

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

# **SEKUNDÁRNÍ METABOLITY ROSTLINNÝCH KULTUR *IN VITRO* I**

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

Pověřen vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Hradec Králové, červen 2017

Pavína Zlochová

Na úvod své diplomové práce bych ráda poděkovala PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za metodické vedení, připomínky, postřehy, cenné rady a čas vynaložený k jejímu zpracování.

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

Hradec Králové, červen 2017

Pavλίna Zlochová

## 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 .....	3
3.1.2.  Odrůdy.....	5
3.1.3.  Droga .....	5
3.1.4.  Obsahové látky jetele .....	6
3.1.5.  Využití rostliny.....	6
3.2.  Flavonoidy .....	7
3.2.1.  Charakterizace .....	7
3.2.2.  Biosyntéza .....	9
3.2.3.  Účinky .....	10
3.3.  Isoflavonoidy .....	11
3.4.  Fytoestrogeny .....	12
3.4.1.  Klimakterický a postmenopauzální syndrom .....	12
3.4.2.  Mechanismus působení fytoestrogenů .....	13
3.5.  Explantátové kultury rostlin .....	15
3.5.1.  Historie .....	15
3.5.2.  Charakteristika.....	15
3.5.3.  Základní terminologie .....	16
3.5.4.  Princip růstu explantátových kultur .....	17
3.5.5.  Rozdělení explantátových kultur.....	19
3.5.6.  Buněčná suspenzní kultura .....	19
3.5.7.  Růst a pasážování suspenzní kultury.....	20
3.5.8.  Kultivační podmínky .....	22
3.5.9.  Regulátory rostlinného růstu .....	24
3.5.10.  Využití explantátových kultur .....	27
3.6.  Elicitace .....	28
3.6.1.  Mechanismus působení elicitoru .....	29
3.6.2.  Přenos signálu v rostlině.....	30

3.6.3.	Typy elicitorů .....	31
3.6.4.	Faktory ovlivňující elicitaci.....	33
3.7.	Chlorid sodný.....	34
3.8.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC .....	35
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	37
4.1.	Materiál, přístroje a pomůcky .....	37
4.1.1.	Rostlinný materiál .....	37
4.1.2.	Chemikálie.....	37
4.1.3.	Přístroje a pomůcky.....	38
4.2.	Kultivace explantátové kultury .....	38
4.2.1.	Nádoby a nástroje použité ke kultivaci .....	38
4.2.2.	Živné médium.....	39
4.2.3.	Pasážování a kultivace.....	40
4.3.	Elicitace .....	41
4.4.	Stanovení obsahu flavonoidů.....	42
4.4.1.	Princip stanovení .....	42
4.4.2.	Postup stanovení.....	42
4.5.	Stanovení obsahu isoflavonoidů .....	44
4.5.1.	Postup stanovení.....	44
4.5.2.	Parametry HPLC analýzy .....	45
4.6.	Statistické zpracování dat .....	46
5.	VÝSLEDKY .....	48
6.	DISKUZE.....	54
7.	ZÁVĚR.....	59
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	60

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Jetel luční .....	4
Obrázek 2: Strukturní typy flavonoidů .....	8
Obrázek 3: Biosyntéza flavonoidů .....	9
Obrázek 4: Příklady isoflavonoidů z jetele lučního .....	14
Obrázek 5: Odvození explantátové kultury .....	18
Obrázek 6: Růstová křivka explantátových kultur .....	20
Obrázek 7: Mechanismus působení elicitoru .....	30
Obrázek 8: Kultivace suspenzní kultury <i>Trifolium pratense</i> .....	40
Obrázek 9: Suspenzní kultura <i>Trifolium pratense</i> sklízená po 3denním působení chloridu sodného .....	41
Obrázek 10: Suspenzní kultura <i>Trifolium pratense</i> sklízená po 7denním působení chloridu sodného .....	42

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozdělení a příklady používaných elicitorů [45] .....	32
Tabulka 2: Složení kultivačního média B5 [53].....	39
Tabulka 3: Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> po 3denním působení chloridu sodného .....	48
Tabulka 4: Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> po 7denním působení chloridu sodného .....	48
Tabulka 5: Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> po 3denním působení chloridu sodného .....	51
Tabulka 6: Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> po 7denním působení chloridu sodného .....	51

## Seznam grafů

Graf 1: Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> po 3denním působení chloridu sodného .....	49
Graf 2: Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> po 7denním působení chloridu sodného .....	49
Graf 3: Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> po 3denním a 7denním působení chloridu sodného .....	50
Graf 4: Obsah genistinu po 3denním a 7denním působení chloridu sodného .....	52
Graf 5: Obsah daidzeinu po 3denním a 7denním působení chloridu sodného .....	52
Graf 6: Obsah genisteinu po 3denním a 7denním působení chloridu sodného .....	53
Graf 7: Obsah biochaninu A po 3denním a 7denním působení chloridu sodného .....	53

# 1. ÚVOD

Člověk byl od počátku své existence nucen hledat přírodní zdroje ke své obživě. Při používání rostlin, postupně objevoval i takové, po jejichž užití se dostavovaly různorodé účinky, působily povzbuzení nebo naopak ospalost, tlumily bolest, působily močopudně nebo laxativně. Těmito náhodnými objevy se rozvinulo používání bylin pro jejich specifické účinky.[1]

Rostliny jsou schopné díky konstituci svého těla, orgánů a buněk (buněčné stěně, vakuolám, protoplastům, idioblastům, mléčnicím, intercelulárám a žláznatým trichomům) produkovat a skladovat kromě primárních také sekundární metabolity. Rostlina je produkuje za určitým účelem, například jako ochranu před požerači a parazity, k lákání opylovačů nebo přenašečů semen. Existuje i hypotéza, že jsou pouze odpadními produkty metabolismu primárně produkováných látek. Sekundární metabolity jsou vysoce biologicky aktivní a zpravidla je v daném taxonu skupina chemicky příbuzných látek dominantní, tato hlavní produkční skupina je doprovázena minoritními sloučeninami.[2]

Hlavními sekundárními metabolity v čeledi *Fabaceae* jsou flavonoidy a isoflavonoidy, mají široké spektrum využití, a proto jsou hojně studovány. Používají se zejména pro schopnost eliminovat volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku, k léčbě některých menopauzálních projevů, úpravě permeability kapilár a dalších.[3][4]

Získ sekundárních metabolitů z intaktních rostlin je omezen úbytkem rostlin na přírodních stanovištích a závislostí produkce obsahových látek na vnějších podmínkách. Proto se hledaly vhodné alternativy pro produkci těchto látek, jednou z těchto náhradních metod je produkce sekundárních metabolitů *in vitro*. [5]

V této diplomové práci je sledována produkce flavonoidů a isoflavonoidů *Trifolium pratense* po elicitaci chloridem sodným.



## 2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je:

1. Seznámení se s metodikou kultivace a elicitace tkáňových kultur rostlin *in vitro*
2. Sledování vlivu různých koncentrací chloridu sodného použitého jako elicitor na produkci flavonoidů a isoflavonoidů v explantátové kultuře *Trifolium pratense* L. (var. Tempus)

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

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

##### 3.1.1. Výskyt a botanický popis

Jetel luční (*Trifolium pratense* L.) je jedním z hlavních druhů píce vyskytující se v mírném pásu, pochází z oblasti Eurasie, v Evropě roste přibližně po sedmdesátý stupeň severní šířky a na východě zasahuje do západní Asie po Bajkal. Zavlečen byl do východní Asie, Severní a Jižní Ameriky, Austrálie, Nový Zéland a Jižní Afriky. Divoké populace je možné nalézt na Kavkaze. Roste na bohatých, suchých až mírně vlhkých půdách, především na loukách, okrajích cest, stráních a na polích jako hospodářská plodina. Jetel luční kvete od května do října.[6][8][9]

Jedná se o vytrvalou bylinu dorůstající výšky 15–100 cm. Druh je variabilní, co se týká vzrůstu rostliny, velikosti a odění lodyh a palistů podpůrných listů. Kořen je kulovitý, dlouhý, rozvětvený a může sahát až do hloubky 50 cm. Lodyhy jsou členité, tvořené 3 – 5 články, vyrůstají z přízemní listové růžice. Lodyhy jsou četné, hranaté, přímé, vystoupavé až poléhavé, jednoduché nebo jen málo větvené. Povrch lodyh je pokryt bělavými chloupky, někdy chloupky ustupují a některé lodyhy jsou lysé často načervenalé. Listy jsou vždy trojčetné, spodní dlouze řapíkaté, výše rostoucí na kratších řapících až téměř přisedlé. Listy jsou složeny ze třech obvejčitých až okrouhlých celokrajných lístků o velikosti maximálně 15 x 30 mm. Jednotlivé lístky mají na hladké lícové straně skvrnu tvaru půlměsíce bělavé nebo hnědočervené barvy, položenou napříč probíhajícímu řapíku. Mají nezřetelnou žilnatinu a rostou na velmi krátkých řapících. Květní hlávky jsou kulovité, jednotlivé nebo po dvou, většinou přisedlé, podepřené palisty vrchních listů. Květní koruny jsou karmínové, červené, vzácně bílé. Vejcovité lusky obsahují žlutá zploštělá nesouměrně srdcovitá semena.[8][9]



**Obrázek 1: Jetel luční [10]**

### 3.1.2. Odrůdy

Rostliny vyskytující se v České republice patří ke třem poddruhům.

- *Trifolium pratense* L. subsp. *pratense* – jetel luční pravý – vytrvalá bylina s hustě přitiskle chlupatými lodyhami vysokými 10 – 40 cm. Květenství jsou obvykle jednotlivá, malá, velikosti 2 – 3,5 cm v průměru. Nejčastěji se vyskytuje v nižších nadmořských výškách. Tento poddruh našel uplatnění jako léčivka.
- *Trifolium pratense* L. subsp. *sativum* – jetel luční setý – pouze 2–3letá odrůda s 40 – 70 cm vysokými řídko chlupatými až lysými lodyhami. Květenství velká 3 – 4 cm v průměru, často se vyskytující po dvou. Používá se jako zelená píce a ke zkvalitňování půdy.
- *Trifolium pratense* L. subsp. *americanum* – jetel luční americký – vytrvalá bylina s odstálými, rezavě chlupatými lodyhami. Přisedlá květenství s velkými palisty podpurných listů. Od pěstování této odrůdy se postupně upustilo.[8]

### 3.1.3. Droga

Sbíranou drogou jsou červené nebo světle karmínové květní hlávky bez podpurných listenů – *Trifolii pratensis flos* (lékopis drogu neuvádí). Květní hlávky se trhají na začátku kvetení rostliny v období od června do září. Odkvétající hlávky sušením hnědnou, rozpadají se a droga ztrácí na hodnotě. Suší se rychle v tenkých vrstvách. Den na přímém slunci a pak se dosuší volně vzduchem na stinném místě. Pokud se k sušení použije umělé teplo, nesmí teplota sušení překročit 35 °C. Poměr seschnutí se udává asi 6:1. Droga je náchylná ke změnám kvality vlivem vlhkosti, zapařená droga se rozpadá. Kvalitní droga si zachovává barvu, případně jen nepatrně zhnědne, droga nesmí změnit barvu na rezavou.[7][9]

Droga se tradičně zpracovává jako nálev, jednotlivá dávka je 1,5 g nebo 1 kávová lžička na šálek produktu. Doporučuje se pít 2 – 3 krát denně, ale není na překážku zdvojnásobit dávku. Při užívání výše popsaných dávek nebyly zaznamenány vedlejší účinky.[11]

### 3.1.4. Obsahové látky jetele

Jetel luční jako většina rostlin z čeledi bobovitých obsahuje jako majoritní skupiny obsahových látek flavonoidy a isoflavonoidy. Hlavními zástupci produkovaných isoflavonoidů jsou biochanin A a formononetin, které jsou v lidském organismu přeměněny na genistein a daidzein. Jetel obsahuje velké množství aktivních isoflavonů, jejich obsah je srovnatelný v listech, kořenech a stoncích, méně se hromadí v květech. Ale spektrum produkovaných metabolitů je mnohem širší, kromě již zmíněných jsou přítomny glykosidy, například genistin a trifolin, třísloviny, saponiny, silice, bílkoviny, organické kyseliny – šťavelová, kumarová, salicylová, hroznová aj., minerální látky (Fe, Mg, Ca), vitamíny skupiny B, A, C a barviva.[9][12][13]

