

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOSIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

SEKUNDÁRNÍ METABOLITY EXPLANTÁTOVÉ KULTURY
***TRIFOLIUM PRATENSE* L.**

Hana Novotná

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

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

Oponent: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

„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.“

V Hradci Králové dne 30. 4. 2015

Za cenné rady, připomínky, trpělivost a ochotu bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D..

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie

Kandidát: Hana Novotná

Školitel: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Název diplomové práce: Sekundární metabolity explantátové kultury *Trifolium pratense* L.

Perspektivním zdrojem sekundárních metabolitů jsou explantátové kultury. Produkce flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. však nebývá vysoká. Jednou z metod podporujících biosyntézu sekundárních metabolitů je elicitace. Elicitací dochází k indukci fyziologických změn, stimulaci obranných či stresem vyvolaných reakcí v rostlinách a následně ke spuštění syntézy sekundárních metabolitů.

Cílem této práce bylo sledovat vliv dvou elicitorů – kyseliny abscisové a kyseliny askorbové – na produkci flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint).

Kultura byla kultivována na médiu podle Gamborga s přidavkem 2 mg.l^{-1} 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 2 mg.l^{-1} 6-benzylaminopurinu, při teplotě $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a světelné periodě 16 hodin světlo / 8 hodin tma.

Nejlepší elicitální účinek kyseliny abscisové na produkci flavonoidů i isoflavonoidů byl po 6 hodinové aplikaci nejvyšší koncentrace $500 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Její pozitivní vliv se však s délkou elicitace snižoval.

Kyselina askorbová jako antioxidační látka projevila nejlepší stimulační efekt po 168 hodinové elicitaci nejnižší koncentrací $5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Ke zvýšení obsahu došlo jak v případě flavonoidů, tak isoflavonoidů. Prospěšný efekt se naopak s délkou aplikace zvyšoval.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Hana Novotná

Supervisor: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Secondary metabolites of plant tissue culture of *Trifolium pratense* L.

Explant cultures are perspective sources of secondary metabolites. Nevertheless production of flavonoids and isoflavonoids by the suspension culture of *Trifolium pratense* L. is not high. Elicitation is one of the methods used to enhance the biosynthesis of secondary metabolites. Elicitation induces physiological changes, stimulates defensive or stress-induced reactions in plants and subsequently triggers the synthesis of secondary metabolites.

The objective of this study was to observe the influence of two elicitors – abscisic acid and ascorbic acid – on the production of flavonoids and isoflavonoids by the *Trifolium pratense* L. suspension culture (Sprint variety).

The culture was cultivated in Gamborg medium to which 2 mg.l⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2 mg.l⁻¹ of 6-benzylaminopurine were added, at the temperature of 25 °C and 16 hours light / 8 hours dark period.

The best elicitation effect of abscisic acid on the production of flavonoids and isoflavonoids was observed after a 6-hour application of the highest 500 μmol.l⁻¹ concentration. However its positive influence decreased with the duration of elicitation.

Ascorbic acid as an antioxidant showed the best stimulative effect after a 168-hour application of the lowest 5 μmol.l⁻¹ concentration. Both flavonoid and isoflavonoid increase was observed. In comparison with abscisic acid, its beneficial effect increased with the duration of elicitation.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Teoretická část	3
3.1	Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L., <i>Fabaceae</i>)	3
3.1.1	Výskyt a botanický popis rostliny	3
3.1.2	Droga	5
3.1.3	Obsahové látky a využití rostliny	5
3.2	Flavonoidy	7
3.2.1	Charakteristika a chemická struktura	7
3.2.2	Biosyntéza	9
3.2.3	Biologické účinky a terapeutická aplikace	10
3.3	Fytoestrogeny - isoflavonoidy	12
3.3.1	Charakteristika	12
3.3.2	Metabolismus	13
3.3.3	Mechanismus účinku a terapeutické využití	13
3.4	Explantátové kultury rostlin	14
3.4.1	Úvod a historie	14
3.4.2	Terminologie	15
3.4.3	Základní principy	16
3.4.4	Úrovně organizace explantátu a obecná charakteristika	17
3.4.5	Podmínky kultivace <i>in vitro</i>	20
3.4.6	Výhody/nevýhody a využití explantátových kultur	24
3.5	Elicitace	25
3.5.1	Úvod a základní principy	25
3.5.2	Klasifikace elicitorů	26
3.5.3	Mechanismus účinku	28
3.5.4	Podmínky elicitace	30
3.6	Kyselina abscisová	31
3.7	Kyselina askorbová	33
4	Experimentální část	35
4.1	Použitý materiál, přístroje, pomůcky	35

4.1.1	Rostlinný materiál	35
4.1.2	Chemikálie.....	35
4.1.3	Přístroje a pomůcky	36
4.2	Kultivace explantátové kultury	37
4.2.1	Kultivační nádoby a nástroje	37
4.2.2	Příprava živného média	37
4.2.3	Pasážování a kultivace.....	38
4.3	Elicitace	39
4.4	Stanovení obsahu flavonoidů.....	39
4.4.1	Princip stanovení	39
4.4.2	Postup stanovení.....	39
4.5	Stanovení obsahu isoflavonoidů	41
4.5.1	Princip stanovení	41
4.5.2	Příprava vzorku	41
4.5.3	Parametry HPLC analýzy	42
4.6	Statistické zpracování výsledků	43
5	Výsledky	45
5.1	Tabulky.....	45
5.2	Grafy.....	49
6	Diskuze.....	52
7	Závěr	57
8	Seznam použité literatury	58

Seznam obrázků

Obr. 1 Jetel luční.....	4
Obr. 2 Významné isoflavony jetele lučního	5
Obr. 3 Obecná struktura hlavních flavonoidních látek.....	8
Obr. 4 Struktura chalkonů, dihydrochalkonů a auronů	8
Obr. 5 Struktura flavanu, isoflavanu a neoflavanu	9
Obr. 6 Schéma syntézy flavonoidů.....	10
Obr. 7 Porovnání struktury endogenního a exogenního estrogenu	12
Obr. 8 Odvození explantátové kultury z rostliny	16
Obr. 9 Růstová křivka buněčné suspenze.....	20
Obr. 10 Mechanismus účinku po rozpoznání elicitoru receptory.....	28
Obr. 11 Kyselina abscisová	31
Obr. 12 Kyselina askorbová	33

Seznam tabulek

Tab. 1 Biotické a abiotické elicitory.....	27
Tab. 2 Faktory ovlivňující tvorbu bioaktivních sloučenin	30
Tab. 3 Složení živného média.....	37
Tab. 4 Obsah flavonoidů po elicitaci různými koncentracemi kyseliny abscisové.....	45
Tab. 5 Obsah flavonoidů po elicitaci různými koncentracemi kyseliny askorbové	46
Tab. 6 Obsah isoflavonoidů po elicitaci různými koncentracemi kyseliny abscisové ...	47
Tab. 7 Obsah isoflavonoidů po elicitaci různými koncentracemi kyseliny askorbové ..	48

Seznam grafů

Graf 1. Obsah flavonoidů po elicitaci kyselinou abscisovou	49
Graf 2. Obsah flavonoidů po elicitaci kyselinou askorbovou	50
Graf 3. Obsah isoflavonoidu genistinu po elicitaci kyselinou abscisovou.....	51
Graf 4. Obsah isoflavonoidu genistinu po elicitaci kyselinou askorbovou	51

1 ÚVOD

Potenciál rostlinných metabolitů léčit lidské choroby je historicky známou a potvrzenou skutečností. I dnes, v postgenomové době, v době proteomiky a kombinatorní chemie, se rozrůstá zájem o tento zdroj nových biologicky aktivních „malých“ molekul. Uvádí se, že za posledních 20 let 61 % nových chemických entit pochází z přírodních produktů, nebo jejich příprava byla přírodními produkty inspirována.

Rostliny jsou schopné díky stavbě svých buněk i těla (souboru vakuol, buněčné stěně, plastidům, plazmodermám, idioblastům, mléčnicím, intercelulárám a žláznatým trichomům) hromadit v sobě metabolity specializovaného (sekundárního) metabolismu. [1] Mnoho z těchto látek má význam ve farmacii, potravinářství, kosmetickém průmyslu atd. Doposud byly získávány z intaktních rostlin, popř. chemickou syntézou. Nyní se do popředí dostává nový způsob produkce rostlinných metabolitů – pomocí *explantátových kultur*, který má oproti tradičním metodám řadu výhod.

Jedním z cílů výzkumu je zvýšení produkce požadovaných látek v kulturách *in vitro*. Bylo zjištěno, že stimulačně na syntézu může působit určitý stres – např. snížení koncentrace živin v živném roztoku, vynechání růstového regulátoru, nebo aplikace prekursorů či tzv. *elicitorů* do média. [2]

Isoflavonoidy a flavonoidy jsou, vzhledem k jejich širokému spektru účinků, úzce studovanými sekundárními metabolity. Jmenované sloučeniny příznivě ovlivňují některé projevy menopauzy a působí jako silné antioxidanty a zhášedce volných radikálů. Mezi hlavní producenty patří rostliny z čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Využitelným zástupcem je jetel luční (*Trifolium pratense* L.). Výnosnost jeho suspenzní kultury není velká, proto je snaha podpořit tvorbu přírodních látek prostřednictvím procesu elicítace. [3][4]

V této diplomové práci je zkoumán vliv kyseliny askorbové a kyseliny abscisové na produkci sekundárních metabolitů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L.

2 CÍL PRÁCE

1. Seznámení se s metodikou kultivace a elicitace rostlinných explantátových kultur.
2. Sledování vlivu elicitace kyselinou askorbovou a kyselinou abscisovou na produkci flavonoidů a isoflavonoidů explantátovou kulturou *Trifolium pratense L.*

3 TEORETICKÁ ČÁST

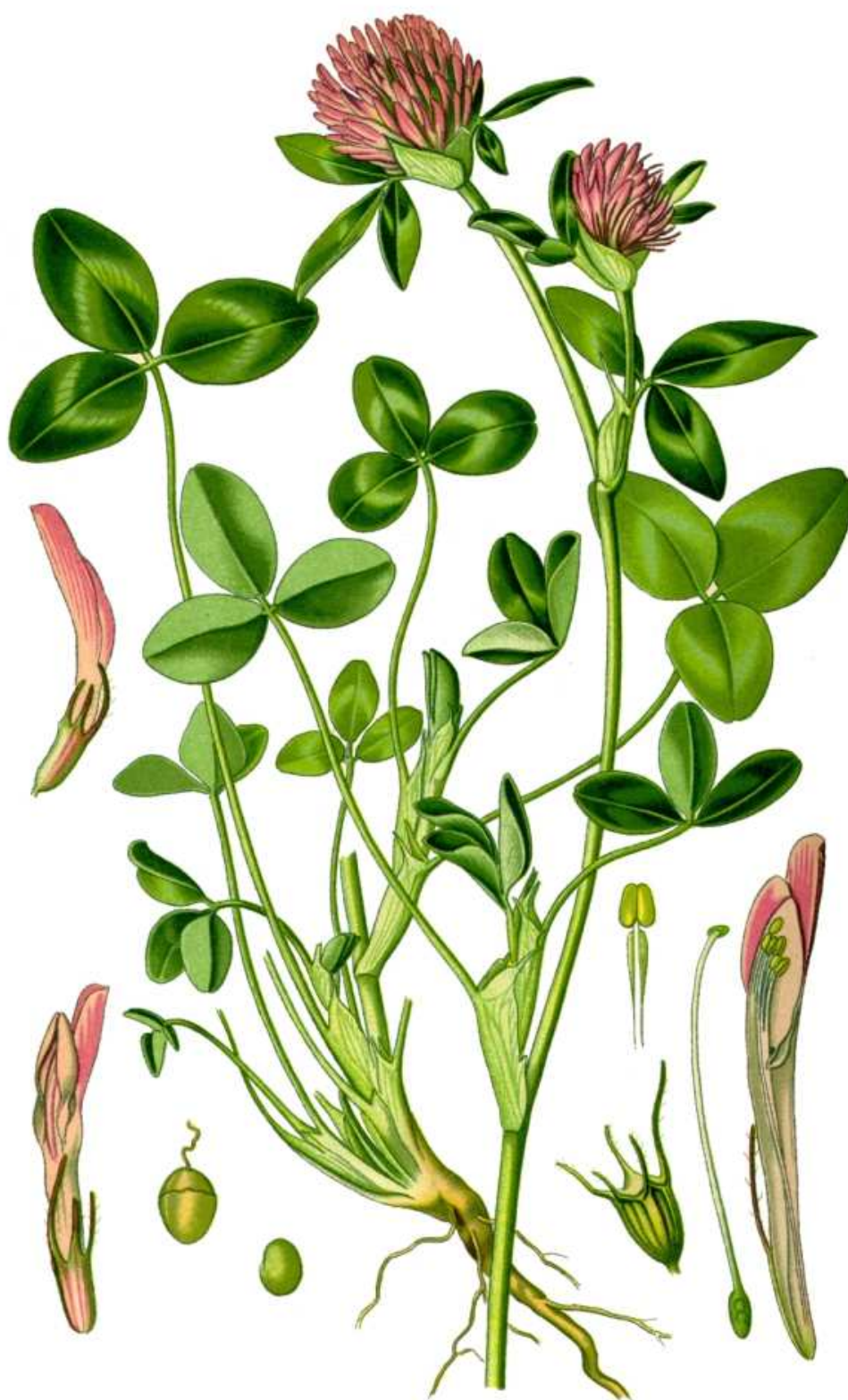
3.1 Jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*)

3.1.1 Výskyt a botanický popis rostliny

Rod *Trifolium* zahrnuje asi 250-300 druhů, které rostou převážně v mírném pásmu severní polokoule, vzácně i v západní části Jižní Ameriky a v jižní a východní Africe. V České republice patří některé druhy mezi hojně rozšířené rostliny. [5]

Jetel luční (obecně jetel červený), **der Rotklee** (něm.), **Red Clover** (angl.) je bylina rostoucí na bohatých, suchých až mírně vlhkých půdách, především na loukách, stráních, v příkopech nebo okrajích cest. Je také pěstován na polích jako hospodářská plodina v různých vyšlechtěných odrůdách. Patří mezi významné medonosné rostliny a poskytuje píci bohatou na bílkoviny a minerály.

Trifolium pratense L. (*Fabaceae*) je vytrvalá (u některých kulturních forem jen 2 až 3letá) rostlina s dlouhým křivým rozvětveným kořenem. Lodyhy mající 3-5 článků jsou přímé, vystoupavé až poléhavé, jednoduché nebo chudě větvené, 20 až 100 cm vysoké. Jsou bělavě chlupaté nebo téměř lysé, často načervenalé. Listy jsou trojčetné střídavé, spodní dlouze řapíkaté, prostřední a horní s řapíky kratšími až přisedlé, s palisty. Lístky jsou podlouhle kopinaté, téměř celokrajné, obvejčité až široce okrouhlé. Obvykle jsou na líci lysé, často s příčnou půlměsíčitou bělavou nebo červenohnědou skvrnou. Na lodyze bývají 1-3 hlávkovitá květenství, která jsou kulatá nebo vejčitá, polozakrytá velikými palisty podpůrných listů. Hlávky se skládají z drobných 13 až 20 mm dlouhých, červených, karmínově růžových nebo vzácně bílých květů. Oboupohlavné květy jsou přisedlé, bez listenů, složené z desetižilného kalichu a zesponu srostlé motýlovité koruny. Plodem je nepukavý, vejčitý, tenké blanitý, jednosemenný lusk otevírající se víčkem. Semena jsou nesouměrně srdcovitá, hladká, lesklá, zploštělá, žlutá až pískově hnědá. [6][7]



Trifolium pratense L.

