\mu\text{mol}$
3. V případě produkce flavonoidů byly u obou testovaných elicatorů zjištěny největší elicitální účinky shodně po 168hodinové aplikaci koncentrace 100  $\mu\text{mol}$ .
4. V případě produkce isoflavonoidů nebyla elicitace chloridem hlinitým úspěšná. Pouze v případě genistinu koncentrace elicatoru 100  $\mu\text{mol}$  po 48hodinové a 168hodinové aplikaci jeho produkci stimulovala (v kontrolní kultuře nebyla přítomnost genistinu detekovaná).

## 8. Seznam literatury

1. Kolektiv autorů: Český lékopis 2009, Praha, Grada, 2009, s. 114, 1801
2. Sikyta, B.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Univerzita Karlova, 1984, s. 86
3. Kamenická, A., Rypák, M.: Explantáty v rozmnožování dřevín, Bratislava, Veda, 1989, s. 31-45, 72
4. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: Exp. Cell Res., 1968, **50**, 151-158
5. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: Čes. Slov. Farm., 2007, **56**, 225-229
6. Kašparová, M. et al.: Čes. Slov. Farm., 2006, **55**, 44-47
7. Rijke, E. et al.: Anal. Chim. Acta, 2002, **468**, 3-11
8. Klemera, P., Klemmerová, V.: Základy aplikované statistiky pro studující farmacie, Praha, Karolinum, 1993, s. 30, 80
9. Vokurka, M., Hugo, J. et al.: Velký lékařský slovník, Praha, Jessenius, 2002, s. 32, 339, 378, 413, 828, 837, 866
10. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 2001, s. 75
11. Kováč, J.: Explantátové kultury, Olomouc, Univerzita Palackého, 1995, s. 1-3, 8-10, 13-18, 32, 33, 50-53, 57, 79-85
12. Landa, Z. et al.: Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění rostlin, Praha, Academia, 1980, s. 7
13. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 1992, s. 2, 9, 37, 84-97
14. Kincl, M., Faustus, L.: Základy fyziologie rostlin, Praha, SPN, 1978, s. 8, 71, 84-90, 103-107, 413
15. <http://www.galati.sk>, 19. 12. 2010
16. Dušek, J. et al.: Čes. Slov. Farm., 1996, **45**, 204-208
17. Novák, F. J.: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin, Praha, Academia, 1990, s. 11-57
18. Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin, Praha, Academia, 1998, s. 89-92, 241, 242, 424, 425
19. <http://www.agromanual.cz/atlas/vykladovy-slovník/fytoalexiny.html>, 12. 12. 2010
20. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie, 1989, **3**, 188-193
21. Angelova, Z., Georgie, S., Roos, W.: Biotechnol. Biotechnik., 2006, **2**, 20-27