### 3.1.5. Využití rostliny

Pro obsah isoflavonů s estrogení aktivitou je jetel součástí potravinových doplňků užívaných ženami ke snížení menopauzálních projevů. Předpokládá se, že tyto rostlinné metabolity vykazují biologický účinek na hormon – dependentní choroby, jako jsou kardiovaskulární nemoci, osteoporóza, některé typy rakoviny a nedostatečná produkce estrogenů v ženském organismu při menopauze. Droga má ještě účinky adstringentní, dezinfekční, expektorační.[9][14]

V lidovém léčení se používá zevně při zánětech dutiny ústní, k dezinfekci hnisavých kožních afekcí a exémů nebo vnitřně k léčbě infekcí gastrointestinálního traktu.[9]

Obsahové látky jetele jsou stále předmětem zájmu a jsou hojně studovány. Byl prokázán inhibiční účinek biochaninu A na genu melanomových buněk *in vitro* i *in vivo* u myši. Biochanin A se tak jeví jako vhodný kandidát pro použití v léčbě nemocí spojených s hyperpigmentací kůže. Dalším studovaným účinkem jetele je částečná inhibice funkce transformujícího růstového faktoru  $\beta 1$ , jenž se významně podílí na patogenezi nádorů prostaty. U formononetinu byl studován potenciál k inhibici růstu ložisek

kolorektálního karcinomu u myši a bylo prokázáno, že indukuje apoptózu snížením koncentrace Bcl-2 proteinu, snižuje růst solidních tumorů díky snížení produkce neoplastického TNF- $\alpha$ . [15][16][17]

## **3.2. Flavonoidy**

### **3.2.1. Charakterizace**

Flavonoidy neboli flavanové deriváty jsou početnou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů. Jsou odvozeny od 2-fenylchromanu. Podle oxidačního stupně prostředního heterocyklu se dělí do několika skupin:

**flavony**

**flavonony**

**flavonoly**

**dihydroflavonoly**

**flavan-3-oly**

**flavan-3,4 dioly**

**aurony**

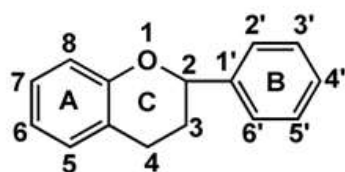
**chalkony.**

Stavba flavonoidů je složitá a je možno mnohostrukturálních obměn, bylo popsáno kolem 4000 látek. Jednotlivé flavonoidní metabolity se liší počtem a polohou hydroxylových (-OH) a methoxylových (-OCH<sub>3</sub>) skupin na obou aromatických kruzích A a B a napojením cukerné složky nebo organických kyselin. [4][18]

Nejčastěji se u rostlin vyskytují flavanové deriváty v glykosidní formě. Cukerná složka se váže přes hydroxylové skupiny kruhu A a kyslíkového heterocyklu. Flavony mají v prostředním cyklu o jednu dvojnou vazbu víc než flavanony. Navázáním jedné hydroxylové skupiny v poloze 3 prostředního kruhu flavonů vznikají flavonoly. Flavan-3-oly, známé pod názvem katechiny a flavan-3,4-dioly, patřící do skupiny leucoanthokyanů jsou prekurzory velké skupiny tříslovin. [19]

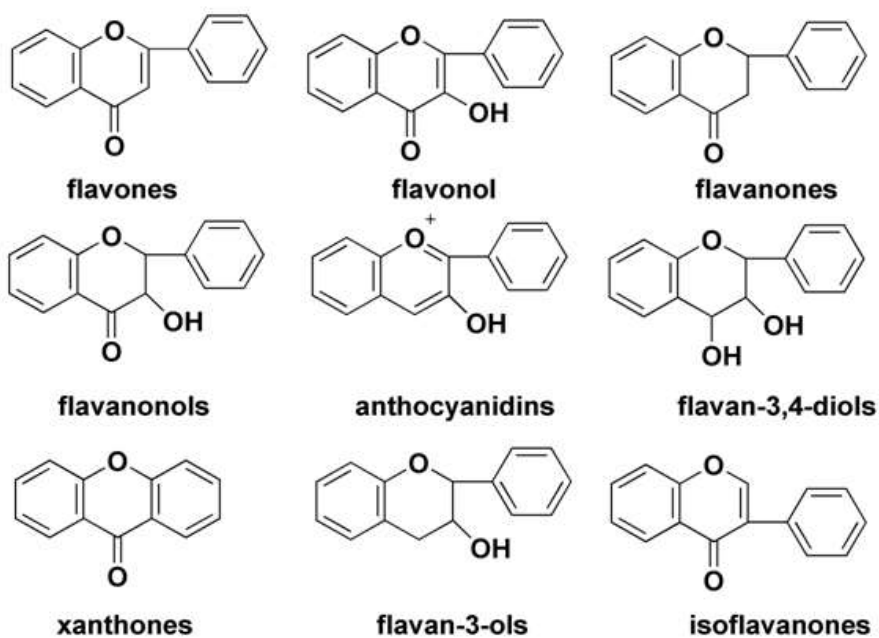
Chalkony jsou na rozdíl od derivátů 2 – fenylochromanu, ochuzeny o charakteristický prostřední heterocyklus. Avšak snadno, například v kyselém prostředí, přecházejí na flavanony.[19]

**A**



**B**

C6-C3-C6

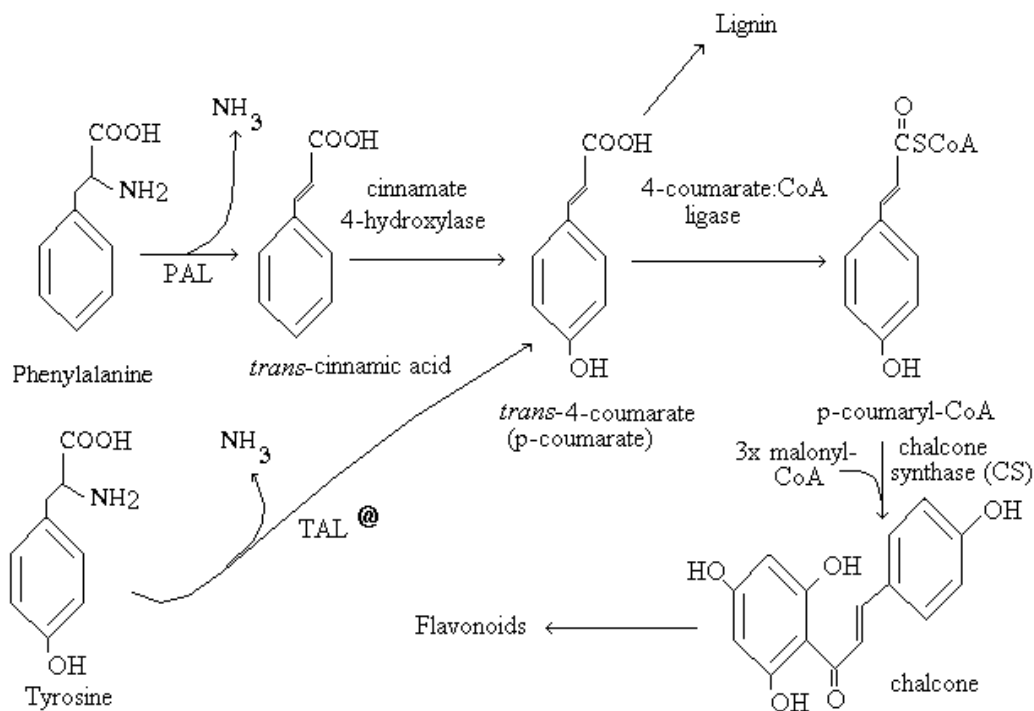


**Obrázek 2:** Strukturní typy flavonoidů [24]

Flavonoidy se vyskytují v cévnatých rostlinách rozpuštěné v buněčné šťávě vakuol, lipofilní sloučeniny, obsahující methoxylové skupiny, mohou být uloženy i v jiných částech rostlinného organismu, hlavně v silicích.[4]

### 3.2.2. Biosyntéza

Aglykony flavonoidních glykosidů vznikají dvěma cestami, obě tyto cesty, šikimátová i acetátová, vedou k syntéze aromatických sloučenin. Fenylypropanová jednotka ve formě kyseliny skořicové vázané na koenzym A – **4-kumaroyl-CoA** je pomocí třech molekul **malonylkoenzymu A** z acetátové cesty prodloužena o šestiuhlíkatý řetězec s karbonylovými skupinami. Acetátovou cestou je tvořena druhá aromatická část molekuly přímého prekursoru flavonoidů, **chalkonu**. Tento kruh A nese typické substituenty flavonoidů, hydroxylové skupiny v polohách 5 a 7 a kyslík v poloze 1 kruhu B. Karbonylová skupina v poloze 4 je pozůstatkem fenylypropanové jednotky. Z chalkonu následně vznikají flavanony, primárně naringenin. Specifický enzym, pro syntézu flavonoidů je chalkon syntáza, ostatní enzymy – izomerázy, reduktázy, hydroxylázy modifikují základní flavonoidní kostru na jednotlivé podskupiny. V posledním kroku syntézy katalyzují transferázy vazbu cukerných jednotek, methylových skupin a zbytků kyselin, čímž moduluje fyziologickou aktivitu flavonoidů tím, že mění jejich rozpustnost, interakci s buněčnými cíli – reaktivitu.[4][20][21]



**Obrázek 3:** Biosyntéza flavonoidů [25]



### 3.2.3. Účinky

Rostliny využívají těchto sekundárních metabolitů k efektivnímu přežití. Jsou nejvíce známy jako charakteristická červená, modrá a fialová barviva rostlinných tkání anthokyanového typu, plní základní roli v rozmnožování vábením opylovačů a roznašečů semen rostlin. Jsou také odpovědné za pestré zbarvení listů některých rostlin, které pravděpodobně chrání buňky listů před fotooxidačním poškozením, čímž se zvýší efektivita získávání živin během procesu stárnutí.[22]

Flavonoidy jsou účinné jako glykosidy i jako aglykony, využívají se buď celé drogy, nebo extrakty se standardizovaným obsahem účinné látky. Významná je jejich antioxidační aktivita, vychytávání kyslíkových radikálů a zhasení reaktivních forem kyslíku při jejich nadměrné tvorbě v organismu. Oblasti terapeutického využití flavonoidů jsou široké. Některé se užívají pro schopnost zvyšovat pevnost a snižovat propustnost kapilár, užívají se proti kornatění tepen. Působí antiagregačně, anihemoragicky, antiedematózně, rozšiřují cévy a snižují krevní tlak, lze je použít při hypercholesterolemii. Zvyšují účinek vitamínu C, některé podporují tvorbu a vylučování žluči, mají diuretický účinek. Za zmínku stojí i antiseptický a spasmolytický účinek. Jejich oxidačně redukční potenciál lze využít k inhibici některých enzymů, jejichž činností se tvoří volné radikály, které poškozují organismus při nádorových onemocněních, srdečních a cévních chorobách a stárnutí.[4][18]

### 3.3. Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou rostlinné sekundární metabolity obsahující 3-fenylchromanový skelet biogeneticky odvozený od 2-fenylchromanu přítomného ve struktuře flavonoidů. Klasifikují se podle stupně oxidace a přítomnosti dalších heterocyklů na základním skeletu. Zahrnují:

**Isoflavony,**

**Isoflavanony,**

**Isoflavany.**

K isoflavonoidům se řadí isopranylované deriváty:

**Pterokarpany,**

**Koumestany,**

**Retinoidy.**

Biosyntéza probíhá stejnou cestou jako u flavonoidů, liší se až u meziprojektu naringenin, který je přeměněn na isoflavon genistein pomocí enzymů isoflavon syntázy a dehydratázy. Podobně enzymy chalkon reduktáza, chalkon isomeráza a isoflavon syntáza katalyzují tvorbu isoflavonoidu daidzeinu z chalkonu naringenin. Rostlina užívá isoflavonoidy a jejich deriváty jako fytoalexiny k ochraně proti chorobám vyvolanými patogenními houbami a ostatními mikroorganismy.[4][23][27]

Hlavní rostlinnou produkční čeledí je *Fabaceae*. Tento fakt vede k přehlížení, že přítomnost isoflavonoidů byla popsána v několika desítkách rodů. Spektrum taxonů produkovat tyto látky tvoří zástupci tříd *Bryopsida*, *Pinopsida*, *Magnoliopsida* a *Liliopsida*. Příkladem produkujících čeledí jsou *Asteraceae*, *Iridaceae*, *Chenopodiaceae*, *Moraceae*, *Miristicaceae* a *Rosaceae*. [26]

### **3.4. Fytoestrogeny**

#### **3.4.1. Klimakterický a postmenopauzální syndrom**

Klimakterium je období přechodu mezi plodným věkem ženy a stářím. Fyziologicky nastává mezi 45. a 60. rokem života. Dochází ke snížení funkce vaječnicků a z toho vycházejících endokrinních, metabolických, psychických a somatických změn. Menopauzou se označuje poslední menstruační krvácení řízené ovariální funkcí. Postmenopauza začíná 12 měsíců po posledním krvácení.