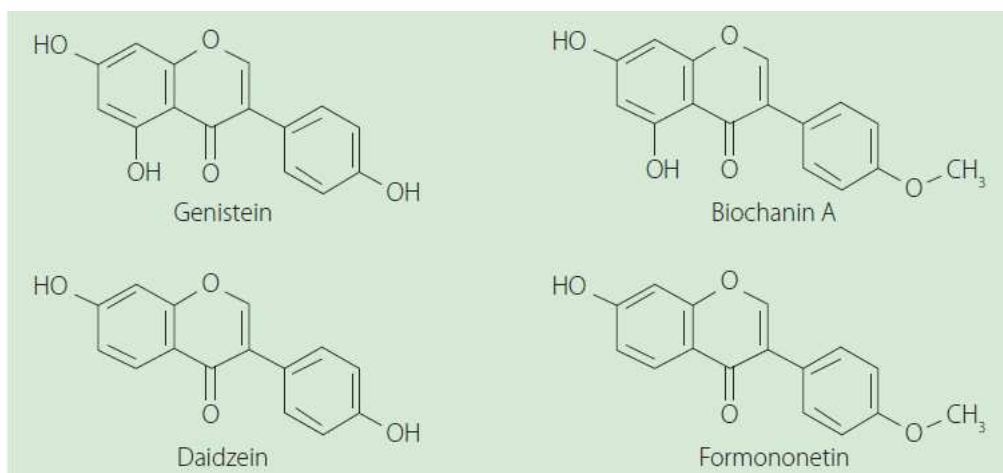
Obr. 1 Jetel luční [8]

3.1.2 Droga

Jetel luční kvete od května do října. Jako droga se používají nerozpadlé hlávky – *Trifolii pratensis flos* (není uvedena v lékopise). Sbírají se v počátku květu. Méně hodnotnou je odkvétající droga, neboť hlávky při sušení hnědnou a rozpadají se. Květy sušíme rychle v tenkých vrstvách. Doporučuje se je na jeden den vystavit přímému slunci a následně je досуšit na stinném a vzdušném místě. Při sušení umělým teplem by teplota neměla přesáhnout 35 °C. Poměr seschnutí se udává asi 6:1. Kvalitní droga si zachovává původní barvu, případně nepatrně ztmavne, nesmí být ale rezavá. Hlavní podmínkou je, aby hlávky zůstaly vcelku a nebyly uvnitř suché. Během skladování je potřeba drogu chránit před světlem a vlhkem, rychle podléhá zkáze. [6][9]

3.1.3 Obsahové látky a využití rostliny

V jeteli lučním byla identifikována široká paleta obsahových látek. Mezi nejhojněji zastoupené patří isoflavonoidy. Jsou zde přítomny hlavně čtyři isoflavony – **biochanin A** (4'-methoxyderivát genisteinu), **formononetin** (4'-methoxyderivát daidzeinu), **genistein** (4',5,7-trihydroxyisoflavon) a **daidzein** (4',7-dihydroxyisoflavon). Dalšími metabolity jsou flavonoidy, třísloviny, saponiny, organické kyseliny (salicylová, šťavelová, kumarová, hroznová aj.), antokyany, silice, salicyláty, aminokyseliny s převahou argininu, různé sacharidy, vitamíny (vitamin A, C, B-komplex), vápník, hořčík, železo. V klíčcích byly nalezeny kumarinové deriváty kumestany, především kumestrol.



Obr. 2 Významné isoflavony jetele lučního [6]

Vzhledem k obsahu rozličných látek má jetel luční široké uplatnění. Kromě fytoestrogenních účinků působí i jako adstringens, dezinficiens, expektorans. V lidovém léčitelství se droga využívá zevně k dezinfekci hnisavých ran a ekzémů či při zánětech dutiny ústní, vnitřně ve formě nálevu (2 čajové lžičky drogy na šálek vody) při léčbě infekcí gastrointestinálního traktu. [6][9][10]

Díky přítomnosti isoflavonoidů a jejich strukturální podobnosti se 17 β -estradiolem je jetel luční používán při terapii některých menopauzálních symptomů, při předmenstruačních obtížích, jako je bolest prsou, při benigní hyperplazii prostaty, ale i při osteoporóze, vysoké hladině cholesterolu nebo diabetu mellitu. Dále může pozitivně působit u pacientů s tumory, jejichž růst závisí na přítomnosti 17 β -estradiolu nebo u lidí s karcinomem prostaty. U jetele lučního byl zaznamenán i tyrosinkinasový inhibiční účinek. [6][11]

3.2 Flavonoidy

3.2.1 Charakteristika a chemická struktura

Flavonoidní látky jsou početnou skupinou přírodních polyfenolů obsahujících v molekule dva benzenové kruhy (kruh A a C) spojené tříuhlíkovým řetězcem. Množství všech flavonoidů se dnes odhaduje na 5 000 a stále se v různých rostlinných zdrojích nacházejí nové sloučeniny. Lokalizace v rostlinách se odvozuje od jejich hydrofilně-lipofilní povahy. Hydrofilní (hydroxylované) glykosidy či aglykony bývají rozpuštěné v buněčné šťávě vakuol, naopak methoxylované a málo hydroxylované flavonoidy jsou lipofilní a lze je nalézt v silicích nebo kutikule listů. [12][13][14]

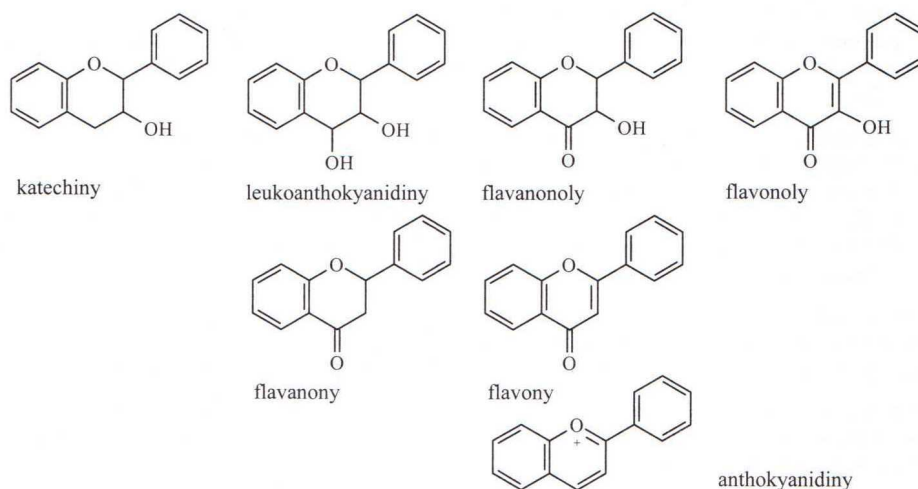
U většiny flavonoidů je C_3 řetězec součástí heterocyklického kruhu odvozeného od 2*H*-pyranu (kruh C). Flavonoidy jsou tedy odvozeny od kyslíkaté sloučeniny 2*H*-chromenu, substituovaného v poloze C2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavan. Jedná se o uspořádání $C_6-C_3-C_6$. Sloučeniny tohoto typu se často nazývají 1,3-diarylpropanoidy. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Vyskytují se jako volné látky nebo častěji jako glykosidy, acylované glykosidy, ale také jako polymery. Cukerným substituentem bývá glukosa, rhamnosa, galaktosa nebo arabinosa. [12][15]

Podle stupně oxidace C_3 řetězce a jeho substituce se rozeznávají následující základní struktury flavonoidů:

- **katechiny** (flavan-3-oly)
- **leukoanthokyanidiny** (flavan-3,4-dioly)
- **flavanony**
- **flavanonoly**
- **flavony**
- **flavonoly** (dihydroflavony)
- **anthokyanidiny**

Základní struktura těchto flavonoidů je znázorněna na **Obr. 3**. V řádcích zleva doprava roste oxidační stupeň sloučenin a současně intenzita jejich barvy. Sloučeniny

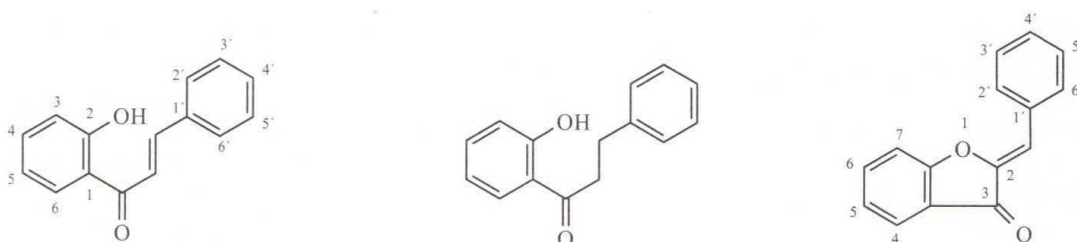
uvedené ve sloupcích pod sebou mají stejný stupeň oxidace. Anthokyanidiny obsahují systém konjugovaných dvojných vazeb.



Obr. 3 Obecná struktura hlavních flavonoidních látek [12]

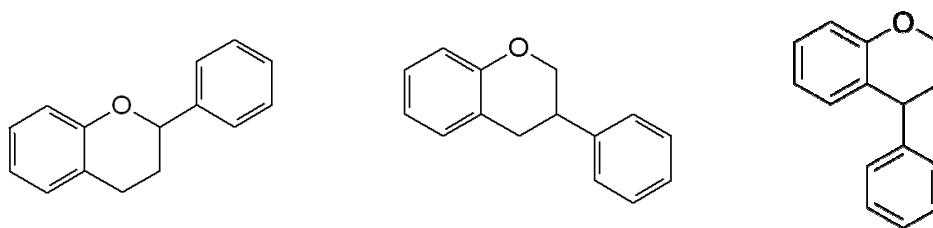
V několika případech existuje šestičlenný heterocyklický kruh B v isomerní otevřené formě, nebo je nahrazen pětičlenným heterocyklickým kruhem. Ze strukturně příbuzných sloučenin se dále rozeznávají:

- **chalkony** a **dihydrochalkony**
- **aurony**



Obr. 4 Struktura chalkonů, dihydrochalkonů a auronů [12]

Méně běžné sloučeniny s kruhem B spojeným s pyranovým kruhem C v poloze C3 (odvozené od isoflavonu) se nazývají **isoflavonoidy**. Pokud je toto spojení v poloze C4, nazývají se příslušné sloučeniny odvozené od neoflavanu, **neoflavonoidy**.



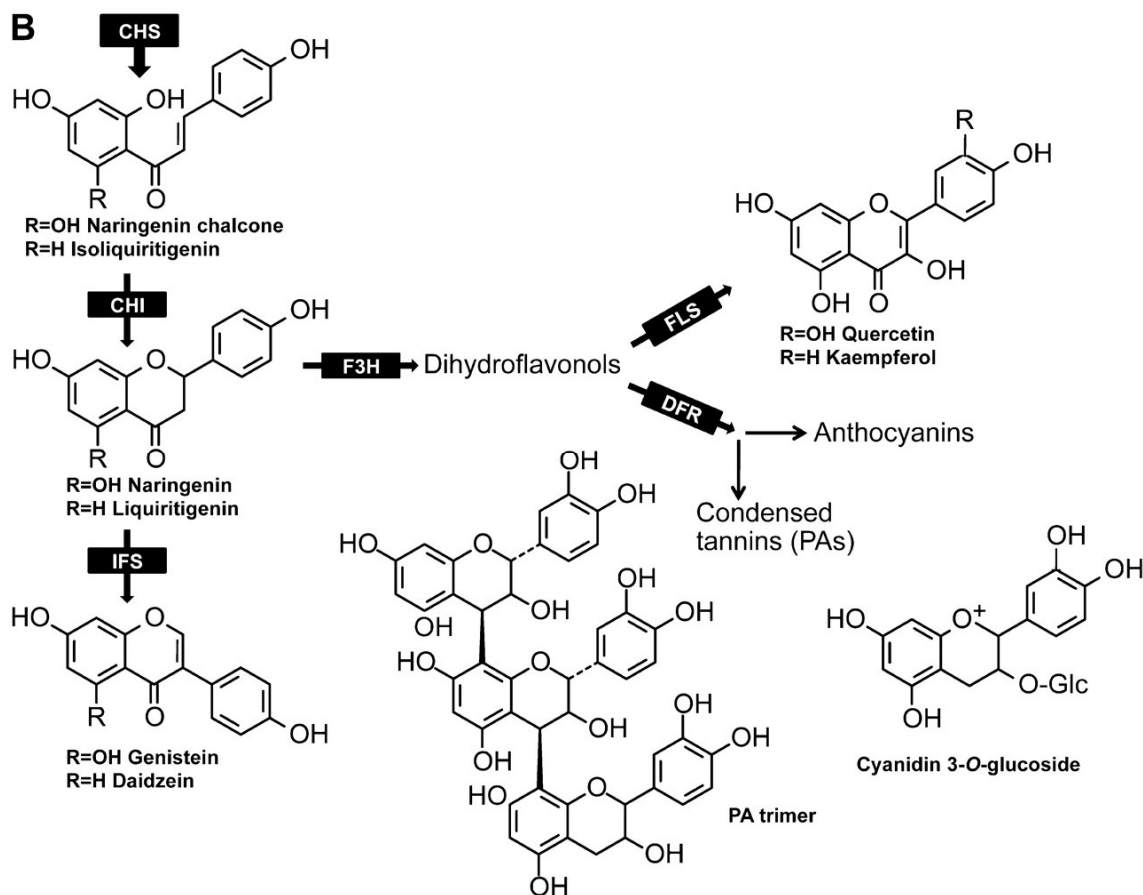
Obr. 5 Struktura flavanu [16], isoflavanu [17] a neoflavanu [18]

Všechny barevné flavonoidy se dříve dělily podle své barvy na dvě skupiny. Na červené až modré **anthokyany** a žluté **anthoxanthiny**. Chalkony a aurony se původně nazývaly **anthochlory**. [12]

3.2.2 Biosyntéza

Biosyntéza flavonoidů probíhá pomocí multienzymového komplexu, známého jako flavonoidní metabolon, volně spojeného s cytoplazmatickou stranou endoplazmatického retikula, ale i dalšími organelami jako jsou vakuoly, plastidy či jádro. Některé z těchto enzymů patří do rodiny cytochromu-P450 a mají schopnost se přímo vázat na membrány.