22. [www.vuzv.cz/files/Publications/ISBN80-86555-63-1.pdf](http://www.vuzv.cz/files/Publications/ISBN80-86555-63-1.pdf), 16. 12. 2010
23. Jahodář, L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 1995, s. 30-45
24. Remy, H.: Anorganická chemie, II. Díl, Praha, SNTL, 1971, s. 151-154
25. Leonard, A. et al.: Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Industrial Pollutants, New York, Plenum, 1983, s. 78-82
26. Baker, A. J. M.: Plant Nutr., 1981, **3**, 643-651
27. Prasad, E. A. V., Vijayasaradhi, D.: Curr. Sci., 1984, **53**, 582-584
28. Vacík, J. et al.: Přehled středoškolské chemie, Praha, SPN, 1996, s. 202, 203
29. Bencko, V., Cikrt, M., Lener, J.: Toxické kovy v životním prostředí a pracovním prostředí člověka, Praha, Avicenum, 1995, s. 125-133
30. Maltais, K., Houde, M.: Physiol. Plant., 2002, **115**, 81-86
31. Horák, V., Dolejšová, J., Hejtmánková, A.: Rostlinná výroba, 1995, **41**, 239-242
32. Kawano, T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Com., 2003, **308**, 35-42
33. Winkel-Shirley, B.: Plant. Physiol., 2001, **126**, 485-493
34. Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Praha, Galén, 2007, s. 346
35. <http://www.sportvital.cz/zdravi/vyziva-a-zdravi/stopove-prvky/stopove-prvky-hlinik/>, 5.1. 2011
36. Klouda, P.: Moderní analytické metody, Ostrava, Pavel Klouda, 2003, s. 10, 25, 26
37. Karlíček, R. et al.: Analytická chemie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 2005, s. 267, 276, 281
38. Klimeš, J. et al.: Kontrola léčiv I., Praha, Karolinum, 2002, s. 29-33
39. Hudecová, T. et al.: Čes. Slov. Farm.: 2003, **52**, 55-67
40. Tůma, J., Tůmová, L.: Fyziologie rostlin, Hradec Králové, Gaudeamus, 1998, s. 203-219
41. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: Farmakognosie I., Praha, SPN, 1989, s. 13, 14
42. <http://www.onlineherbar.estranky.cz/clanky/bobovite/jetel-lucni.html>, 3. 1. 2011
43. Tůmová, L., Blažková, R. et al.: Čes. slov. Farm.: 2002, **51**, 44-47
44. Kartosentovo, S. et al.: Biotechnol. Zett., 2002, **24**, 687-692
45. Chakravarty, B. et al. : Ann. Bot, 1997, **79**, 487-495
46. Tůmová, L., Tůma, J., Staňková, J.: Herba Pol., 1999, **44**, 28-31
47. Klabanová, L.: Diplomová práce, UK Praha, FaF Hradec Králové, 2010

48. Kašparová, M., Siatka, T.: Čes. slov.Farm., 2004, **53**, 252-255
49. Tůmová, L., Poustková, J., Tůma, J.: Acta Pharm., 2001, **51**, 159-162
50. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K69.php>, 26. 2. 2011
51. <http://www.obrazky.cz/?q=jetel%20lucen&fulltext>, 26. 2. 2011
52. <http://rostliny.prirodou.cz/bobovite/jetel/jetel-lucni/>, 26. 2. 2011
53. Korbelář, J., Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství, Praha, Avicenum, 1981, s. 178-179
54. Slavík, B. et al.: Květena České republiky, Praha, Academia, 1995, s. 474-476
55. Pilát, A., Ušák, O.: Atlas rostlin, Praha, SPN, 1964, s. 108
56. Kresánek, J., Krejča, J.: Atlas léčivých rostlin a lesných plodov, Martin, Osveta, 1982, s. 192, 193
57. Gran, J., Jung, R., Münker, B.: Bobulovité užitkové a léčivé rostliny, Praha, Ikar, 1996, s. 102
58. Baloun, J., Beneš, K., Minařík, J.: Farmaceutická botanika, Praha, Avicenum, 1978, s. 15, 16
59. Beffa, M. T. D.: Luční květiny, Praha, Euromedia Group, 2001, s. 90
60. Antus, S., Gábor, M., Vetschera, K.: Flavonoids and Bioflavonoids, Budapest, Akadémiai Kiadó, 1995, s. 56-68, 95
61. Janča, J., Zentrich, J. A.: Herbář léčivých rostlin II. díl, Praha, Eminent, 1995, s. 144-147
62. <http://home.zf.jcu.cz/~dadalova/texty/flavon.htm>, 24. 2. 2011
63. <http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html>, 24. 2. 2011
64. Hubík, J., Dušek, J., Řezáčová, A., Štarhová, H.: Obecná farmakognosie II., Praha, SPN, 1986, 31-34
65. Macholán, L.: Sekundární metabolity, Brno, Masarykova universita, 2003, s. 76
66. <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin291/980113.html>, 25. 2. 2011
67. <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2004/01/05.pdf>, 25. 2. 2011
68. <http://edukafarm.cz/clanek.php?id=583>, 25. 2. 2011
69. Šatník, V., Ondřejová, M., Mika, K., Čunderlík, R.: Farmakognózia, Martin, Osveta, 2006, s. 45
70. [http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/docs/Compound/2-3-2\\_Isoflavonoidy.pdf](http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/docs/Compound/2-3-2_Isoflavonoidy.pdf), 25.2.2011
71. Deavours, B. E., Dixon, R. A.: PlantPhysiol., 2005, **138**, 2245-2251
72. [http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/isoflavonoidy\\_cz.html](http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/isoflavonoidy_cz.html), 27. 2. 2011