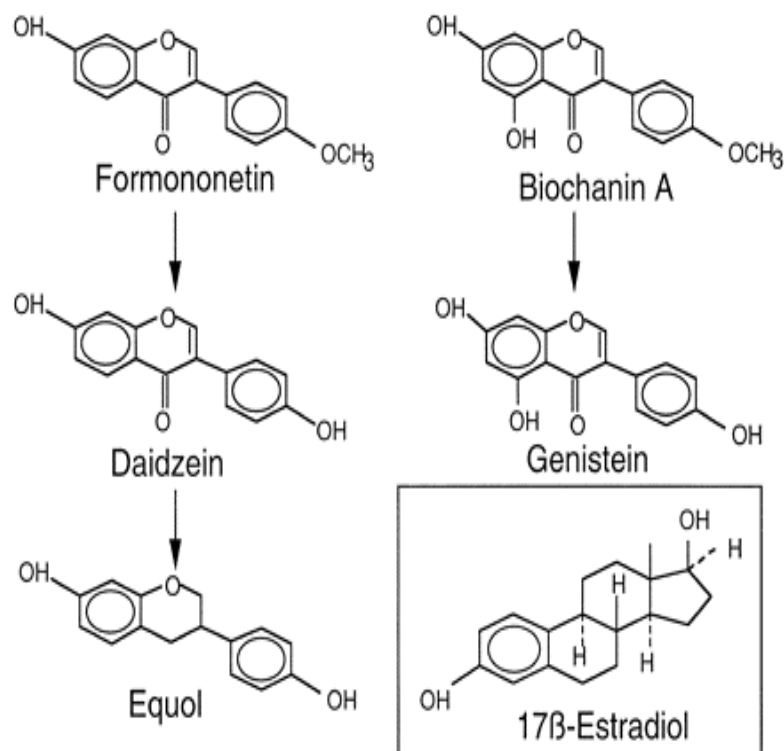
Projevy spojené se stárnutím ženského organismu se objevují postupně podle toho, jak klesá produkce estrogenů a snižuje se funkce ovárií. Akutní klimakterický syndrom se projevuje návaly horka, změnami nálad, pocením, depresemi. Některé ženy trpí závratěmi, bolestmi hlavy, plačtivostí a zhoršením paměti. Subakutní postmenopauzální syndrom se rozvíjí po dvou až pěti letech. Svaly dna pánevního ztrácí tonus a rozvíjí se stresová inkontinence. Kůže a sliznice atrofuje, poševní stěna je méně lubrikovaná a je náchylnější k infekcím. Nezřídka dochází ke ztrátě libida. Chronický postmenopauzální syndrom se objevuje 8 – 12 let po menopauze a je charakterizován metabolickými změnami, projevujícími se zvýšením triacylglycerolů, celkového a LDL cholesterolu a snížením HDL. Vlivem poklesu plazmatické hladiny estrogenu dochází k poklesu kostní denzity, ovlivnění cévní rezistence a tlaku krve.

Tíže klimakterického syndromu je hodnocena pomocí Kuppermanova Indexu.[28][29][30]

### 3.4.2. Mechanismus působení fytoestrogenů

Fytoestrogeny jsou sloučeniny produkované rostlinami s vlastnostmi podobnými estrogením hormonům. Klasifikují se do 4 hlavních skupin: steroly, terpeny, saponiny a fenoly. Poslední jmenovaná skupina se skládá z isoflavonoidů, lignanů a kumestanů. Isoflavonoidy a lignany jsou považovány za hlavní skupiny fytoestrogenů. Jejich biologická aktivita je připisována strukturální podobnosti se základním fyziologicky významným estrogenem - 17 $\beta$ -estradiolem. Tyto sekundární metabolity stejně jako estradiol obsahují fenolický kruh. Mechanismus účinku těchto rostlinných metabolitů spočívá ve vazbě a aktivaci intracelulárních estrogeních receptorů – ER $\alpha$  a ER $\beta$ . Následuje dimerizace estrogeních receptorů a interakce s estrogen responsivním elementem v promotoru estrogen responsivního genu. Tímto krokem je aktivována transkripce genu a generování účinku rozhodujícího pro normální fyziologické funkce. Isoflavonoidy vykazují vyšší afinitu k estrogením receptorům  $\beta$ , nacházejícím se v kostech, epitelu krevních kapilár, prostatě a vyšších centrech CNS, než k  $\alpha$  receptoru přítomnému zejména v prsní a děložní sliznici. Estradiol se na oba receptory váže přibližně stejnou afinitou. Účinek vykazovaný na receptorech může být estrogení nebo antiestrogení v závislosti na cirkulující hladině estrogenů. Ve srovnání s endogenními estrogeny mají nižší efekt v ovlivnění menopauzálních symptomů.[9][13][23][32-34]

Jetel luční produkuje významné fytoestrogeny v podobě **isoflavonoidů genisteinu, daidzeinu, biochaninu a formononetinu**. Biochanin A a formononetin jsou methoxy prekurzory, které jsou demethylovány izoenzymy cytochromu P450 v tenkém střevě a játrech na ER $\beta$  selektivní genistein a daidzein. Daidzein může být dále metabolizován na equol.[13][31]



**Obrázek 4:** Příklady isoflavonoidů z jetele lučního [31]

Použití klasické hormon substituční terapie je omezeno karcinogenním účinkem estrogenů na endometrium u žen a feminizujícím efektem u mužů. Proto stoupá zájem o nález a využití alternativních látek bez těchto nežádoucích účinků. V tomto smyslu se jeví fytoestrogeny jako vhodná alternativa, strava bohatá na fytoestrogeny je spojována s nižším rizikem výskytu nádorů prsu a prostaty a kardiovaskulárních chorob. Zlepšují výše popsané metabolické symptomy, také mají protektivní účinek na kostní tkáň během menopauzy.[31][34]

Kromě jetele lučního se používají potravní doplňky s obsahem sóji luštinaté. Ze skupiny lignanů je výborným zdrojem fytoestrogenů len setý, ploštičnick hroznovitý a další.[9]

## **3.5. Explantátové kultury rostlin**

### **3.5.1. Historie**

Kultura rostlinných explantátů *in vitro* je označení pro aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. Vznik rostlinných explantátů *in vitro* se datuje do roku 1902, kdy Haberlandt neúspěšně kultivoval vysoce diferencované buňky na médiích nedostatečného složení. Pozitivní výsledky přinesla volba meristematických buněk a rostlinných embryí. La Rue dosáhl úspěchu v roce 1936, když kultivací vegetačního rostlinného vrcholu získal výhony i kořeny. Ve stejném roce byla získána dlouhodobě rostoucí kultura izolovaných kořenových špiček. Postupně bylo dosaženo splnění základního požadavku na explantátové kultury, tedy neomezeného růstu. Následovalo období realizace explantátových kultur rozmanitých rostlinných druhů. Ruku v ruce z výše uvedenými experimenty se vinula snaha o zjištění optimálního složení kultivačních médií, co do obsahu anorganické a organické složky, se snahou o jejich plně syntetickou povahu. 50. léta jsou kromě pozitivních pokusů o kultivaci jednotlivých buněk uvolněných z pletiv charakterizována vývojem aparatur – třepaček, rolerů, fermentačních aparatur.

V 70. letech došlo k dalším významným objevům a to možnosti masově získat haploidy cestou kultivace prašníků *in vitro* a možnosti hromadně získat protoplasty rostlin enzymatickým rozrušením buněčné stěny. Diploidizací haploidů dochází k vytvoření rostlin maximálně homozygotních.[35]

### **3.5.2. Charakteristika**

Explantátem je označena část živé rostliny uměle oddělená, která je pěstována sterilně v umělých podmínkách mimo původní individuum. Jedná se tedy o fragment živého pletiva, orgán nebo orgánový komplex, jenž je vytržen z korelačních vztahů celého organismu a je pěstován v umělých podmínkách, a to dokonce bez ohledu na to, jestli roste nebo ne.

Předpokladem je, že vznik explantátu je podmíněn násilným přerušением všech vztahů s původním jedincem. [36]

Explantáty jsou různé typy *in vitro* kultivovaných rostlinných orgánů nebo jejich částí (protoplastů, meristematických pletiv a buněk). Výhodné je, že lze v malém prostoru kultivovat velké populace buněk a možnost z každé buňky vypěstovat plnohodnotnou rostlinu. Další výhodou je možnost zakonzervovat genetickou stabilitu materiálu a ve šlechtění rostlin využít metod genového inženýrství.

Explantátové kultury se využívají ke dvěma hlavním úkolům, ke šlechtění rostlina k produkci rostlinných metabolitů. Vzhledem ke zvyšujícím se požadavkům na množství farmaceuticky využitelných obsahových látek se přírodní zdroje rostlin jeví nedostačující. Proto jsou kromě zemědělské produkce středem zájmu jiné alternativní zdroje.[37]

### 3.5.3. Základní terminologie

- ***In vitro*** = ve skle, tedy v umělých podmínkách
- **Ex plantare** = pěstovat mimo
- **Explantát** – fragment živého pletiva, orgán nebo orgánový soubor, jenž je vytržen z korelačních vztahů celku a je pěstován v umělých podmínkách
- **Aseptická kultura** – kultura bez infekce vyvolané bakteriemi, kvasinkami a plísněmi
- **Tkáňová kultura** – termín přenesený z oblasti fyziologie živočichů, pro kultury rostlinných pletiv není vhodný
- **Totipotence buňky** – schopnost jednotlivé somatické buňky se dělit a vytvořit veškeré diferencované buňky organismu, včetně extraembryonálních tkání/pletiv. Totipotentní jsou zygoty a meristematické buňky
- **Meristém** – dělivé pletivo
- **Kalus** – soubor nediferencovaných buněk

- **Buněčná suspenzní kultura** – homogenní populace buněk nebo jejich shluků kultivovaná v pohybujícím se tekutém živném médiu [38][39][40]

#### 3.5.4. Princip růstu explantátových kultur

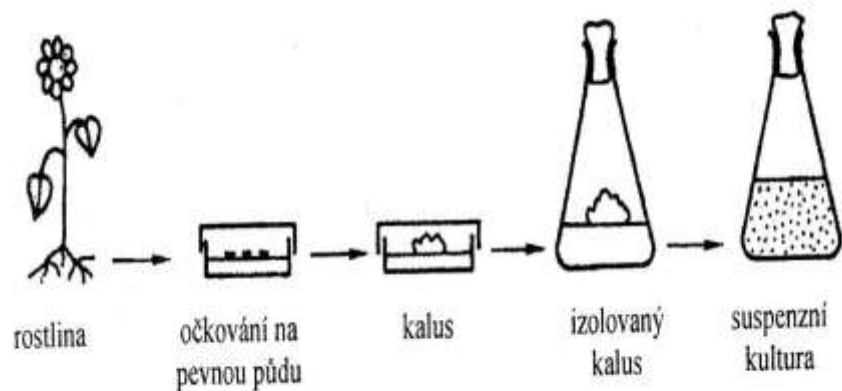
Základem organismu rostlin, rozmnožujících se pohlavní cestou, je buňka zygota, která vzniká oplozením vaječné buňky spermatickou. Zygota je nositelem kompletní genetické informace v jádře, tedy otcovské i mateřské. V cytoplazmě zygoty probíhá různými mechanismy realizace této jaderné genetické informace. Zygota je totipotentní buňka se schopností mitotického dělení. Mitotickým dělením jsou produkovány dceřinné buňky, které se dále vyvíjejí a diferencují na stavební jednotky různě specializovaných pletiv. Rostlinné buňky diferenciací nijak nedegenerují, spíše naopak. Jsou schopny opětovně se dediferencovat a znovu se dělit.