Biogeneticky vznikají z **chalkonu**, přímého produktu biosyntézy dvou rozdílných složek. Jednou složkou, biogenetickým prekursorem, je fenylpropanová kyselina (skořicová, kumarová, kávová nebo jiné di- a trihydroxyskořicové kyseliny) pocházející ze šikimátové dráhy. Na tento prekursor (př. **4-kumaryl-CoA**) se váží tři molekuly **malonyl-CoA**. Enzym katalyzující jejich kondenzaci je chalkon-synthasa (CHS). Dle podmínek prostředí je chalkon dále přeměněn chalkon-izomerasou (CHI) buď na bezbarvý flavanon **naringenin**, nebo **liquiritigenin**. Účinkem mnoha jiných enzymů (izomerasy, hydroxylasy, reduktasy aj.) z nich vznikají další skupiny flavonoidů. Transferasy nakonec připojují cukerné zbytky, methylové skupiny a/nebo acyly, čímž dochází k modifikaci fyziologické aktivity změnou rozpustnosti, reaktivity a schopnosti flavonoidů interagovat s buněčnými strukturami. [19][20][21]



IFS- isoflavon synthasa, F3H- flavanon-3- β -hydroxylasa,
 FLS- flavonol synthasa, DFR- dihydroflavonol reduktasa

Obr. 6 Schéma syntézy flavonoidů [22]

3.2.3 Biologické účinky a terapeutická aplikace

Existuje řada studií zabývajících se biologickými a farmakologickými účinky flavonoidů. Předpokládá se, že na jejich protektivním účinku se podílí schopnost zhášet reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Byla prokázána i antialergická a protizánětlivá aktivita. Snižují patologicky zvýšenou propustnost a lomivost kapilár, mají antihemoragické a antiedematózní účinky. S ionty Ca^{2+} tvoří komplexní soli a brání srážení krve a zadržují vápník v těle. Ovlivňují činnost srdce, snižují vysoký krevní tlak, působí hepatoprotektivně, spasmolyticky a diureticky. Dále byla potvrzena hypocholesterolemická aktivita a

schopnost potencovat účinek vitamínu C. Flavonoidy mají i antibakteriální a antivirový efekt a v neposlední řadě *in vitro* cytostatickou aktivitu. Pro mnohostranný účinek na lidský organismus jsou často nazývány **bioflavonoidy**.

Terapeuticky využitelné jsou samotné drogy bohaté na flavonoidy, standardizované extrakty i čisté látky. Uplatnění nacházejí při lomivosti kapilár (kůže, dásně, sliznice), žilní a lymfatické nedostatečnosti, žilních a kapilárních onemocnění a hemoroidech.

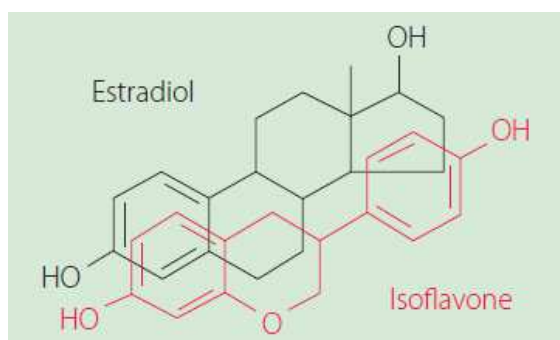
Pro samotné rostliny jsou výše jmenované sekundární metabolity nezbytné pro vábení opylovačů a symbiontů. Působí jako ochrana před UV zářením a volnými radikály. [13][14][23]

3.3 *Fytoestrogeny - isoflavonoidy*

3.3.1 Charakteristika

Fytoestrogeny (FE) jsou nesteroidní polyfenolické sekundární metabolity rostlin, strukturně blízké se 17 β -estradiolem, vykazující estrogenní i antiestrogenní účinky. Často působí i jako přírodní antioxidanty, což může být spojeno s řadou dalších příznivých účinků na buněčný metabolismus. Na rozdíl od živočišných estrogenů se však nejedná o steroidy, ale většinou jde o produkty fenylypropanového metabolismu. Přestože se mohou v organismu vyskytovat v mnohem vyšší koncentraci než estradiol, vykazují oproti němu až 1 000x slabší afinitu k estrogenním receptorům. [6][24]

Dnes je známo více než 300 rostlin, které obsahují fytoestrogeny. Nejrozšířenějšími FE jsou isoflavonoidy, flavonoidy, lignany, kumestany a stilbeny. Neaktivnější skupinou fytoestrogenů jsou isoflavony. Je jich popsáno asi přes 1 000, jsou obsaženy zejména v luštěninách (hrách, čočka, fazole), v sójových bobech, jeteli a vojtěšce. Vstřebávají jsou lipofilní aglykony, glykosidy až po štěpení ve střevě. Aktivita jednotlivých zástupců a metabolitů se značně liší. Signifikantní biologická estrogenní aktivita byla zaznamenána pouze u čtyř z nich. Jde o **biochanin A**, **formononetin**, **genistein** a **daidzein**. Estrogenně nejúčinnější je **S-equol**, který vzniká v menší míře z daidzeinu působením lidské střevní mikroflóry. [6][10][25][26][27]



Obr. 7 Porovnání struktury endogenního a exogenního estrogenu [6]

3.3.2 Metabolismus

Chemická struktura a biogeneze je odlišná od endogenních estrogenů. Společným znakem je fenolové jádro v molekule, které propůjčuje estrogení vlastnosti FE a umožňuje jejich vazbu na estrogení receptor. Tak jako přirozené estrogény se FE vstřebávají střevem, podléhají enterohepatálnímu cyklu, konjugují se s kyselinou glukuronovou a sírovou, konjugáty jsou vylučovány do moči a žluči, kde podléhají enterohepatální cirkulaci. [27]

3.3.3 Mechanismus účinku a terapeutické využití

V jádře buněk cílových tkání se váží FE na estrogení receptor (ER), regulují expresi genů, jejich doba retence v jádře buněk je však krátká. ER má dvě isoformy (alfa a beta). Afinita k β -ER je asi 5x vyšší. Zatímco β -ER se nachází převážně v kostech, v epitelu krevních kapilár, prostatě, močovém měchýři a vyšších centrech CNS, α -ER je přítomen v prsní a děložní tkáni.

Tento fakt by mohl vysvětlovat prospěšný vliv jetele v prevenci osteoporózy (např. formononetin zvyšuje proliferaci osteoblastů a chrání buňky před apoptózou [26]). Extrakty z jetele působí preventivně na vznik kardiovaskulárních onemocnění, snižují systolický a diastolický tlak, inhibují lipooxygenasu, omezují oxidaci LDL a chrání cévní kolagen. V mozku a hypofýze FE snižují hladinu gonadotropinů (více ovlivňují FSH nežli LH). Tímto mechanismem mohou mít vliv na nepříjemné menopauzální projevy – změny nálady, poruchy spánku, deprese, návaly pocení a další příznaky z nedostatku estrogenů. [6][27]

U isoflavonů z jetele lučního byl popsán výrazný inhibiční účinek na aromatasu (čímž dochází ke snížení tvorby 17β -estradiolu ve specifických tukových tkáních, jako je prsní tkáň), což naznačuje protinádorový účinek na tumory, jejichž růst závisí na přítomnosti tohoto hormonu. Enzym 5α -reduktasa je kompetitivně inhibován biochaninem A a genisteinem. Tím je brzděna konverze testosteronu na dihydrotestosteron a vznik benigní hyperplazie prostaty. Isoflavonoidy také indukují apoptózu rakovinových buněk v prostatě. [10]

3.4 *Explantátové kultury rostlin*

3.4.1 Úvod a historie

V posledních několika letech je zaznamenán velký rozvoj technik rostlinných explantátových kultur. Příčinou jsou stoupající nároky na rostlinné metabolity, které jsou využívány člověkem ve farmaceutickém průmyslu jako nepostradatelná farmaka, ale i v textilním průmyslu, zemědělství, potravinářství a kosmetice. Původní zdroje v podobě polní produkce již nestačí k uspokojení všech potřeb, proto je nutné hledat alternativní metody k získávání těchto látek. [28][29]

Někteří badatelé považují teoretický počátek kultur rostlinných explantátů *in vitro* u Klebse (1887); tento německý rostlinný fyziolog studoval životní projevy jednotlivých buněk vláknitých řas izolovaných z vlákna plazmolytickou macerací. Přitom vyslovil domněnku, že podobné pokusy by se také snad mohly podařit na materiálu z vyšších rostlin semenných.

Roku 1893 uveřejnil Rechinger výsledky pokusů s pěstováním fragmentů různých částí rostlin v umělých podmínkách (první použití živného roztoku v kulturách *in vitro*). Studoval problém minimální velikosti fragmentu rostliny, který by ještě při pěstování v umělých podmínkách rostl a jehož buňky by se také množily dělením. Pěstoval kousky pupenů topolu černého, jasanu ztepilého a dalších. Ze svých pokusů učinil závěr, že fragment rostliny, k tomu, aby mohl dále růst v kultuře *in vitro*, musí mít elementy cévního svazku.

Haberlandt (1902) dokazoval na základě pokusů, že neexistuje spodní hranice velikosti fragmentu podmiňující růst v kultuře *in vitro* a že bude možné zvolit k pokusům jedinou buňku. Vysoká diferenciací a specializace trvalých buněk, jichž Haberlandt použil ke svým experimentům, se pokládá v literatuře za první příčinu nezdaru jeho pokusů. Za druhý důvod ztroskotání se považuje volba extraktů z rostlin jako kultivačního prostředí.

První tzv. pravé tkáňové kultury rostlinného původu se pravděpodobně zdařily nejdříve Whiteovi (1938), poté Gautheretovi (1939) a Nobécourtovi (1939). [30] Pracemi těchto badatelů byl splněn základní požadavek kladený na kulturu explantátů *in vitro*, totiž dosažení časově neomezeného růstu. [31]

3.4.2 Terminologie

- * **Ex plantare:** pěstovat mimo
- * **In vitro:** „ve skle“, v umělých podmínkách
- * **Rostlinný explantát:** označení pro jakoukoliv živou, uměle oddělenou část rostliny, pěstovanou sterilně v umělých podmínkách mimo původní celek (individuum)
 - * dle Bauera (1939) je explantát každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů, který je vytržený z korelačních vztahů k celku (individu) a je pěstován v umělých podmínkách (definované kultivační médium, teplota, vlhkost, kvalita a kvantita světla)
- * **Tkáňová kultura:** historický termín přenesený z oblasti fyziologie živočichů, nepřesný pro kultury rostlinných pletiv
- * **Primární explantát:** rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny
- * **Primární kultura:** kultura primárních explantátů
- * **Subkultivace, pasážování:** přenos celé kultury nebo její části (inokula) do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat či zesílit růst kultury po další subkultivační interval
- * **Kalus, zával, svalec:** v původním slova smyslu neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů (dělivých pletiv) po poranění rostliny, v přeneseném slova smyslu pletivo proliferující na povrchu nenádorových primárních explantátů, které jsou schopny subkultivace
- * **Diferenciace:** chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech spočívající v aktivaci či inaktivaci určitých genů, jimiž se odlišily od tzv. eumeristemického stavu a získaly jinou specializaci

- * **Dediferenciace, embryonizace:** chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech, na jejichž základě získávají již specializované zralé buňky vlastnosti typické pro eumeristematický stav
- * **Totipotence:** schopnost diferencované rostlinné buňky regenerovat za vhodných podmínek celou rostlinu [30][32][33]

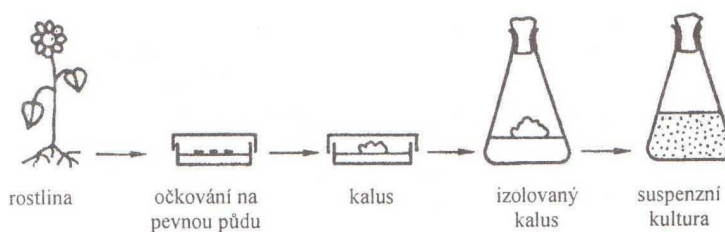
3.4.3 Základní principy

Základem rostlinného organismu, vznikajícího pohlavním rozmnožováním, je jedna buňka – zygota, která vznikne oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou. Zygota obsahuje v jádře kompletní genetickou informaci a v cytoplazmě mechanismy umožňující realizaci této informace. Zygota je totipotentní a mitoticky se dělí. Tímto procesem vznikají dceřiné buňky, které se dále vyvíjejí, dochází k jejich diferenciaci a stávají se stavebními kameny specializovaných pletiv. Možnost vegetativního množení rostlin však dokazuje, že rostlinné buňky jsou schopny dediferenciace a opětného dělení. Buňky diferencovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristematických.

V rostlinném organismu je totipotentní nejen zygota a meristematická buňka, ale i kterákoli jiná rostlinná buňka. Úpravou okolních podmínek buňky je tedy možné vyvolat dediferenciaci a neorganizovaný růst. Teoreticky je jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem vhodné pro odvození rostlinné explantátové kultury.[34]

Jak píše ve svém díle Sikyta a Dušek [29]: „Explantátová kultura se získá z kterékoli části rostliny, nadzemní nebo podzemní, explantací parenchymatické tkáně, jejím přenesením na tuhou živnou půdu a inkubací v teplotním rozmezí 23-28 °C.“

(Obr. 8)



Obr. 8 Odvození explantátové kultury z rostliny [29]

Po nárůstu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné je opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat tak získanou kulturu v aktivním stavu. Složení živné půdy, hlavně množství růstových látek a minerálů, ovlivňuje růst kalusové kultury, ale i převádění kalusu do suspenzní kultury. Výhodný je rozpadavý kalus, který zajišťuje homogenitu po přenesení do tekuté živné půdy.

Velký význam má pro přípravu explantátů volba kultivačního zařízení. Vhodným zařízením jsou pomaloběžně rolery nebo plastické vaky umístěné na pomaloběžném reciprokém třepacím stroji.

Problematickou stále zůstává generační (kultivační) doba explantátových kultur. Buněčný cyklus je u explantátů pomalejší a pohybuje se od 15 hodin výše. Nutné je po celou tuto dobu zajistit sterilitu procesu. Hlavním úkolem je nalezení takových způsobů kultivace, zejména z hlediska složení živné půdy, které by urychlily růst a množení buněk. [29]

3.4.4 Úrovně organizace explantátu a obecná charakteristika

- * rostlina (klíčnicí rostlinka, embryo)
 - *kultura izolovaných embryí* – kultura asepticky vyjmutého embrya přeneseného na vhodné médium kultivována za optimálních podmínek

- * orgán (kořen, pupen, řapík, list)
 - *orgánová kultura* – orgánové systémy, orgány resp. jejich části pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a částečně zachovává i jejich stavbu a funkci

- * pletivo (dřeňový parenchym, endosperm, kambium)
 - *pletivové/tkáňové kultury* – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy pletiva (tkáně), pomnožené na polotuhých či pevných nosičích nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě

- * buňka (mikrospory, pylová zrna, buněčné suspenze)
 - *buněčná kultura* – volné jednotlivé buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotekuté živné půdě nebo na nosiči nasyceném živnou půdou

- * izolovaný protoplast
 - *protoplastová kultura* – suspenzní kultura rostlinných buněk, u níž byla pomocí směsi enzymů (celulóza, hemicelulóza, pektináza) odstraněna buněčná stěna [32][33]

3.4.4.1 Buněčná suspenzní kultura

Kováč [34] uvádí, že tento typ explantátové kultury představuje relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných shluků, které jsou kultivovány v pohyblivém tekutém živném médiu. Použití tekutého prostředí umožňuje buňkám suspenze přímý kontakt s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou rychleji buňkám přístupné. Snadný přístup živin a dobrá výměna dýchacích plynů v pohyblivém médiu umožňuje velmi rychlý růst buněčné suspenze.

