

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Vliv elicitace na produkci suspenzní kultury**  
*Trifolium pratense L.*

**Marie Zagorová**

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

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

Oponent: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

# Abstrakt

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakognozie**

**Kandidát:** Marie Zagórová

**Školitel:** PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Vliv elicítace na produkci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L.

Produkce sekundárních metabolitů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (jetel luční) je nízká, a proto je snaha ji zvýšit pomocí elicítace. Elicítace je metoda využívající obranných mechanismů rostlin ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinách i v kulturách *in vitro*. K endogenním signálním látkám rostlinných obranných reakcí patří také kyselina jasmonová, její prekurzory a deriváty. V případě exogenní aplikace mohou působit také jako elicitory.

V této diplomové práci byl sledován vliv kyseliny jasmonové a vliv kyseliny jasmonové v kombinaci s vápenatými ionty a verapamilem na produkci flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L.

Kultura byla kultivována při teplotě 25°C a světelné periodě 16 hodin světlo / 8 hodin tma na živném médiu podle Gamborga s přídatkem 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 2 mg.l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinu. Stanovení obsahu flavonoidů bylo provedeno spektrofotometricky podle ČL 2009 a stanovení isoflavonoidů HPLC metodou. Nejlepší elicitační účinek kyseliny jasmonové byl zjištěn po 24hodinové aplikaci koncentrace 500 μmol. Maximální stimulace elicítace extracelulárními vápenatými ionty se nejvíce projevila po 24hodinové aplikaci chloridu vápenatého o koncentraci 10 mmol. Přidání verapamilu snížilo produkci sledovaných metabolitů zablokováním vápníkového kanálu.

# Abstract

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacognosy**

**Candidate:** Marie Zagorová

**Supervisor:** PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

**Title of Thesis:** The Influence of Elicitation on the Production of Suspension Culture of *Trifolium pratense* L.

The production of secondary metabolites in the *Trifolium pratense* L. suspension culture (red clover) is low and therefore there was an attempt to increase it by elicitation. Elicitation is a method making use of protective mechanisms of plants to increase the production of secondary metabolites in plants and *in vitro* cultures. The jasmonic acid and its precursors and derivatives are some of the endogenous signal substances of the plants' defensive responses. In the exogenic application case, they may also function as elicitors.

This diploma thesis examined the effect of jasmonic acid and the effect of jasmonic acid in combination with calcium ions and verapamil on the production of flavonoids and isoflavonoids by the *Trifolium pratense* L. suspension culture. The culture was cultivated in Gamborg medium to which 2 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2 mg.l<sup>-1</sup> of 6-benzylaminopurine were added, at the temperature of 25°C, 16-hr light/8-hr dark period. The flavonoids were determined spectrophotometrically according to the Czech Pharmacopoeia 2009 and the isoflavonoids by the HPLC method. The best elicitation effect of the jasmonic acid was observed after the 24-hour application of the 500 µmol concentration. The stimulation of elicitation with extracellular calcium ions mostly took effect after the 24-hour application of the 10 mmol concentration CaCl<sub>2</sub>. An application of verapamil decreased production of secondary metabolites by blocking calcium channels.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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.“

Úvodem své diplomové práce bych chtěla poděkovat PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za vedení, cenné rady, podporu a pomoc v celém průběhu jejího zpracování.

# OBSAH

1	Úvod .....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Teoretická část .....	3
3.1	Jetel luční ( <i>Trifolium pratense</i> L., Fabaceae) .....	3
3.1.1	Botanický popis rostliny .....	3
3.1.2	Výskyt.....	4
3.1.3	Odrůdy .....	5
3.1.4	Sběr a použití drogy.....	5
3.1.5	Obsahové látky .....	6
3.1.5.1	Flavonoidy .....	6
3.1.5.2	Isoflavonoidy .....	9
3.1.6	Fytoestrogeny v léčbě menopauzálního syndromu .....	12
3.2	Explantátové kultury rostlin .....	14
3.2.1	Úvod a historie .....	14
3.2.2	Charakteristika.....	15
3.2.3	Základní termíny .....	15
3.2.4	Základní principy.....	16
3.2.5	Kultivace rostlinných kultur in vitro .....	18
3.2.5.1	Množení nepřímou organogenezí .....	18
3.2.5.2	Buněčné suspenzní kultury .....	19
3.2.5.3	Kultivační média pro suspenzní kultury .....	22
3.2.5.4	Růstové regulátory .....	24
3.2.6	Biotechnologické využití explantátových kultur.....	26
3.2.6.1	Tvorba sekundárních metabolitů .....	26
3.2.6.2	Šlechtění a rozmnožování rostlin.....	29
3.3	Elicitace .....	31
3.3.1	Elicitory .....	31
3.3.2	Signální transdukce elicitoru .....	32
3.3.3	Elicitace kyselinou jasmonovou .....	35
3.3.4	Elicitace vápenatými ionty .....	36
3.3.5	Elicitace kyselinou jasmonovou a vápenatými ionty .....	37
3.3.6	Elicitace verapamilem .....	38

4	Experimentální část .....	40
4.1	Použitý materiál, přístroje, pomůcky.....	40
4.1.1	Rostlinný materiál .....	40
4.1.2	Stanovení ztráty sušením.....	40
4.1.3	Chemikálie.....	40
4.1.4	Přístroje a pomůcky .....	41
5	Kultivace explantátové kultury.....	42
5.1.1	Kultivační nádoby a nástroje .....	42
5.1.2	Příprava živného média .....	42
5.1.3	Podmínky pasážování a kultivace .....	43
5.2	Elicitace .....	44
5.2.1	Příprava roztoků elicitoru .....	44
5.2.2	Elicitace a odběr kultur.....	44
5.3	Stanovení obsahu flavonoidů .....	45
5.3.1	Princip stanovení .....	45
5.3.2	Postup stanovení.....	45
5.4	Stanovení obsahu isoflavonoidů.....	46
5.4.1	Princip stanovení .....	46
5.4.2	Postup stanovení.....	46
5.5	Statistické vyhodnocení.....	48
6	Výsledky.....	50
6.1	Tabulky.....	50
6.2	Grafy.....	54
7	Diskuze .....	57
8	Závěr.....	61
9	Seznam literatury.....	62

# 1 ÚVOD

Člověk byl od samého počátku své existence nucen hledat v okolní přírodě rostliny použitelné jako potraviny. Mezi nimi nacházel i takové, po jejichž použití se dostavily určité účinky. Tlumily bolesti, vyvolávaly spánek nebo působily povzbudivě, projímavě, zvyšovaly sekreci potu apod. nebo působily i toxicky. Zatímco dříve převládalo přímé použití drog nebo z nich zhotovených přípravků, používají se dnes velmi často izolované čisté látky. Řada přírodních účinných látek se stala předlohou pro synteticky vyráběná léčiva, která se používají jako taková, nebo dochází k obměnám jejich struktury za účelem dosažení výhodnějších terapeutických vlastností. V důsledku velkého množství přírodních struktur, komplikované syntézy a časové i ekonomické náročnosti, není průmyslová výroba u velkého množství přírodních látek možná. V těchto případech zůstávají léčivé rostliny jediným využitelným zdrojem terapeuticky účinných látek.

Rostlinný materiál se pro další zpracování získává sběrem intaktních rostlin či z polních monokultur. Tyto metody mají ovšem řadu nedostatků, jako je možnost výskytu škůdců, chorob, sezónní sklizeň, závislost produkce na podnebí, počasí, teplotě, světle, půdních a vodních podmínkách atd. V závislosti na těchto faktorech může dojít ke změnám množství a poměrného zastoupení jednotlivých rostlinných metabolitů.

Tyto obtíže vedou k hledání alternativních způsobů získávání rostlinných metabolitů. Jednou z možností je využití biotechnologických metod založených na kultivaci rostlinných buněk a tkání. Jde o kultivaci *in vitro* rostlinných explantátů, kdy metabolity mohou být produkovány a kontrolovány za daných podmínek. Kultivace probíhá bez závislosti na přírodních podmínkách, produkováná biomasa je sterilní a vysoce homogenní. (60, 20)

Množství účinných látek (sekundárních metabolitů) získaných z explantátové kultury bývá bohužel oproti intaktní rostlině nižší. Jedním z efektivních způsobů zvýšení produkce sekundárních metabolitů je metoda elicítace. Využívá se zde vlastnosti rostlin a *in vitro* kultur reagovat na různé stresové podněty kaskádou obranných reakcí s následným zvýšením produkce sekundárních metabolitů. (28)

V současnosti dochází díky širokému spektru biologických účinků ke vzrůstu zájmu o produkci flavonoidů a isoflavonoidů explantátovými kulturami. Vhodným zdrojem těchto látek se jeví jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*).

Problematikou vlivu elicítace kyselinou jasmonovou, chloridem vápenatým a verapamilem na explantátové kultury *Trifolium pratense* L. se zabývá tato diplomová práce.

## 2 CÍL PRÁCE

1. Seznámení se s metodikou kultivace a elicitace rostlinných tkáňových kultur *in vitro*
2. Sledování vlivu biotického elicitoru kyseliny jasmonové v kombinaci s vápenatými ionty a verapamilem na produkci flavonoidů a isoflavonoidů kulturou *Trifolium pratense* L.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

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

#### 3.1.1 Botanický popis rostliny

Jetel luční je vytrvalá (někdy jen krátce) bylina s dlouhým křovitým rozvětveným kořenem sahajícím i přes 60 cm hluboko do půdy. 15 – 100 cm vysoké četné lodyhy jsou vystoupavé až poléhavé, jednoduché nebo chudě větvené. Povrch lodyhy je bělavě chlupatý anebo je olysaly až téměř lysý, často načervenalý. Listy jsou trojčetné, spodní dlouze řapíkaté, prostřední a horní s krátkými řapíky až téměř přisedlé. Listy jsou složeny z obvejčitých až téměř okrouhlých lístků 1 – 5 cm dlouhých, celokrajných, obvykle na líci lysých, často s příčnou půlměsíčitou bělavou nebo červenohnědou skvrnou. Lístky jsou nezřetelně řapíkaté, s málo vyniklými žilkami.



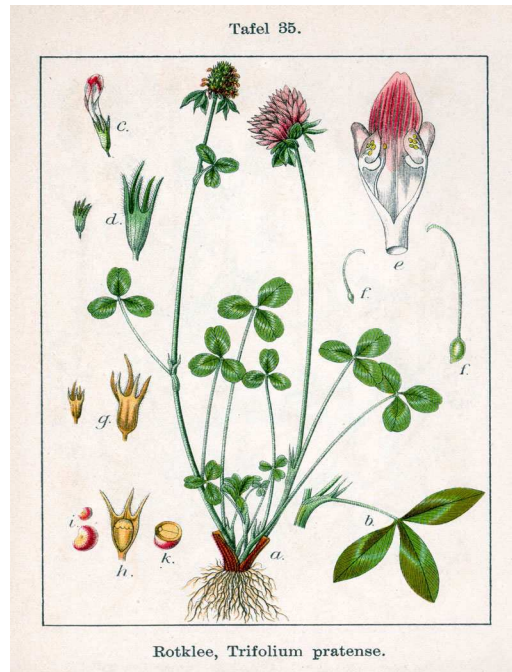
Obr. 1. Trojčetný list *Trifolium pratense*

Květy jetele lučního se uspořádávají do hlávek, které vyrůstají jednotlivě nebo po dvou zdánlivě na koncích lodyh a větví. Mají kulovitý tvar a jsou většinou přisedlé, podepřené palisty nejhořejších listů. Průměrná velikost hlávky je 2-3 cm. Každá hlávka je složena z 30-60 květů průměrně 16–18 mm dlouhých. Květy jsou přímé a přisedlé, pětičetné, vždy bez listenů, složeny z desetižilného kalichu, který je vně krátce chlupatý. Karmínová nebo červená (vzácně bílá) koruna má pavézu delší než člunek i křídla.



**Obr. 2.** Plně rozkvetlá hlávka *Trifolium pratense*

Plodem jsou lusky vejcovitého tvaru, v zobánek zúžené. Otvírají se víčkem. Semena jsou nesouměrně srdcovitá, poněkud zploštělá, 1,5–2,0 mm dlouhá, 1,2–1,5 mm široká, žlutá až pískově hnědá. *Trifolium pratense* L. kvete od května do října. (1,2,3,4,5)



**Obr. 3.** *Trifolium pratense*

### 3.1.2 Výskyt

*Trifolium pratense* L. je rozšířen téměř po celé Evropě, na východ zasahuje do západní Asie po Altaj, Bajkal a severní Indii. Zavlčený, zdomácnělý a pěstovaný je také ve východní Asii, v Severní i Jižní Americe, v Austrálii, na Novém Zélandu a v jižní Africe. Na Novém Zélandu a v Severní Americe zplněl. Tato bylina je pěstována na polích jako píce, roste na bohatých, suchých až mírně vlhkých půdách, především na loukách, stráních, na polích nebo okrajích cest a lesů. Je to rostlina poměrně přizpůsobivá, výborně se jí daří v nížinách, stejně

jako ve vyšších nadmořských výškách. (1,6)



Obr. 3. Výskyt *Trifolium pratense*

### 3.1.3 Odrůdy

V České republice rozeznáváme 3 poddruhy *Trifolium pratense* L., které bývají někdy hodnoceny jako odrůdy. Jsou to:

- *Trifolium pratense* subsp. **pratense** (*Jetel luční pravý*) – vyznačuje se hustě přitiskle chlupatými lodyhami a malými květenstvími. Využití této odrůdy je jako léčivka a roste pouze v nižších nadmořských výškách.
- *Trifolium pratense* subsp. **sativum** (*Jetel luční setý*) – tato odrůda se od ostatních odlišuje především příčnou skvrnou na lístcích a velkým květenstvím vyskytujícím se nezářídka po dvou. Jetel luční setý představuje jednu z nejvýznamnějších pícnin a také je významný zlepšováním kvality půdy.
- *Trifolium pratense* subsp. **americanum** (*Jetel luční americký*) – odlišuje se drsně odstále rezavě chlupatými lodyhami. Tento poddruh byl k nám dovezen ze Severní Ameriky v 80. letech 19. století, ale později se od jeho pěstování upustilo, protože ho dobytek odmítal. (1)

### 3.1.4 Sběr a použití drogy

Jako droga se používají sušené nerozpadlé květní hlávky – *Trifolium pratense* flos. Červeně či karmínově zbarvené květní hlávky otrháváme od května do srpna na začátku kvetení. Hlávky musí být čerstvě vykvetlé, plně rozkvetlé nebo odkvetlé jsou bezcenné, při sušení rychle hnědnou a rozpadávají se. Materiál sušíme ihned a rychle v tenkých vrstvách ve

stínu a průvanu. Sušíme-li hlávky uměle, teplota by neměla překročit 35 °C. Poměr seschnutí je u jetele 6:1. Hlavní podmínkou sušení je, aby hlávky zůstaly v celku a nebyly uvnitř suché.

Častým přehrabáváním se totiž hlávky snadno rozpadají a dávají bezcennou drť. Správně usušená droga si zachovává původní barvu, či trochu ztmavne, droga nesmí být ovšem rezavá. Droga podléhá poměrně rychle zkáze, proto ji při uchovávání chráníme před světlem a vlhkem. (7)

Jetel luční ve formě nálevu se používá jako antidiarhoikum. Blahodárně taky působí na horní cesty dýchací při kašli a bronchitidách. Zevně se droga používá jako kožní desinficiens na ekzémy a hnisavé rány.

Ve farmacii začal být používán začátkem dvacátého století na léčbu žilních onemocnění. Estrogenní aktivita byla objevena až roku 1950 a jako estrogenní látky byly identifikovány isoflavony formononetin, biochanin A, daidzein a genistein. Extrakty jetele lučního byly testovány na obsah a účinnost isoflavonů a bylo potvrzeno, že tyto látky mají schopnost vázat se na estrogenové receptory v lidském těle. Jako hormonálně nejaktivnější látka jetele lučního se ukázal **genistein**. Na základě mnoha humánních studií a klinických testů byly extrakty jetele lučního doporučeny jako prevence rakoviny prsu, kardiovaskulárních chorob a všech ostatních klimakterických obtíží. Bylo zjištěno, že tyto extrakty v některých případech významně snižují hladinu LDL cholesterolu v séru. (7,8)

### 3.1.5 Obsahové látky

V *Trifolium pratense* L. je široká škála obsahových látek. Patří mezi ně třísloviny, glykosidy (tricholin a isotricholin), flavonoidy, isoflavonoidy, saponiny, organické kyseliny (salicylová, šťavelová, kumarová, hroznová aj.), fenolické látky, silice, pryskyřice, tanin, bílkoviny, barviva, v listech asparagin a jiné aminokyseliny. Z hlediska terapeutického užití nejzajímavějšími látkami jsou isoflavonoidy. Mezi ně řadíme biochanin A a formononetin, které se vyskytují ve větší míře, dále pak genistein, genistin, daidzein, kumestrol, ononin a trifoliol. (7,9,10)

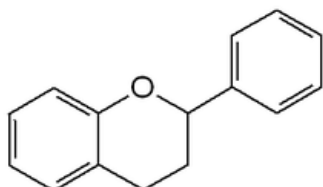
#### 3.1.5.1 Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů a patří mezi sekundární rostlinné metabolity. Jsou v rostlinné říši velmi rozšířeny, jedná se o ve vodě rozpustná barviva (především červená, modrá a purpurová) zodpovědná za barvu květů, plodů a někdy i listů. V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se

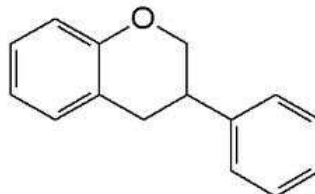
nacházejí další sloučeniny. (11,12)

### Chemická struktura

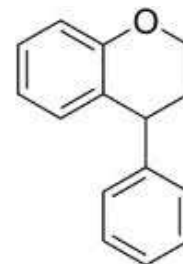
Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany).