Proces diferenciacie je založen na diferenční genové aktivitě, kdy se aktivací či inaktivací určitých genů rostlinného druhu vytváří konkrétní specializace buňky rostliny. Totipotentní je meristematická buňka, zygota, ale i jakákoli jiná buňka rostlinného organismu. Dediferenciaci a neorganizovaný růst je v mnoha případech možné vyvolat změněním podmínek, ve kterých se právě konkrétní buňka nachází. K odvození explantátové kultury je podle výše uvedeného principu vhodná každá rostlinná buňka obsahující funkční jádro. Rostlinné části mohou být kultivovány po určitou dobu *in vitro* a následně je možné je za vhodných podmínek dopěstovat v nové intaktní rostliny.

Kalus jako soubor nediferencovaných buněk je možné odvodit z různých explantátů, například ze segmentů stonků, listů, kořenů, vzrostlých vrcholů a embryí. Explantát je umístěn na kultivační médium s vysokou koncentrací auxinu, čímž je indukován růst kalusu. Inkubace probíhá při teplotě 23 – 28 °C. Po nárůstu kalusu, obsahujícího dostatečný počet buněk, je možné kalus nebo jeho část přenášet na čerstvé kultivační půdy a udržovat tak kulturu v aktivním, množícím se stavu.



Původní předpoklad využití explantátových kultur vycházel z představy genetické stability vyprodukovaných rostlin. Ukázalo se, že při regeneraci rostlin z kalusové nebo suspenzní kultury může docházet ke genetickým odchylkám. Vznik genetických anomálií v *in vitro* kultuře závisí na výchozím explantátu a kultivačních podmínkách. Genetická stabilita je vázána na organizovaný typ vývoje, kdy je eliminováno stádium dediferenciace a kalusový růst. Následující podmínky splňují jen embryonální kultury a většinou i meristémové kultury. Pokud je zachován organizovaný růst, je zachován i diploidní charakter buněčného cyklu. Pokud ne, dochází ke změnám buněčného cyklu vedoucím k chromozomálním a jaderným abnormalitám. Nejčastěji se vyskytovanými genetickými odchylkami jsou polyploidie, aneuploidie a chimerismus.[37][40]



**Obrázek 5:** Odvození explantátové kultury [37]

### 3.5.5. Rozdělení explantátových kultur

Explantátové kultury lze dělit dle kultivovaného explantátu nebo charakteru pletiva. Podle tohoto hlediska se rozlišuje:

- Kultury izolovaných embryí
- Kultury izolovaných semen
- Kultury vegetativních orgánů a jejich částí: kořeny, listy, stonky, pupeny
- Kultury generativních orgánů: poupata, květy, pestíky, tyčinky, prašníky, spory, pylová zrna
- Kalusové kultury
- Buněčné kultury
- Protoplastové kultury

Kalusové, protoplastové i buněčné kultury jsou odvozeny od kultur výše uvedených i od sebe navzájem. Jednotlivé kultury se od sebe liší také náročností metodiky při jejich zakládání.[41]

### 3.5.6. Buněčná suspenzní kultura

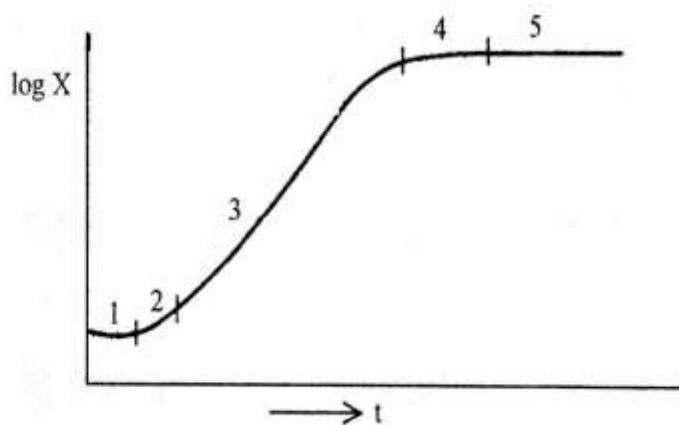
Buněčná suspenzní kultura představuje homogenní populaci buněk nebo agregátů kultivovaných v tekutém živném médiu. Tekuté médium a rovnoměrné rozprostření buněk zajišťuje snadný přístup živin a výměnu dýchacích plynů. Kultivace v pohybujícím se tekutém médiu zajišťuje rychlý růst suspenze. Nejvhodnější je homogenní suspenze, dlouhodobá kultivace kultury vede k postupné heterogenitě. Heterogenita je způsobena genetickými změnami, které jsou v suspenzních kulturách časté. Ve staré kultuře jsou kromě agregátů buněk patrné i vakuoly.

Suspenzní kultura se odvozuje z rozpadavého kalusu, naopak nevhodný je kalus kompaktní. Kalus je následně kultivován v tekutém médiu na rolleru nebo třepačce. Pokud se suspenzní kultura pravidelně filtruje přes síta o určité velikosti pórů, lze získat jednobuněčnou kulturu. Počet otáček rolleru se liší dle přístroje, 1 – 10 otáček za minutu, u třepaček 30 – 150 otáček za minutu.

Kultivační nádoby se naplňují médiem do jedné pětiny až jedné čtvrtiny. Modernější metodou kultivace je využití tzv. bioreaktorů, které mají mnoho automatických funkcí. Pohyb média je zajištěn míchadlem nebo probubláváním vzduchem. Dále zajišťují stálou hustotu buněk v médiu, konstantní složení živného roztoku, regulaci pH, monitorování růstu kultury a další. Suspenzní kultury se užívají mimo jiné jako modelový systém pro studium sekundárního metabolismu rostlin, indukce enzymů a genové exprese.[40]

### 3.5.7. Růst a pasážování suspenzní kultury

Růst buněčné kultury je charakterizován tzv. růstovou křivkou. Růstová křivka popisuje závislost hmotnosti kultivovaných buněk na čase kultivace v měnících se podmínkách kultivace.



**Obrázek 6:** Růstová křivka explantátových kultur [37]

1. **Lag fáze** – první fáze růstu charakterizuje přizpůsobování nově naočkovaných buněk kultivačnímu médiu. Běžně počet živých buněk v této fázi klesá.
2. V **akcelerační fázi** se buňky množí stále stoupající rychlostí
3. Maximální konstantní růstová rychlost je dosažena v **exponenciální fázi**

4. V **deklinální fázi** dochází k vyčerpání substrátů a také ke hromadění toxických metabolitů. Důsledkem těchto změn je zpomalení množení buněk.
5. Ve **stacionární fázi** se rychlost množení a odumírání vyrovnává. Růst je limitován vyčerpáním živin z média během předcházející exponenciální fáze.
6. Posledním úsekem růstové křivky je **fáze umírání**, kdy rychlost odumírání buněk převyšuje rychlost jejich množení.

Délka časového úseku mezi založením buněčné kultury a stacionární fázi je závislá na několika faktorech, především na počáteční hustotě suspenze, době trvání lag fáze a délce buněčného cyklu.[37][40]

Průměrná inkubační doba je 18 – 25 dnů. Při velmi aktivním buněčném dělení se inkubace snižuje na 6 – 9 dnů. Klasická syntetická kultivační média mají kritickou počáteční hustotu  $5 - 15 \cdot 10^3$  buněk na mililitr. Je-li počáteční hustota nízká, dochází k prodloužení lag fáze. Růst suspenze s počáteční nízkou hustotou lze stimulovat kontaktem se suspenzí o vysoké hustotě buněk. Protože aktivně se dělící buňky produkují substance, které stimulují růst.

Pasážování se provádí centrifugací ve zkumavce při 200 – 1000 otáčkách za minutu, supernatant se odpipetuje, sedimentované buňky se resuspendují do nového živného média. Tato nová suspenze se přefiltruje přes sítko, aby se odstranily buněčné shluky, stanoví se počet buněk v mililitru suspenze a následně se rozpipetuje v určitém objemu, podle počtu buněk do baněk s živným médiem. Další možností kultivace je rozlití suspenzní kultury na agarovou plotnu v Petriho misce. [40]

### 3.5.8. Kultivační podmínky

Kultivační podmínky jsou zásadní pro růst a vývoj v explantátové kultuře. Jedná se především o zdroj energie, výživy a látek s regulační funkcí v podobě kultivačního média. Dalšími významnými faktory je intenzita a kvalita světla a fotoperioda, dále teplota a plynná fáze uzavřeného kultivačního prostředí, množství vodní páry.

#### Kultivační médium

Kultivační médium je exogenním zdrojem rostlinných hormonů. Významnou součástí jsou minerální živiny, tedy mikroprvky a makroprvky, sacharidy, aminokyseliny nebo jiný zdroj organického dusíku, další organické složky a zpevňující látky.[41][40]

Makroelementy zahrnují 6 nejdůležitějších prvků: N, P, K, Ca, S. Optimální koncentrace k dosažení maximální rychlosti růstu se liší podle druhu rostliny. Médium by mělo obsahovat alespoň 25 – 60 mM anorganického dusíku, navíc rostliny jsou schopny pro růst využít jen dusík v nitrátové formě. Lepších výsledků růstu je dosaženo přidáním N ve formě nitrátu společně s amonnými solemi. Draslík se dodává ve formě dusičnanu a chloridu, 20 – 30 mM. 1 – 3 mM je optimální koncentrace ostatních prvků, síry, fosforu, hořčíku, vápníku.

Mikroelementy zahrnují Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo, I, Cl, Na. Zinek a železo se přidávají ve formě chelátu.

Vitamíny fungují jako katalyzátory metabolických procesů a jsou pro rostliny nezbytné. Do médií se nejčastěji přidávají thiamin, pyridoxin, kyselina nikotinová a myo-inositol. Kyselina nikotinová a pyridoxin nejsou tak nepostradatelné jako thiamin. Myo-inositol nemusí být pro růst nezbytný, ale může ho stimulovat. Účastní se syntézy fosfatidylinositolu a dalších látek účastnících se buněčného dělení. Do médií lze přidat také biotin, kyselinu askorbovou, listovou, pantotenovou a riboflavin.

Sacharóza se používá jako nejčastější zdroj uhlíku, ale může ji nahradit fruktóza a glukóza. Sacharidy přítomné v kultivačním médiu plní funkci heterotrofní výživy rostlinného organismu.

Aminokyseliny jsou rostlinami syntetizovány, přesto některé jsou do média uměle přidávány, protože stimulují růst explantátů. Slouží jako zdroj dusíku a lze je přímo využít pro tvorbu bílkovin. Směsi aminokyselin se dodávají zejména při kultivaci protoplastů a buněčných suspenzí. V praxi se přidává kasein jako směs aminokyselin nebo jednotlivé aminokyseliny, například adenin, L-asparagin, L-glutamin a glycin.

Nedefinované organické složky se do médií přidávají z různých důvodů. Jejich použití je sporné z důvodu nedefinovaného složení. Používají se: kasein, kokosové mléko, extrakt ze sladu a kvasnic, šťáva z ovoce a zeleniny, někdy se přidává aktivní uhlí, které adsorbuje látky inhibující růst, růstové regulátory a způsobuje ztmavnutí média.

Pro zpevnění média se u tuhých kultivačních médií používá agar. Agarový gel je stálý při teplotách kultivace a nespornou výhodou je jeho inertnost vůči ostatním složkám média. Kromě agaru lze použít agarózu. Pokud je použito tekuté kultivační médium, je možné explantáty fixovat na můstcích vyrobených z filtračního papíru, polyuretanové pěny, plastu potaženého polypropylenovou membránou nebo celofánu.