Buněčné kultury se využívají jako modelový systém při studiu procesů sekundárního metabolismu, indukci enzymů a genové exprese. Dále jako výchozí materiál pro přípravu enzymů, mutační šlechtění rostlin a k produkci somatických embryí.

O ideální buněčné suspenzi hovoříme tehdy, když je morfologicky a biochemicky homogenní. Dlouhodobou kultivací se však buněčná suspenze stává značně heterogenní. Tato různorodost je způsobena genetickými změnami, které jsou v suspenzních kulturách časté. [34]

Metody kultivace buněčných suspenzí

Pro získání suspenzní kultury je v první řadě nutné odvodit kalusové pletivo. Nevhodný je kalus kompaktní, naopak žádoucí je kalus rozpadavý. Kousky kalusu jsou následně kultivovány v tekutém médiu na třepačce nebo roleru. Pokud je cílem získání jednobuněčné suspenze, je nutné kulturu pravidelně filtrovat přes sítko o známé velikosti pórů.

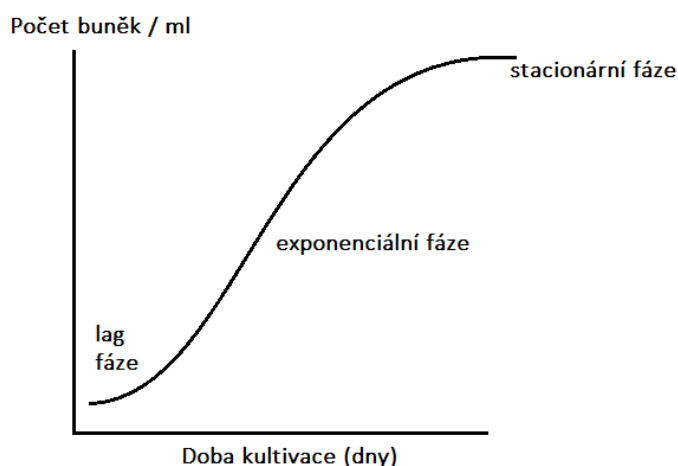
Ke kultivaci se používají různé kultivační systémy. Pro všechny je společné tekuté živné médium, které se pohybuje. Jeho pohybem se dosahuje aerace, zajišťuje se lepší přístup živin k jednotlivým buňkám a napomáhá se rozpadu buněčných shluků, které vznikají při dělení buněk.

Pro kontinuální kultivace buněčných suspenzí se používají různé typy bioreaktorů, kde je pohyb média podporován míchadlem či probubláváním sterilního vzduchu. Nejmodernější bioreaktory mají mnoho automatických prvků, které jistí stálé složení živného roztoku, stálou hustotu buněčné suspenze, regulaci pH, stálou koncentraci plynů, umožňují monitorování růstu buněčné kultury atd. [34]

Růst a pasážování suspenzních kultur

Růst buněčné suspenze je v porovnání s růstem kalusu na pevném médiu rychlejší, což vede k rapidnímu odčerpávání živin z kultivačního média a k zajištění stálého růstu je proto nutné buněčné suspenze poměrně často pasážovat na čerstvé médium. Subkultivace je prováděna na konci exponenciální fáze růstu, která je charakteristická aktivním dělením a zvětšováním buněk.

V uzavřeném systému lze charakterizovat růst tzv. **růstovou křivkou**. Tu získáme grafickým znázorněním závislosti některé z růstových charakteristik suspenze (PCV, čerstvá hmotnost, počet buněk, sušina atd...) na čase. Průběh křivky je proměnlivý a můžeme ho rozdělit na tři základní fáze. **Lag fáze** odpovídá pomalému růstu buněčné suspenze těsně po naočkování. **Exponenciální fáze** popisuje velmi intenzivní nárůst a v poslední **stacionární fázi** dochází k poklesu popř. zastavení růstu.



Obr. 9 Růstová křivka buněčné suspenze (vlastní zpracování dle [34])

Délka doby mezi založením buněčné kultury a stacionární fází závisí na několika faktorech: **na počáteční hustotě suspenze, době trvání lag fáze a délce buněčného cyklu.** Při použití velmi nízké počáteční hustoty buněk dochází k prodloužení lag fáze a exponenciální fáze. Růst suspenze je možné stimulovat jejím „kontaktem“ s kulturou o vysoké hustotě buněk resp. s metabolity, které intenzivně se dělící buňky uvolňují do okolního média (tzv. **kondiciované médium**). Aktivně se dělící buňky totiž produkují doposud nedefinované substance, které stimulují růst okolních buněk. [34]

Měření růstu buněčné suspenze

Růst buněk suspenze lze měřit pomocí několika parametrů: čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny, počtu buněk, mitotického indexu, objemu sedimentované kultury vzhledem k celkovému množství suspenze v % (PCV), vodivosti média a celkového obsahu bílkovin či DNA. [34]

3.4.5 Podmínky kultivace *in vitro*

Jednou z hlavních podmínek kultivace *in vitro* je mít aseptickou kulturu. Je potřeba sterilizovat živné médium, používané nástroje, pracovní prostory a desinfikovat rostlinný materiál. Další z podmínek je přiměřená výživa explantátu, kterou zajistíme ideálním složením živného média. V neposlední řadě jsou nutné optimální fyzikální podmínky, jako je osvětlení (dostatečná intenzita a vhodné spektrální složení), teplota

(nutnost řízení klimatizace), koncentrace plynů (správná ventilace kultivačních nádob) a vlhkost vzduchu. [32]

3.4.5.1 Složení živných médií

Kultivační médium je exogenním zdrojem rostlinných hormonů. Jeho významnou součástí jsou minerální živiny, tj. makroelementy a mikroelementy, a organické látky, především cukry, jako zdroj energie a uhlíku a důležitý faktor ovlivňující osmotickou hodnotu média. Dále vitamíny a aminokyseliny, případně další nedefinované organické složky, zpevňující látka a růstové regulátory. Všechny složky živného média se navzájem ovlivňují a společně se podílejí na usměrňování procesů, které probíhají v kultivovaných pletivech. [35]

Mezi nejčastěji používaná média patří média, která popsali White (1963), Murashige a Skoog (MS, 1962), Gamborg et al (B5, 1968), Gautheret (1942), Shenk spolu s Hildebrantem (SH, 1968), Nitsch a Nitsch (1969) a Lloyd s McCownem (1981). Média MS, SH a B5 jsou charakteristická vysokým obsahem makroelementů, zatímco ostatní média obsahují makroelementů podstatně méně. [34]

1. Makroelementy

Do kultivačních médií je dodáváno šest nejdůležitějších prvků: **dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra**. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je závislá na rostlinném druhu. Přidávají se ve formě solí.

2. Mikroelementy

Mezi mikroprvky nezbytné pro růst tkáňových kultur rostlin patří **železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden**. Může být dodáván i **kobalt, jód, sodík a chlór**.

3. Zdroj uhlíku

Nejčastějším zdrojem uhlíku je **sacharosa** v koncentraci 2-5%. V některých případech může být nahrazena **glukosou** či **fruktosou**. Sacharidy jsou do médií dodávány z důvodu heterotrofní výživy explantátů.

4. Vitamíny

Jedná se o látky nutné jako katalyzátory metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být limitujícím faktorem jejich růstu. Nejčastěji používané vitamíny jsou **thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol**. Poslední jmenovaný nemusí být pro růst explantátů nezbytný, ale může ho stimulovat. Předpokládá se jeho účast na tvorbě fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, které hrají roli v buněčném dělení. Dalšími používanými vitamíny mohou být **biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin** a jiné.

5. Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku

Aminokyseliny jsou přidávány především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Slouží buňkám jako zdroj dusíku nebo mohou být využívány k syntéze proteinů. Často používanými jsou **L-glutamin, L-asparagin, glycin** a **adenin**. Koncentrace stimulační růst závisí na druhu aminokyseliny.

6. Nedefinované organické složky médií

Růst explantátové kultury je možné stimulovat přidáním organických extraktů. Použití těchto směsí je však lépe vynechat z důvodu jejich nedefinovaného složení. Příkladem je **protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu banánů, pomerančové nebo rajčatové šťávy**. Média se někdy doplňují **aktivním uhlím**, kterému se připisují tři základní funkce: absorpce látek inhibujících růst a růstových regulátorů a ztmavnutí média.

7. Zpevňující látky

Nejběžněji používanou látkou této skupiny je **agar**. Agar je stabilní při teplotách kultivace, nereaguje s ostatními složkami média a je inertní vůči rostlinným enzymům. Dalšími zpevňujícími látkami jsou **agarosa** či syntetické látky **Phytigel** a **Gerlite**. Alternativou pevné půdy je „fixace“ na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě, perforovaném celofánu atd. Nejnovější jsou plastové nosiče, do kterých se upevňuje polypropylenová membrána (tzv. rafty).

8. Růstové regulátory

Dělíme je do čtyř základních skupin: **auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová**. Pro růst explantátu je důležitá nejen koncentrace těchto hormonů, ale i jejich vzájemný poměr.

Mezi nativní auxiny užívané při kultivaci patří **kyselina indolyloctová (IAA)**. Syntetickými látkami jsou **kyselina indolylmásečná (IBA)**, **kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D)**, **kyselina naftyloctová (NAA)** a další. Auxiny jsou v živném médiu využívány ke stimulaci růstu kalusu a buněk, k indukci tvorby prýtů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu prýtů.

Ze skupiny cytokininů jsou využívány syntetické látky. Například **benzylaminopurin (BAP či benzyladenin BA) a zeatin**. Zástupci používaných nativních cytokininů jsou **6-dimethylaminopurin (2iP či IPA) a furfurylaminopurin (kinetin)**. Působením cytokininů dochází ke stimulaci buněčného dělení a tvorby axilárních prýtů.

Používané gibereliny jsou zastoupeny **kyselinou giberelovou (GA₃) a giberelinem (GA₇)**, které stimulují růst buněčných kultur při nízké hustotě suspenze. Dále podněcují růst kalusu a zakrslých rostlin.

Kyselina abscisová podporuje i inhibuje růst kalusu (účinek záleží na rostlinném druhu), stimuluje proliferaci prýtů a inhibuje pozdější fáze embryogeneze. [34]

3.4.5.2 Fyzikální podmínky

Osvětlení

V závislosti na osvětlení dochází ke změně intenzity biosyntézy a akumulace účinných látek. Intenzita osvětlení bývá od 2 000-5 000 luxů.

Teplota

Teplota ovlivňuje rychlost metabolismu, růst, vývoj a dělení buněk. Nejvhodnější se jeví kultivace v teplotním rozmezí 23-28 °C. Při teplotách nižších dochází ke zpomalení růst, případně až k poškození kultur.

pH živného média

Optimální hodnota pH živného média je závislá na typu kultury. Většinou je počáteční hodnota média slabě kyselá (pH 5,5-6,0). pH se upravuje kyselinou chlorovodíkovou či hydroxidem sodným/draselným.

Vlhkost vzduchu

Vzdušná vlhkost bývá nastavena v okolí hodnot 20-98 % podle požadavků dané kultury. [33][36]

3.4.6 Výhody/nevýhody a využití explantátových kultur

Hlavním benefitem explantátových kultur je, že lze dlouhodobě a v malém prostoru kultivovat velké populace buněk a z každé lze vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. Další předností je možnost vést proces kultivace za řízených podmínek, bez závislosti na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech. [29]

Nevýhodami jsou finanční náročnost, nutnost aseptického prostředí, genetická variabilita a labilita kultur, rozdílná genetická exprese klíčových biosyntetických enzymů v intaktní rostlině a rostlinné tkáňové kultuře a jiné. [33]

Využití kultur *in vitro* lze rozdělit na dvě sféry, ve kterých je nejintenzivněji prováděn výzkum. Jde o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin a o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami, kterou lze podpořit použitím prekursorů požadovaných metabolitů, biotransformací nebo elicací. [37]

3.5 *Elicitace*

3.5.1 Úvod a základní principy

Jak už bylo v úvodu řečeno, v dnešní době je možné sekundární metabolity získávat přímou *extrakcí z intaktních rostlin*, *chemickou syntézou* a novinkou posledních let jsou *explantátové kultury*. První dva jmenované způsoby s sebou nesou řadu nevýhod. U intaktních rostlin je obsah žádaných látek závislý na klimatických podmínkách, na postupu sušení a skladování rostlin. Další komplikací je i to, že řada rostlin v současné době přichází o své životní prostředí a s jejich úbytkem roste i jejich cena. Příprava sekundárních metabolitů chemickou syntézou je často zase obtížná, drahá a u složitých látek prozatím neuskutečnitelná. Konečným produktem chemických syntéz je obvykle směs izomerů, zatímco rostlinná buňka produkuje jediný stereoizomer. [34]

Jako slibná alternativa se jeví tkáňové kultury, které by mohly mít v průmyslové produkci sekundárních metabolitů široké uplatnění. I přes řadu výhod má tato metoda mnoho biologických a biotechnologických nedostatků. Jedna z hlavních překážek je relativně pomalý růst rostlinných buněčných kultur a nízká výnosnost sekundárních metabolitů. [34][38]

Řešením se zdá využití imobilizovaných rostlinných buněk, které spočívá v jejich uzavření do určitého nosného inertního materiálu. Při aktivní imobilizaci se uzavírají do polymerů, při pasivní imobilizaci vcestují buňky do porézní hmoty (př. polyuretanová pěna). Imobilizované buňky se dále používají buď k *biotransformacím*, nebo *komplexním syntézám*. V případě biotransformačních reakcí se do kultivačního média přidají prekursorů požadovaných látek a rostlinné buňky je přemění na finální produkt. K dosažení komplexní syntézy je nejprve nutné dosáhnout zvýšení produkce sekundárních metabolitů.

Syntéza a akumulace sekundárních metabolitů je považována za aspekt diferenciací. Bylo zjištěno, že v rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se akumuluje malé množství těchto metabolitů. Ukazuje se, že faktory zpomalující růst buněčných kultur působí často stimulačně na produkci sekundárních metabolitů, především cestou omezení primárního metabolismu. Stimulačně může působit i určitý

stres – př. snížení koncentrace živin, vynechání růstového regulátoru, nebo přidání prekursorů či tzv. *elicitorů* do média. [34]

Funkcí sekundárních metabolitů je mimo jiné chránit rostlinu před napadením hmyzem, býložravci, patogeny a zajistit přežití rostliny při působení biotických a abiotických stresorů. Tento poznatek využívá metoda *elicitace*, která je dobrou strategií, jak indukovat fyziologické změny, stimulovat obranné či stresem vyvolané reakce v rostlinách a následně tímto mechanismem spustit syntézu sekundárních metabolitů.