Obr. 4. Flavan



Obr. 5. Isoflavan



Obr. 6. Neoflavan

Vyskytují se jen v rostlinné říši, a to nejčastěji flavany, řidčeji isoflavany. Neoflavany se vyskytují vzácně a nemají terapeutický význam.

Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavany dělí do několika skupin: flavany, flaveny, flavanoly, flavanonoly, flavandioly, flavony, flavonoly, katechiny, leukoanthokyanidiny a anthokyanidiny. Flavany jsou v přírodě hojně rozšířeny, v cévnatých rostlinách. Zvlášť významné jsou deriváty 4-oxoflavanu – flavony, flavonoly a flavanony, a katechinové třísloviny – deriváty flavanu. Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin. (13,14)

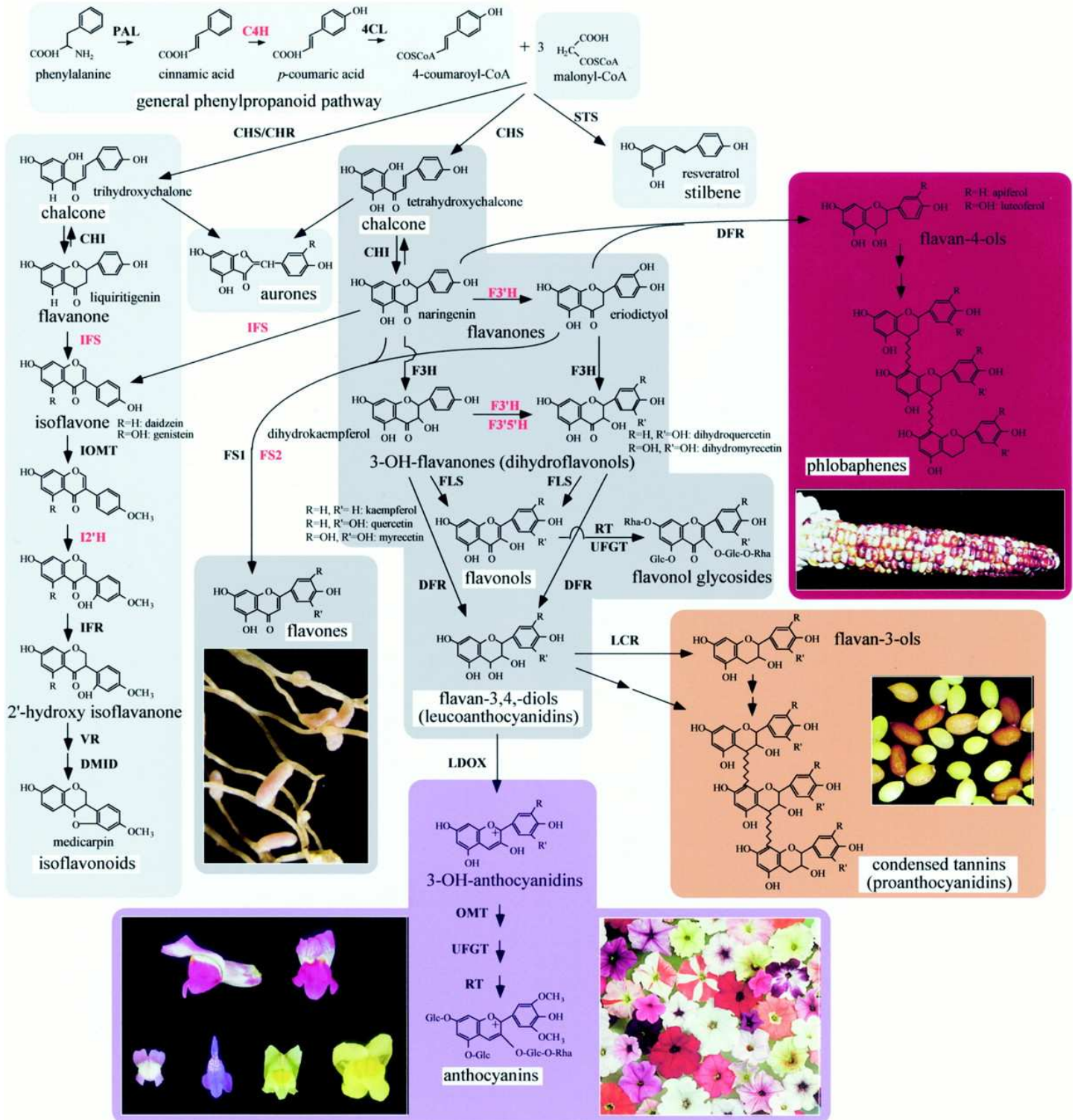
### Funkce v rostlinném organizmu

Kromě toho, že flavonoidy poskytují krásnou pigmentaci květů, plodů, semen a listů, mají také klíčovou roli v signalizaci mezi rostlinami a mikroby, v mužské plodnosti některých druhů, v obraně jako antimikrobiální látky a ochrana proti UV záření. (13)

### Biosyntéza

Aglykony flavonoidních glykosidů jsou produkty vznikající oběma cestami vedoucími k syntéze aromatických látek v biologických systémech. Jeden 6-uhlíkový fragment  $C_6-C_3-C_6$  sloučenin se odvozuje z acetátového metabolismu a zbývající 9-uhlíková část z kyseliny šikimové (fenylpropanoid). Jednotka  $C_6-C_3$ , patrně ve formě kyseliny skořicové, se spojuje se 3 molekulami acetátu za vytvoření meziprojektu z 15 C, chalkonu, z něhož vzniká potom flavanon. Flavanonony mají vztah k dalším skupinám flavanoidů, 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, dehydrogenace poloh 2 a 3 vede ke vzniku flavonolů. Glykosylace nastává v pozdním stadiu tvorby flavonoidu. (13,12)



Obr. 7. Biosyntéza flavonoidů

### **Biologická aktivita**

Flavonoidy, pro všestranné působení na organismus často nazývané jako bioflavonoidy, se v rostlinách vyskytují většinou glykosidně vázané, rozpuštěné v buněčné šťávě vakuoly. Methoxylované deriváty jsou lipofilní a vyskytují se v silicích. V živém rostlinném organismu se flavonoidy patrně účastní oxidačně redukčních pochodů.

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemorhagicky a antiedematosně (P-vitaminový účinek). Jsou inhibitory hyaluronidasy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi, jsou proto podpůrnými prostředky při léčení infekčních nemocí. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S ionty dvojmocného vápníku tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C. Mají též vlastnosti choleretické, cholagogní a spasmolytické.

Účinné jsou glykosidy i aglykony. Používají se v čistém stavu (rutin, hesperidin), častěji jako drogy nebo jejich extrakty. (13)

#### **3.1.5.2 Isoflavonoidy**

Isoflavonoidy patří stejně jako flavonoidy do rozsáhlé skupiny sekundárních rostlinných metabolitů. Funkce isoflavonoidů u rostlin je odlišná od úlohy isoflavonoidů u živočichů. Netýká se funkce rozmnožovací, ale u rostlin plní funkci ochrannou a obrannou. Posilují imunitu rostliny, mají antioxidační vlastnosti, chrání rostlinu před patogeny – mají vlastnosti antiparazitární, antivirové, antibakteriální a fungistatické. Brání tvorbě nových cév (angiogenezi). (16)

Přírodně se vyskytující isoflavonoidy jsou rostlinné metabolity s estrogení aktivitou a společně s kumestany a lignany tak představují hlavní řadu aktuálně pozorovaných fytoestrogenů. Isoflavonoidy jsou nejvíce známými fytoestrogeny. Estrogení účinky isoflavonoidů byly poprvé pozorovány roku 1940 u australských ovcí, které trpěly tzv. „jetelovou nemocí“. Ovce, které spásaly převážně jetelové pastviny, trpěly poruchami reprodukce, abnormální laktací, změnami pohlavních orgánů, permanentní neplodností, prolapsy uteru a velmi těžkými porody. Účinky *Trifolium pratense* na reprodukční systém samic jsou známy více než 60 let. Problémy této nemoci analyzoval a příčinu určil veterinář Henry Bennets již roku 1946. (8,15)

Isoflavony se primárně nacházejí v čeledi *Fabaceae* a to v sóji (*Glycine max*), arašídech

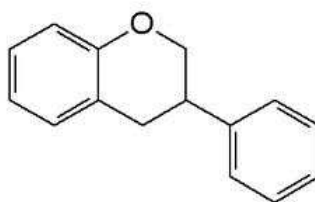
(*Arachis hypogaea* L.) a jeteli (*Trifolium spp.*). Sojové boby mají vysoký obsah formononetinu a biochaninu A. Jinými zdroji isoflavonoidů jsou olejnatá semena a ořechy, například slunečnicová semena (*Helianthus spp.*, *Asteraceae*) a vlašské ořechy (*Juglans nigra*, *Juglandaceae*). Vyskytují se taky v čeledích *Iridaceae* a *Euphorbiaceae*, ale primárně je získáváme ze sóji a jetele lučního.

Přírodně se vyskytující isoflavony, které vykazují estrogení aktivitu jsou: aglykony **daidzein** (4',7 – dihydroxyisoflavon) a **genistein** (4',5,7 – trihydroxyisoflavon), glykosidy **daidzin** a **genistin** a 4'-methylethery daidzeinu a genisteinu **biochanin A** a **formononetin**. V rostlině se tyto látky často nachází ve formě glykosidů, které během zpracování, izolace a analýzy jsou chemicky či enzymaticky degradovány na aglykony. Potom co savci sní isoflavonoidy, daidzein a genistein jsou metabolizovány v gastrointestinálním traktu. Biochanin A a formononetin jsou metabolizovány na genistein a daidzein. (8)

Typickým isoflavonoidem jetele je formononetin. Ten je sice sám o sobě neúčinný, ale působením střevní mikroflóry se postupně mění na daidzein, dihydrodaidzein a equol. Až poslední jmenovaná látka je účinným fytoestrogenem, jako taková se v jeteli tedy nevyskytuje. Equol není metabolizován všemi organismy stejně. Různé způsoby transformace equolu mohou vysvětlovat variabilní výsledky fytoestrogenních studií. (15,8)

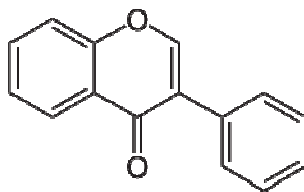
### Chemická struktura

Chemicky jsou isoflavonoidy deriváty **3 – fenylochromanu**.

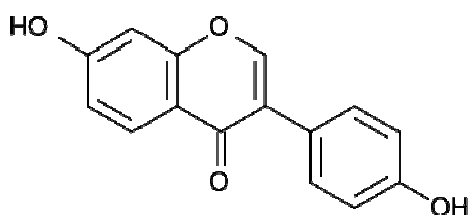


Obr. 8. Chemická struktura 3-fenylochromanu

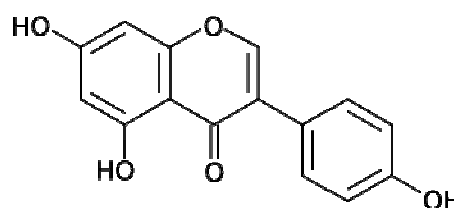
Rozlišujeme isoflavonoidy odvozené od 3-fenylchromanu, 3-fenylchromonu, 3-fenylchromenu, 2-arylbenzofuranu a flavonoidy s otevřeným pyranovým cyklem. Nejrozsáhlejší skupinou isoflavonoidů jsou **isoflavony** (3-fenylchromony), které tvoří nejvíce redukovanou formu isoflavonoidů.



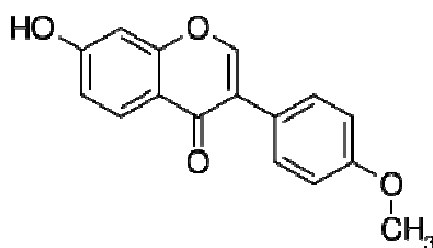
Obr. 9. Isoflavon



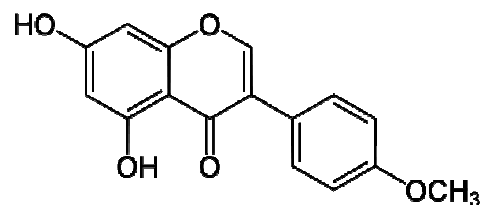
Obr. 10. Daidzein



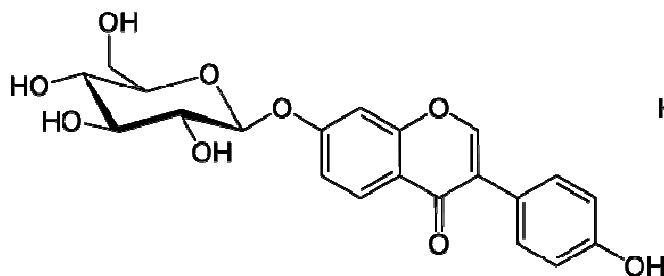
Obr. 11. Genistein



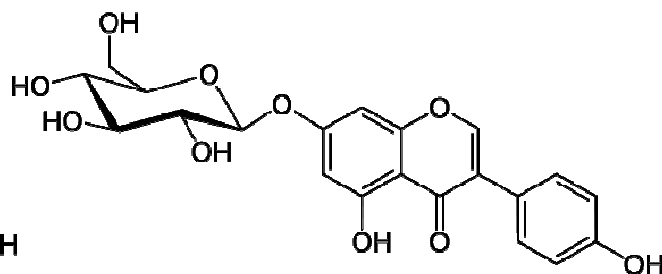
Obr. 12. Formononetin



Obr. 13. Biochanin A



Obr. 14. Daidzin



Obr. 15. Genistin

## **Biosyntéza**

Isoflavonoidy v rostlinách jsou syntetizovány v základu stejnou cestou jako flavonoidy (viz. obr. 7. biosyntéza flavonoidů, str. 8), tedy kondenzací polyacetátu a aromatických aminokyselin, které jsou syntetizovány biosyntetickou cestou kyseliny šikimové. Z běžných flavanonových meziproductů jsou syntetizovány migrací arylu katalyzovanou enzymem 2-hydroxyisoflavanonsyntázou (IFS). (17)

## **Biologická aktivita**

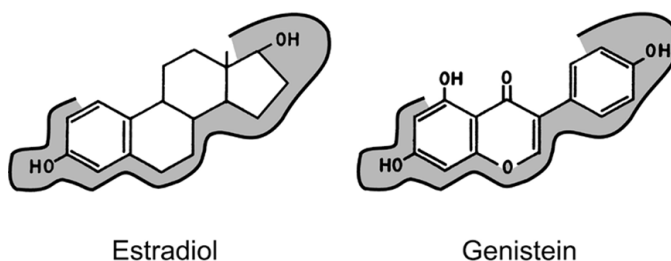
Jak již bylo zmíněno, isoflavonoidy jsou nejvýznamnější skupinou fytoestrogenů. Fytoestrogeny jsou látky přírodního původu, které strukturně a funkčně napodobují savčí estrogen a proto hrají důležitou úlohu v prevenci rakovin, srdečních onemocnění, menopauzálních symptomů a osteoporózy. Estrogeny mají vliv na vývoj a fungování ženských i mužských reprodukčních tkání, správnou funkci kostry a nervového systému, mají kardioprotektivní účinek na kardiovaskulární systém a chrání před rakovinou tlustého střeva a stárnutím kůže. (8)

### **3.1.6 Fytoestrogeny v léčbě menopauzálního syndromu**

Období perimenopauzy a postmenopauzy bývá u žen spojeno s různými potížemi, které se projevují jako klimakterický syndrom nebo estrogen deficitní metabolický syndrom. K typickým příznakům klimakterického syndromu, které mohou významně zhoršit kvalitu života, patří návaly horka, poruchy spánku, noční poty, změny nálad až depresivní stavy či poruchy kognitivních funkcí. K závažným a dlouholetým zdravotním problémům po přechodu patří pak zvýšené riziko osteoporózy a kardiovaskulárních onemocnění. K léčbě a zmírnění těchto obtíží je dlouhodobě používána hormonální terapie. Avšak i ta má své limity, a po zveřejnění výsledků rozsáhlých studií WHI (The Women's Health Initiative) a The Million Women Study, se stále více poukazuje na možná rizika hormonální terapie. Fytoestrogeny tak představují možnou alternativu k této léčbě. Užití fytoestrogenů je možné i ve fertilním období k úpravě menstruačního cyklu, ovlivnění primární dysmenorhey, mastodynie či premenstruačního syndromu.