Regulátory rostlinného růstu auxiny, gibbereliny, kyselina abscisová a cytokininy svým obsahem a poměrem jejich obsahu v kultivačních médiích ovlivňují růst rostlinných explantátů. Auxiny se přidávají za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, indukce somatické embryogeneze, indukce tvorby prýtlů a stimulaci jejich růstu. Cytokininy se přidávají ke stimulaci buněčného dělení a tvorby axilárních prýtlů. Je-li poměr auxinu a cytokininu je vysoký, je stimulována iniciace tvorby kořenů a kalusů, je-li tento poměr nízký, je indukována tvorba adventivních a axilárních prýtlů. Funkcí kyseliny abscisové je stimulace, ale i inhibice růstu v závislosti na kultivovaném rostlinném druhu. Gibbereliny nejsou většinou explantáty k růstu vyžadovány, přesto se přidávají, aby stimulovaly růst buněčných kultur při nízké hustotě suspenze.

Vhodné pH kultivačního média se pohybuje mezi 5,5 – 7,0. Úprava koncentrace vodíkových iontů se provádí kyselinou chlorovodíkovou a hydroxidem sodným. Složení média by mělo odpovídat aktuálním

požadavkům rostliny, nacházející se v různých stádiích rozmnožovacího cyklu.[40]

### 3.5.9. Regulátory rostlinného růstu

Přírodní regulátory, v tomto případě stimulatory růstu se dělí do dvou skupin podle výchozích látek jejich biosyntézy.

První skupinu tvoří růstové regulátory vznikající při metabolismu aminokyselin. Řadí se mezi ně neindolové a indolové auxiny, fenolické látky odvozené od tryptofanu, tyrosinu, dále etylen tvořící se z metioninu.

Druhou skupinou jsou regulátory tvořené isoprenovými jednotkami tvořenými z kyseliny mevalonové. Zástupci skupiny jsou cytokininy, kyselina abscisová, xanthoxin a gibereliny.

#### Auxiny

Kyselina indol-3-octová (IAA) je rostlinami tvořena v metabolicky aktivních oblastech, v meristematických pletivech a listech. Prekurzor syntézy, tryptofan je mikroorganismy a rostlinami tvořen z kyseliny šikimové působením šesti enzymů, jedním z nich je tryptofansyntáza. Syntéza je regulována množstvím vytvořeného tryptofanu, jeho nahromadění allostericky inhibuje první krok syntézy. Přírodní auxiny jsou v rostlinách ve formě volné - účinné nebo vázané s nízkomolekulárními látkami typu peptidů nebo cukrů. Úlohou vázané indol-3-octové kyseliny je ochrana kyseliny proti působení peroxidáz, je zásobní formou kyseliny a je pohotovostní formou kyseliny vyrovnávající homeostázu. Auxiny podléhají neenzymatické degradaci působením kyselin a zásad, míra působení degradujících látek závisí na citlivosti auxinu k degradačnímu činiteli. Možný je také rozklad oxidací za přítomnosti katalyzátorů, fotolýzou UV absorpcí fotonů, v přítomnosti kyslíku ionizujícím zářením. Enzymatická degradace je katalyzována enzymem IAA-oxidázou.[42]

Nejlépe prostudovanou funkcí je stimulace dlouhivého růstu, dále je udržována dominance plodů, reguluje opad listů a plodů, ten nastane, když se zastaví transport auxinu do oblasti listů a plodů. Auxiny stimulují tvorbu kořenů, tvorbu adventivních kořenů na segmentech stonku i u explantátů. Kromě dlouhivého růstu stimulují i dělení buněk, čehož se využívá v *in vitro* systémech.[41]

### Gibereliny

Gibereliny (GA) jsou alicyklické sloučeniny fluorenové řady. Nomenklatura je založena na hypotetickém tetracyklinu gibanu. Je známo více než 60 giberelinů a pro všechny je charakteristická přítomnost gibanu a laktonového cyklu připojenému na A kruh gibanu a přítomností karboxylové skupiny v poloze 10 a methylové skupiny v pozici 1. Rozdílnost jednotlivých zástupců je dána přítomností nebo nepřítomností dvojně vazby v kruhu A a množstvím a postavením hydroxylových skupin. Podle počtu uhlíků se skupina giberelinů dělí na C<sub>20</sub>-gibereliny a C<sub>19</sub>-gibereliny. Biosyntéza probíhá v klíčících semenech, mladých vrcholových listech, v kořenech a vrcholcích kořenů. U jetele lučního se tvoří v mladých listech a za krátkého dne jsou transportovány do rostliny, kdežto za dlouhého dne se akumulují. Gibereliny odpovídají stavbou diterpenu geranylgeraniolu. Sntéza vychází z acetylkoenzymu A přes kyselinu mevalonovou, geranylgeranylpyrofosfát, jeho cyklizací a postupnou oxidací kyselina7-β-hydroxykaurenová a z ní jednotlivé gibereliny. Na biosyntézu má velký vliv světlo. Degradace probíhá hydrolýzou a také přechodem v glykosidy a glykosylestery. Gibereliny jsou nestálé ve vodném prostředí, dobře snášejí bezvodé roztoky organických rozpouštědel, jsou termostabilní a stálé v UV. Typickým představitelem giberelinů je kyselina giberelová.[42]

Gibereliny stimulují dlouhivý růst, avšak neovlivňují kořenovou část. Dále stimulují buněčné dělení v přechodu z fáze G1 do S a S fáze je obvykle zkrácena.[41]



### Cytokininy

Strukturálně vycházejí z adeninu substituovaného na aminoskupině v poloze N-6. Tato konfigurace je podmínkou biologické aktivity. První přírodní zástupce skupiny byl nazván zeatin díky jeho objevu v endospermu kukuřice. V rostlinách se vyskytují volně nebo jako součást molekul t-RNA. Vnikají přenesením izoprenylového řetězce odvozeného od mevalonátu na adenylový zbytek.

Účastní se hormonálních regulací fyziologických procesů. Stimulace buněčného dělení, větvení, iniciace růstu adventivních pupenů. Redukce dlouhivého růstu stonků, inhibice diferenciaci kořenů, oddálení stárnutí pletiv. Působí v kooperaci s auxiny. Exogenní aplikace byla využita pro stimulaci větvení okrasných rostlin ke zvýšení tvorby květů. Předpokládá se využití cytokininů ke zvyšování odolnosti rostlin vůči stresujícím faktorům.[41]

### Kyselina abscisová

Jedná se o opticky aktivní látku, v rostlinách se přirozeně vyskytuje (+)-(S)-enantiomer. Strukturou je seskviterpen odvozen od kyseliny mevalonové ze štěpného produktu xantofylu. V rostlinách se vyskytuje v nízkých koncentracích. Produkce je zvýšena při stresu, který na rostlinu působí, v tomto případě kyselina abscisová indukuje uzavírání průduchů inhibicí ATP-protonové pumpy v cytoplazmatické membráně. Univerzální reakcí rostlinných buněk na přítomnost kyseliny abscisové je inhibice růstu. Také redukuje množství m-RNA, syntézu t-RNA a r-RNA, čímž ovlivňuje syntézu bílkovin a funkci enzymů. V explantátových kulturách podporuje vývoj zygotických embryí.[41]

### 3.5.10. Využití explantátových kultur

- Zisk rostlinných produktů doposud získávaných z intaktních rostlin. Výhodou je možnost nastavení podmínek, aby výnos byl, co možná nejvyšší bez závislosti na půdních poměrech, ročním obdobím a klimatických podmínkách. Získané produkty jsou nekontaminované hmyzem a chemikáliemi k ochraně rostlin.
- Zisk látek z rostlin, které se složitě pěstují.
- Z explantátových kultur je možné izolovat látky, které nebyly izolovány z mateřských rostlin.
- Explantátové kultury mají schopnost exogenně dodané, levné a snadno dostupné substráty biotransformovat na farmaceuticky významné látky.
- Dále je možné inkorporovat cizí genetický materiál do rostlinné buňky a tím modifikovat rostlinný genom, využít explantátové kultury k ozdravování rostlin od virových infekcí, využít tyto metody k vegetativnímu množení rostlin, regulovat proces oplození, selektovat spontánní výskyt genomových a genových mutací u regenerovaných rostlin.[37][40]

### 3.6. Elicitace

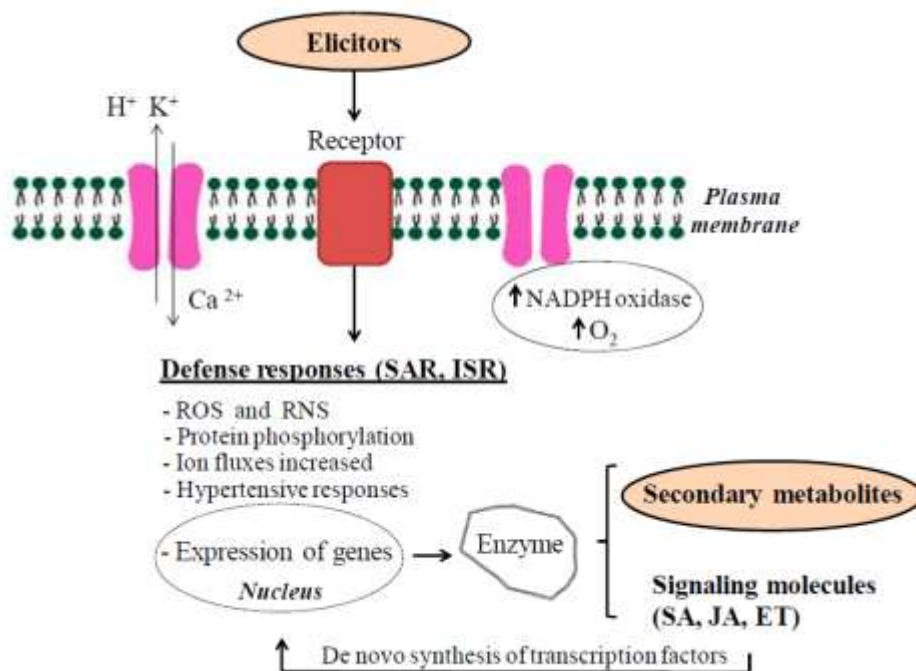
Vyšší rostliny jsou nejbohatším zdrojem pro výběr přírodních látek využitelných v lékařství, kosmetice a potravinářství. Odhaduje se, že asi jedna třetina léčivých přípravků obsahuje látky rostlinného původu nebo jejich deriváty. Ve většině případů není možné požadované množství obsahových látek získat organickou syntézou a problémem je i jejich výroba metodami genového inženýrství v mikrobiálních systémech, protože vznikají mnohostupňovými syntézami. Jednou z možností zisku rostlinných sekundárních metabolitů je využití explantátových kultur.[43]

Rostlinné tkáňové kultury jsou nadějným zdrojem sekundárních metabolitů. Avšak jejich produkce je ve srovnání s intaktní rostlinou většinou nižší. Tento fakt je důvodem, proč se hledají různé postupy a metody ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů rostlinnými kulturami. Tradiční a jednou z nejúspěšnějších strategií ke zvýšení produkce je použití elicítace. Princip elicítace spočívá v hromadění sekundárních substancí v rostlině jako následek rostlinné obranné reakce proti patogenním vlivům nebo rostlinnému prostředí. Spouštěcí faktor vedoucí k obranné reakci u rostliny se nazývá elicitor. Rostlinné sekundární biosyntetické dráhy jsou mimořádně indukovatelné elicitory a umožňují posílení produkce metabolitů rostlinnými buněčnými a tkáňovými kulturami. Elicitory mohou regulovat velký počet kontrolních míst a spouštět expresi klíčových genů odpovědných za zvýšení biochemických a metabolických buněčných procesů zahrnujících signální sloučeniny.[3][44]

### 3.6.1. Mechanismus působení elicitoru

V rámci rostlinných obranných mechanismů, každá rostlinná buňka získala schopnost reagovat na patogeny a environmentální faktory a vyvolat na ně obrannou reakci. Reakce rostlin závisí na několika faktorech v závislosti na jejich genetické výbavě a fyziologickém stavu. Odolnost rostlin proti chorobám je zapříčiněna geneticky, pomocí rezistentních rostlinných genů a patogen avirulentních genů. Obranné pochody rostlin mohou ovlivnit elicitory.