Principem zahájení produkce sekundárních metabolitů je aktivace buněčných receptorů vlivem extracelulárního nebo intracelulárního signálu. Následuje transdukce tohoto signálu, která vyústí v aktivaci nebo *de novo* biosyntézu transkripčních faktorů. Transkripční faktory regulují expresi genů zapojených v sekundárním rostlinném metabolismu. Výsledné enzymy katalyzují tvorbu cílových sekundárních metabolitů. [38]

3.5.2 Klasifikace elicitorů

Elicitory jsou chemické látky nebo biofaktory pocházející z různých zdrojů, které mohou vyvolat fyziologické změny ve vybraném rostlinném organismu. V širším slova smyslu se jedná o látky, které mají potenciál spustit fyziologické a morfologické změny a mohou vést k akumulaci fytoalexinů. [38]

Elicitory klasifikujeme na základě jejich původu na **biotické a abiotické**. Biotické stresory mají biologický původ. Pocházejí z hub, bakterií, virů a býložravců. Může se jednat i o komponenty stěn rostlinných buněk nebo chemické látky uvolňované rostlinami po napadení patogeny či býložravci. První biotické elicitory byly objeveny v roce 1968. Abiotické elicitory jsou děleny na chemické sloučeniny (anorganické soli, ionty kovů a další látky narušující celistvost membrány) a fyzikální faktory (UV záření, sucho, mráz a další). (**Tab. 1**)

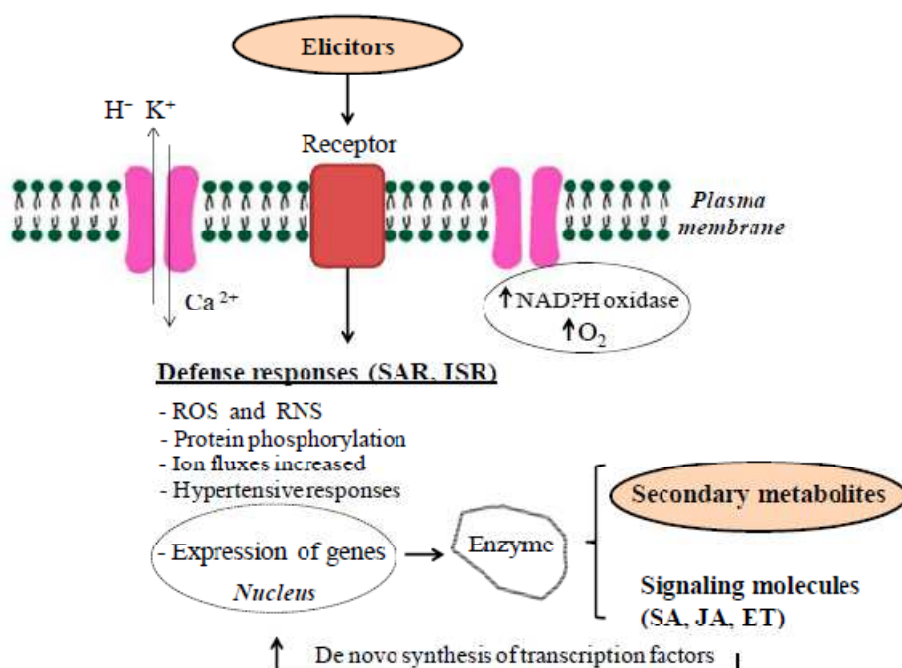
Na základě jejich schopnosti interagovat s hostitelskou buňkou dělíme elicitory na **obecné** a **specifické**. Někdy jsou do skupiny elicitorů řazeny i **rostlinné hormony**. [39][40]

Tab. 1 Biotické a abiotické elicitory [39]

Biotické elicitory	
<u>Lipopolysacharidy</u>	
<u>Polysacharidy</u> : pektin a celulóza, chitosan, chitin a glukany, algináty, arabská klovatina, guma guar, LBG, kvasnicový extrakt	
<u>Oligosacharidy</u> : galakturonany, mannan, guluronát, mannuronát	
<u>Proteiny</u> : celuláza, glykoproteiny, kryptogein, laktoferrin, oligandrin, ...	
<u>Složené komplexy</u> : houbové spóry, mikrobiální a mycelární buněčná stěna	
<u>Patogenní toxiny</u> : koronatin	
<u>Extrakt z dobromyslu</u>	
Abiotické elicitory	
<u>Chemické</u> :	<u>Fyzikální</u> :
kyselina octová	změna složení plynů
benzothiadiazol	mráz
silikony	oxid uhličitý
ethanol	sucho
ethen	extrémní teplotní šok
anorganické soli: chlorid rtuťnatý, síran měďnatý, chlorid vápenatý,...	vysoký tlak
kovové ionty: Co^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , Ag^+ , Ag^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} a Cd^{2+}	vysoká a nízká osmolarita
	UV záření
	solný stres
	poranění a ozon
Rostlinné hormony	
jasmonová kyselina, metyl jasmonát, salicylová kyselina, metyl salicylát, ethylen, cytokinin, giberelin GA_3	

3.5.3 Mechanismus účinku

Prvním krokem účinku elicitorů je vazba těchto molekul na receptory, které jsou buď na plazmatické membráně rostlinné buňky, nebo uvnitř buňky na endomembráně. Následuje přenos signálu. Několik autorů popsalo, že rostliny reagují na elicitory aktivováním řady obranných mechanismů na povrchu plazmatické membrány (**Obr. 10**), zahrnujících např. produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), aktivaci genů chránících buňku, změny v napětí plazmatické membrány a zvýšení toku iontů (chloridy a draslík putují ven z buňky, opačným směrem proudí vápník), rychlé změny ve fosforylaci proteinů, oxidaci lipidů a strukturálních obranných bariérách (např. posílení a dřevnatění buněčné stěny) atd. Následně dochází k aktivaci a *de novo* biosyntéze transkripčních faktorů, které přímo regulují expresi genů účastnících se produkce sekundárních metabolitů.



SAR = získaná systémová odpověď, ISR = navozená systémová odolnost, ROS = reaktivní formy kyslíku, RNS = reaktivní formy dusíku, SA = salicylová kyselina, JA = jasmonová kyselina, ET = ethylen

Obr. 10 Mechanismus účinku po rozpoznání elicitoru receptory [39]

3.5.3.1 Přenos signálu elicitoru

Po rozpoznání signálu vyvolaného elicitem dochází k aktivaci buněčných receptorů a následně k ovlivnění dalších článků v této signální dráze, jako jsou *iontové kanály*, *G-proteiny* (GTP vázající proteiny) a *protein kinasy*. Aktivované efekty přenášejí signál k tzv. sekundárním posílům, které ho ještě více zesilují a převádějí dál.

Zjednodušeně může být tato cesta popsána takto:

1. vazba elicitoru na receptor
2. reverzibilní fosforylace a defosforylace proteinů plazmatické membrány a cytosolu
3. prudký nárůst koncentrace cytosolických Ca^{2+} iontů
4. depolarizace plazmatické membrány
5. Cl^- a K^+ eflux/ H^+ influx
6. extracelulární alkalizace a okyselení cytoplazmy
7. aktivace mitogenem aktivované protein kinasy (MAPK)
8. aktivace NADPH oxidasy a produkce reaktivních forem kyslíku (ROS)
9. časná exprese obranných genů
10. produkce ethylenu a jasmonátů
11. pozdní genová exprese obranné reakce
12. hromadění sekundárních metabolitů [38]

3.5.4 Podmínky elicitace

Existuje několik faktorů ovlivňujících úspěšnost elicitace. Týkají se jak samotných rostlin, tak elicatorů. **Tab. 2** obsahuje jejich výčet. [39]

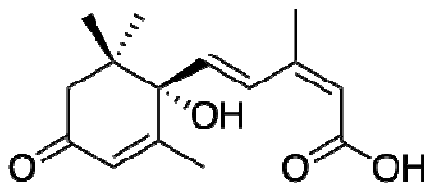
Tab. 2 Faktory ovlivňující tvorbu bioaktivních sloučenin [39][41]

ROSTLINA/R. KULTURA	ELICITOR
Genetická charakteristika – rostlinný druh, kultivar	Dávka – různé koncentrace
Fyziologický stav – semena, výhonky,.../ stáří kultury, růstová fáze kultury	Povaha – biotický/abiotický (chemický/fyzikální)
Podmínky prostředí – světlo, teplota	Způsob aplikace – hydroponický roztok, ve formě spreje
Agronomické podmínky – zavlažování, složení půdy, úrodnost/složení živného média	Synergický efekt – aditivní nebo antagonistická kombinace elicatorů
Zacházení a uchovávání – transport, teplota, vlhkost	Doba elicitace – krátkodobá, dlouhodobá (hodiny, dny)

3.6 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je rostlinný hormon (fytohormon) regulující vývojové a metabolické procesy abscise a dormance v rostlinách. Důležitou regulační funkci má ABA za stresových podmínek, tj. sucha, chladu, nevhodných osmotických podmínek a imisí, což se projevuje několikanásobným zvýšením její endogenní hladiny. Význam ABA jako stresového hormonu poprvé zaznamenali Wright a Hiron (1969). Alternativní, dnes méně používané názvy ABA jsou abscisin II a dormin. [2][35][42]

Kyselina (+)-*S*-abscisová je označení pro látku definovanou jako kyselina (+)-(1'*S*,2*Z*,4*E*)-5-(1'-hydroxy-2',6',6'-trimethyl-4'-oxo-2'-cyklo-hexenyl)-3-methyl-2,4-pentadienová (**Obr. 11**). [35] Jde o seskviterpen s 15 uhlíkovými atomy a cyklickou částí v molekule. Podle orientace karboxylové skupiny na C2 uhlíku rozlišujeme *cis*- a *trans*- isomery. Většina molekul ABA v rostlinách tvoří 2-*cis*-4-*trans*-isomer, který se na světle snadno přeměňuje na 2-*trans*-4-*trans*-formu. Fyziologicky aktivní je výhradně její (+)-*S*-isomer. Kromě geometrické isomerie vykazuje molekula ABA také isomerii optickou, danou přítomností asymetrického uhlíku v pozici 1' šestičlenného cyklu molekuly. [42]



Obr. 11 Kyselina abscisová [43]

ABA v rostlinách ovlivňuje stárnutí a zrání plodů (je charakterizováno zvýšenou syntézou ABA), abscisi listů, květů a plodů, dormanci pupenů (má inhibiční účinek na rašení), dormanci semen (je inhibitorem klíčení), vodní provoz, stres (vodní stres je počátkem obranné reakce), geotropismus kořenů, růst rostlin a kvetení. [44]

Několik článků uvedlo, že ABA hraje důležitou roli v obranné reakci rostlin. Její funkce zde je však komplexnější a záleží na typu rostliny a patogenu. ABA může působit negativně i pozitivně. Negativní regulace rostlinné obrany proti různým biotrofním a nekrotrofním patogenům byla prokázána v několika experimentech. Příkladem je ABA-deficientní mutant *sitiens* rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*),

který projevil větší odolnost proti plísni *Botrytis cinerea* (Audenaert et al. 2002) nebo bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Thaler a Bostock 2004) než divoce rostoucí rostliny. Rovněž exogenní aplikace ABA zvýšila citlivost různých rostlinných druhů vůči bakteriálním a plísňovým patogenům. Například u sóji luštinaté (*Glycine max*) došlo ke zvýšení náchylnosti k infekci způsobené plísní *Phytophthora sojae* (Mohr a Cahill 2001). Jako pozitivní regulátor ABA působí hlavně mechanismem uzavření svěřacích buněk průduchů, čímž dojde k vytvoření bariéry pro vstup bakteriální infekce (Melotto et al. 2006). [45]

Kyselina abscisová přidávaná do kultivačního média explantátových kultur byla dlouhou dobu považována za pouhý retardant růstu. Ackerson (1984) však zjistil, že přídavek ABA podporuje normální vývin izolovaných zygotických embryí sóji (*Glycine hispida*). Působením ABA může být také ovlivněna organogeneze. Například Abou-Mandour a Hartung (1986) zaznamenali její kladné působení na regeneraci kořenů v kalusové kultuře kukuřice seté (*Zea mays*). Nejvýznamněji se vliv ABA projevuje u somatické embryogeneze. [35][42]

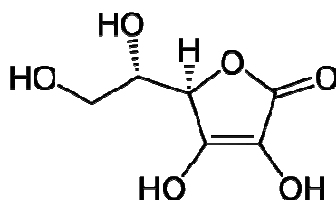
Rozsah fyziologických procesů regulovaných ABA je značný a mechanismus účinku nemusí být stejný. U abscisové kyseliny lze nalézt tři hlavní směry účinků:

1. účinky na membránové úrovni,
2. inhibice syntézy proteinů,
3. účinky na molekulární úrovni – specifická aktivace a deaktivace určitých genů. [35]

3.7 Kyselina askorbová

Askorbová kyselina (AA) je přírodně se vyskytující, ve vodě rozpustná organická sloučenina s antioxidačními vlastnostmi, nepostradatelná pro rostliny, zvířata i lidi. Díky své výživové hodnotě je dobře známou molekulou, avšak metabolismus a některé její funkce u rostlin jsou prozkoumány méně. [46][47]

Kyselina L-askorbová (vitamín C) je označení pro látku definovanou jako (2R)-2-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-2H-furan-5-on. [48] Rozmístění π -elektronů přes C2-C3 konjugovaný endiolový systém stabilizuje molekulu a vede k vysoké kyselosti vodíkového atomu hydroxylové skupiny na C3 ($pK_a = 4,13$). Proto při fyziologickém pH existuje L-askorbová kyselina jako monovalentní anion (L-askorbát). K disociaci druhého hydroxyly dochází při pH 11,6. [49]



Obr. 12 Kyselina askorbová [50]

Funkcí v rostlinném organismu má AA několik. Jako antioxidant reaguje se superoxidem, singletovým kyslíkem, ozonem, peroxidem vodíků a vysoce reaktivním hydroxylovým radikálem. Účastní se tedy odstraňování reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou vyprodukovány během fotosyntézy, specifických fází vývoje (např. růst sazenic je doprovázen katabolismem lipidů, při kterém probíhá β -oxidace mastných kyselin s vedlejší produkcí H_2O_2) a po vystavení některým znečišťujícími a herbicidními látkám. Tímto mechanismem pak AA udává míru tolerance rostlin k mnoha abiotickým a biotickým stresorům (mráz, sucho, vystavení těžkým kovům atd.), které vedou k tvorbě ROS. Navíc L-askorbát regeneruje lipofilní antioxidant α -tokoferol z α -chromanoxyllového radikálu. [46][47]

Dále L-AA plní funkci enzymového kofaktoru pro enzymy, které jsou obecně mono nebo dioxygenasy, obsahující železo nebo měď na aktivním místě a které potřebují L-askorbovou kyselinu pro udržení kovového iontu v redukované formě (např.

je kofaktorem pro prolyl a lysylhydroxylasy účastnící se syntézy hydroxyprolinu a hydroxylysinu). [46][49]

L-AA je dobře známá jako *in vitro* donor elektronů pro fotosyntetický a mitochondriální elektronový transport. Podílí se na tvorbě oxalátu a tartrátu, na které může být rozštěpena. Mimo jiné ovlivňuje i buněčné dělení, růst a dobu kvetení rostlin. [46][47]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál, přístroje, pomůcky

4.1.1 Rostlinný materiál

Ke všem experimentům uvedeným v této diplomové práci byla použita čtyřletá suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint).