Struktura a velikost molekuly podobné endogenním estrogenům umožňují exogenním estrogenům různé interakce s estrogenními receptory (ER). Podle okolností může být účinek fytoestrogenů agonistický nebo antagonistický. Afinita fytoestrogenů k alfa i beta estrogenovým receptorům (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) je až na výjimky 100 – 1000x nižší než afinita 17 $\beta$ -estradiolu. Fytoestrogeny obsazují převážně ER $\beta$ , jejichž exprese je vyšší např. v cévní

stěně, kostech, CNS i ledvinách. Agonistický účinek fytoestrogenů na ER $\beta$  spolu se slabou vazbou na ER $\alpha$  má příznivý účinek na kost, kardiovaskulární systém, lipidový metabolismus a rakovinu prsu. (16,18,19)



**Obr. 16. Porovnání struktur endogenních a exogenních estrogenů**

Existuje několik tříd fytoestrogenů: steroidní estrogeny, rozšířenější fenolické estrogeny, isoflavony, ligniny, kumestany, antrachinony, chalkony, flavony, prenylflavonoidy a saponiny. Příkladem steroidního estrogenu je estron, který se nachází v palmě *Elaeis guineensis*, nebo  $\beta$ -sitosterol nalezený ve většině rostlin. Pro efektivní vazbu na receptor je důležitý aromatický kruh a hydroxylová skupina. K vazbě na receptor jsou důležité také sterické a hydrofobní vlastnosti látky, stejně jako vodíková vazba mezi fenolickou hydroxylovou skupinou a vazebným místem receptoru. Rozdílnost aktivity jednotlivých látek mohou být dány právě odlišnostmi v chemické struktuře. V některých případech se fytoestrogeny stanou aktivními látkami až po metabolizaci v živočišném organismu. (8)

Výzkum v oblasti fytoestrogenů dramaticky vzrostl zejména v posledních několika letech, čemuž odpovídá množství publikací týkajících se této problematiky. Nicméně mnoho otázek zůstává stále nevyřešeno. Výzkum je nutné zaměřit zejména na hodnocení bezpečnosti fytoestrogenů na lidský organismus, prospěšných a škodlivých dávek, rozdílu v reakci na fytoestrogeny v závislosti na pohlaví, rozdílu mezi různými skupinami fytoestrogenů a lékových interakcí s jinými léky nebo potravními doplňky. Vzhledem k tomu, že fytoestrogeny jsou funkčně i strukturně velmi různorodá skupina látek, je jejich biologická aktivita také různorodá, a proto se mohou vyskytovat i takové účinky, které nejsou zatím prostudovány. Většina těchto účinků je pro naše zdraví prospěšná, ale byly pozorovány i nežádoucí účinky a proto je potřebný další výzkum k potvrzení těchto zjištění. Estrogenní sloučeniny a jejich účinky jsou komplexní a často i druhově specifické. Složitost fytoestrogenů naznačuje, že interpretace je nutné provést s opatrností. (8)

## 3.2 *Explantátové kultury rostlin*

### 3.2.1 Úvod a historie

Řada rostlinných látek je pro člověka nenahraditelná jako farmaka a požadavky na tyto látky rychle stoupají. Proto kromě zemědělské produkce jsou středem zájmu jiné alternativní zdroje. Jedním z těchto alternativních zdrojů je technika explantátových kultur rostlin. Rostliny musíme stále ještě považovat za dosud málo prozkoumanou zásobárnu farmaceutických látek. (20)

Kultury rostlinných explantátů *in vitro* datují svůj vznik prací Haberlandtovou (1902). Jeho značná autorita ovlivnila na poměrně dlouhou dobu počáteční vývoj: negativní výsledky Haberlandtových pokusů kultivovat vysoce diferencované buňky na médiích nepostačujícího složení a za neaxenických podmínek bohužel nevedly jeho následovníky k drastickým změnám materiálu, médií a podmínek kultivace, nýbrž naopak k celé řadě neúspěšných modifikací jeho pokusů. Teprve volba meristemických buněk místo buněk vysoce diferencovaných dala pozitivní výsledky: první Häningan (1904) a až dlouho po něm další (Dietrich 1924, Turkey 1933, La Rue 1936) úspěšně kultivovali rostlinná embrya. La Rue (1936) dosáhl jako první významného úspěchu tím, že při kultivaci jiné části rostliny – vegetačního vrcholu – získal výhony i kořeny. Neméně významného úspěchu dosáhl White (1936) tím, že získal dlouhodobě rostoucí kulturu izolovaných kořenových špiček. Rozhodujících výsledků dosáhli nezávisle na sobě tři autoři: Nobécourt (1937), Gautheret (1938) a White (1939). Prvním dvěma se podařilo volbou vhodného materiálu (pletiva účastnícího se na hojivých procesech v rostlině *in situ* – kambia) dosáhnout neomezeně rostoucích kalusových kultur, odvozených z explantátů mrkve. Třetí z nich, White, dosáhl neomezeného růstu tumorového pletiva z lodyžních segmentů hybridu *Nicotiana glauca* × *N. langsdorfii*. Pracemi těchto autorů byl splněn základní požadavek kladený na kulturu explantátů *in vitro*, totiž dosažení časově neomezeného růstu. Během poměrně dlouhého období, které následovalo, byly realizovány explantátové kultury nejrozmanitějších rostlinných druhů a pletiv. V tomto období byla uskutečněna rozsáhlá práce, týkající se zjišťování optimálních složení médií co do anorganické i organické složky. K dalším objevům již z pozdější doby patří získávání haploidů cestou kultivace prašníků *in vitro* a získávání rostlinných protoplastů cestou enzymatického rozrušení buněčné stěny. (21)

Explantátové kultury se využívají jak při šlechtění rostlin, tak při produkci rostlinných metabolitů. (20)

### 3.2.2 Charakteristika

Pojem „kultura rostlinných explantátů *in vitro*“ (explantátová kultura) znamená aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi experimentu to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostoru a kultivovat za více či méně definovaných podmínek. (21)

Hlavní výhodou explantátových kultur je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk, a z každé lze vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. Explantátové kultury umožňují též konzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin. Vegetativní množení rostlin v explantátových kulturách je možné díky **totipotenci** rostlinné buňky, což znamená, že i diferencované rostlinné buňky obsahují veškerý genetický materiál potřebný pro regeneraci celé rostliny. (20)

### 3.2.3 Základní termíny

**Explantátové kultury** – různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristemických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů

**Kultivace *in vitro*** – pěstování v podmínkách co nejúplněji definovatelných po stránce chemické i fyzikální, zabraňující nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organizmy a buňkami

**Intaktní rostlina** – původní rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách

**Primární explantát** – rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny

**Primární kultura** – kultura primárních explantátů

**Subkultivace, pasážování** – přenos celé kultury nebo její části do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat či zesílit růst po další subkultivační interval

**Subkultivační interval** – doba mezi jednotlivými přesazeními

**Kalus** – neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny, v přeneseném slova smyslu pletivo proliferující na povrchu nenádorových primárních explantátů, které jsou schopny proliferace

**Totipotence** – schopnost buňky vytvořit jakýkoliv typ buňky, který se v organismu vyskytuje. Každá totipotentní buňka obsahuje kompletní genetickou informaci pro celý organismus a má tuto jedinečnou schopnost diferenciaci.

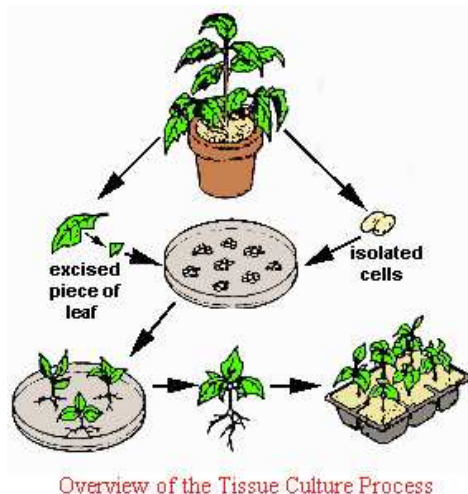
### 3.2.4 Základní principy

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 dceřiné 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 že jsou schopny dediferenciace a opětového dělení. Buňky diferencovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristematických. Proces diferenciaci je totiž založen na tzv. 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 meristematická buňka, ale i kterákoli jiná rostlinná buňka. 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.**

Ve svém principu zahrnují rostlinné explantátové kultury izolaci buněk, pletiv a orgánů a jejich kultivaci ve sterilních podmínkách řízeného prostředí (definovaná kultivační média, teplota, vlhkost, kvalita a kvantita světla). Vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, kořene, reprodukční části jako mikrospory, vajíčka, embrya, semena nebo spory, jakož i jednotlivé buňky a protoplasty mohou být krátkodobě kultivovány *in vitro* a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny. To umožňuje uskutečnění cyklu rostlina – explantát – kultura *in vitro* – organogeneze nebo embryogeneze – intaktní rostlina. (23,22)

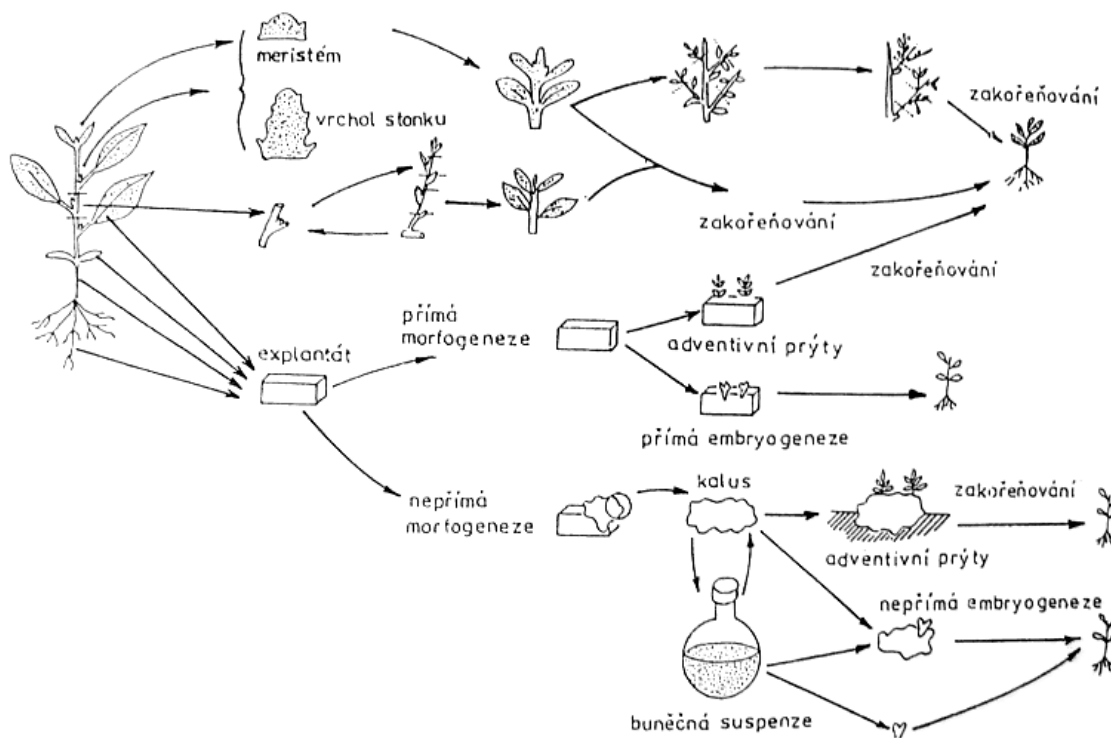


Obr. 17. Přehled procesu explantátových kultur

Diferenciace rostlin *in vitro* probíhá v těchto různých systémech:

- organizované struktury – meristémy a zygotická embrya,
- diferencovaná pletiva resp. komplexy pletiv,
- pletiva na různém stupni dediferenciace, zejména ve formě kalusu,
- izolované buňky a protoplasty. (24)

Jednou z možných oblastí využití explantátových kultur je vegetativní množení rostlin metodou tkáňových kultur, které se nazývá **mikropropagace**.



Obr. 18. Metody mikropropagace rostlin podle George a Sherringtona, 1984

Metody teoreticky použitelné k mikropropagaci jsou tyto (viz obr. 18.):

- množení rostlin indukci tvorby prýtů z axilárních (úžlabních) pupenů
- tvorba adventních prýtů nebo adventních somatických embryí buď:
  - přímou morfogenezi, při které výše uvedené struktury vznikají přímo na částech orgánů nebo pletiv
  - **nepřímou morfogenezi, kdy uvedené struktury vznikají z kalusového pletiva nebo v suspenzní kultuře.** (23,25)

### 3.2.5 Kultivace rostlinných kultur in vitro

Tato kapitola se zabývá poslední z uvedených metod množení a to nepřímou morfogenezi neboli taky **nepřímou organogenezi**.

#### 3.2.5.1 Množení nepřímou organogenezi

Tato metoda je charakteristická vznikem kořenů, stonků, popř. celých rostlin z neorganizovaného kalusového pletiva. Protože tyto orgány nevznikají z původního pletiva mateřské rostliny, označuje se tato organogeneze jako **nepřímá**. Množení probíhá v několika etapách:

##### a) Odvození kalusu

Kalus představuje soubor nediferencovaných buněk. U většiny dvouděložných bylin je možné odvodit kalus z různých explantátů jako např. ze segmentu listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, vzrostných vrcholů, embryí atd. U jednoděložných je výběr pletiv vhodných k odvození kalusu menší. Je možné použít embrya, velmi mladé listy, nodální segmenty stonků, popř. květní základy. Ještě problematičtější je odvození kalusu u dřevin.



Obr. 19. Kalus

Růst kalusu je ve většině případů indukován umístěním explantátu na médium

s relativně vysokou koncentrací auxinu (1-10 mg/l) v přítomnosti nižší koncentrace cytokininu. **Kalus může být použit k odvození suspenzní kultury v tekutém médiu jeho umístěním na třepačku.**

Hlavní výhodou suspenzních kultur je velmi rychlý růst buněk, což je způsobeno jejich lepším kontaktem s živným médiem. Z hlediska mikropropagace rostlin je nevýhodné, že kalusová kultura s opakovanými pasážemi ztrácí morfogenní schopnost a stoupá u ní pravděpodobnost genetických změn.

#### b) Organogeneze v kalusové kultuře

Vytvořený kalus resp. buňky suspenzní kultury jsou přeneseny na médium s nižší koncentrací auxinu a dochází k vytvoření orgánových základů. Významná je především produkce prýtlů, protože kořeny, které v kalusové kultuře vznikají, nemají většinou vaskulární spojení s prýty. Proto často musí následovat třetí fáze – zakořeňování. Je realizována buď ve sterilních podmínkách, nebo jsou prýty po aplikaci auxinu na jejich bázi přeneseny do nesterilního substrátu. (23, 25)

### 3.2.5.2 Buněčné suspenzní kultury

Buněčné suspenzní kultury rostlin představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujiícím se tekutém živném médiu. Použití tekutých médií umožňuje buňkám suspenze přímý kontakt s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou jim rychle přístupné. Snadný přístup živin a dobrá výměna dýchacích plynů v pohybujiícím se médiu umožňuje velmi rychlý růst buněčné suspenze.

Buněčné kultury se hojně využívají jako modelový systém při studiu procesů **sekundárního metabolismu**, indukci enzymů, genové exprese a jako výchozí materiál pro přípravu enzymů. Většina buněčných suspenzí v buňkách neobsahuje karotenoidy a chlorofyl, což je z hlediska izolace enzymů a sekundárních metabolitů velmi výhodné. Buněčné suspenzní kultury se také využívají jako výchozí materiál pro mutační šlechtění rostlin a k produkci somatických embryí.

Ideální buněčná suspenze je morfologicky a biochemicky homogenní. Při dlouhodobé kultivaci se však buněčná suspenze stává značně heterogenní. Heterogenita je způsobena genetickými změnami, které jsou v suspenzních kulturách poměrně časté. Ve staré buněčné suspenzi je možné např. kromě tvorby buněčných agregátů pozorovat i tvorbu protáhlých vakuolizovaných buněk, které se nedělí.

## **Metody kultivace buněčných suspenzí**

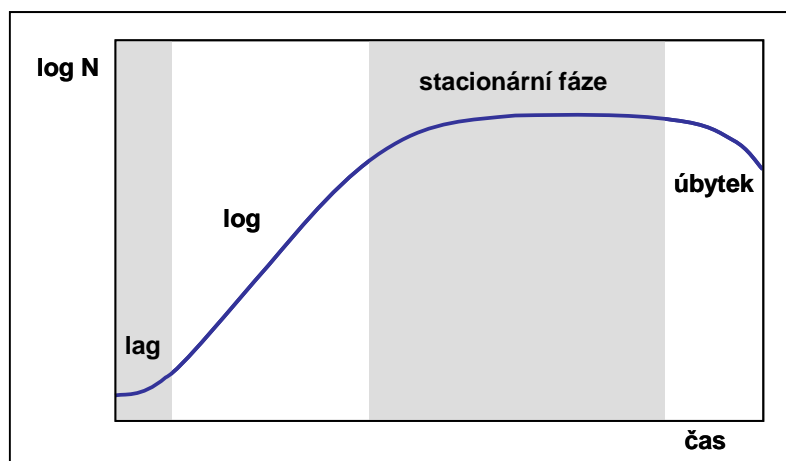
Pro získání suspenzní kultury je většinou nezbytné nejprve odvodit kalusové pletivo. Suspenze se snadno odvozuje z rozpadavého kalusu, nevhodný je kalus kompaktní. Kousky kalusu jsou potom kultivovány na tekutém médiu na třepačce nebo rolleru. K získání jednobuněčné suspenze se musí rostoucí kultura pravidelně filtrovat přes sítko o známé velikosti pórů.

Ke kultivaci buněčných suspenzí se používají různé kultivační systémy. Pro všechny je společné používání tekutých živných médií, která se pohybují. Pohybem média se dosahuje jeho 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. 100-500 ml Erlenmeyerovy baňky) na roller (v šikmé rovině se otáčející plocha) nebo na třepačku (pohyb baněk v horizontální rovině). Počet otáček rolleru je v závislosti na zařízení 1-10 otáček za minutu a u třepačky je to 30–150 ot/min při amplitudě výkyvu 2-5 cm. Při použití rolleru se mechanické separaci buněk napomáhá speciální úpravou kultivačních baněk (mají různé výstupky). Při kultivaci na rolleru nebo třepačce se kultivační nádoby naplňují médiem pouze z jedné pětiny až jedné čtvrtiny.