Elicitor se váže na receptory přítomné v plasmatické membráně rostlinných buněk, receptory mají odlišnou citlivost na působení různých elicitorů. Uvádí se, že na přítomnost elicitoru mohou rostliny reagovat aktivací obranných mechanismů na povrchu plasmatické membrány, včetně indukce enzymů chránících před oxidačním stresem, produkce reaktivních forem kyslíku a reaktivních forem dusíku. Elicitor může ovlivnit propustnost membrány pro ionty. Chloridové a draselné ionty putují ven z buňky a naopak vápenaté ionty dovnitř. Dalšími ovlivnitelnými faktory jsou fosforylace proteinů, oxidace lipidů a tvorba strukturální bariéry tvorbou depozit dřeva, což vede ke ztvrdnutí buněčné stěny. Pokud je elicitem regulována produkce sekundární rostlinných metabolitů děje se tak na základě aktivace a *de novo* biosyntézy transkripčních faktorů, které regulují expresi genů podílejících se na produkci sekundárních metabolitů. Ukazuje se, že je možné takto regulovat velké množství biochemických kontrolních bodů na buněčné a molekulární úrovni. [44][45]



SAR – získaná systémová odpověď; ISR – navozená systémová rezistence; ROS – reaktivní formy kyslíku; RNS – reaktivní formy dusíku; NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát; SA – kyselina salicylová; ET – ethylen

**Obrázek 7:** Mechanismus působení elicitoru [45]

### 3.6.2. Přenos signálu v rostlině

Základem působení elicitoru je jeho vazba na receptor. Po vazbě a rozpoznání elicitoru rostlinnými receptory, jsou tyto receptory aktivovány a dochází ke spuštění řady přenašečových mechanismů, jakými jsou iontové kanály, GTP vazebné proteiny, proteinkinázy a další. Na zmíněné transportní mechanismy navazuje systém tzv. druhých posílů, jejichž úkolem je signál zesílit a poslat ho k dalšímu zpracování. Celý proces může být schematicky rozdělen do následujících kroků:

- Vazba elicitoru na receptor
- Reverzibilní fosforylace a defosforylace bílkovin plazmatické membrány a cytosolu
- Náhlý vzestup koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů v cytosolu
- Depolarizace plazmatické membrány

- Vstup  $\text{Cl}^-$  a  $\text{K}^+$  do cytosolu a současný výstup  $\text{H}^+$  z cytosolu
- Změna acidity: alkalizace extracelulárního prostoru a acidifikace cytoplazmy
- Aktivace MAPK – mitogenem aktivované protein kinázy
- Aktivace NADPH oxidázy a následná produkce reaktivních forem kyslíku
- Časná exprese obranných genů
- Produkce jasmonátu a ethylenu
- Pozdní exprese obranných genů
- Produkce a kumulace sekundárních metabolitů

Signální dráhy elicitoru se mohou lišit v závislosti na vnímání různých signálů elicitoru a typu obranné reakce.[46]

### 3.6.3. Typy elicitorů

Elicitory se klasifikují jako biotické, abiotické a rostlinné hormony.

První biotické elicitory byly popsány na začátku sedmdesátých let. Od té doby bylo publikováno mnoho prací, které poskytly důkazy o několika sloučeninách odvozených od patogenů, které navozují obrannou reakci v intaktních rostlinách i v rostlinných buněčných kulturách. Elicitor, jako nástroj ke zvýšení obsahu fytochemických látek, se aplikuje sám nebo v kombinaci s jiným elicitem v určitém časovém úseku rostlinného vývoje.

Biotické elicitory mají biologický původ, často jako výsledek virové, bakteriální a houbové infekce nebo se jedná o enzymy uvolněné z patogenního agens. Abiotické elicitory jsou produkovány faktory odpovědnými za vnější stres. Abiotické elicitory se dále rozdělují podle původu na chemické a fyzikální. Kromě předchozího dělení, lze elicitory dělit na základní, které indukují nespecifické mechanismy k vyvolání obranné reakce u různých rostlinných kultur, a specifické, které účinkují jen na určitý kultivar rezistentní proti specifickému genu patogenu.

Příklady používaných elicitorů jsou uvedeny v tabulce č. 1:

<b>Biotické elicitory</b>	
<u>Lipopolysacharidy</u>	
<u>Polysacharidy</u> – pektin, celulóza, chitosan, chitin, mikrobiální glukany, alginát, arabská klovatina, LBG, kvasničný extrakt	
<u>Oligosacharidy</u> – galakturonidy, guluronát, mannuronát, mannan	
<u>Bílkoviny</u> – laktoferrin, celuláza, kryptogein, oligandrin, pektolýza, hydrolyzáty rybích proteinů, glykoproteiny	
<u>Komplexní sloučeniny</u> – spóry hub, myceliární buněčná stěna a mikrobiální buněčná stěna	
<u>Patogenní toxiny</u> – koronatin	
<u>Extrakt z dobromyslu</u>	
<b>Abiotické elicitory</b>	
<i>Fyzikální</i>	<i>Chemické</i>
Extrémní teplotní šok	<u>Anorganické soli</u> – chlorid rtuťnatý,
Mráz	síran měďnatý, chlorid vápenatý, síran vanadnatý
Oxid uhličitý	Benzothiadiazol
Ozón	Ethanol
Poranění	Ethen
Solný stres	Kyselina octová
Sucho	<u>Kovové ionty</u> – $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Ag}^+$ , $\text{Ag}^{2+}$ ,
UV záření	$\text{Al}^{3+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$
Nízká a vysoká osmolarita	
Vysoký tlak	
<b>Rostlinné hormony</b>	
Kyselina jasmonová, methyl jasmonát, kyselina salicylová, methyl salicylát, ethylen, cytokinin, gibberelin $\text{GA}_3$	

**Tabulka 1:** Rozdělení a příklady používaných elicatorů [45]

### 3.6.4. Faktory ovlivňující elicitaci

Faktory, které ovlivňují průběh a výsledek elicitace se týkají rostlin, které se pro elicitaci použijí a volby samotného elicitoru. Při volbě rostlinného materiálu se bere v úvahu, jaký druh a kultivar a v jakém fyziologickém stádiu se použije, vnější podmínky, teplota a světlo. Pokud se jedná o intaktní rostlinu, jsou důležité pěstební podmínky, tedy půda, způsob množení, zálivka aj.

Z pohledu elicitoru je elicitace ovlivněna volbou látky – abiotický nebo biotický, dávkou, respektive koncentrací aplikovaného elicitoru. Výsledek ovlivní také doba působení elicitoru. Pokud se použije kombinace elicitorů, hraje roli jejich vzájemné působení, které může být synergické nebo antagonistické.

Lepší výsledky jsou dosahovány, pokud je elicitor aplikován během exponenciální fáze rostlinného růstu. [45]



### 3.7. Chlorid sodný

Chlorid sodný neboli sůl kamenná chemického vzorce NaCl je bezbarvá nebo bílá krystalická látka.

Chlorid sodný pochází z rozličných zdrojů, zahrnující mořskou vodu, minerální zdroje (kamenná sůl), solná jezera atd. Protože je sůl nezbytná pro přežití organismu, stala se v historii cennou obchodní komoditou a zdrojem bohatství. Chlorid sodný poskytuje dva pro život nezbytné elementy, sodík a chlor. Chloridový aniont hraje zásadní roli ve fyziologických funkcích organismu, účastní se retence tekutin, čímž ovlivňuje osmotický tlak. Zásadní je jeho podíl na udržení hodnoty pH. Chlorid sodný je neopomenutelný vrozený faktor bránící infekci hostitele. Chloridový iont slouží jako substrát pro produkci účinné látky, která stimuluje neutrofyly, také přispívá k regulaci homeostázy iontů. [47]

V přírodě se vyskytují rostliny charakteristické tolerancí vyšší koncentrace  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  v půdě, která by jiným rostlinným druhům způsobila poškození, označují se termínem halofyty. Rostliny rostoucí ve slaném prostředí potřebují udržovat pozitivní osmotický tlak. Halofyty kumulují sodné a chloridové ionty ve vakuolách, zatímco v cytoplazmě se hromadí organické ionty jako prevence nežádoucích účinků metabolismu. Vysoká salinita inhibuje růst, možnou příčinou je mimo jiné toxický metabolismus iontů sodíku a chloru v cytoplazmě. [48]

Chlorid sodný je možné použít jako elicitor, ke stimulaci produkce sekundárních metabolitů. NaCl působí v buněčných kulturách navození stresové reakce, dochází k produkci reaktivních forem kyslíku a v rostlinném organismu se aktivuje řada antioxidantních procesů chránících rostlinnou buňku. Jednou z těchto obranných reakcí je produkce sekundárních metabolitů. Základním mechanismem vedoucím k produkci kyslíkových radikálů je navození osmotické nerovnováhy ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  a neschopnost rostliny čerpat vodu z okolí stejně jako je tomu v období sucha. Salinita jako faktor stresu výrazně potlačuje růst a vývoj rostlin.[49][50][51]

### 3.8. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC

Jedná se o separační analytickou metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení složek separovaných ze směsi. Stanovení prováděná touto metodou jsou vysoce selektivní, citlivá a v relativně krátkém čase. K provedení analýzy je třeba velmi malé množství vzorku, výhodou je také možnost automatizace. Výstupem analýzy je chromatogram, ze kterého lze získat detailní informace o identitě, čistotě a obsahu analyzovaného materiálu.

HPLC chromatograf se skládá z:

- zásobníků mobilní fáze
- vysokotlakého čerpadla, které čerpá mobilní fázi přes kolonu do detektoru konstantní rychlostí
- programovací jednotky, díky níž se nastavuje požadované složení mobilní fáze
- dávkovacího zařízení, umožňujícího dávkování roztoku vzorku na chromatografickou kolonu
- chromatografické kolony, kterou je pomocí mobilní fáze unášena směs vzorku a dělena na jednotlivé složky. Kolony pro tento typ chromatografie jsou vyrobeny z nerezové oceli nebo skla, dlouhé 10 – 25 cm s vnitřním průměrem 3 – 5 mm naplněné vhodným sorbentem. Používanými sorbenty jsou chemicky vázané stacionární fáze. Na hydroxylové skupiny silikagelu jsou vázány uhlovodíkové řetězce s počtem uhlíků nejčastěji 18. Z polárních sorbentů se používá silikagel a oxid hlinitý.
- Detektoru, který zaznamenává průtok separované složky detekční celou a přenáší upravený signál do počítače ke zpracování. Použitý detektor zásadně ovlivňuje selektivitu a citlivost stanovení. Používají se elektrochemické detektory pro analýzu vzorků s oxidačně-redukčními vlastnostmi, fluorimetrické detektory pro látky, které přímo nebo po úpravě vzorku vykazují fluorescenci. Spektrofotometrické detektory proměřují absorpenci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu

protékajícími detektorem, tyto detektory jsou pro ultrafialovou i viditelnou oblast spektra. Refraktometrické detektory měří rozdílný index lomu eluátu obsahujícího analyzovanou látku a porovnávají ho s indexem lomu čisté mobilní fáze. Nevýhodná je závislost odezvy detektoru na teplotě. Vysoce selektivní a citlivé jsou detektory s využitím hmotnostního spektrometru. Separované složky jsou v plynném stavu ionizovány a nabitě částice jsou v magnetickém poli tříděny dle náboje a hmotnosti.

Kvalitativní charakteristikou je retenční čas, tedy doba od nástřiku vzorku na kolonu do maxima píku na chromatogramu. Porovnává se retenční čas analyzovaného vzorku s retenčním časem standardního vzorku. Kvantitativní charakteristikou je plocha chromatografického píku.

HPLC je využitelná v mnoha oblastech. Ve farmacii ke zjištění totožnosti léčiv, jejich obsahu a přítomnosti doprovodných nečistot. Na chromatogramu lze identifikovat rozkladné produkty vzorku, z toho plyne využití ve stabilitních studiích. Možné je analyzovat obsahové látky v rostlinném materiálu.[52]

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Materiál, přístroje a pomůcky

#### 4.1.1. Rostlinný materiál

K veškerým experimentům uvedeným v diplomové práci byla použita suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (*Fabaceae*) varieta Tempus. Elicitace byla provedena u pětileté suspenzní kultury.

#### 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 sodný *p.a.*, Lachema, Brno
- Chlorid thiaminia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- Chlorid vápenatý *p.a.*, Lachema, Brno
- Jodid draselný *p.a.*, Lachema, Brno
- Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová č., Lachema, Brno
- 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 $\mu$ m) s předkolonkou, Merck, Darmstadt
- Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
- Vodní lázeň KL – 1, Laboratorní přístroje, Praha

## 4.2. Kultivace explantátové kultury

### 4.2.1. Nádoby a nástroje použité ke kultivaci

Kultivace explantátových kultur probíhala ve skleněných nádobách značky SIAL. Baňky jsou vyrobeny z varného skla dostatečně odolného vůči teplotním rozdílům, vodě a chemikáliím, vyhovujícího požadavkům pro práci s tkáňovými kulturami. Ke kultivaci byly použity 250ml varné baňky.