4.1.2 Chemikálie

- 6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno
- Dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno
- Dusičnan draselný *p.a.*, Lachema, Brno
- Ethanol 96%, Lachema, Brno
- Edetan disodný č., Lachema, Brno
- Chloramin B, Lachema, Brno
- Chlorid kobaltnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- Chlorid pyridoxinia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- Chlorid thiaminia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- Chlorid vápenatý *p.a.*, Lachema, Brno
- Jodid draselný *p.a.*, Lachema, Brno
- Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová č., Lachema, Brno
- Kyselina abscisová č., Sigma-Aldrich, Praha
- Kyselina askorbová č., Sigma-Aldrich, Praha
- Kyselina boritá *p.a.*, Lachema, Brno
- Kyselina chlorovodíková *p.a.*, Lachema, Brno
- Kyselina mravenčí bezvodá *p.a.*, Lachema, Brno
- Kyselina nikotinová č., Lachema, Brno
- Kyselina octová bezvodá *p.a.*, Lachema, Brno
- Kyselina octová ledová *p.a.*, Lachema, Brno
- Kyselina šťavelová č., Lachema, Brno

- Methanol *p.a.*, Lachema, Brno
- Molybdenan sodný *p.a.*, Lachema, Brno
- Myoinositol č., Sigma, St. Louis
- Sacharosa *p.a.*, Lachema, Brno
- Síran amonný *p.a.*, Lachema, Brno
- Síran hořečnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- Síran manganatý *p.a.*, Lachema, Brno
- Síran měďnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- Síran zinečnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- Síran železnatý *p.a.*, Lachema, Brno

4.1.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen
- Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, Žilina
- Horkovzdušný sterilizátor HS 31A, Chirana, Brno
- Chromatografická sestava Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), Merck, Darmstadt
- Kolona LiChrosper RP – 18 250x4 (5 μ m) s předkolonkou, Merck, Darmstadt
- Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
- Třepačka Unimax 2010, Heidolph
- Vodní lázeň KL – 1, Laboratorní přístroje, Praha

4.2 Kultivace explantátové kultury

4.2.1 Kultivační nádoby a nástroje

Pro kultivaci explantátových kultur bylo použito nádobí z varného skla značky SIAL (materiál dostatečně odolný vůči vodě, chemikáliím a rozdílům teplot), které vyhovuje požadavkům pro práci s tkáňovými kulturami.

Suspenzní kultury byly kultivovány ve 250ml varných baňkách ze skla SIAL. Kovové nástroje (pinzety, skalpely) byly opláchnuty 96% ethanolem a po zabalení do hliníkové folie sterilizovány 2 hodiny při teplotě 200 °C v horkovzdušném sterilizátoru. Pipety byly sterilizovány v hliníkové fólii 15 min při teplotě 121 °C v autoklávu.

4.2.2 Příprava živného média

Pro kultivaci suspenzních kultur *Trifolium pratense* L. bylo použito živné médium podle Gamborga (B5) následujícího složení [51]:

Tab. 3 Složení živného média

KNO ₃	2 500,00 mg.l ⁻¹
CaCl ₂ . 2H ₂ O	150,00 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	250,00 mg.l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00 mg.l ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150,00 mg.l ⁻¹
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,84 mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,34 mg.l ⁻¹
KI	0,75 mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	3,00 mg.l ⁻¹
MnSO ₄ . H ₂ O	10,00 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	2,00 mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25 mg.l ⁻¹
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
myoinositol	100,00 mg.l ⁻¹

kyselina nikotinová	1,00 mg.l ⁻¹
pyridoxin	1,00 mg.l ⁻¹
thiamin	10,00 mg.l ⁻¹
sacharosa	30 000,00 mg.l ⁻¹

Jako stimulátor růstu byla použita kombinace kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové (2 mg.l⁻¹) s 6-benzylaminopurinem (2 mg.l⁻¹). [28]

Jednotlivé substance byly naváženy na analytických vahách, v případě nízkých koncentrací pipetovány ze zásobních roztoků. Všechny látky byly rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1 000 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.

4.2.3 Pasážování a kultivace

Pasážování bylo prováděno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen minimálně 1 hodinu germicidní zářivkou. Po celou dobu subkultivace byly zachovány přísné aseptické podmínky a bylo používáno sterilní sklo a nástroje.

Suspenzní kultura byla kultivována ve varných baňkách na médiu podle Gamborga na pomaloběžném roleru při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo / 8 hodin tma. Pasážování bylo prováděno vždy po 14 dnech přenesením části narostlé suspenze do baněk s čerstvým médiem. [28]

4.3 Elicitace

Elicitace byla prováděna roztoky kyseliny abscisové a kyseliny askorbové o třech různých koncentracích ($c_1 = 5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $c_2 = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $c_3 = 500 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Ve 21. dni kultivace byla provedena elicitace přidáním 1,0 ml elicitoru příslušné koncentrace k suspenzní kultuře za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Ke kontrolním kulturám byl přidán 1,0 ml destilované vody.

K experimentu bylo využito 72 kultivačních baněk s explantátovou kulturou. Soubor 8 baněk bez elicitoru sloužil jako kultura kontrolní. Do ostatních 64 baněk byl napipetován vždy 1,0 ml elicitoru o příslušné koncentraci. Poté byly elicítované kultury kultivovány za již uvedených podmínek.

Po 6, 24, 48 a 168 hodinách aplikace elicitoru byly elicítované kultury odebírány. Odběry kontrolních kultur byly provedeny po 6 a 168 hodinách. Buňky suspenzní kultury byly odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a sušeny při laboratorní teplotě.

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

4.4 Stanovení obsahu flavonoidů

4.4.1 Princip stanovení

Obsah flavonoidů se stanoví spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé. [52]

4.4.2 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 minut 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. 250ml baňka i filtr se promyje *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 ($C_{21}H_{20}O_{12}$) 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.

4.5 Stanovení obsahu isoflavonoidů

Methanolvé 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. [53]

4.5.1 Princip stanovení

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze. Mobilní fází je kapalina, která prochází kolonou naplněnou fází stacionární. Hnací mechanismus separačního procesu je opakované rozdělování analytu na rozhraní obou fází. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifická interakce v afinitní chromatografii. [54]

4.5.2 Příprava vzorku

Asi 0,200 – 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. Identifikace obsahových látek se provede porovnáním retenčních časů a spekter příslušných píků se standardy.

4.5.3 Parametry HPLC analýzy

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

Kolona: Kolona LiChrosper RP-18 (250 x 4 mm, velikost částic 5 μm)
s ochrannou předkolumnou

Objem nástríku: 20 μl

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

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

Průtok: 1,1 ml/min.

Detekce: DAD Jasco MD-2015, $\lambda = 200\text{-}650$ nm,

vyhodnoceno při vlnové délce 260 nm

Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

4.6 Statistické zpracování výsledků

Získané výsledky obsahu flavonoidů ve sledovaných kulturách *Trifolium pratense* L. byly statisticky vyhodnoceny na základě **T-testu** (test významnosti rozdílu dvou průměrů), 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

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

t ... testovací kritérium

\bar{x}_1 ... aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x}_2 ... aritmetický průměr pokusného souboru

n_1 ... počet členů kontrolního souboru

n_2 ... počet členů pokusného souboru

s_1 ... směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 ... směrodatná odchylka pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t rozdělení se stupněm volnosti (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 $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ 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 $p(0,05) = 3,182$. [55]

5 VÝSLEDKY

5.1 Tabulky

Tab. 4 Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) po elicitaci různými koncentracemi kyseliny abscisové

Koncentrace kyseliny abscisové ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Doba působení (hod)	ELICITACE		KONTROLA		T-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
$c_1 = 5$	6	0,065	0,006	0,087	0,026	0,815
	24	0,080	0,007	0,087	0,026	0,244
	48	0,063	0,008	0,087	0,026	0,861
	168	0,064	0,01	0,085	0,01	1,429
$c_2 = 50$	6	0,078	0,03	0,087	0,026	0,214
	24	0,094	0,03	0,087	0,026	0,215
	48	0,065	0,004	0,087	0,026	1,000
	168	0,075	0,011	0,085	0,01	0,594
$c_3 = 500$	6	0,124	0,009	0,087	0,026	1,396
	24	0,117	0,004	0,087	0,026	1,189
	48	0,091	0,017	0,087	0,026	0,157
	168	0,060	0,002	0,085	0,01	2,418

Tab. 5 Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) po elicitaci různými koncentracemi kyseliny askorbové

Koncentrace kyseliny askorbové ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Doba působení (hod)	ELICITACE		KONTROLA		T-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
$c_1 = 5$	6	0,068	0,016	0,087	0,026	0,595
	24	0,086	0,006	0,087	0,026	0,007
	48	0,091	0,053	0,087	0,026	0,082
	168	0,105	0,055	0,085	0,01	0,374
$c_2 = 50$	6	0,046	0,001	0,087	0,026	1,567
	24	0,072	0,021	0,087	0,026	0,413
	48	0,089	0,013	0,087	0,026	0,114
	168	0,074	0,001	0,085	0,01	1,032
$c_3 = 500$	6	0,078	0,002	0,087	0,026	0,299
	24	0,086	0,01	0,087	0,026	0,000
	48	0,060	0,004	0,087	0,026	1,01
	168	0,060	0,04	0,085	0,01	0,604

Tab. 6 Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varietá Sprint) po elicitaci různými koncentracemi kyseliny abscisové

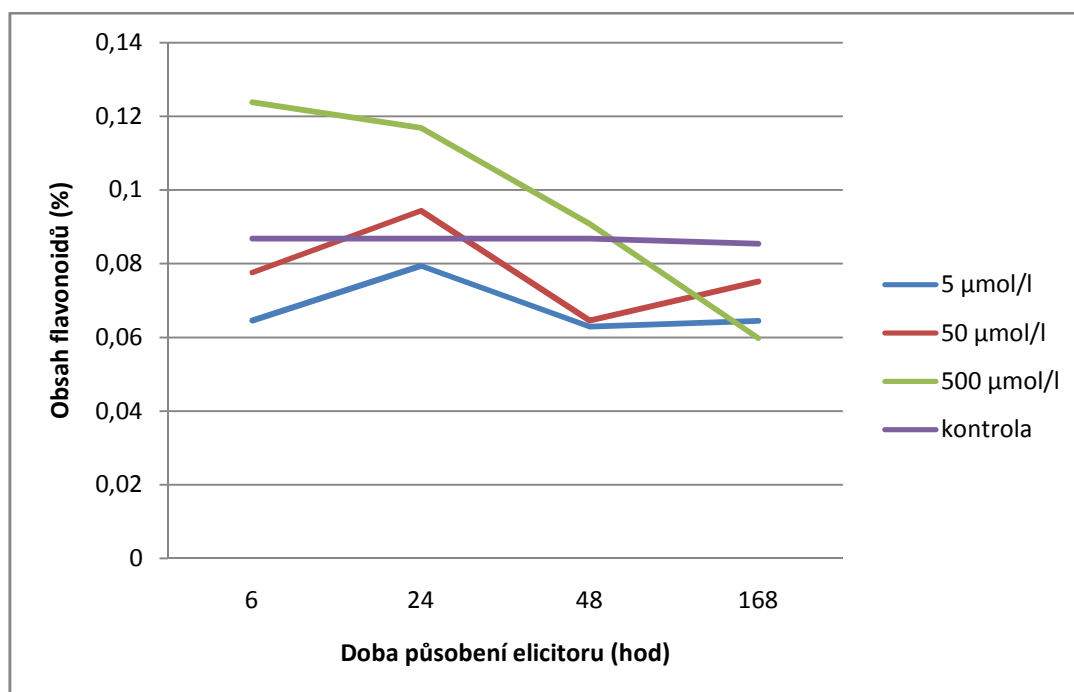
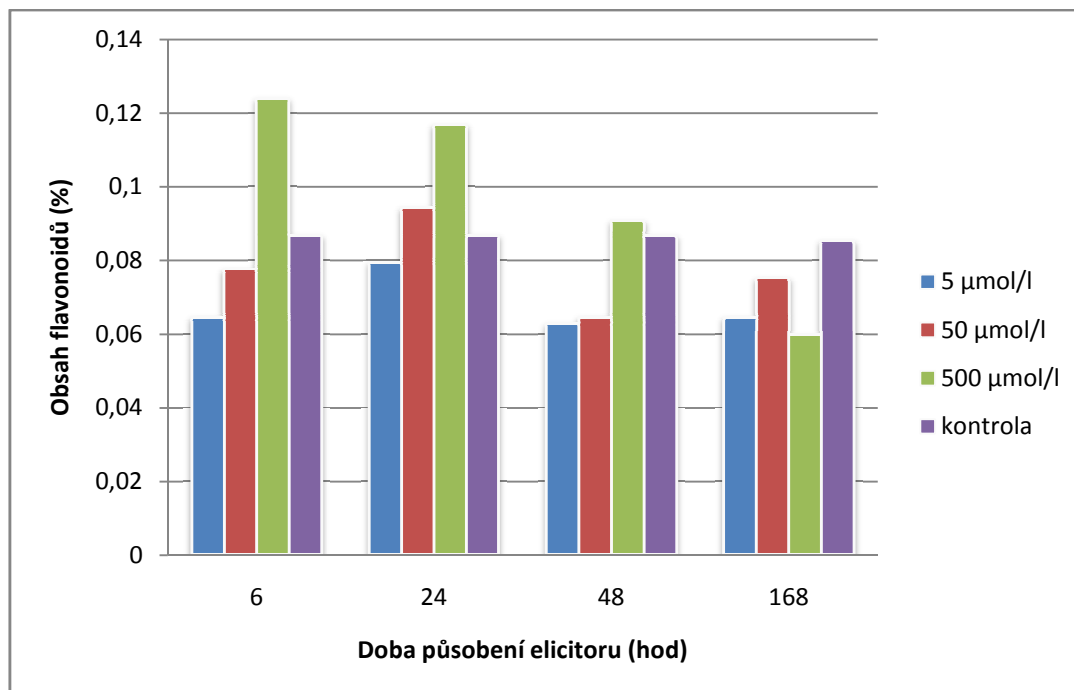
Koncentrace kyseliny abscisové ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Doba působení (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)				
		genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochaninA
$c_1 = 5$	6	0,02	-	-	-	-
	24	0,02	-	-	-	-
	48	0,01	-	-	-	-
	168	0,01	0,01	-	-	-
$c_2 = 50$	6	0,01	-	-	-	-
	24	0,01	-	0,01	-	-
	48	0,01	-	0,01	-	-
	168	0,01	-	0,01	-	-
$c_3 = 500$	6	0,09	0,02	0,05	-	-
	24	0,02	0,01	0,01	-	-
	48	0,01	0,02	-	-	-
	168	-	-	-	-	-
kontrola	6	0,01	0,01	-	-	-
	24	0,01	0,01	-	-	-
	48	0,01	0,01	-	-	-
	168	0,01	-	-	-	-