Pro kontinuální kultivace buněčných suspenzí se používají různé typy bioreaktorů. Pohyb média je zde zajišťován buď míchadlem, nebo probubláváním sterilního vzduchu. Nejmodernější bioreaktory mají mnoho automatických prvků, které zajišťují stálé složení živného roztoku, stálou hustotu buněčné suspenze (přebytek biomasy je odváděn z bioreaktoru), regulaci pH, stálou koncentraci plynů, umožňují monitorování růstu buněčné kultury atd. Nejčastěji používaná kapacita bioreaktorů pro rostlinné buněčné suspenze je 5-10 litrů.

## **Růst a pasážování suspenzních kultur**

Růst buněčné suspenze v uzavřeném systému – mění se podmínky kultivace (složení média, hustota buněčné suspenze atd.) lze charakterizovat tzv. růstovou křivkou. Růstovou křivku je možné získat tak, že se graficky znázorní závislost některé z růstových charakteristik suspenze (PCV, čerstvá hmotnost, počet buněk, sušina atd.) na čase.



Obr. 20. Růstová křivka buněčné suspenze.

Růst buněčné suspenze je v porovnání s růstem kalusu na pevném médiu mnohem rychlejší. Rychlý růst buněk způsobuje rychlé odčerpávání živin z kultivačního média a k zajištění stálého růstu je proto nutné buněčné suspenze poměrně často pasážovat na čerstvém médiu.

Pasážování je nutné provádět na konci exponenciální fáze růstu, která je charakteristická aktivním dělením a růstem buněk. V exponenciální fázi není růst buněk limitován exogenními faktory. Exponenciální fáze růstu je jednou z fází růstové křivky (v grafu označena **log**).

Průběh 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 exponenciálního růstu.

Délka doby mezi založením buněčné kultury a stacionární fází závisí na několika faktorech: na počáteční hustotě suspenze, době trvání lag fáze a růstové rychlosti buněčné linie (délce buněčného cyklu). Obvykle se počáteční hustota buněčné suspenze pohybuje mezi  $0,5-2,5 \cdot 10^5$  buněk/ml. Tato hustota se před nástupem stacionární fáze zvýší na  $1-4 \cdot 10^6$  buněk/ml. Tento nárůst počtu buněk odpovídá 4-6 dělením každé buňky inokula. Průměrná inkubační doba je potom 18-25 dní. Jestliže se buňky dělí velmi aktivně, inkubační doba se zkracuje na 6-9 dní.

Při použití velmi nízké počáteční hustoty buněk dochází k prodloužení lag fáze a exponenciální fáze. Pro klasická syntetická média je za kritickou počáteční hustotu suspenze považována hustota  $9-15 \cdot 10^3$  buněk/ml. Růst buněčné suspenze je při její malé počáteční hustotě možné stimulovat jejím „kontaktem“ s kulturou o vysoké hustotě buněk resp. s metabolity, které intenzivně se dělící buňky uvolňují do okolního média (tzv. **kondicionané médium**). Aktivně se dělící buňky totiž produkují doposud nedefinované substance, které

stimulují růst okolních buněk.

Pasážování buněčné suspenze se provádí tak, že se suspenze centrifuguje ve zkumavce při 200-1000xg (5 minut), supernatant se odpipetuje a sedimentované buňky se resuspendují v živném roztoku. Nová suspenze se scedí přes sterilní sítko (velikost pórů 250 µm), 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. (23)

### 3.2.5.3 Kultivační média pro suspenzní kultury

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin je **složení kultivačního média**.

Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: **makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny** nebo **další zdroj organického dusíku, sacharid(y), další nedefinované organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory**.

Existuje celá řada médií používaných pro různé druhy rostlin a pro různé účely kultivace. Mezi nejčastěji používaná média patří média, která popsali White (1963), Murashige and Skoog (MS, 1962), Gamborg et al. (B5, 1968), Gautheret (1942), Shenk and Hildebrandt (SH, 1968), Nitsch and Nitsch (1969) a Lloyd and McCown (1981). Media MS, SH a B5 jsou charakteristická vysokým obsahem makroelementů, zatímco ostatní média obsahují makroelementů podstatně méně.

#### Makroelementy

Makroelementy dodávané do kultivačních médií zahrnují šest nejdůležitějších prvků: **dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru**. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu.

Dusík se do média obvykle dodává ve formě nitrátů a amonných solí. Kultivační médium by mělo obsahovat přinejmenším 25-60 mM anorganického dusíku.

#### Mikroelementy

Mezi mikroelementy nezbytné pro růst tkáňových kultur rostlin patří **železo, mangan, zinek, bór, měď** a **molybden**. Do médií se také někdy dodává kobalt, jód, sodík a chlór, ale nemusí být pro růst explantátové kultury nezbytné.

## **Zdroj uhlíku**

Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána **sacharóza**. V některých případech je možné sacharózu nahradit glukózou či fruktózou.

## **Vitamíny**

Vitamíny jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi vitamíny nejčastěji používané v živných médiích patří **thiamin**, **kyselina nikotinová**, **pyridoxin** a **myo-inositol**.

**Thiamin** je pro růst tkáňových kultur nepostradatelných na rozdíl od ostatních. Myo-inositol se vyskytuje ve většině živných médií. Jedná se o disacharid, který nemusí být pro růst explantátů nezbytný, ale může tento růst stimulovat. Předpokládá se jeho účast na tvorbě fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, které hrají roli v buněčném dělení.

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

Aminokyseliny se dodávají do živných médií především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Aminokyseliny slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Dusík se v organické formě dodává do živných médií nejčastěji ve **směsi aminokyselin** (např. kasein hydrolyzát). Velmi často se používá také **L-glutamin**, **L-asparagin**, **glycin** a **adenin**.

## **Nedefinované organické složky médií**

Růst explantátové kultury je možné také stimulovat přidáním celé řady **organických extraktů** jako např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Z důvodu jejich nedefinovaného složení, je lepší pokud možno jejich použití vynechat. Nejčastěji používaný je **protein (kasein) hydrolyzát** a **kokosové mléko**.

Do médií se také někdy dodává **aktivní uhlí**, které může mít jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů. Má tři základní funkce v živném médiu: absorpce látek inhibujících růst, absorpce růstových regulátorů a ztmavnutí média.

### **Látky používané pro zpevnění média**

Nejčastěji se používá pro přípravu tuhých médií **agar**. Je stabilní při teplotách užívaných pro kultivaci. Tuhost agarového gelu je možné regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média.

Vedle agaru je možné používat ke zpevnění média také agarózu, Phytigel a Gerlite, které představují syntetické látky.

V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty „fixovat“ na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě (rockwool), perforovaném celofánu atd. (23)

### **Růstové regulátory**

O této skupině látek bude pojednáno v následující kapitole.

#### **3.2.5.4 Růstové regulátory**

Významnou součástí kultivačních médií explantátových kultur jsou růstové regulátory. Růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová.

Důkaz existence růstových látek provedl Went (1926) na koleoptili (blanitý obal zárodku jednoděložných rostlin, chránící prvotní vzrostný vrchol) trav, která splňuje podmínky pokusu, protože je složená ze stejných buněk, buňky jsou schopné intenzivního růstu a buněčné dělení v nich neprobíhá. Z pokusu vyplynul závěr, že existuje látka podporující růst buněk, tvořící se ve vrcholu koleoptile, pronikající bazipetálně a tím podporující růst subapikálních, středních a bazálních oblastí koleoptile. Může difundovat do agaru a odtud do dekapitovaného pahýlu koleoptile. Pohyb této látky je dán polaritou parenchymatických buněk koleoptile. (26)

Růstové regulátory se dělí na látky působící pozitivně na růst (stimulátory) a látky působící negativně na růst (inhibitory).

#### **Látky působící pozitivně na růst**

##### **AUXINY**

Mezi auxiny používané v tkáňových kulturách rostlin patří především **kyselina indolyloctová (IAA)**, **kyselina indolylmásečná (IBA)**, **kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D)** a **kyselina naftyloctová (NAA)**. IAA představuje **přirozený auxin**, ostatní jsou látky

**syntetické.** Různé druhy auxinů mají různou fyziologickou aktivitu, pohybují se různou rychlostí pletivy, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jsou jiným způsobem metabolisovány. Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především za účelem **stimulu růstu kalusu a buněk**, v některých případech k indukci tvorby prýtlů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu prýtlů.

#### CYTOKININY

Mezi cytokininy běžně používané v kultivačních médiích patří především **benzylaminopurin** (BAP, jinak benzyladenin BA), **6-dimethylaminopurin** (2iP či IPA), **furfurylaminopurin** (kinetin) a **zeatin**. Zeatin a 2iP jsou považovány za **přírodní** cytokininy, zatímco kinetin a BAP představují **syntetické** cytokininy. **Adenin**, další přírodně se vyskytující látka, má podobnou chemickou strukturu jako cytokininy a v některých případech také vykazuje cytokininovou aktivitu. Cytokininy se používají v kultivačních médiích za účelem **stimulace buněčného dělení**, a stimulace tvorby axilárních prýtlů.

Morfogenetická reakce v explantátové kultuře je značně závislá na vzájemném **poměru auxinu a cytokininu** v kultivačním médiu. Iniclace tvorby kořenů, embryogeneze a **iniciace tvorby kalusu** je stimulována, je-li poměr auxinu k cytokininu vysoký (**A>C**). Je-li tento poměr nízký, je indukována tvorba adventních či axilárních prýtlů. (23)

#### GIBERELINY

Tyto růstové látky byly izolovány z askomycety *Giberella fujikuroi*. Chemicky se jedná o diterpenické kyseliny; dnes je známých kolem 70 typů, z toho 20 u cévnatých rostlin. Nejúčinnější je **kyselina giberelová** o značená číslicí **3** (GBA 3). Většina explantátů jejich přítomnost pro svůj růst v médiu nevyžaduje, ale u některých druhů můžou stimulovat jejich růst. GBA 3 se přidává většinou do média za účelem **stimulace růstu buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, ke stimulaci růstu kalusu** a ke stimulaci růstu zakrslých rostlin.

#### **Látky působící negativně (inhibičně) na růst**

##### KYSELINA ABSCISOVÁ (DORMIN)

Chemickou podstatou se jedná o seskviterpenickou kyselinu. Je přirozeným inhibitorem všeobecně rozšířeným u krytosemenných rostlin. Stejně jako u gibelerinů většina explantátů její přítomnost pro svůj růst v médiu nevyžaduje. Abscisová kyselina se dodává za účelem **stimulace i inhibice růstu kalusu** (v závislosti na rostlinném druhu), **ke stimulaci proliferace prýtlů** a k **inhibici pozdějších fází embryogeneze**. (26, 23)

### 3.2.6 Biotechnologické využití explantátových kultur

Využití explantátových kultur je velmi široké. V zásadě je lze rozdělit na dvě oblasti. Jde o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami a problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin. (23)

#### 3.2.6.1 Tvorba sekundárních metabolitů

Rostliny mají schopnost z živin syntetizovat kromě nepostradatelných složek svého těla (aminokyselin, vitamínů, nukleových bazí atd.) i přepestrout paletu nejrozmanitějších látek, jejichž funkce není zřejmá, a jež jsou pro vlastní růst rostliny postradatelné. Označují se proto na rozdíl od primárních nepostradatelných metabolitů jako **sekundární metabolity** a metabolismus vedoucí k jejich vzniku z primárních metabolitů se nazývá metabolismus sekundární. Sekundární metabolity jsou specifické pro určitý biologický druh.

Velmi dobře známá a komerčně využívaná je produkce sekundárních metabolitů u mikroorganismů (např. produkce antibiotik). Intaktní rostliny produkují ve srovnání s mikroorganismy mnohem širší škálu sekundárních metabolitů, z nichž mnohé mají význam ve farmacii, potravinářství, kosmetickém průmyslu atd. Sekundární metabolity se většinou doposud získávají z intaktních rostlin, popř. chemickou syntézou. Hlavním problémem získávání žádaných látek z intaktních rostlin je to, že velká část druhů takto významných rostlin v současné době přichází o své životní prostředí a s jejich úbytkem a obtížností při pěstování roste i jejich cena. Další nevýhodou je velká závislost obsahu žádaných látek na klimatických podmínkách, na postupu sušení a skladování rostlin. Chemické syntézy jsou často obtížné a drahé a u složitějších látek zatím neuskutečnitelné. Konečný produkt chemických syntéz je také obvykle směsí izomerů, zatímco buňka produkuje stereoizomer.

Tkáňové kultury rostlin se mohou v průmyslové produkci sekundárních metabolitů uplatnit na několika úrovních. Předně je možné využít tkáňových kultur k vlastnímu množení rostlin významných z hlediska produkce sekundárních metabolitů. Pomocí tkáňových kultur je možné selektovat kultivary s vysokou produkcí sekundárních metabolitů. Po zjištění, že rostlinné tkáňové kultury mohou tyto látky produkovat také, byla a je snaha je využít stejně jako kultury mikroorganismů. Pro průmyslové využití tkáňových kultur jako nového zdroje sekundárních metabolitů je třeba, aby jejich produkce byla ekonomičtější než tradiční postupy získávání těchto látek.

Tkáňové kultury mají oproti tradičním způsobům získávání sekundárních metabolitů podstatné výhody:

- syntéza probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatu a půdních podmínkách
- produkčním systémem jsou vyloučeny negativní biologické vlivy (mikroorganismy, hmyz) v přírodě měnící produkci sekundárních metabolitů
- v tkáňové kultuře je možné selektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů
- automatizací řízení buněčného růstu a regulací metabolických procesů může klesat výrobní cena a stoupat produkce
- můžeme získávat nové látky v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk. Z explantátových kultur byly izolovány látky, které nebyly zjištěny v mateřských rostlinách, z nichž byly kultury odvozeny.

Syntézu a akumulaci sekundárních metabolitů je možné považovat za aspekt diferenciací, jev, který je charakterizován biochemicky, histochemicky a morfologicky. Bylo demonstrováno, že v rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se akumuluje malé množství sekundárních metabolitů, a že při procesech cytodiferenciací, buněčné agregace a morfologické organizace dochází ke zpomalení růstu, což přímo koreluje se vzestupem syntézy sekundárních metabolitů v tkáňové kultuře. Ukazuje se, že faktory zpomalující růst buněčných kultur působí také často stimulačně na produkci sekundárních metabolitů, především cestou omezení primárního metabolismu. Tento poznatek naznačuje určitý antagonismus primárního a sekundárního metabolismu, což na molekulární úrovni představuje rozdílné využívání společných prekurzorů. Za podmínek rychlého růstu a dělení jsou tyto látky využívány např. k syntéze proteinů, ale za podmínek inhibice růstu jsou tyto využity k syntéze sekundárních metabolitů (např. fenolů a alkaloidů). Stimulačně na produkci sekundárních metabolitů může působit i vliv určitého stresu – např. snížení koncentrace živin v živném roztoku, vynechání růstového regulátoru, nebo aplikace prekurzorů či tzv. elicitorů do média. Elicitory jsou sloučeniny biologického původu, které působí jako aktivátory enzymů v pletivech rostlin nebo stimulují syntézu těchto enzymů. Elicitory působí jako jakýsi stresový faktor vyvolávající obrannou odpověď založenou na produkci sekundárních metabolitů. Produkce sekundárních metabolitů může být vedle biotických elicitorů stimulována také elicitory abiotickými. Jako abiotické elicitory produkce sekundárních metabolitů může působit UV záření, chlad, vysoká teplota, soli těžkých kovů, změny pH, změny osmotického potenciálu atd. (23, 20)

Z explantátových kultur byla izolována řada farmaceuticky důležitých látek, které jsou uvedeny v **tab. 1**.

**Tab.1. Rostlinné sekundární metabolity, jejich použití a producenti.**

Sekundární metabolit	Účinek	Producent
Ajmalicin	vasodilatans	<i>Catharanthus roseus</i>
Antrachinony	meziprodukty pro syntézu kancerostatik	<i>Morinda citrifolia</i> , <i>Cassia tora</i>
Diosgenin	steroidní hormony	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Ginsenosidy	adjuvans, tonikum	<i>Panax ginseng</i>
Chinin	antimalarikum	<i>Cinchona ledgeriana</i>
Kodein	analgetikum	<i>Papaver somniferum</i>
Kofein	stimulans, kardiotonikum	<i>Camelia sinensis</i> , <i>Coffea arabica</i>
Morfin	analgetikum	<i>Papaver somniferum</i>
Reserpin	antihypertensivum	<i>Rauwolfia sp.</i>
Thebain	syntéza morfinových alkaloidů	<i>Papaver bracteatum</i>
Ubichinon-10	kardiotonikum	<i>Nicotiana tabacum</i>
Vinkristin	antileukemikum	<i>Catharanthus roseus</i>
Visnagin	kardiotonikum	<i>Ammi visnaga</i>

V explantátových kulturách se dosáhl vyšší obsah příslušné látky ve srovnání s matečnou rostlinou v několika případech (**tab. 2.**).