Kovové nástroje – pinzety byly před použitím omyty 96% ethanolem, zabaleny do hliníkové fólie a sterilizovány po dobu 2 hodin v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200 °C.

#### 4.2.2. Živné médium

Suspenní kultura jetele lučního byla kultivována v živném médiu, ve složení dle Gamborga (B5) [53]:

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>

**Tabulka 2:** Složení kultivačního média B5 [53]

Substance byly váženy na analytických vahách, případně pipetovány ze zásobních roztoků, jednalo-li se o nízkou koncentraci složky média. Všechny složky se rozpustily v destilované vodě v 1 000 ml odměrné baňce a roztok se doplnil destilovanou vodou po rysku. K živnému médiu byly přidány růstové stimulanty 2 mg.l<sup>-1</sup> kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 2 mg.l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinu. Živné médium bylo rozlito po 30 ml do varných baněk. Následně byly baňky uzavřeny aluminiovou fólií a sterilizovány 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa v autoklávu.

#### 4.2.3. Pasážování a kultivace

Pasážování probíhalo v boxu s laminárním prouděním, tedy v aseptickém prostředí, prostor laminárního boxu byl desinfikován roztokem Ajatinu, ředěném v poměru 1:10 a vyzářen germicidní zářivkou po dobu alespoň jedné hodiny. Všechny používané nástroje a pomůcky byly sterilizovány a při práci byly zachovávány aseptické podmínky. Pasážování bylo prováděno pravidelně po 14 dnech subkultivace přenesením 2 ml narostlé suspenze do 30 ml čerstvého média podle Gamborga v 250 ml varné baňce.

Suspenzní kultura byla kultivována v kultivační místnosti při teplotě 25 °C a světelné periodě 16/8, tedy 16 hodin světlo a 8 hodin tma, na pomaloběžném roleru.



**Obrázek 8:** Kultivace suspenzní kultury *Trifolium pratense*

### 4.3. Elicitace

Jako elicitor použitý ke stimulaci produkce flavonoidů a isoflavonoidů byl zvolen chlorid sodný. Ve 12. dni kultivace suspenzní kultury *Trifolium pratense* (na začátku exponenciální fáze růstu) byla provedena elicítace. V aseptickém prostředí boxu s laminárním prouděním vzduchu byl do souboru 6 varných baněk se suspenzní kulturou přidán vždy 1,0 ml roztoku NaCl v koncentracích 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 125 a 175 mmol.l<sup>-1</sup>. Doba působení elicitoru byla 3 dny a 7 dní. Po třídenní a sedmidenní aplikaci elicitoru byly elicítované vzorky a kontrolní vzorky (přidáván 1ml destilované vody) suspenzní kultury sklizeny zfiltrováním za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce a usušeny při laboratorní teplotě.



**Obrázek 9:** Suspenzní kultura *Trifolium pratense* sklizená po 3denním působení chloridu sodného





**Obrázek 10:** Suspenzní kultura *Trifolium pratense* sklízená po 7denním působení chloridu sodného

U každého vzorku bylo provedeno stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2009 a stanovení obsahu isoflavonoidů metodou 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 bezvodé kyselině mravenčí. [54]

##### **4.4.2. Postup stanovení**

Základní roztok: 0,200 g – 0,400 g upráškované suspenzní kultury se ve 250ml baňce smíchá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 minut na vodní lázni při teplotě 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 (V/V)*

a zahřívá se 10 minut na vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky. 250ml baňka i filtr se promyjí *lihem R 60% (V/V)* a promývací tekutina se přidá do odměrné baňky. Spojené roztoky se zředí *lihem R 60% (V/V)* na 100,0 ml a roztok se zfiltruje.

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

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

Po 30 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 – absorbančí roztoku v maximu při 410 nm

M – hmotnost zkoušené kultury v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405

#### **4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů**

Ke stanovení obsahu isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorimetrickou detekcí. [55] Obsah daidzeinu, genisteinu, genistinu, biochaninu A a formononetinu se stanovil v methanolových extraktech suspenzní kultury.

##### **4.5.1. Postup stanovení**

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 metanolem 80% na 25,0 ml. Roztok se převede přes mikrofiltr do vialek a analyzuje se metodou HPLC.

#### 4.5.2. Parametry HPLC analýzy

Chromatograf: Jasco (autosampler AS-2055 Plus, čerpadlo PU-2089 Plus, detektor MD2015, MD2020)

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

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  $t = 0$  min 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 260 nm

Obsah všech měřených látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky. Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v tabulkách č. 4 až 7

#### 4.6. Statistické zpracování dat

Experimentem získané výsledky obsahu sledovaných látek v kulturách *Trifolium pratense* L. var. Tempus, byly vyhodnoceny statisticky na základě **T-testu**. Jedná se o 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 soubor 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  $v$ , počítáno podle vzorce  $v = n_1 + n_2 - 2$ .

Vypočtená hodnota testovacího kritéria ( $t$ ) se porovná s kritickou hodnotou  $t(v)_p$  pro vypočtený stupeň volnosti ( $v$ ) a zvolenou hladinu významnosti ( $p$ ). Je-li hodnota ( $t$ ) větší než  $t(v)_p$ , je rozdíl  $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$  statisticky významný na hladině významnosti ( $p$ ).

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

Kritická hodnota  $t(v)_p$  pro  $p(0,05) = 3,182$ . [56]

## 5. VÝSLEDKY

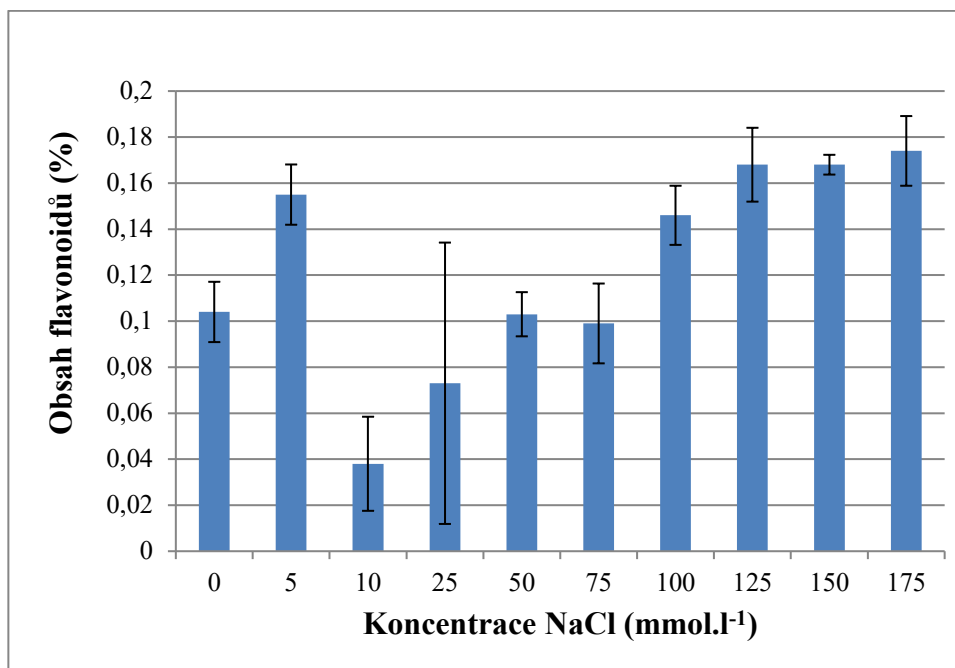
Koncentrace NaCl (mmol.l <sup>-1</sup> )	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	T-test
0	0,104	0,013	0,000
5	0,155	0,046	1,607
10	0,038	0,020	2,767
25	0,073	0,061	0,497
50	0,103	0,010	0,061
75	0,099	0,017	0,234
100	0,146	0,013	2,284
125	0,168	0,016	3,104
150	<b>0,168</b>	0,004	4,705
175	<b>0,174</b>	0,015	3,527

**Tabulka 3:** Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* po 3denním působení chloridu sodného

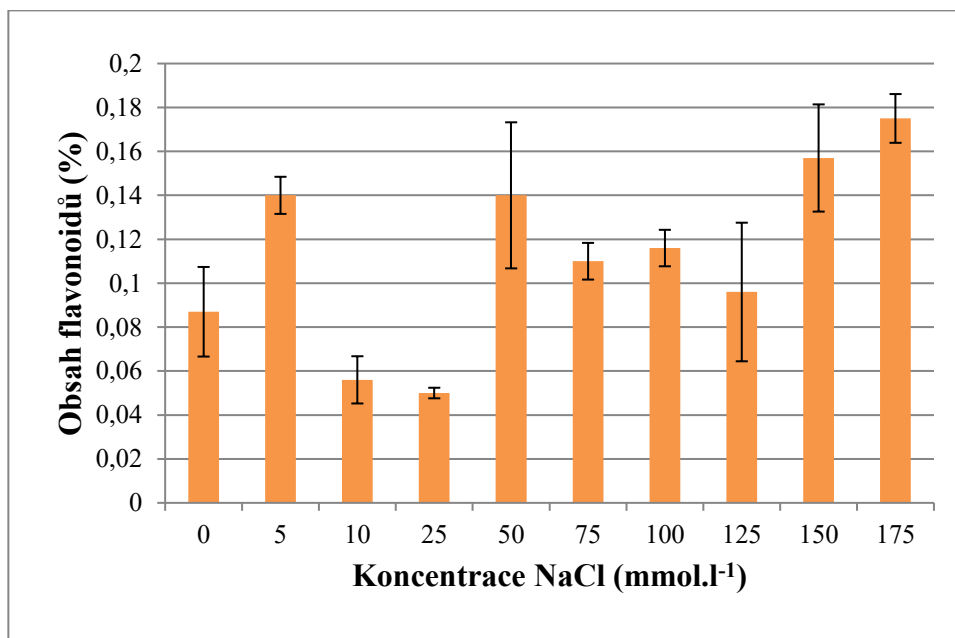
Koncentrace NaCl (mmol.l <sup>-1</sup> )	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	T-test
0	0,087	0,020	0,000
5	0,14	0,008	2,460
10	0,056	0,011	1,358
25	0,05	0,002	1,841
50	0,14	0,033	1,373
75	0,11	0,008	1,068
100	0,116	0,008	1,346
125	0,096	0,032	0,238
150	0,157	0,024	2,241
175	<b>0,175</b>	0,011	3,855

**Tabulka 4:** Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* po 7denním působení chloridu sodného

V tabulkách uvedené zvýrazněné hodnoty obsahu flavonoidů jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly.