Tab. 7 Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) po elicitaci různými koncentracemi kyseliny askorbové

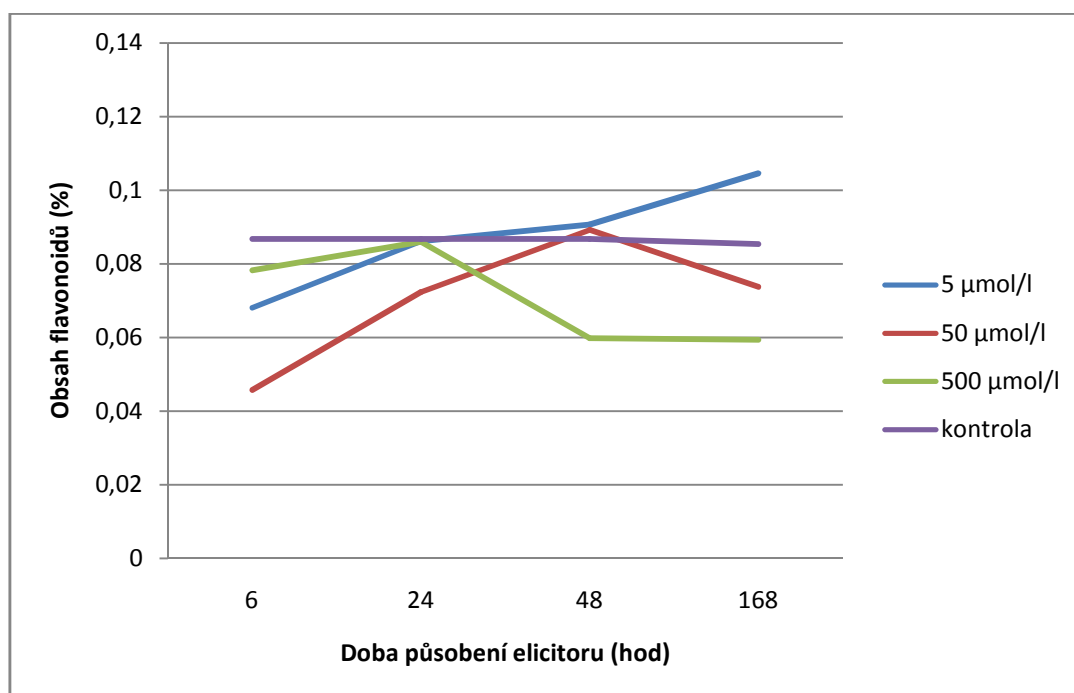
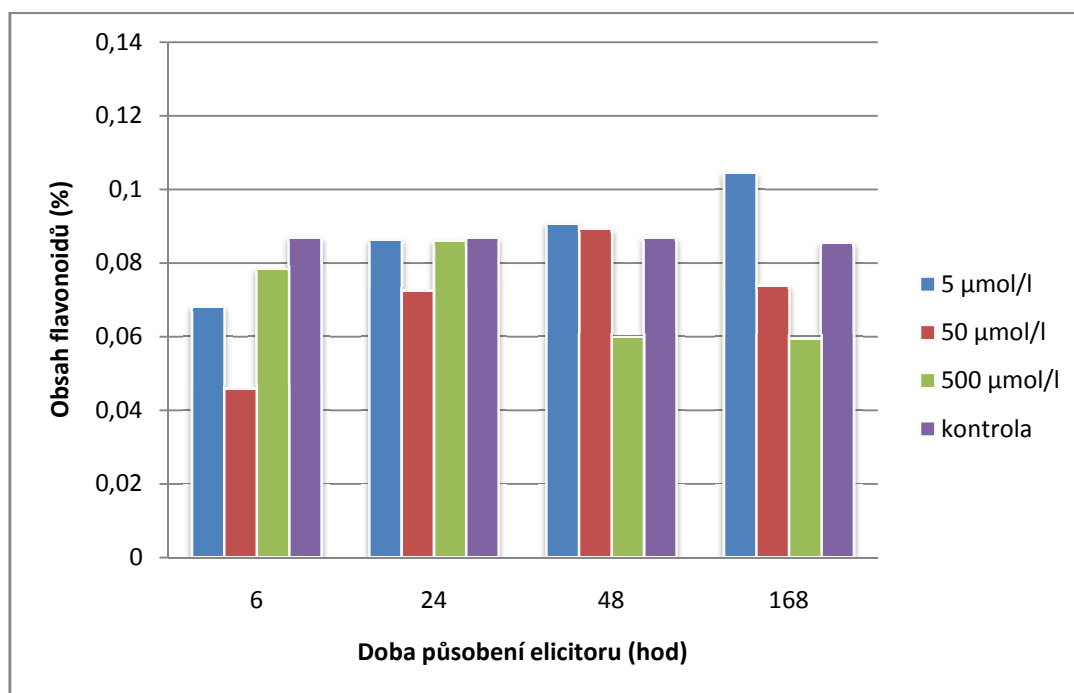
Koncentrace kyseliny askorbové ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Doba působení (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)				
		genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochaninA
$c_1 = 5$	6	0,02	-	-	-	-
	24	0,02	-	-	-	-
	48	0,05	-	-	-	-
	168	0,08	0,02	-	-	-
$c_2 = 50$	6	-	-	-	-	-
	24	0,01	-	-	-	-
	48	0,01	-	-	-	-
	168	0,03	-	-	-	-
$c_3 = 500$	6	0,01	-	-	-	-
	24	0,05	-	-	-	-
	48	0,01	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	-
kontrola	6	0,01	0,01	-	-	-
	24	0,01	0,01	-	-	-
	48	0,01	0,01	-	-	-
	168	0,01	-	-	-	-

5.2 Grafy

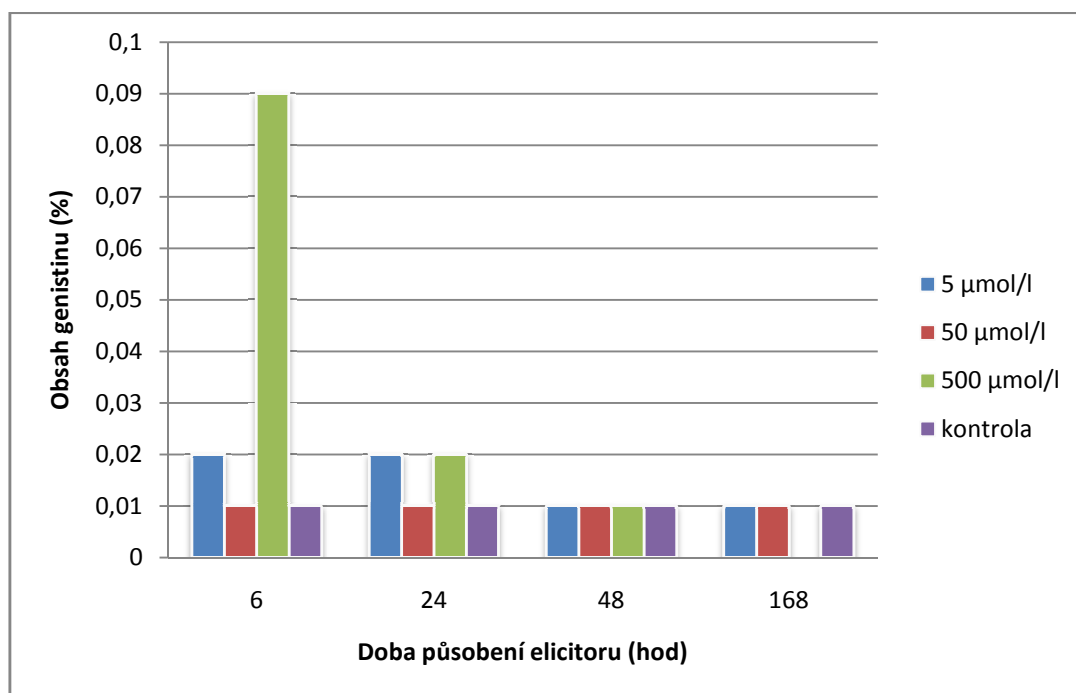
Graf 1. Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) po elicitaci kyselinou abscisovou



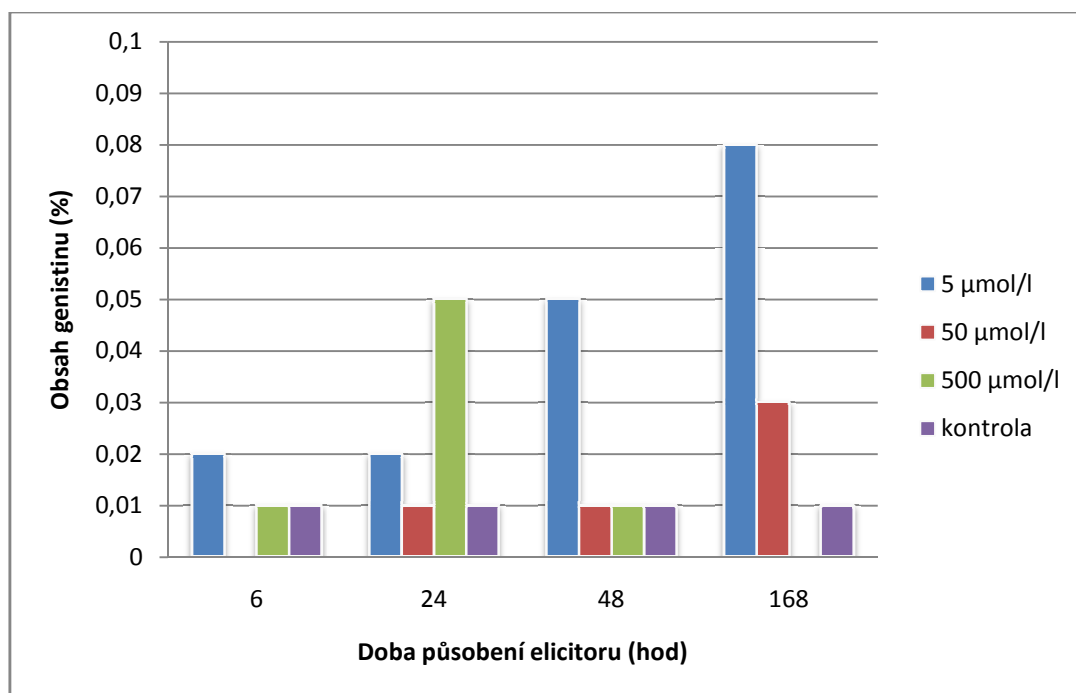
Graf 2. Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) po elicitaci kyselinou askorbovou



Graf 3. Obsah isoflavonoidu genistinu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. po elicitaci kyselinou abscisovou



Graf 4. Obsah isoflavonoidu genistinu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. po elicitaci kyselinou askorbovou



6 DISKUZE

Vyšší rostliny jsou důležitým zdrojem potravin, dřeva, vlákniny, olejů, ale poskytují i nejbohatší výběr přírodních látek, z nichž mnohé jsou využívány ve farmacii a medicíně. Odhaduje se, že asi třetina vyráběných léčivých přípravků obsahuje biogenní látky rostlinného původu nebo z nich získané deriváty. Jednou z možností, jak získat požadované rostlinné látky, je využití rostlinných explantátových kultur. Vzhledem k tomu, že až na výjimky je charakteristickým problémem kultivace rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* nízká produkce sekundárních metabolitů, jeden ze způsobů, kterým je možné dosáhnout zvýšení produkce sekundárních látek, je metoda elicítace.

Elicítace rostlinných kultur za účelem zvýšení produkce sekundárních látek je v současné době studována především pro svoji jednoduchost. Navíc se jedná o metodu ekonomicky výhodnou bez velkých nároků na prostory. Základním předpokladem úspěšné elicítace je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby jeho působení na rostlinnou kulturu *in vitro*. Elicitor stojí na počátku všech obranných reakcí jako spouštěcí faktor. [56]

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv potenciálních elicitorů – kyseliny askorbové a kyseliny askorbové na produkci flavonoidů a isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint).

Při experimentu byly zkoušeny tři různé koncentrace obou elicitorů ($5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$), které byly zvoleny v rozmezí koncentrací obvykle používaných u těchto typů elicitorů. [57-60][62] Sledované doby působení elicitorů (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z poznatků již provedených pokusů a z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po přidání elicitoru. [61-63] Kontrolní vzorky byly odebírány po 6 a 168 hodinách, neboť jejich produkce se v takto krátkých časových intervalech významně nemění. [62]

Elicítace suspenzní kultury byla prováděna za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu ve 21. dni kultivace, který byl zjištěn na základě předchozích pokusů jako optimální. [28] Po uplynutí 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 a stanovení isoflavonoidů HPLC s fluorimetrickou detekcí.

Z výsledků elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) roztokem **kyseliny abscisové (Tab. 1, Graf 1.)** vyplývá, že ve všech sledovaných časových intervalech nedošlo ke statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů. Maximální obsah flavonoidů (0,125 %) byl zaznamenán po 6 hodinovém působení nejvyšší koncentrace $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Došlo k nárůstu o 43 %, avšak v porovnání s kontrolní kulturou se nejednalo o statisticky významnou hodnotu. S délkou aplikace se pozitivní vliv dané koncentrace postupně snižoval. Průměrný obsah po 24 hodinové aplikaci byl 0,118 %, po 48 hodinách 0,092 %, což odpovídá zvýšení o 35 % a 5 %.

U žádné jiné použité koncentrace kyseliny abscisové nebylo zjištěno zvýšení obsahu flavonoidů. V porovnání s kontrolní skupinou došlo dokonce v některých případech i k poklesu syntézy flavonoidů.

Po elicitaci roztokem **kyseliny askorbové (Tab. 2, Graf 2.)** nedošlo taktéž u většiny vzorků k závažnému zvýšení produkce sledovaných metabolitů. Dle výsledků byl patrný pozitivní vliv nejnižší koncentrace $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, který se s délkou aplikace zvyšoval. Maximálního obsahu flavonoidů (0,106 %) bylo pak dosaženo po 168 hodinovém působení elicitoru. Ve srovnání s kontrolní kulturou se jedná o zvýšení produkce o 22 %, které však není statisticky významné. K mírnému, statisticky nevýznamnému, vzestupu došlo u téže koncentrace po 48 hodinové aplikaci, kdy byl rozdíl v obsahu 4 %.

Koncentrace $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ nevedly ve většině časových intervalů k pozitivnímu ovlivnění produkce flavonoidů, s výjimkou $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentrace po 48 hodinové aplikaci, kdy bylo zaznamenáno zvýšení obsahu daných metabolitů o 3 % bez statistické významnosti.

Metodou HPLC byla sledována produkce isoflavonoidů. V případě kontrolní kultury byly po 6 hodinách stanoveny dva z pěti sledovaných isoflavonoidů – genistin a daidzein. Po 168 hodinách byl prokázán už pouze genistin. (**Tab. 3**).