**Tab. 2. Některé produkty hromaděné v explantátových kulturách ve vyšších koncentracích než v matečné rostlině.**

Produkt	Druh rostliny	Tvorba buněk (% suché hmotnosti)	
		v kultuře buněk	v rostlině
Antrachinony	<i>Morinda citrifolia</i>	18	2,2
Ubichinon-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,04	0,003
Ajmalicin	<i>Catharanthus roseus</i>	1,8	0,8
Serpentin	<i>Catharanthus roseus</i>	1,8	0,8
Diosgenin	<i>Dioscorea deltoides</i>	2,2	2
Rosmarinová kyselina	<i>Coleus blumei</i>	25	3

I přes pokrok dosažený v oblasti rostlinné biotechnologie v produkci užitečných sekundárních metabolitů získané hodnoty stále v dostatečné míře nedosahují na úroveň komerční aplikace. Z velkého množství užitečných metabolitů získaných použitím tkáňových kultur dosáhlo širokého komerčního použití pouze malé množství látek. Patří sem shikonin z rostlinné kultury *Lithospermum erythrorhizon*, purpurin získaný z explantátové kultury *Rubia akane* a poměrně známý taxol, který se získává z kultury *Taxus cuspidata*. (20,27)

### 3.2.6.2 Šlechtění a rozmnožování rostlin

Komplex metod založený na kultivaci *in vitro* – explantátové kultury – představuje v současné době nový netradiční systém **šlechtění rostlin**. Šlechtitelská biotechnologie vychází mimo jiné z těchto základních principů:

Buněčná kultura je potenciálním zdrojem genetické variability, neboť rostlinné buňky *in vitro* jsou geneticky a chromozomálně nestabilní. Genetickou variabilitu lze pronikavě zvýšit při použití mutagenů v kultuře *in vitro*. Buněčné mutantní linie často neztrácejí totipotenci, což umožňuje získat výraznou genetickou proměnlivost i u rostlin regenerovaných *in vitro*.

Populace odvozená z haploidních buněk (např. pylových zrněk) zvyšuje pravděpodobnost zachycení recesivních mutací, které nejsou maskovány dominantními alelami.

Kultura organizovaných struktur rostlinného organismu (zárodků nebo meristémů) představuje systém udržení vysoké genetické stability materiálu. Kultivace organizovaných struktur, zejména meristémů, umožňuje hromadně množit geneticky identické potomstvo (klon) nepohlavní cestou.

Šlechtitelská práce se podstatně zefektivní tím, že se sníží prostorové nároky na velký rozsah rostlinného materiálu a podstatně se urychlí čas nutný k vyšlechtění a namnožení nového, výkonného kultivarů.

V průběhu 80. let 20. století se objevily nové perspektivy pro šlechtění rostlin, kdy byl podán přímý důkaz o tom, že systém nediferenciované buněčné a pletivové kultury je mimořádně vhodný pro rozšíření genetické proměnlivosti rostlin a že vytváří možnosti selektovat agronomicky významné vlastnosti na úrovni *in vitro*. Regenerace rostlin v kultuře *in vitro* a jejich převedení do podmínek běžného pěstování (skleníkové a polní kultury) umožnila analyzovat genetickou variabilitu systému *in vitro* na úrovni celého organismu s následným využitím ve šlechtění. Došlo tak k propojení genetického studia somatické buňky s klasickou mendelistickou hybridologickou analýzou. (24)

Následně jsou vyjmenovány další způsoby využití explantátových kultur:

Technika tkáňových kultur umožňuje kultivovat i rostlinné buňky zbavené buněčné stěny – tzv. **protoplasty**. Nepřítomnost buněčné stěny a zachování metabolické a funkční kapacity umožňuje studium transportu látek přes cytoplazmatickou membránu, studium biosyntéz spojených s regenerací buněčné stěny, dovoluje izolaci organel. Na protoplastových kulturách je možné sledovat proces obnovy buněčné stěny, inkorporovat do buněk větší částice – organely, molekuly nukleových kyselin a bílkovin. Je možné uměle zvýšit fúzi protoplastů, a tak získat cestou tzv. **somatické hybridizace** mezidruhově hybridy. Práce s rostlinnými protoplasty nalézají celý komplex zajímavých aplikací především v oblasti **šlechtění rostlin**. Izolované protoplasty mohou vzájemně fúzovat. Kultivují-li se za určitých podmínek protoplasty odvozené z různých rostlinných druhů, je možné jejich splynutím získat hybridní buňky, které mohou mít vlastnosti obou rodičovských buněk. Pouze u poměrně malého počtu rostlinných druhů se z fúzovaných protoplastů podařilo regenerovat celé rostliny. Klasickým příkladem somatického hybridu je např. kříženec rajčete a bramboru.

Objektem šlechtění rostlin jsou obvykle diploidní rostliny. Přítomnost genů v diploidním stavu genetickou a šlechtitelskou práci komplikuje. Aby se v tomto stavu mohla projevit jakákoliv mutace, musí být dominantní nebo dvojnásobně recesivní. K odvození haploidních rostlin se ve větší míře používají tzv. **prašňkové kultury**, kdy se jako výchozího explantátu používá izolovaných prašníků. Haploidní pletivo popř. haploidní rostliny potom vznikají z **mikrospor**.

Explantátové kultury mohou být využity k **ozdravování rostlin**, tzn. k produkci bezvirózních, popřípadě bakteriálních a houbových nákaz prostých rostlin. Řada bakteriálních a houbových infekcí je eliminována již při vlastním zakládání sterilní kultury. K eliminaci bakteriální infekce také dochází při kultivaci izolovaných meristémů, které postrádají cévní svazky, představující hlavní dráhu šíření řady rostlinných patogenů. Bakteriální kontaminaci explantátů je také možné eliminovat přidáním antibiotik do kultivačního média. Tohoto postupu se však vzhledem k toxickému působení antibiotik na buňky explantátu používá méně často, než jednodušších postupů povrchové sterilizace explantátu.

Explantátové kultury nacházejí rozsáhlé uplatnění v oblasti **uchovávání genofondu rostlinných druhů**, které jsou ohrožené vyhynutím v důsledku destrukce jejich přirozených stanovišť nebo rostlinných druhů, které jsou ekonomicky významné a je možné je množit pouze vegetativně.

Tkáňové kultury se komerčně v zemědělství využívají především k **mikropropagaci**.

Mikropropagace našla své uplatnění zejména v produkci okrasných druhů rostlin, ale je také využívána k množení ovocnářsky významných druhů rostlin a zeleniny. (23)

### 3.3 *Elicitace*

Produkce sekundárních metabolitů rostlinnými explantátovými kulturami čelí i přes čtyři desetiletí úsilí stále mnoha biologickým a biotechnologickým omezením. Jednou z hlavních překážek je nízká výtěžnost sekundárních metabolitů v těchto kulturách. Vzhledem k tomu, že hlavní rolí sekundárních metabolitů rostlin je chránit rostliny před útokem býložravců, hmyzu a patogenů nebo ochrana před dalšími biotickými či abiotickými stresory, byly na stejném principu vyvinuty strategie zlepšení výtěžnosti sekundárních metabolitů. Tyto strategie zahrnují využití různých elictorů, signálních sloučenin a abiotických stresorů. Mnohé takové zákroky skutečně účinně podporují tvorbu sekundárních metabolitů rostlin, a to jak *in vivo*, tak *in vitro*.

Zásada pro aktivaci sekundární metabolické biosyntézy je tato: extracelulární či intracelulární signál působí na receptory na povrchu plazmatické membrány nebo endomembrány. Tento stimul iniciuje transdukční signální kaskádu, která vede k aktivaci biosyntézy transkripčních faktorů. Ty regulují expresi genů, které jsou zapojené v sekundárním rostlinném metabolismu. (28)

#### 3.3.1 *Elicitory*

Elicitory jsou chemické látky nebo biofaktory pocházející z různých zdrojů, které mohou v cílovém organismu vyvolat fyziologické a morfologické odpovědi, např. akumulaci fytoalexinů (látky s antibakteriálním a antifungálním účinkem) i jiných sekundárních metabolitů a látek podílejících se na ochraně rostliny či explantátu.

Elicitory se dělí na **abiotické**, tzn. takové, které nemají biologický původ, např. ionty kovů nebo anorganické sloučeniny a **biotické** elicitory mající biologický původ. Pocházejí z hub, bakterií, virů, býložravců a rostlinné buněčné stěny. Patří sem také látky, které se uvolňují při napadení rostliny patogeny nebo býložravci.

Z patogenetického hlediska řada elictorů může působit jako avirulentní determinanty rostlinného genetického systému. Elicitory nebo avirulentní determinanty musí být nejprve rozpoznány rostlinnými receptory nebo R bílkovinami lokalizovanými na plazmatické membráně nebo cytoplazmě, aby mohlo dojít k iniciaci signálních drah, které vedou k obranným reakcím. Jedná se např. o syntézu příslušných proteinů nebo obranných

sekundárních metabolitů. Molekulární a fyzikální interakce mezi molekulami elicitoru a specifickými rostlinnými receptory jsou složité procesy, které jsou potřebné pro konkrétní specifickou signální transdukcí elicitoru. Díky těmto konformačním interakcím se mění nebo aktivují receptorové kinázy, a to dále způsobuje aktivaci příslušných efektorů elicitorů, jako jsou iontové kanály, G – proteiny, lipázy a kinázy. (28)

### 3.3.2 Signální transdukcí elicitoru

Navázáním elicitoru se aktivuje receptor, a díky tomu se dále aktivuje i efektor, který přenáší signál elicitoru a zesiluje následující obranné reakce. V elicitem indukované obranné odpovědi může postupně docházet k těmto uvedeným událostem:

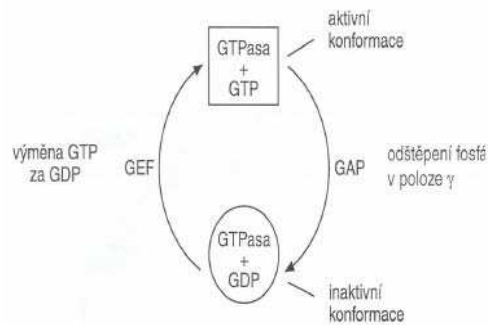
1. vazba elicitoru na receptor
2. reverzibilní fosforylace a defosforylace bílkovin cytoplazmatické membrány a cytoplazmy
3. zvýšení koncentrace cytosolických  $\text{Ca}^{2+}$  iontů
4. depolarizace plazmatické membrány
5.  $\text{Cl}^-$  a  $\text{K}^+$  eflux/  $\text{H}^+$  influx
6. extracelulární alkalizace a cytoplazmatická acidifikace
7. aktivace mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK)
8. aktivace NADPH oxidázy a produkce reaktivních forem kyslíku (ROS)
9. časná exprese obranných genů
10. produkce jasmonátů a etylenu
11. pozdní obranná reakce genové exprese
12. akumulace sekundárních metabolitů

Signální transdukcí elicitoru je vícekomponentní síť s různými sekvenčními reakcemi vytvořená za účelem efektivní obrany. Tato síť se skládá z paralelních nebo zkřížených signálních drah vedoucích k různým cílovým odpovědím. Signální dráhy elicitoru se mohou lišit ve vazbě různých signálních elicitorů nebo v cílové obranné reakci.

Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (označovaných také jako druzí poslové; *second messengers*). V signální transdukcí kaskádě se nacházejí vždy následující komponenty:

## GTP - vazebné proteiny (G – proteiny)

G–proteiny tvoří jednu třídu starověkých eukariotických proteinů, které zahrnují **heterotrimerický komplex** (skládající se z  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -podjednotky) a **monomerní** malý G-protein. Heterotrimerický G–protein se v rostlinách vyskytuje v menší míře než monomerní G-protein.



Obr. 21. GTP – vazebný protein (G–protein)

Rostoucí množství důkazů ukazuje, že G-proteiny regulují různé buněčné procesy týkající se růstu, vývoje, hormonální signalizace a obranné reakce. Některé studie ukázaly, že G-proteiny se mohou účastnit obranné rostlinné odpovědi pravděpodobně pomocí spojení s iontovými kanály a fosfolipázami. To následně vede k signální transdukční reakci jako je produkce sekundárních rostlinných metabolitů. Analýzy různých aktivátorů a inhibitorů G-proteinu naznačují, že G-proteiny jsou zapojeny do biosyntézy různých sekundárních metabolitů rostlin indukované elicitory. Příkladem takovýchto sekundárních metabolitů jsou isoflavonoidy v kultuře sóji, alkaloid benzofenantridin z kultury vlčího máku pocházejícího z Kalifornie, skoparon z kultury citrónu a  $\beta$ -thujaplicin v buněčné kultuře *Cupressus lusitanica*. (28, 29)

### Iontové toky a $\text{Ca}^{2+}$ signalizace

Elicitem indukované iontové toky jsou bezprostřední reakcí rostlinné buňky, která se vyskytne do 5 minut od podání elicitoru. I přes to, že není doposud úplně jasné, jak elicitor stimuluje iontový transport v rostlinné buňce, jsou pozorovány po podání avirulentních patogenů nebo elicitorů iontové toky jako  $\text{K}^+/\text{H}^+$  výměna,  $\text{Cl}^-$  eflux a  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Mezi těmito toky je nejvýznamnější  $\text{Ca}^{2+}$  influx, protože  $\text{Ca}^{2+}$  ionty jsou klíčovými druhými posly pro mnoho různých fyziologických změn a buněčných procesů.

### Acidifikace cytoplazmy

Alkalizace extracelulární tekutiny je jedna z prvních reakcí vyskytujících se v elicitorem

exponovaných kulturách rostlinných buněk. Alkalizace extracelulární tekutiny je výsledkem elicitorem indukované depolarizace plazmatické membrány a následné  $K^+/H^+$  výměny s  $Cl^-$  efluxem a  $Ca^{2+}$  influxem. Odpovídající acidifikace cytoplazmy byla pozorována jako doprovodný děj alkalizace extracelulární tekutiny. Acidifikace cytoplazmy je považována za zásadní krok v signální transdukcii, která vede k oxidativnímu vzplanutí a biosyntéze rostlinných sekundárních metabolitů.

### **Oxidativní vzplanutí a reaktivní formy kyslíku**

Další významnou událostí v obranné odpovědi rostlin je oxidativní vzplanutí (oxidative burst). Dochází k náhlému zvýšení koncentrace peroxidu vodíku a v menší míře i ostatních aktivních forem kyslíku. Reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species) – superoxid  $O_2^-$  a peroxid vodíku  $H_2O_2$  jsou toxické meziprodukty, které vznikají postupnou redukcí molekulárního  $O_2$ . Tvorba volných radikálů zpravidla začíná aktivací NADPH-oxidázy v plazmatické membráně. Současně také dochází k inhibici antioxidantních enzymů. Existují i další zdroje ROS v rostlinách, např. apoplastická peroxidáza a další oxidázy v mitochondriích, chloroplastech a peroxizomech.

### **Inositol-1,4,5- trifosfáty(IP3) a cyklické nukleotidy**

Elicitem indukovaná hydrolýza fosfoinositolu se vyskytuje v mnoha různých rostlinách. Jedna z významných reakcí je konverze fosfatidyl-4,5-bisfosfátu (PIP2) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) pomocí enzymu fosfolipázy C. IP3 mobilizuje  $Ca^{2+}$  ionty z intracelulárních kalciových zásobáren, např. endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu nebo vakuol.

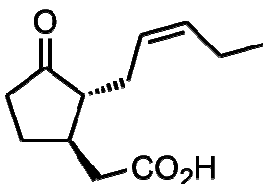
### **Jasmonová kaskáda**

Exogenní aplikace kyseliny jasmonové, příbuzných látek (např. methyljasmonátu) a také jejich konjugovaných sloučenin do buněčných rostlinných kultur nebo intaktních rostlin stimuluje biosyntézu sekundárních metabolitů. Indukce akumulace sekundárních metabolitů pomocí jasmonové kaskády se neomezuje jen na určité typy metabolitů, ale zahrnuje širokou škálu sekundárních metabolitů, např. terpenoidy, flavonoidy, alkaloidy, fenyylpropanoidy a mnoho jiných typů sekundárních metabolitů ve většině rostlin. Signální dráha kyseliny jasmonové je proto považována za nedílnou součást signální dráhy pro biosyntézu mnoha sekundárních rostlinných produktů. Také proto, že i mnoho dalších elictorů stimuluje endogenní biosyntézu kyseliny jasmonové v rostlinách, jsou jasmonové signální kaskády vnímány jako zprostředkovatelé signalizace elictoru, která vede k akumulaci sekundárních

rostlinných metabolitů. (28)

### 3.3.3 Elicitace kyselinou jasmonovou

Kyselina jasmonová dostala své jméno po prvním zdroji z vyšších rostlin, ze kterého byla izolována – z esenciálních olejů *Jasminum grandiflorum*. Dnes víme, že kyselina jasmonová (JA) a její metylester (MeJA) jsou obsaženy ve všech orgánech mnoha rostlinných druhů, a to v relativně vysokých množstvích (až desítky mikrogramů na gram čerstvé hmotnosti). Kyselina jasmonová je chemicky kyselina 3-oxo-2-(2'-cis-pentenyl)cyclopentan-1-octová. Aktivnější než kyselina jasmonová bývá její metylester, patrně díky své těkavosti a neschopnosti disociovat.



Obr. 22. Kyselina jasmonová

Nejdéle známým účinkem kyseliny jasmonové je urychlování stárnutí listových segmentů. Ve stárnoucích listech ječmene a dalších rostlin se akumuluje MeJA. Aplikace 0,1-1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  MeJA výrazně urychlí rozklad chlorofylu v listových segmentech, zvyšuje se dýchání ve tmě a urychluje se proteolýza. Retardační vlivy světla a cytokininů na stárnutí jsou MeJA anulovány. V některých případech je urychlení stárnutí způsobeno zvýšením tvorby etylenu po aplikaci kyseliny jasmonové či MeJA.

Kyselina jasmonová, podobně jako kyselina abscisová, má růstově inhibiční vlastnosti např. u listových pochev, hypokotylů apod. Brzdí kinetinem indukovaný růst kalusu sóji, inhibuje klíčení a růst kořenů, přestože obvykle aktivuje jejich iniciaci.