73. <http://faf.vfu.cz/html/txts/isoflav/biolakt.html>, 27. 2. 2011
74. <http://edukafarm.cz/clanek.php?id=618>, 27. 2. 2011
75. Pineros, M., Tester, M.: J. Exp. Bot., 1997, **48**, 551-558
76. Ma, Q., Rengel, Z., Kuo, J.: Ann. Bot., 2002, **89**, 241-249
77. Siatka, T. et al.: Čes. Slov. Farm., 2005, **54**, 47-51
78. Siatka, T., Kašparová, M.: Čes. Slov. Farm., 2010, **59**, 112–116
79. Ghosh, S., Ghosh, B., Jha, S.: Biotechnol. Lett., 2006, **28**, 497–503
80. Nasim, S., A., Dhir, B.: Rev. Envir. Cont. Toxicol., 2010, **203**, 139–149
81. Schützendübel, A., Polle, A.: J. Exp. Bot., 2002, **53**, 1351



## 9. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmakognosie

Kandidát: Adriana Dudová

Školitel: PharmDr. Marie Kašparová, PhD.

Název diplomové práce: **Explantátová kultura *Trifolium pratense* L.**

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv abiotických elicitorů chloridu hlinitého a chloridu chromitého na produkci flavonoidů, a u elicitoru chloridu hlinitého také isoflavonoidů, u explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9).

Kultury byly kultivovány při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma na živném médiu podle Gamborga s přídavkem 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2 mg.l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinu. Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky dle Českého lékopisu 2009. Obsah isoflavonoidů byl stanoven metodou HPLC.

Z výsledků elicítace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. chloridem hlinitým a chloridem chromitým je zřejmé, že maximální zvýšení produkce flavonoidů oproti kontrole vyvolala v obou případech 168hodinová aplikace koncentrace 100 μmol.

Byl sledován také obsah isoflavonoidů genistinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu při elicítaci explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) chloridem hlinitým. Tento elicitor nevykazuje příznivý vliv působení na produkci isoflavonoidů explantátovou kulturou, pouze v případě genistinu nejsilnější koncentrace elicitoru 100 μmol po 48hodinové a 168hodinové aplikaci jeho produkci stimulovala.

## Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Adriana Dudová

Supervisor: PharmDr. Marie Kašparová, PhD.

Title of Doctoral Thesis: **Explant Culture of *Trifolium pratense* L.**

The objective of this thesis was to observe the effect of the abiotic elicitors of aluminium chloride and chromium chloride on the production of flavonoids, as well as the effect of the aluminium chloride elicitor on the production of isoflavonoids in the *Trifolium pratense* L. exulant culture (variety DO-9).

The cultures were cultivated in the Gamborg nutrient media with the addition of 2 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2 mg.l<sup>-1</sup> of 6-benzylaminopurine, at the temperature of 25 °C, 16-hr light/8-hr dark period. The quantity of flavonoids was determined spectrophotometrically according to the Czech Pharmacopoeia 2009. The quantity of isoflavonoids was determined using HPLC.

The results of the elicitation of the *Trifolium pratense* L. suspension culture with aluminium chloride and chromium chloride show that the maximum increase in the flavonoid production compared to the control culture was evoked by the application of a 100 µmol concentration over a 168-hr period in both cases.

During elicitation of the *Trifolium pratense* L. exulant culture (variety DO-9) with aluminium chloride, quantities of isoflavonoids genistin, daidzein, genistein and formononetin were determined using HPLC. The elicitor did not display any positive effect on isoflavonoid production and was therefore declared unsuitable for this particular elicitation, only in the case of genistin, its production was stimulated by the highest concentration of the elicitor 100 µmol after a 48-hr and 168-hr application.