Pozitivně se projevila 6 hodinová elicitace kyselinou abscisovou nejvyšší koncentrace $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, při níž došlo ke zvýšení obsahu genistinu o 800 %, daidzeinu o 100 % a navíc byl identifikován genistein v množství 0,05 %. Na základě výsledných hodnot pak byla zaznamenána klesající účinnost tohoto stresoru s časem elicitace. Při 24 hodinovém intervalu už bylo zvýšení u genistinu jen o 100 %, při 48 hodinách nebyl zaznamenán žádný nárůst a po 168 hodinách nebyl genistin identifikován vůbec (**Graf 3**). U zbývajících dvou isoflavonoidů byl nárůst už jen v obsahu daidzeinu po 48 hodinách elicitace a u genisteinu po 24 hodinách.

Vzestup genistinu o 100 % byl zjištěn při 6 a 24 hodinové aplikaci nejnižší koncentrace $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ kyseliny abscisové.

Koncentrace $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pak stimulovala tvorbu genisteinu v čase 24, 48 a 168 hodin.

U kyseliny askorbové byl maximální účinek dosažen v případě nejnižší koncentrace po 168 hodinové aplikaci, který se projevil zvýšením produkce genistinu o 700 % (**Graf 4**). Dle výsledků bylo vypořováváno, že pozitivní vliv stoupá s časem. Obsah daidzeinu naopak téměř ve všech časových intervalech klesl na nulu.

Z článků publikovaných v odborných periodických lze potvrdit pozitivní vliv kyseliny abscisové i kyseliny askorbové jako stimulátorů produkce sekundárních metabolitů.

Kyselina abscisová se jako úspěšný stresor projevila v několika experimentech. Příkladem je zvýšení produkce paklitaxelu suspenzní kulturou *Taxus chinensis*. Testováno bylo více koncentrací. Vysoká tvorba paklitaxelu byla zaznamenána po přidání 5 mg.l^{-1} ABA. Jednalo se téměř o pětinašobný nárůst obsahu oproti kontrole. Avšak nejvyšší produkce sledovaného metabolitu nastala po kombinaci 5 mg.l^{-1} ABA s 20 mg.l^{-1} methyljasmonátu. [58]

V další studii došlo po elicitaci kyselinou abscisovou k navýšení fenolických kyselin a karotenoidů v listech hlávkového salátu (*Lactuca sativa* L.), čímž stouply antioxidační vlastnosti rostliny. Stimulačně působila koncentrace $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$. [57]

ABA působila pozitivně i v případě stimulace produkce reserpinu rostlinnou kulturou *Rauwolfia serpentina* L. V experimentu bylo využito předpokladu, že se ABA podílí na přenosu signálu při působení stresových faktorů a reguluje expresi genů účastnících se biosyntézy indolových alkaloidů. Optimální koncentrace ABA zde byla $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$. [64]

Ve výzkumu publikovaném v roce 2012 došlo po přidání kyseliny abscisové ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$) k pozitivní změně v obsahu hyoscyaminu a anisodinu (daturaminu) v kořenech rostliny *Anisodus acutangulus*. Především množství anisodinu po 24 a 96 hodinové aplikaci dosáhlo několikanásobného zvýšení. [65]

Příkladem úspěšné elicitace kyselinou askorbovou je experiment zveřejněný v roce 2010, kde byla tato kyselina zkoumána jako potenciální elicitor pro zvýšení produkce glycyrrhizinu buněčnou kulturou *Abrus precatorius* Linn.. V pokuse bylo použito opět více koncentrací (1 až 100 mg.l^{-1}). 3,6násobný nárůst obsahu glycyrrhizinu byl zaznamenán při použití kyseliny askorbové o koncentraci 50 mg.l^{-1} . Stresor byl přidáván k 18denní kultuře a vyhodnocení probíhalo po 48 hodinách. Dle autorů má askorbová kyselina přínosný efekt ve smyslu akumulace glycyrrhizinu díky antioxidačním vlastnostem. [60]

V další studii byla askorbová kyselina vybrána jako stimulátor tvorby vasicinu v buněčné kultuře *Adhatoda vasica* (L.). Nejúčinněji se projevila koncentrace 10 mg.l^{-1} , kdy došlo ke zvýšení obsahu vasicinu na $0,284 \%$. V porovnání s kontrolní kulturou ($0,121 \%$) se jednalo o zvýšení o $134,7 \%$. Vyšší koncentrace (20 a 50 mg.l^{-1}) nebyly více účinné, na druhou stranu vedly ke zvýšení růstu buněčné biomasy. Conklin (2001) uvedl, že askorbová kyselina hraje roli v syntéze buněčných stěn, obraně buněk a pravděpodobně v buněčném dělení. Pozitivní efekt je opět připisován antioxidační aktivitě. [59]

Jako úspěšný elicitor se kyselina askorbová ukázala i ve studii publikované v Journal of Food Biochemistry v roce 2007. Výzkum ukázal, že askorbová kyselina je efektivní elicitor pentósofosfátového cyklu (PPP) ve výhoncích bobu obecného

naklíčených ve tmě. Zvýšila syntézu pro zdraví prospěšných fenolů a L-dihydroxyfenylalaninu, který je významný v léčbě Parkinsonovy nemoci. O kyselině askorbové jako buněčném metabolitu je známo, že hraje svou roli během biotického i abiotického stresu, proto byla použita k napodobení stresové odpovědi s cílem zvýšit syntézu fenolických sloučenin. Z testovaných koncentrací vedla pouze jedna (500 mg.l^{-1})¹⁾ k nejvyšší fenolické produkci. Došlo k šestinásobnému zvýšení v porovnání s kontrolou. Druhá účinná koncentrace byla 250 mg.l^{-1} . Obsah L-DOPA byl po elicitaci těmito dvěma koncentracemi hned první den významně zvýšen, avšak postupně docházelo k poklesu v důsledku využití jeho prekursorů k produkci volných fenolů. [66]

7 ZÁVĚR

Výsledky této práce mohou být shrnuty následovně:

1. Nejvyšší obsah flavonoidů (0,125 %) vyprodukovaný čtyřletou suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. varieta Sprint, po použití kyseliny abscisové jako elicitoru, vyvolala 6 hodinová aplikace jejího roztoku o koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. V porovnání s kontrolní kulturou se však nejednalo o statisticky významné zvýšení produkce.
2. Nejvyšší obsah flavonoidů (0,106 %) vyprodukovaný čtyřletou suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. varieta Sprint, po použití kyseliny askorbové jako elicitoru, vyvolala 168 hodinová aplikace jejího roztoku o koncentraci 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. V porovnání s kontrolní kulturou se však nejednalo o statisticky významné zvýšení produkce.
3. Metodou HPLC byl sledován obsah isoflavonoidů. V kontrolní kultuře byly identifikovány pouze genistin a daidzein. Po použití kyseliny abscisové jako elicitoru se projevila nejúčinněji 6 hodinová aplikace nejvyšší koncentrace 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Došlo ke zvýšení obsahu genistinu o 800 %, daidzeinu o 100 % a navíc byl detekován genistein v množství 0,05 %.
4. Vliv kyseliny askorbové jako elicitoru na obsah isoflavonoidů byl nejvíce patrný po 168 hodinové aplikaci nejnižší koncentrace 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kdy nastalo zvýšení obsahu genistinu o 700 %. Mimo to byl detekován daidzein o obsahu 0,02 %, který v tomto čase nebyl v kontrolní kultuře identifikován vůbec.
5. Pozitivní vliv obou elicitorů, ve svých nejúčinnějších koncentracích, se projevily shodně na obsah flavonoidů i isoflavonoidů. Elicitace kyselinou abscisovou (500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) vedla k nejvyššímu obsahu flavonoidů a isoflavonoidů po nejkratší době aplikace a dále jejich obsah klesal. U kyseliny askorbové (5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) se stimulační schopnost s délkou aplikace zvyšovala. Shodně byla pak produkce flavonoidů i isoflavonoidů nejvyšší po 168 hodinové elicitaci.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Jahodář, L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*, Praha, Karolinum, 2009, s. 9-13
- [2] Kováč, J.: *Kapitoly z rostlinné fyziologie*, Ústí nad Labem, Pedagogická fakulta, 1991, s. 143-145
- [3] Kašparová, M. et al.: TSWJ, 2012; vol. 2012, ID 746412, 5 stran
- [4] Kašparová, M. et al.: Chem. Listy, 2012; 106, 660-664
- [5] <http://botanika.wendys.cz/kytky/K439.php>, cit. 29. 11. 2014
- [6] Kašparová, M.: Prakt. lékáren., 2013; 9(4-5), 201-203
- [7] Slavík, B. et al.: *Květena České republiky 4*, Praha, Academia, 1995, s. 474
- [8] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cleaned-Illustration_Trifolium_pratense.jpg, cit. 29. 11. 2014
- [9] Korbel, V., Endris, Z.: *Naše rostliny v lékařství*, Praha, Avicenum, 1990, s. 178
- [10] Potužák, M.: Čas. Čes. Lék., 2009; 81(2), s. 19
- [11] Fialová, S.: Prakt. lékáren., 2012; 2(4), 150-153
- [12] Velíšek, J., Hajšlová, J.: *Chemie potravin II.*, Tábor, OSSIS, 2009, s. 186-188
- [13] <https://docs.faf.cuni.cz/getmedia/d5cd15d4-4246-4b06-9e1b-87b28b6c8997/Flavonoidy-anthocyany.aspx?disposition=attachment>, Online prezentace, Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická, Hradec Králové, cit. 4. 1. 2015
- [14] Hubík, J. et al.: *Obecná farmakognosie II.*, Praha, SPN, 1989, s. 31
- [15] Hohnová, B.: *Studium přírodních látek obsažených ve vybraných bylinách a méně obvyklých druzích drobného ovoce*, Disertační práce, VÚT, Fakulta chemická, Brno, 2010
- [16] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavan.PNG>, cit. 17. 1. 2015
- [17] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Isoflavan.PNG>, cit. 17. 1. 2015
- [18] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neoflavonoid.PNG>, cit. 17. 1. 2015
- [19] Petrusa, E. et al.: Int. J. Mol. Sci., 2013; 14(7), 14950-14973
- [20] Ferreyra, M. L. F. et al.: Front. Plant Sci., 2012; 3, 222
- [21] Harmatha, J.: *Chemie a biochemie přírodních látek. Cyklus organické chemie*, Praha, ÚOCHB-AVČR, 2002, s. 133

- [22] Dixon, R. A., Pasinetti, G. M.: *Plant. Physiol.*, 2010; 154(2), 453-457
- [23] Slanina, J., Táborská, E.: *Chem. Listy*, 2004; 98, 239-245
- [24] Malý, J., Doseděl, M.: *Prakt. lékáren.*, 2012; 8(4), 181-186
- [25] Oborná, I. et al.: *Interní Med.*, 2007; 9(10), 459-461
- [26] <http://www.menoflavon.cz/lekari/lekari.html>, cit. 3. 1. 2015
- [27] Vrzáňová, M., Heresová, J.: *Med. Pro Praxi* 2008; 5(3), 113-116
- [28] Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.*, 2006; 55, 44-47
- [29] Sikyta, B., Dušek, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*, Praha, Karolinum, 2001, s. 75-76, 78-79
- [30] Petruš, E., Řetovský, R.: *Rostlinné explantáty*, Praha, ČSAV, 1956, s. 7, 10, 14
- [31] Landa, Z. et al.: *Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění rostlin*, Praha, ČSAV, 1980, s. 7
- [32] Dubová, J., Smíšková, A.: *Od rostlinné kultury „in vitro“ k biotechnologiím*, Online prezentace, Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká, Brno, dostupné z www: <http://svp.muni.cz/ukazat.php?docId=592>, cit. 30. 11. 2014.
- [33] Sikyta, B., Dušek, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*, Praha, Karolinum, 1992, s. 87-88, 92-93
- [34] Kováč, J.: *Explantátové kultury rostlin*, Olomouc, Vydavatelství Univerzity Palackého, 1995, s. 1, 13-18, 50-55, 79-82, 87
- [35] Procházka, S., Šebánek, J. a kolektiv: *Regulátory rostlinného růstu*, Praha, Academia, 1997, s. 80, 87-89, 151, 156-158
- [36] Dudová, A.: *Explantátová kultura *Trifolium pratense* L.*, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická, Hradec Králové, 2011
- [37] Dušek, J. et al.: *Čes. slov. Farm.*, 1996; 45, 204
- [38] Zhao, J. et al.: *Biotechnol. Adv.*, 2005; 23, 283-333
- [39] Baenas, N. et al.: *Molecules*, 2014; 19, 13541-13563
- [40] Patel, H., Krishnamurthy, R.: *J. Phcog. Phytochem.*, 2013; 2(2), 60-65
- [41] Reichling, J., Beiderbeck, R.: *Biologie*, 1989; 5, 453
- [42] Podlešáková, K. et al.: *Chem. Listy*, 2012; 106, 373-379
- [43] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Abscisic_acid.svg, cit. 17. 1. 2015
- [44] Kutina, J.: *Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví*, Praha, Státní zemědělské nakladatelství, 1988, s. 108-109

- [45] Bari, R., Jones J. D. G.: *Plant Mol. Biol.*, 2009; 69, 473-488
- [46] Smirnoff, N.: *Ann. Bot.*, 1996; 78, 661-669
- [47] Gallie, D. R.: *Scientifica*, 2013; ID 795964, 24 stran
- [48] http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic_acid#section=Auto-Ignition, cit. 17. 1. 2015
- [49] Davey, M. W. et al.: *J. Sci. Food Agric.*, 2000; 80, 825-860
- [50] http://en.wikipedia.org/wiki/Ascorbic_acid, cit. 17. 1. 2015
- [51] Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: *Exp. Cell Res.*, 1968; 50, 151-158
- [52] Kolektiv autorů: *Český lékopis 2009*, Praha, Grada, 2009, s. 1801
- [53] Rijke, E. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 2002; 468, 3-11
- [54] Dohnal, J., Kadlečková, I.: *Analýza látek pomocí HPLC*, Univerzita J. E. Purkyně, Fakulta přírodovědecká, Ústí nad Labem, 2013, Dostupné z [www: http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Analyza_latek_pomoci_HPLC_Mevapox_17102013.pdf](http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Analyza_latek_pomoci_HPLC_Mevapox_17102013.pdf), cit. 17. 1. 2015
- [55] Klemra, P., Klemrová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*, Praha, Karolinum, 1999, s. 37-39
- [56] Tůmová, L., Tůma, J.: *Chem. Listy*, 2009; 103, 503-510
- [57] Zlotek, U. et al.: *Food Chem.*, 2014; 148, 253-260
- [58] Luo, J. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 2001; 23, 1345-1348
- [59] Bhambhani, S. et al.: *Acta. Physiol. Plant*, 2012; 34, 1571-1578
- [60] Karwasara, V. S. et al.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2010; 45, 354-362
- [61] Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.*, 2009; 58, 67-70
- [62] Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.*, 2008; 57, 107-110
- [63] Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.*, 2007; 56, 225-229
- [64] Panwar, G. S., Guru, S. K.: *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 2015; 24(1), 49-55
- [65] Luo, X. et al.: *Biologia*, 2012; 67/2, 352-359
- [66] Randhir, R., Shetty, K.: *J. Food Biochem.*, 2007; 31, 485-508