Nejvýznamnější úlohou JA je zřejmě její funkce jako signálu při reakci na dotyk (u rostlin s úponky), na patogeny nebo jejich elicitory (účinné látky) a na poranění. Ve všech těchto případech stoupá endogenní obsah JA či MeJA, které se šíří rostlinou a nesou informaci o působení vnějšího faktoru a zprostředkovávají reakci na něj. Tuto funkci může s výhodou zastávat MeJA, který díky své těkavosti může působit i jako plynný signál. Tak JA (MeJA) indukuje na transkripční úrovni syntézu některých proteinů, např. enzymu fenylalaninamoniaklyázy, který je klíčovým enzymem syntézy některých fenolických fytoalexinů, tj. rostlinných obranných látek, a dalších tzv. PR (pathogen-related) proteinů. Při poranění JA aktivuje též syntézu inhibitorů proteáz. (32, 33, 41)

Pozitivní elicitací účinek kyseliny jasmonové byl pozorován v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum*. Zde kyselina jasmonová indukovala zvýšenou produkci hypericinu a zvýšený růst buněk. Tento efekt se projevil u elicitace probíhající za tmy. (30)

Další rostlinou, kde byly pozorovány pozitivní účinky elicitace kyselinou jasmonovou je *Ginkgo biloba*. Působením methyljasmonátu se zvýšilo množství bilobadinu, ginkgolidu A a ginkgolidu B v této rostlině současně s mírným poklesem růstu buněk. (31)

Bylo také zkoumáno působení kyseliny jasmonové na sekundární metabolismus sazenic červeného jetele. Elicitací kyselinou jasmonovou v koncentraci 50  $\mu\text{M}$  po dobu 48 hod byla indukována produkce 4 sloučenin. Tyto sloučeniny byly izolovány a identifikovány jako klovamid, kafeoyltyrozin, p-kumaryl-3,4-dihydroxyfenylalanin a p-kumaryltyrozin. Nejhojněji zastoupený byl klovamid. Jeho koncentrace se začala zvedat po 24-36 hodinách od podání kyseliny jasmonové a dosáhla vrcholu po 96 hodinách. Indukce formace těchto látek byla pozorována i při koncentraci 5  $\mu\text{mol}$  kyseliny jasmonové. (34)

### 3.3.4 Elicitace vápenatými ionty

$\text{Ca}^{2+}$  je relativně velký dvojmocný kation. Velká jeho část se nachází v buněčných stěnách. Některé  $\text{Ca}^{2+}$  jsou spojeny s buněčnou stěnou, zatímco jiné jsou vyměnitelné na buněčných membránách. Kromě toho tyto ionty můžeme nalézt ve vysokých koncentracích v buněčných vakuolách. V některých tkáních jednotlivých rostlin  $\text{Ca}^{2+}$  ionty tvoří více než 10 % sušiny a přitom nejsou zřejmé jejich škodlivé účinky na růst rostliny. Rostliny potřebují  $\text{Ca}^{2+}$  k posílení buněčné stěny a poskytují ochranu proti stresu. Vápník má mimořádnou roli v předávání signálů. Po objevení kalmodulinu a dalších bílkovin vážících  $\text{Ca}^{2+}$  je vápník považován za významného posla při přenosu signálů v rostlinách. Bylo prokázáno, že ionty  $\text{Ca}^{2+}$  splňují všechna 4 kritéria, která jsou rozhodující pro identifikaci posla ve fyziologických procesech indukovaných primárními stimuly:

- Dochází k výrazným změnám v koncentraci cytosolového  $\text{Ca}^{2+}$  jakožto odpovědi na primární stimuly a tyto změny předcházejí vlastní fyziologické odpovědi.
- Uměle navozené změny v obsahu  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu vyvolávají fyziologickou reakci i bez působení primárního stimulu.
- Buňky mají mechanismy, jimiž reagují na změny v obsahu cytosolového  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Blokování změn obsahu  $\text{Ca}^{2+}$  zároveň blokuje fyziologické odpovědi na

příslušné podněty.

Obsah iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu je udržován v rozsahu od 0,1 do 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Jeho koncentrace v cytosolu svěřacích buněk se mění při působení kyseliny abscisové. Také vítr, mechanický pohyb, světlo, gravitace, zasolení, auxin, kyselina gibberelová a cytokininy vyvolávají rychlé změny koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu. Začíná proto převládat názor, že změny v obsahu  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu jsou jednou z prvních odpovědí na mnohé podněty. I když existují rozdíly mezi koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu a v jádře, bylo prokázáno, že změna koncentrace cytosolového  $\text{Ca}^{2+}$  se projevuje také změnou exprese genů. Přitom v závislosti na druhu podnětu i samotné buňky může se koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu zvýšit vtokem extracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  z buněčných stěn, uvolněním z intracelulárních zásob nebo kombinací obou těchto možností. Předpokládá se také interakce s inositol-1,4,5-trifosfátem a diacylglycerolem, jejichž účast v přenosu signálů je rovněž známa. Protože kalmodulin a další bílkoviny vážící  $\text{Ca}^{2+}$  jsou obsaženy také v jádře, chloroplastech a mitochondriích, předpokládá se, že i v těchto organelách plní  $\text{Ca}^{2+}$  úlohu posla zprostředkovávajícího regulaci genové exprese, oxidační fosforylace a fotosyntetické fixace  $\text{CO}_2$ . (35, 42)

Aplikace vápenatého ionoforu A23187, který obecně zvyšuje influx  $\text{Ca}^{2+}$ , zlepšil akumulaci fytoalexinů v buněčných kulturách *Allium cepa* L. a taky  $\beta$ -tujaplicinu v buněčných kulturách *Cupressus lusitanica*. Inhibitory vápenatých iontů (např. verapamil, který snižuje hladinu intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ ) potlačují produkci indolových alkaloidů v houbami elicitovaných buněčných kulturách *Catharanthus roseus* a  $\beta$ -tujaplicinu v kvasinkami elicitovaných buněčných kulturách *Cupressus lusitanica*. (36)

Přidání extracelulárních vápenatých iontů podporovalo taky akumulaci alkaloidů v buněčných kulturách *Coffea arabica*. (63) Podobně přidání vápenatých iontů zvýšilo produkci fytoalexinu, glyceollinu, v elicitorem indukované buněčné suspenzní kultuře *Glycine max*. (64)

### 3.3.5 Elicitace kyselinou jasmonovou a vápenatými ionty

$\text{Ca}^{2+}$  ionty a jasmonáty interagují při modulaci obranné reakce rostliny.  $\text{Ca}^{2+}$  hrají roli v biosyntéze jasmonátu. Inhibitory vápenatých iontů potlačují elicitory indukovanou lipoxygenázu (enzym zapojený do biosyntézy jasmonátu) např. v buněčných kulturách *Cupressus lusitanica*. V kulturách *Catharanthus roseus* bylo pozorováno zapojení  $\text{Ca}^{2+}$  influxu s methyljasmonátem na regulaci *Str* genu, který kóduje syntázu odpovědnou za produkci indolových alkaloidů obsažených v *Catharanthus roseus*. Studie ukazují, že influx

vápenatých iontů je potřebný pro biosyntézu jasmonátu a indukci dvou transkripčních faktorů ORCAs a CrBPF-1. (36)

Ve studii, kde byla sledována produkce ajmalicinu v suspenzní kultuře *Catharanthus roseus*, byla zkoumána interakce mezi ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a kyselinou jasmonovou. Tato suspenzní kultura byla elicitována devíti kombinacemi  $\text{CaCl}_2$  (3, 23 a 43 mmol) a methyljasmonátu (0,10 a 100  $\mu\text{mol}$ ) po šesti dnech růstu této kultury. Zvýšený influx  $\text{Ca}^{2+}$  díky působení extracelulárního  $\text{CaCl}_2$  potlačil produkci ajmalicinu v těchto kulturách. Nejvyšší produkce ajmalicinu (4,75 mg/l) byla pozorována, když buňky byly elicitovány nízkými dávkami vápníku (3mmol) v kombinaci s vysokými dávkami methyljasmonátu (100  $\mu\text{mol}$ ). (36)

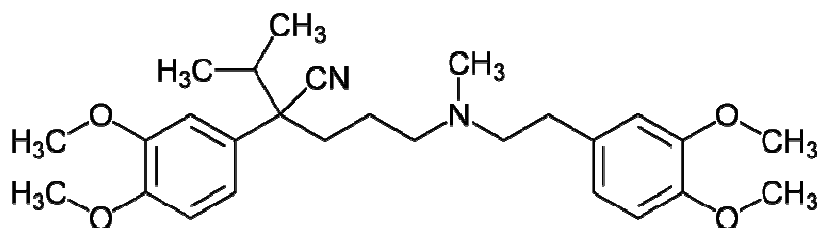
Přidáním  $\text{Ca}^{2+}$  chelatačního činidla EGTA (1,25 a 5 mmol) nebo inhibitoru vápníkových kanálů, např. verapamilu (1, 10 a 50  $\mu\text{mol}$ ) do MeJA-indukovaných (100  $\mu\text{mol}$ ) kultur došlo k inhibici produkce ajmalicinu po vyšších dávkách inhibitorů  $\text{Ca}^{2+}$ . (36)

### 3.3.6 Elicitace verapamilem

Blokátory kalciového kanálu jsou heterogenní skupinou látek, blokujících průnik  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk hladkého svalstva cév a myokardu. Platí pro ně, že mění kinetiku otevírání a zavírání kalciových kanálů (především typu L) buněčných membrán. Tento mechanismus vede k dilataci v systémovém i koronárním řečišti a k poklesu periferní cévní rezistence s následným poklesem krevního tlaku. Blokátory kalciového kanálu nevedou k poklesu krevního tlaku u normotoniců a neovlivňují hladiny reninu. Vedou k významné regresi hypertrofie levé srdeční komory. Nevyvolávají ortostatickou hypotenzi, nevedou k bronchokonstrikci a jsou metabolicky neutrální.

Blokátory kalciového kanálu můžeme rozdělit podle chemické struktury, vazby na vápníkové kanály, lipofility a specifického účinky do tří hlavních tříd – na fenylalkylaminy, dihydropyridiny a benzothiazepiny.

Nejvýznamnějším zástupcem první skupiny blokátorů vápníkového kanálu je verapamil, chemicky (+)-[3-[[2-(3,4-dimethoxyfenyl)ethyl]methylamino]propyl]-3,4-dimethoxy- $\alpha$ -(1-methylethyl)benzenacetonitril].



Obr. 23. Verapamil

Jeho syntéza vychází z nitrilu, který hydrogenací (na Raneyově niklu) v přítomnosti methylaminu poskytne fenetylaminový derivát. Jeho alkyací 1-brom-3-chlorpropanem se získá terciální amin. Nukleofilní substituce chloru v aminu aniontem vzniklým z 2-(3,4-dimethoxyfenyl)-3-methylbutannitrilu účinkem báze poskytne verapamil.

Verapamil působí přednostně na myokard. Jeho základní vlastností je zpomalení sinusového rytmu a snížení rychlosti vedení v převodním systému. Ve vyšších dávkách může verapamil vyvolat atrioventrikulární blokádu II.-III. stupně. Má větší negativně inotropní působení než diltiazem a nifedipin. Vazodilatační působení verapamilu se uplatňuje až při dávkování nad 240 mg denně.

V poslední době se zjistilo, že oba stereoizomery verapamilu se poněkud liší ve svém farmakologickém působení. (S)-(-)-Verapamil je specifickým antagonistou  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů, který se osvědčuje spíše při léčení srdečních arytmií a hypertenze, zatímco (R)-(+)-verapamil vykazuje širší spektrum účinků (ovlivňuje např. i sodíkové kanály) a je zřejmě vhodnější pro léčení anginy pectoris. (44, 45, 61, 62)

Přidání elicitoru odvozeného z plísně *Penicillium expansum* (PE-elicitor) nebo kalciového ionoforu A23187 k buněčné suspenzní kultuře *Sanguinaria canadensis* indukovalo tvorbu benzofenanthridinových alkaloidů, sanguinarinu a chelerythrinu. Aplikace EGTA nebo verapamilu před přidáním PE-elicitoru snížila akumulaci obou alkaloidů. (46)

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použitý materiál, přístroje, pomůcky

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

K veškerým experimentům v této práci byla použita tříletá suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (varieta DO 9).

#### 4.1.2 Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech (m/m). Do předem vysušené váženky byly odváženy asi 2,000 g explantátové kultury. Váženka s obsahem byla zvážena a sušena 2 hodiny v sušárně při 105 °C. Po vysušení a vychladnutí v exsikátoru byla 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. (37)

#### 4.1.3 Chemikálie

6–benzylaminopurin č., Lachema, Brno

dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno

dusičnan draselný *p.a.*, Lachema, Brno

edetan disodný č., Lachema, Brno

chlorid vápenatý *p.a.*, Lachema, Brno

jodid draselný *p.a.*, Lachema, Brno

kyselina 2,4–dichlorfenoxyoctová č., Lachema, Brno

kyselina boritá *p.a.*, Lachema, Brno

kyselina jasmonová *p.a.*, Sigma-Aldrich, Steinheim

kyselina mravenčí bezvodá *p.a.*, Lachema, Brno

kyselina nikotinová č., Lachema, Brno

kyselina octová bezvodá *p.a.*, Lachema, Brno

kyselina octová ledová *p.a.*, Lachema, Brno

kyselina št'avelová 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 hořečnatý *p.a.*, Lachema, Brno  
síran manganatý *p.a.*, Lachema, Brno  
síran med'natý *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 S, 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  
Roler, vývojové dílny AV ČR, Praha  
Třepačka Unimax, 2010, Heidolph  
Vodní lázeň KL – 1, Laboratorní přístroje, Praha  
Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge  
Kapalinový chromatograf Unican Crystal, Cambridge  
Kolona LiChrosper RP – 18 s předkolonkou, Merk, Darmstadt

## 5 KULTIVACE EXPLANTÁTOVÉ KULTURY

### 5.1.1 Kultivační nádoby a nástroje

Pro odvození a kultivaci explantátových kultur bylo použito nádobí z varného skla SIAL (materiál odolný vůči vodě, chemikáliím a rozdílům teplot), které vyhovuje požadavkům pro kultivaci tkáňových kultur. Kalusové kultury byly kultivovány na můstcích z filtračního papíru ve 100ml Erlenmayerových baňkách. Suspenzní kultury byly kultivovány ve 250 ml varných baňkách ze skla SIAL. Kovové pinzety, používané pro tento pokus, byly opláchnuty 96% ethanolem a po zabalení do hliníkové folie sterilizovány 2 hodiny při 200 °C v horkovzdušném sterilizátoru.

### 5.1.2 Příprava živného média

Pro kultivaci tkáňových kultur *Trifolium pratense* L. bylo použito živné médium podle Gamborga (B5) následujícího složení: (42)

KNO <sub>3</sub>	2 500,00 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>

Jako stimulátor růstu byla použita kombinace kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové (2 mg.l<sup>-1</sup>) s 6-benzylaminopurinem (2 mg.l<sup>-1</sup>). (38)

Jednotlivé substance byly naváženy na analytických vahách, v případě nízkých koncentrací pipetované ze zásobních roztoků. Všechny látky byly rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněné destilovanou vodou po značku. Až poté byly přidány růstové stimulatory. Živné médium bylo rozděleno po 25 ml do varných baněk. Baňky byly uzavřeny hliníkovou folií a sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

### 5.1.3 Podmínky pasážování a kultivace

Suspenzní kultura byla kultivována ve varných baňkách na médiu podle Gamborga na pomaloběžném roleru při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hod. světlo/8 hod. tma. Subkultivační interval byl 14 dní. (38) Pasážování kultur bylo provedeno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen minimálně 1 hodinu germicidní zářivkou. Po celou dobu pasážování byly zachovány přísné aseptické podmínky, bylo používáno sterilní sklo a nástroje.

## 5.2 *Elicitace*

### 5.2.1 Příprava roztoků elicitoru

U elicitoru **kyseliny jasmonové** byl připraven lihový roztok o koncentraci **500  $\mu\text{mol}$** .  
(38)

U roztoku **chloridu vápenatého** byly použity tři koncentrace:

Koncentrace I **0,1 mmol**

Koncentrace II **1,0 mmol**

Koncentrace III **10,0 mmol**

U roztoku **verapamilu** byly použity tyto tři následující koncentrace:

Koncentrace I **1,0  $\mu\text{mol}$**

Koncentrace II **10,0  $\mu\text{mol}$**

Koncentrace III **100,0  $\mu\text{mol}$**

### 5.2.2 Elicitace a odběr kultur

Elicitace suspenzní kultury byla prováděna kyselinou jasmonovou a rozdílnými koncentracemi chloridu vápenatého a verapamilu ve 21. dni kultivace. Všechny práce byly uskutečněny za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu.

Postup elicítace byl následovný:

Do 12 baněk s kulturami byl vždy napipetován 1,00 ml elicitoru kyseliny jasmonové o koncentraci 500  $\mu\text{mol}$ . Do dalších 12 baněk s kulturami byl napipetován vždy 1,00 ml chloridu vápenatého o koncentraci 10 mmol a do dalších 12 baněk byl vždy napipetován 1,00 ml verapamilu o koncentraci 100  $\mu\text{mol}$ .

K následujícímu pokusu bylo použito 72 baněk s kulturami. Přidávala se do nich vždy kombinace kyseliny jasmonové s třemi koncentracemi chloridu vápenatého nebo kombinace kyseliny jasmonové se třemi koncentracemi verapamilu.

Šest baněk bylo vyhrazeno pro vzorky kontrolní. Do nich nebyl napipetován žádný elicitor. Všechny 114 baněk bylo řádně označeno a pečlivě uzavřeno hliníkovou folií. Následovala kultivace za již zmíněných podmínek.

Ve všech pokusech byly elicítované kultury odebírány po 6, 24, 48 a 168 hodinách.

Odběry kontrolních vzorků byly provedeny po 6 a 168 hodinách.

U každého vzorku bylo provedeno stanovení flavonoidů dle ČL 2009 a stanovení isoflavonoidů pomocí HPLC.

## **5.3 Stanovení obsahu flavonoidů**

### **5.3.1 Princip stanovení**

Obsah flavonoidů se stanoví spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé. (37)

### **5.3.2 Postup stanovení**

#### **Základní roztok**

0,200 g – 0,400 g práškové suspenzní kultury se ve 250ml baňce smíchá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy ve 250ml baňce, přidá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje 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 100,0 ml a roztok se zfiltruje.

#### **Zkoušený roztok**

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

#### **Kontrolní roztok**

5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R (10 + 100)* a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R (10 + 100)* a promývací

tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>) se vypočítá podle vzorce:

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

v němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm;

M – hmotnost zkoušené kultury v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

## 5.4 Stanovení obsahu isoflavonoidů

Methanolové extrakty suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. byly zkoušeny na přítomnost isoflavonoidů. Stanovení daidzeinu, genisteinu, genistinu, formononetinu a biochaninu A bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí. (39)

### 5.4.1 Princip stanovení

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

### 5.4.2 Postup stanovení

#### Příprava vzorku

Asi 0,2000 – 0,4000 g upráškované kultury se ve 100ml baňce smíchá s 15 ml methanolu 80 % a extrahuje se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes malý chomáček vaty do 25ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku kultury ve 100ml baňce, přidá se 15 ml methanolu 80 % a extrahuje se ještě jednou 20 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky

a spojené extrakty se zředí methanolem 80 % na 25,0 ml. Roztok se převede přes mikrofiltr do vialek a analyzuje se metodou HPLC. Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

### **Parametry HPLC analýzy**

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

Kolona: Kolona LiChrospher RP-18 (250 x 4 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ) s ochrannou předkolumnou

Objem nástřiku: 20  $\mu\text{l}$

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

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

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

Standardy: genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A

Průtok: 1,1 ml/min.

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

## 5.5 Statistické vyhodnocení

Získané výsledky obsahu flavonoidů ve sledovaných kulturách *Trifolium pratense* L. byly statisticky vyhodnoceny na základě T-testu, pro zvolenou hladinu významnosti  $p = 0,05$ .

### Aritmetický průměr

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

### Směrodatná odchylka

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

n...rozsah souboru

$x_i$ ...naměřené hodnoty

$\bar{x}$ ...aritmetický průměr

s...směrodatná odchylka

### T-test

T-test je test významnosti rozdílu dvou průměrů, vypočítaný dle vzorce:

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

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 ( $v$ ), vypočítáno dle vzorce:

$$v = n_1 + n_2 - 2.$$

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

Pro dvě paralelní stanovení obsahu platí, že počet členů souboru kontrolního a pokusného souboru je shodný  $n_1 = n_2 = 2$  a počet stupňů volnosti  $v = 2$ .

Kritická hodnota  $t(v)_p$  pro  $p(0,05) = 3,182$ . (40)

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Tabulky

Tab. 3. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicitované kyselinou jasmonovou

Koncentrace kyseliny jasmonové ( $\mu\text{mol}$ )	Doba aplikace (hod)	elicitovaná kultura		kontrola		T-test
		průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
500	6	0,185	0,032	0,172	0,008	0,381
	24	0,295	0,025	0,172	0,008	4,686
	48	0,136	0,018	0,172	0,008	1,828
	168	0,108	0,028	0,193	0,016	2,626

**Tab. 4. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicitované kombinací kyseliny jasmonové (500 μmol) a chloridu vápenatého (0,1 mmol; 1 mmol; 10 mmol)**

koncentrace kyseliny jasmonové (μmol)	koncentrace chloridu vápenatého (mmol)	doba aplikace (hod)	elicitovaná kultura		kontrola		T-test
			průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
500	0,1	6	0,312	0,016	0,172	0,008	7,809
		24	0,241	0,012	0,172	0,008	4,784
		48	0,051	0,020	0,172	0,008	5,617
		168	0,046	0,027	0,193	0,016	4,860
500	1	6	0,423	0,021	0,172	0,008	8,953
		24	0,114	0,012	0,172	0,008	4,022
		48	0,105	0,013	0,172	0,008	4,427
		168	0,044	0,008	0,193	0,016	11,779
500	10	6	0,435	0,009	0,172	0,008	22,218
		24	0,562	0,018	0,172	0,008	19,799
		48	0,142	0,032	0,172	0,008	0,908
		168	0,022	0,012	0,193	0,016	12,092

**Tab. 5. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicitované kombinací kyseliny jasmonové (500 μmol) a verapamilu (1 μmol; 10 μmol; 100 μmol)**

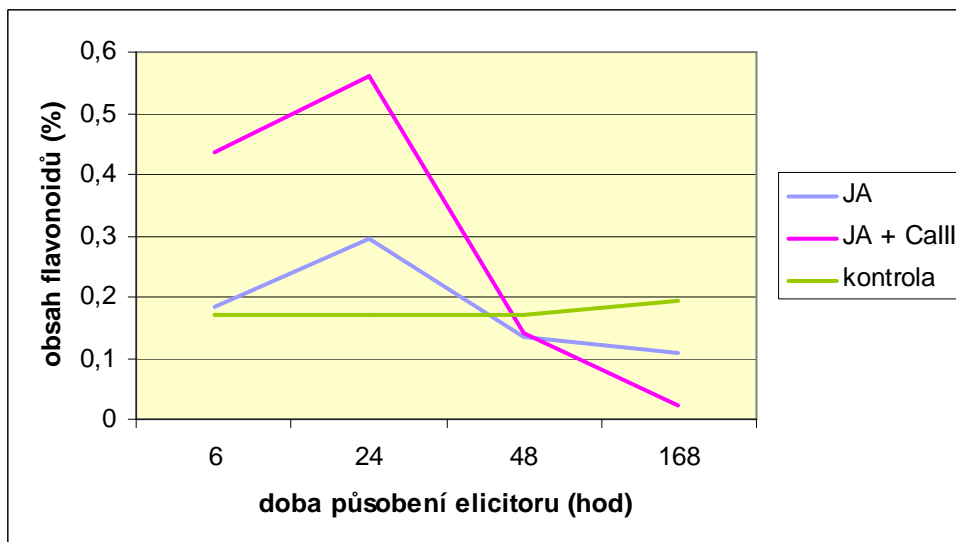
koncentrace kyseliny jasmonové (μmol)	koncentrace verapamilu (μmol)	doba aplikace (hod)	elicitovaná kultura		kontrola		T-test
			průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
500	1	6	0,158	0,032	0,1717	0,008	0,424
		24	0,096	0,020	0,1717	0,008	3,559
		48	0,069	0,010	0,1717	0,008	8,218
		168	0,147	0,015	0,1927	0,016	2,966
500	10	6	0,147	0,036	0,1717	0,008	0,677
		24	0,080	0,006	0,1717	0,008	8,927
		48	0,056	0,030	0,1717	0,008	3,735
		168	0,109	0,025	0,1927	0,016	2,883
500	100	6	0,043	0,019	0,1717	0,008	6,389
		24	0,123	0,013	0,1717	0,008	3,183
		48	0,134	0,004	0,1717	0,008	4,382
		168	0,054	0,020	0,1927	0,016	5,486

Tab. 6. Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* elicitované kys. jasmonovou (500 μmol), chloridem vápenatým (0,1;1;10 mmol) a verapamilem (1;10,100 μmol)

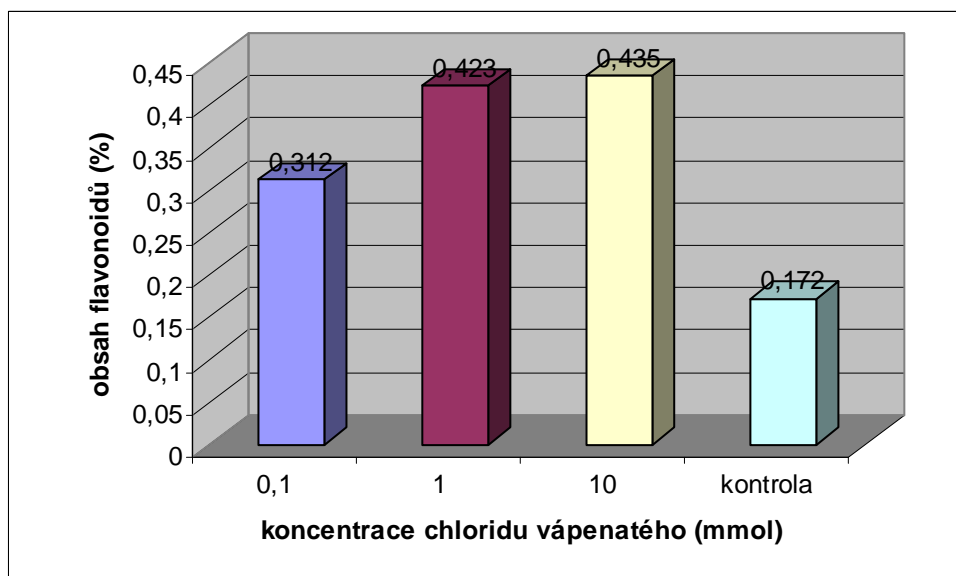
Elicitor 500 μmol	Čas (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)				
		genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A
<b>Kontrola</b>	6	0,01	0,01	0,01	0,01	-
<b>JA</b>	6	-	0,01	0,01	0,01	-
<b>JA</b>	24	-	0,01	0,01	0,01	-
<b>JA</b>	48	-	-	0,01	0,01	-
<b>JA + Ca<sub>I</sub></b>	6	0,01	-	0,01	0,01	-
<b>JA + Ca<sub>I</sub></b>	24	-	-	0,01	0,01	-
<b>JA + Ca<sub>I</sub></b>	48	-	0,01	0,01	0,01	-
<b>JA + Ca<sub>II</sub></b>	6	-	0,02	0,01	0,01	-
<b>JA + Ca<sub>II</sub></b>	24	-	0,01	0,01	0,01	-
<b>JA + Ca<sub>II</sub></b>	48	-	0,01	0,01	0,01	-
<b>JA + Ca<sub>III</sub></b>	6	-	0,02	0,01	0,01	-
<b>JA + Ca<sub>III</sub></b>	24	-	0,02	0,01	0,01	-
<b>JA + Ca<sub>III</sub></b>	48	-	0,02	0,01	0,01	-
<b>JA + Ve<sub>I</sub></b>	6	0,01	0,01	-	0,01	-
<b>JA + Ve<sub>I</sub></b>	24	-	-	-	-	-
<b>JA + Ve<sub>I</sub></b>	48	-	-	-	-	-
<b>JA + Ve<sub>II</sub></b>	6	-	0,01	-	0,01	-
<b>JA + Ve<sub>II</sub></b>	24	0,01	-	-	-	-
<b>JA + Ve<sub>II</sub></b>	48	-	0,01	-	-	-
<b>JA + Ve<sub>III</sub></b>	6	-	0,01	-	-	-
<b>JA + Ve<sub>III</sub></b>	24	-	0,01	-	-	-
<b>JA + Ve<sub>III</sub></b>	48	-	0,01	-	-	-

## 6.2 Grafy

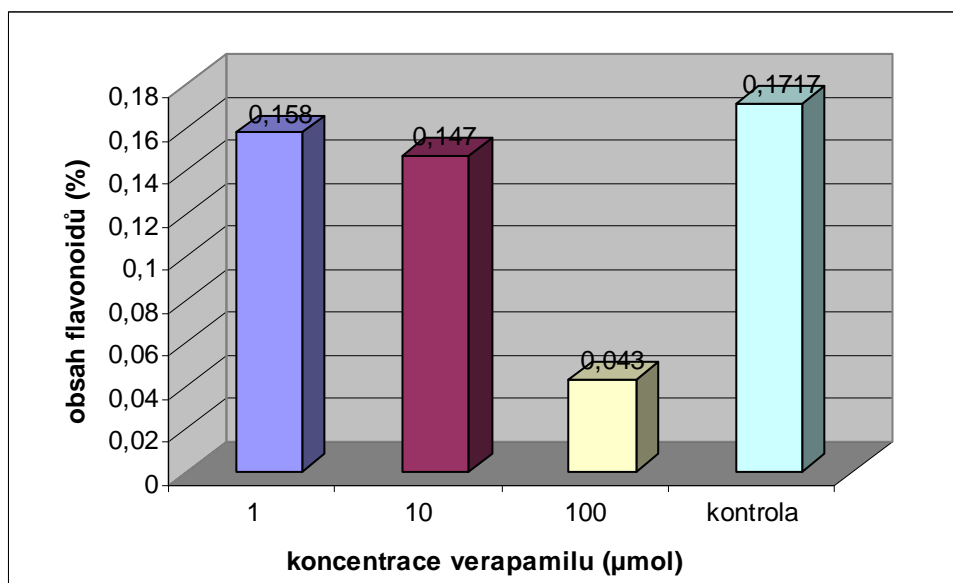
**Graf 1. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. po elicitaci kyselinou jasmonovou (500  $\mu$ mol) a kombinací kyseliny jasmonové (500  $\mu$ mol) a chloridu vápenatého (10 mmol) v průběhu 168hodinové aplikace**



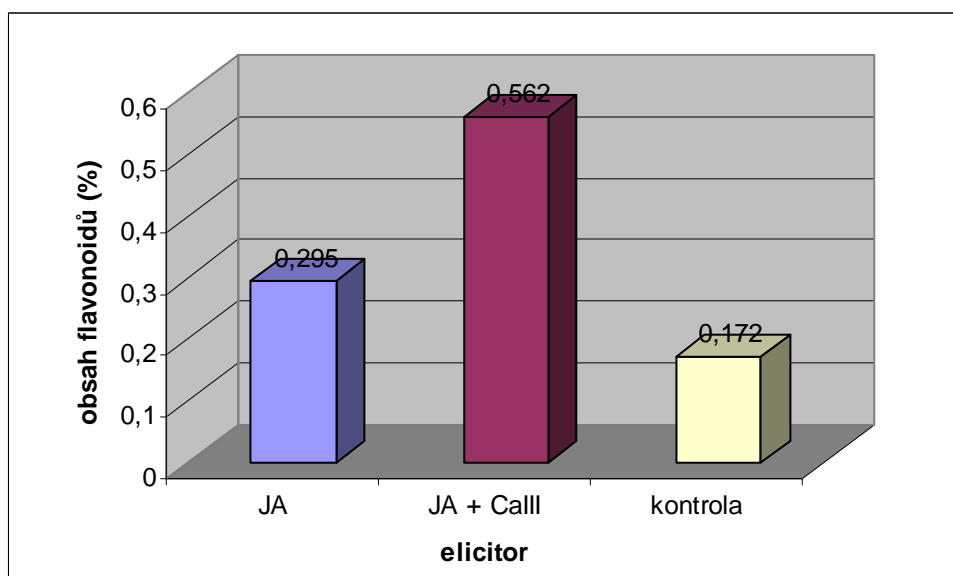
**Graf 2. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. po 6hodinové elicitaci kombinací kyseliny jasmonové (500  $\mu$ mol) a chloridu vápenatého (0,1 mmol; 1 mmol; 10 mmol)**



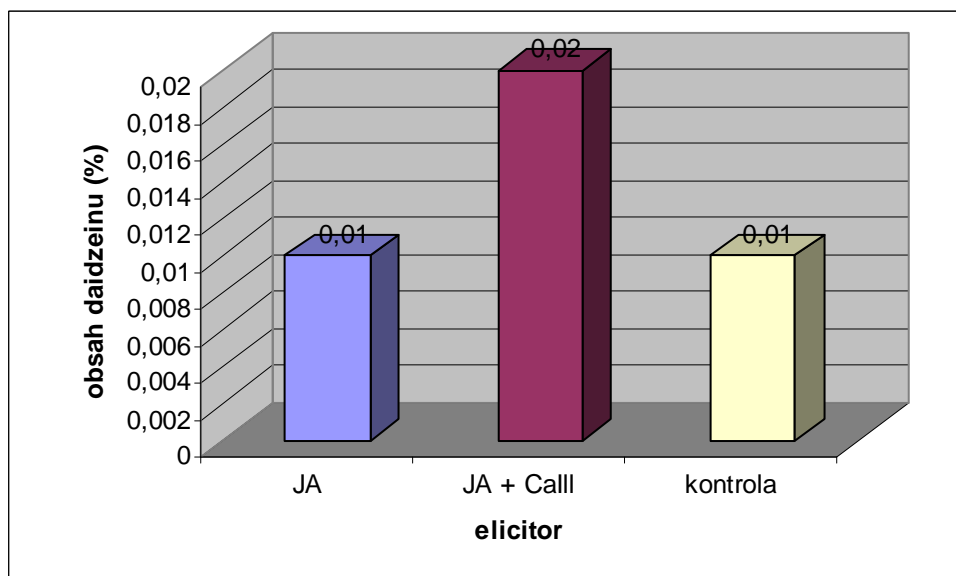
**Graf 3. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. po 6hodinové elicitaci kombinací kyseliny jasmonové (500  $\mu$ mol) a verapamilu (1  $\mu$ mol; 10  $\mu$ mol; 100  $\mu$ mol)**



**Graf 4. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. po 24hodinové elicitaci kyselinou jasmonovou (500  $\mu$ mol) a kombinací kyseliny jasmonové (500  $\mu$ mol) a chloridu vápenatého (10 mmol)**



**Graf 5. Produkce isoflavonoidu daidzeinu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. po 24hodinové elicitaci kyselinou jasmonovou (500  $\mu$ mol) a kombinací kyseliny jasmonové (500  $\mu$ mol) a chloridu vápenatého (10 mmol)**



## 7 DISKUZE

Kultivaci rostlinných tkání a buněk v podmínkách *in vitro* je věnována již řadu let velká pozornost. Výhodou rostlinných explantátů je především to, že nepodléhají vlivům vnějších faktorů. Nejsou ovlivňovány ročním obdobím, počasím, napadením škůdců apod. Buňky explantátových kultur mohou syntetizovat sekundární metabolity, které jsou typické pro matečnou rostlinu. Jejich produkce oproti intaktním rostlinám však bývá zpravidla nižší, a proto se hledají způsoby, kterými by se tato produkce zvýšila.

Jednou z možných metod je elicitace explantátových kultur. Elicitace využívá obranných mechanismů rostlin ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinách i v kulturách *in vitro*. Cílem této práce bylo sledovat vliv kyseliny jasmonové v kombinaci s vápenatými ionty a verapamilem na produkci flavonoidů a isoflavonoidů u suspenzní kultury *Trifolium pratense* L.

Kyselinu jasmonovou můžeme zařadit mezi biotické elicitory, protože v rostlinách působí jako induktor exprese obranných proteinů. Indukuje na transkripční úrovni syntézu některých proteinů, např. enzymu fenylalaninamoniaklyázy, který je klíčovým enzymem syntézy některých fenolických fytoalexinů, tj. rostlinných obranných látek, a dalších tzv. PR (pathogen-related) proteinů. Elicitory však obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu, ke kterým patří především vápenaté ionty. Vápník má mimořádnou roli v předávání signálů. Po objevení kalmodulinu a dalších bílkovin vázících  $\text{Ca}^{2+}$  je vápník považován za významného posla při přenosu signálů v rostlinách. V pokusech byl proto ověřován také vliv chloridu vápenatého (jako extracelulárního zdroje vápenatých iontů) a verapamilu (naopak jako blokátoru vápníkového kanálu ze skupiny fenylalkylaminů) – na průběh elicitace kyselinou jasmonovou.

V poslední době je stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s velkým spektrem biologických účinků těchto sekundárních metabolitů. Velmi nadějným zdrojem těchto přírodních látek je jetel luční - *Trifolium pratense* L., (*Fabaceae*). Je používán jako hospodářská plodina a má dlouhou tradici v přírodním lidovém léčitelství. V současnosti si získává pozornost také díky perspektivnímu využití v léčbě rakoviny prsu, vaječníků, prostaty a lymfatických uzlin. Účinné látky z jetele lučního zlepšují krevní oběh, snižují hladinu cholesterolu a triacylglyceridů v krvi, čímž účinně chrání cévy před aterosklerózou. Jetel se používá také k utlumení nežádoucích příznaků provázejících menopauzu (návaly horka), jako přírodní prostředek pro hormonální

substituci, snižuje riziko vzniku osteoporózy.

K pokusům byla použita tříletá suspenzní kultura, odvozená ze sterilní klíčící rostliny jetele lučního (varieta DO-9).

Úspěšná elicitace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor a pro každou explantátovou kulturu. Jedná se např. o koncentraci a dobu působení elicitoru. Z těchto důvodů byly již v předcházejících pokusech zkoušeny čtyři koncentrace roztoku kyseliny jasmonové (5  $\mu\text{mol}$ , 50  $\mu\text{mol}$ , 500  $\mu\text{mol}$ , 5000  $\mu\text{mol}$ ), které byly zvoleny v rozmezí koncentrací obvykle používaných u tohoto typu elicitoru (34,47-49). Nejlepší elicitální účinek prokázala koncentrace 500  $\mu\text{mol}$ , a proto právě tuto koncentraci jsem sledovala ve své práci. Také koncentrace roztoků chloridu vápenatého (0,1 mmol, 1 mmol, 10 mmol) a verapamilu (1  $\mu\text{mol}$ , 10  $\mu\text{mol}$ , 100  $\mu\text{mol}$ ), které jsem v pokusech přidávala k suspenzní kultuře v kombinaci s kyselinou jasmonovou, byly zvoleny na základě předcházejících pokusů (50-54).

Sledované doby působení elicitoru (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z poznatků již provedených pokusů (55,56) a z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po přidání elicitoru (57-59). Kontrolní kultury byly odebrány jen po 6 a 168 hodinách, neboť jejich produkce se v takto krátkých časových intervalech významně nemění.

Elicitace suspenzní kultury byla prováděna za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu ve 21. dni kultivace, který byl již dříve zjištěn jako optimální (38). K suspenzní kultuře byl přidáván 1,0 ml samotné kyseliny jasmonové a dále v kombinaci s 1,0 ml roztoku chloridu vápenatého nebo verapamilu o příslušné koncentraci. Ke kontrolním kulturám byl přidáván 1,0 ml, resp. 2,0 ml destilované vody.

Po uplynutí sledovaných časových intervalů aplikace elicitoru byly buňky suspenzní kultury sklizeny, odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a sušeny při laboratorní teplotě.

U všech vzorků bylo provedeno fotometrické stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2009 (po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé) a stanovení isoflavonoidů HPLC s fluorimetrickou detekcí.

Z výsledků biotické elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. samotnou kyselinou jasmonovou (graf 1) o koncentraci 500  $\mu\text{mol}$  vyplývá, že maximální obsah flavonoidů (0,295 %) a statisticky významné zvýšení vzhledem ke kontrole o 72 % bylo

zjištěno po 24hodinové aplikaci elicitoru. Také v případě kombinace kyseliny jasmonové s nejsilnější koncentrací vápenatých iontů (graf 1,4) byl maximální obsah flavonoidů (0,562 %) a statisticky významné zvýšení produkce oproti kontrolní kultuře o 227 % a oproti elicitované kultuře o 91 % zaznamenáno po jejich 24hodinové aplikaci.

Stimulace sledované elicítace přidáním extracelulárních vápenatých iontů (graf 2) se projevila již po 6hodinové aplikaci kyseliny jasmonové v kombinaci se všemi sledovanými koncentracemi chloridu vápenatého (0,1; 1; 10 mmol) (graf 1, 2), kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů vůči kontrolní kultuře o 81 %; 146 % a 153 % a vůči elicitované kultuře o 69 %; 129 % a 135 %. Z výsledků je zřejmé, že s rostoucí koncentrací přidávaných vápenatých iontů se obsah flavonoidů zvyšoval.

V experimentu byl dále ověřován vliv verapamilu – blokátoru vápníkového kanálu – na průběh elicítace kyselinou jasmonovou (graf 3). Potvrdilo se, že koncentrace intracelulárního vápníku má v procesu elicítace důležitou úlohu. Po přidání všech koncentrací verapamilu (1; 10; 100  $\mu\text{mol}$ ) a ve všech sledovaných časových intervalech došlo k zablokování vápníkového kanálu, což se projevilo snížením produkce flavonoidů. Maximální pokles obsahu flavonoidů vzhledem ke kontrole byl zjištěn po 6hodinové aplikaci nejsilnější koncentrace verapamilu, kdy došlo ke statisticky významnému snížení oproti kontrolní kultuře o 75 % a oproti elicitované kultuře o 77 %.

U suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. elicítované kyselinou jasmonovou byla také sledována produkce isoflavonoidů. V kontrolní kultuře byl stanoven nízký obsah isoflavonoidů - genistein, daidzein, formononetin a genistin. Elicitační účinek kyseliny jasmonové na produkci isoflavonoidů nebyl na rozdíl od flavonoidů pozitivní. Lze pouze konstatovat, že shodně s výsledky zjištěnými u flavonoidů se jako nejlepší prokázala aplikace kyseliny jasmonové po přidání chloridu vápenatého v nejsilnější koncentraci 10 mmol, kdy bylo zaznamenáno všech sledovaných časových intervalech zvýšení produkce daidzeinu v porovnání s kontrolní kulturou i elicítovanou kulturou o 100 %. (graf 5)

Vliv kyseliny jasmonové na produkci sekundárních metabolitů zjišťován také u suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (variety DO-8) (55). Maximální obsah flavonoidů vyvolala kyselina jasmonová o koncentraci 500  $\mu\text{mol}$  (tedy shodně s výsledky této prezentované práce). Zatímco produkce isoflavonoidů byla nejlépe stimulována koncentrací 50  $\mu\text{mol}$  a tím lze snad vysvětlit to, že koncentrace kyseliny jasmonové (500  $\mu\text{mol}$ ) sledovaná v této práci nebyla v případě isoflavonoidů úspěšná.

Význam kyseliny jasmonové, vápenatých iontů a verapamilu, v procesu biotické

elicitace lze dokumentovat také na řadě příkladů v odborných publikacích (uvedených v teoretické části diplomové práce), z nichž vyplývá, že kyselina jasmonová patří k důležitým signálním látkám rostlinných obranných reakcí, které vedou ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů, přidání extracelulárních vápenatých iontů pak podporuje akumulaci fytoalexinů v explantátových kulturách, zatímco blokátory vápníkového kanálu, např. verapamil, jejich produkci snižují.

## 8 ZÁVĚR

Výsledky dosažené v této práci lze shrnout do následujících bodů:

Při použití samotného biotického elicitoru kyseliny jasmonové o koncentraci 500  $\mu\text{mol}$  bylo u suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) dosaženo nejvyšší produkce flavonoidů (0,295 %) za 24 hodin působení elicitoru. V porovnání s kontrolní kulturou zde došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 72 %.

Maximální produkci flavonoidů (0,562 %) vykazovala suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) při působení kyseliny jasmonové v kombinaci s chloridem vápenatým v nejvyšší koncentraci (10 mmol) za 24 hodin působení elicitoru. Došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce oproti kontrolní kultuře o 227 % a oproti elicitované kultuře o 91 %.

Zvýšená produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) při elicitaci kyselinou jasmonovou (500  $\mu\text{mol}$ ) v kombinaci s chloridem vápenatým ve třech různých koncentracích (0,1; 1; 10 mmol) se projevila už po 6 hodinovém působení. Se zvyšující se koncentrací se zvyšoval i obsah flavonoidů v těchto kulturách. Došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů vůči kontrolní kultuře o 81 %; 146 %; 153 % a vůči elicitované kultuře o 69 %; 129 %; 135 %.

Byl zkoušen také vliv verapamilu na průběh elicitace kyselinou jasmonovou v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9). Po přidání všech koncentrací verapamilu (1; 10; 100  $\mu\text{mol}$ ) a ve všech sledovaných časových intervalech došlo k zablokování vápníkového kanálu, což se projevilo snížením produkce flavonoidů. Maximální pokles obsahu flavonoidů vzhledem ke kontrole byl zjištěn po 6hodinové aplikaci nejsilnější koncentrace verapamilu, kdy došlo ke statisticky významnému snížení oproti kontrolní kultuře o 75 % a oproti elicitované kultuře o 77 %.

U suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. elicitované kyselinou jasmonovou byla také sledována produkce isoflavonoidů. Elicitační účinek kyseliny jasmonové na produkci isoflavonoidů nebyl na rozdíl od flavonoidů pozitivní. Lze pouze konstatovat, že shodně s výsledky zjištěnými u flavonoidů se jako nejlepší prokázala aplikace kyseliny jasmonové po přidání chloridu vápenatého v nejsilnější koncentraci 10 mmol, kdy bylo zaznamenáno ve všech sledovaných časových intervalech zvýšení produkce daidzeinu v porovnání s kontrolní kulturou i elicitovanou kulturou o 100 %.

## 9 SEZNAM LITERATURY

1. Slavík, B. et al.: Květena České republiky, Academia, Praha 1995, s. 474
2. [http://botanika.borec.cz/jetel\\_lucni.php](http://botanika.borec.cz/jetel_lucni.php), 6.11.2010
3. [http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I\\_SB26770&res=640](http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_SB26770&res=640), 6.11.2010
4. [http://www.hajany.com/clanky/zahrada\\_-flora/jetel-lucni.html](http://www.hajany.com/clanky/zahrada_-flora/jetel-lucni.html), 6.11.10
5. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trifolium\\_pratense\\_Sturm35.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trifolium_pratense_Sturm35.jpg), 20.11.2010
6. <http://rostliny.prirodou.cz/bobovite/jetel/jetel-lucni/>, 6.11.2010
7. Kresánek, J., Krejča, J.: Atlas léčivých rostlín a lesných plodov, Osveta, Martin 1977, s. 192–193
8. Ososki, A. L., Kennelly, E. J.: *Phytoter. Res.*, 2003; 17, 845
9. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K69.php>, 6.11.2010
10. Kašparová, M.; Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.*, 2009; 58, 67
11. <http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/texty/flavon.htm>, 5.12.2010
12. <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/126/2/485>, 5.12.2010
13. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: *Obecná farmakognosie II*, SPN, Praha 1989, s. 31–34
14. <http://commons.wikimedia.org/>, 12.12.2010
15. Lapčík, O., Stárka, L.: *Vesmír*, 2004; 83, 531
16. Koliba, P.: *Klimakter. Med.*, 2010; 15, 20
17. Deavours, B. E., Dixon, R. A.: *Plant physiol.*, 2005; 138, 2245
18. Oborná, I., Fingerová, H., Březinová, J.: *Inter. Med. Prax.*, 2007; 9, 459
19. <http://www.emeraldinsight.com/journals.htm?articleid=1463286&show=html>, 18.12.2010
20. Sikyta, B., Dušek, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha 2001, s. 75–81
21. Landa, Z. et al.: *Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění rostlin*, ČSAV, Praha 1980, s. 7–8
22. <http://www.sarjanbiotech.com/overviews.html>, 20.12.2010
23. Kováč, J.: *Explantátové kultury rostlin*, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1995, s. 1

24. Novák, F. J.: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin, Academia, Praha 1990, s. 13
25. [http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika\\_fr/mb130c74/in\\_vitro/1\\_uvod\\_in\\_vitro.pdf](http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130c74/in_vitro/1_uvod_in_vitro.pdf), 14.1.2011
26. Jahodář, L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2000, s. 33–40
27. Vasconsuelo, A., Boland, R.: *Plant Sci.*, 2007; 172, 861
28. Zhao, J. et al.: *Biotechnol. Adv.*, 2005; 23, 283
29. <http://kbfr.agrobiologie.cz/kbfr/hnilicka/prednasky/fyziologie-rostlin/fyznemrostlin/mechanismus.pdf>, 30.1.2011
30. Walker, T. S., Bais, P. H., Vivanco, J. M.: *Phytochemistry*, 2002; 60, 289
31. Kang, S. M. et al.: *Vit. Cell. Dev. Biol. Plant*, 2006; 42, 44
32. [http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_jasmonov%C3%A1](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_jasmonov%C3%A1), 11.2.2011
33. Procházka, S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha 1998, s. 276–277
34. Tebayashi, S. et al.: *Phytochemistry*, 2000; 54, 387
35. Kendal, D. H.: *Plant physiol.*; 2004; 136, 2438
36. Carylton, W. T. : *Physiol. Biochem.*, 2005; 1
37. Kolektiv autorů: *Český lékopis 2009*, Praha, Grada, 2009, s. 114, 1801
38. Kašparová, M. et al.: *Čes. slov. Farm.*, 2006; 55, 44
39. Rijke, E. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 2002; 468, 3
40. Klemra, P., Klemrová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*, Praha, Karolinum, 1993, s. 30, 80
41. Procházka, S., Šebánek, J.: *Regulátory rostlinného růstu*, Academia, Praha 1997, s. 106, 107, 151
42. Procházka, S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha 1998, s. 108, 109, 412, 424, 425
43. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: *Exp. Cell Res.*, 1968; 50, 151
44. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Verapamil\\_Structural\\_Formulae.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Verapamil_Structural_Formulae.png), 19.4.2011
45. Marek, J. et al.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, Grada, Praha 2005, s. 100

46. Mahady, G. B., Beecher, C. W. W.: *Phytochemistry*, 1994; 37, 415
47. Publ 12
48. Wei, W. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006; 70, 298
49. Chong, T. et al.: *Process Biochem.*, 2005; 40, 3397
50. Pitta-Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., Giulietti, A. M.: *Enzyme Microb. Technol.*, 2000; 26, 252
51. Kartosentono, S. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 2002; 24, 687
52. Lee-Parsons, C. W. T., Ertürk, S., Tengtrakool, J.: *Biotech. Lett.*, 2004; 26, 1595
53. Lee-Parsons, C. W. T., Ertürk, S.: *Plant Cell Rep.*, 2005; 24, 677
54. Zhao, J., Sakai, K.: *J. Exp. Bot.*, 2003; 54, 647
55. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.*, 2008; 57, 107
56. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.*, 2002; 51, 177
57. Seung, M. et al.: *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2006; 42, 44
58. Repcak, M., Imrich, J., Franekova, M.: *J. Plant Physiol.*, 2001; 158, 1085
59. Katoch, R. et al.: *J. Veget. Sci.*, 2005; 11, 85
60. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: *Farmakognosie I*, Praha, SPN, 1989, s. 8-15
61. Bannister et al.: *Org. Proc. Res. Develop.*, 2000; 4, 467
62. Lincová, D., Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Praha 2007, s. 241
63. Bramble, J. L., Graves, D. J.: *Biotech. Bioeng.*, 1991; 37, 859
64. Stab, M. R., Ebel, J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987; 257, 416