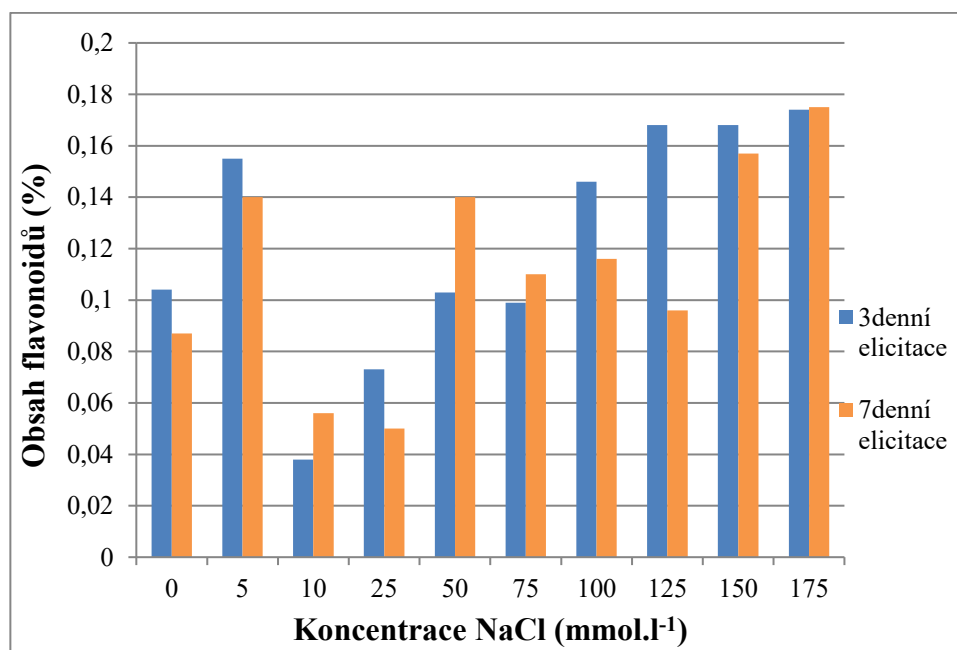


**Graf 1:** Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* po 3denním působení chloridu sodného



**Graf 2:** Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* po 7denním působení chloridu sodného





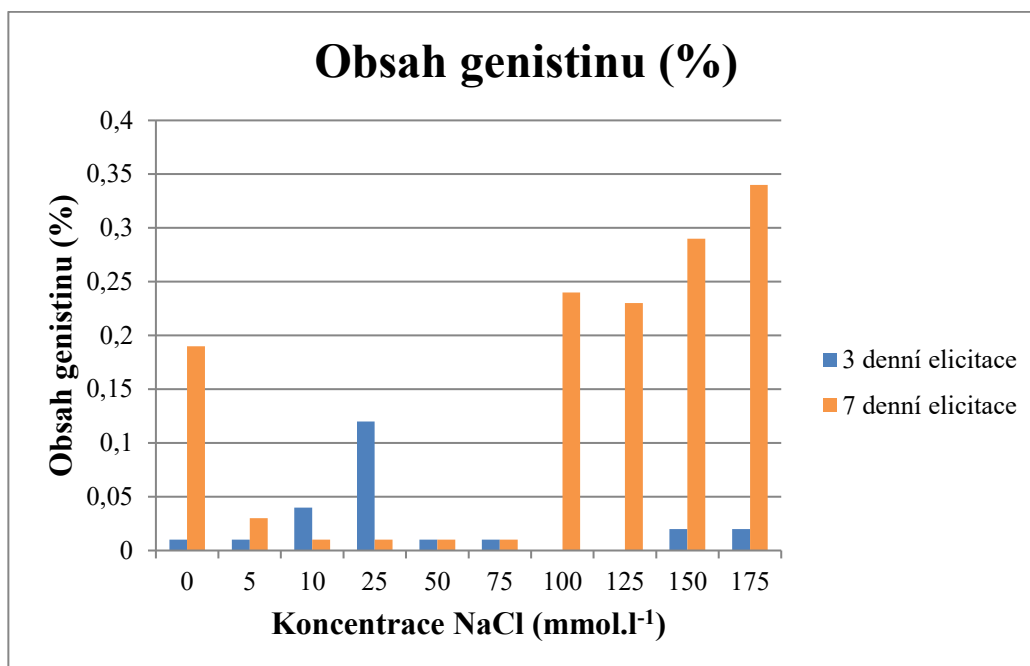
**Graf 3:** Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* po 3denním a 7denním působení chloridu sodného

Koncentrace NaCl (mmol.l <sup>-1</sup> )	Obsah isoflavonoidů (%)				
	Genistin	Daidzein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
0	0,01	0,02	-	-	-
5	0,01	0,01	-	-	-
10	0,04	0,04	-	-	-
25	0,12	0,06	0,01	-	0,01
50	0,01	0,04	0,01	-	0,01
75	0,01	0,05	0,01	-	0,01
100	-	0,05	0,01	-	0,01
125	-	0,01	-	-	-
150	0,02	0,01	-	-	-
175	0,02	0,01	-	-	-

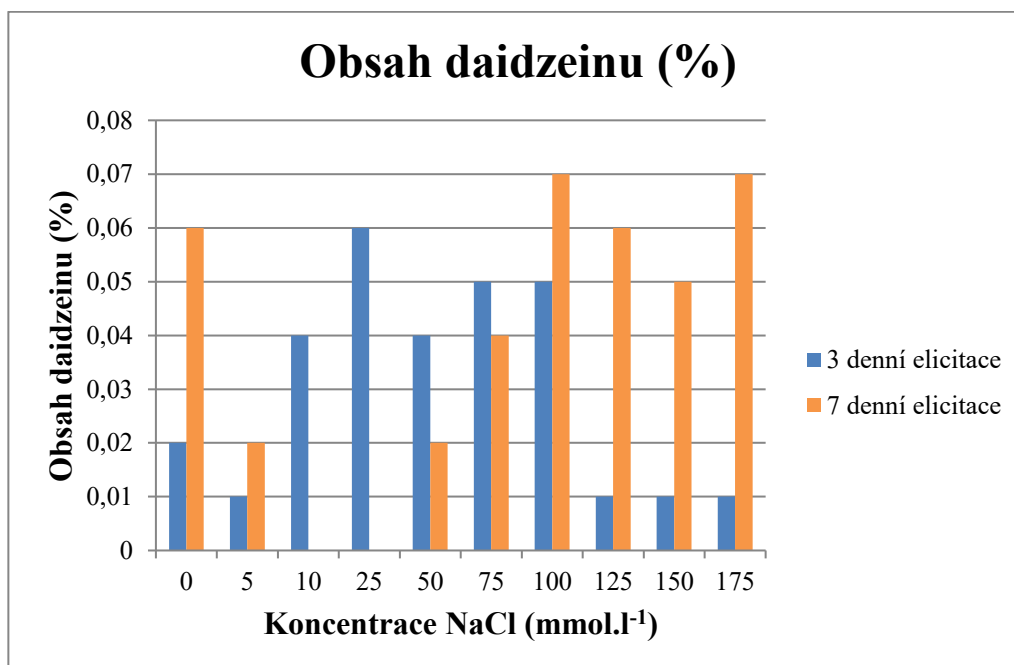
**Tabulka 5:** Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* po 3denním působení chloridu sodného

Koncentrace NaCl (mmol.l <sup>-1</sup> )	Obsah isoflavonoidů (%)				
	Genistin	Daidzein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
0	0,19	0,06	-	-	-
5	0,03	0,02	-	-	-
10	0,01	-	-	-	-
25	0,01	-	-	-	-
50	0,01	0,02	-	-	-
75	0,01	0,04	-	-	-
100	0,24	0,07	-	-	0,01
125	0,23	0,06	-	-	0,01
150	0,29	0,05	-	-	0,01
175	0,34	0,07	0,01	-	0,01

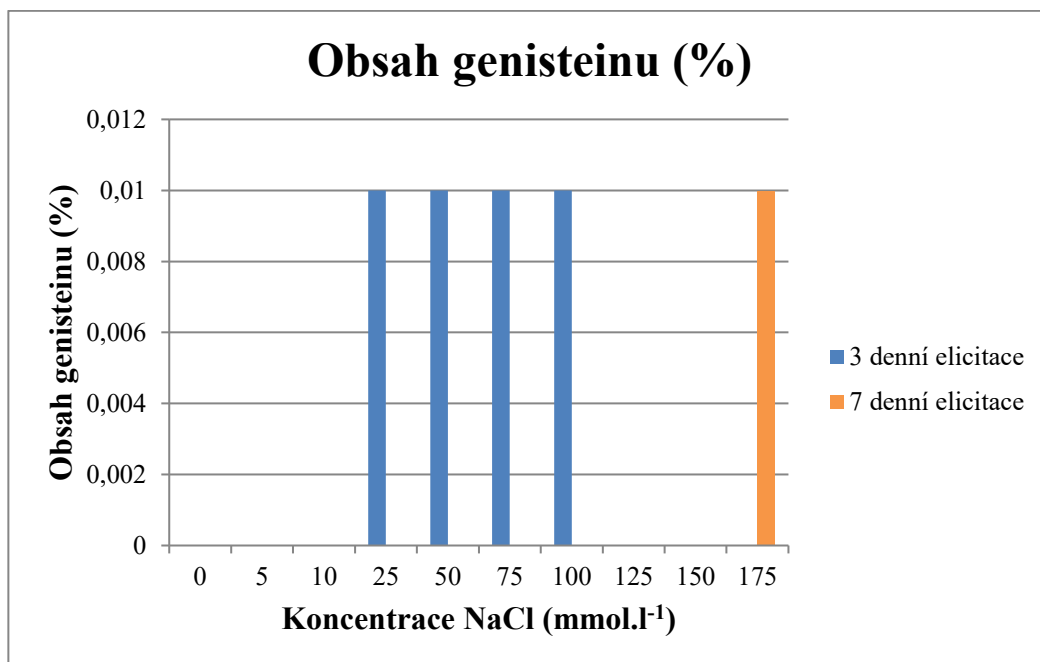
**Tabulka 6:** Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* po 7denním působení chloridu sodného



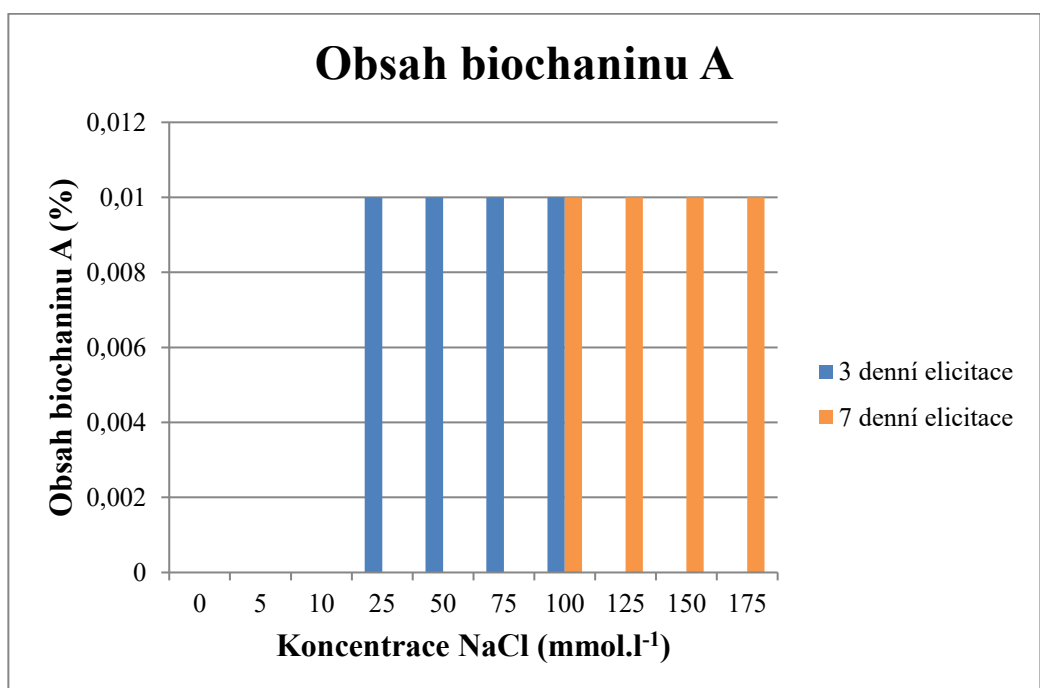
**Graf 4:** Obsah genistinu po 3denním a 7denním působení chloridu sodného



**Graf 5:** Obsah daidzeinu po 3denním a 7denním působení chloridu sodného



**Graf 6:** Obsah genisteinu po 3denním a 7denním působení chloridu sodného



**Graf 7:** Obsah biochaninu A po 3denním a 7denním působení chloridu sodného

## 6. DISKUZE

Tradice používání léčivých rostlin pro výrobu léčivých přípravků sahá do starověku. Celosvětově používání rostlinných léčivých přípravků stoupá, například ve Spojených státech Amerických se 19 % dospělé populace léčí pomocí bylinných přípravků. Pro přípravu léčivých přípravků se více než celé rostliny používají izolované obsahové látky. Mnohé ze sekundárních metabolitů nelze získat ekonomicky únosnou organickou syntézou. Jednou z možností je využití explantátových kultur, avšak nevýhodou je, že v těchto kulturách je produkce sekundárních metabolitů obvykle nízká. Pro zvýšení tvorby rostlinných metabolitů se využívá metoda elicitace. Elicitor vyvolá v rostlinném organismu stresovou reakci, která vede ke změně transkripce genů, kódujících biosyntézu sekundárních metabolitů. Faktory stresu působící na rostlinu mohou vést ke zvýšení produkce cenných látek potenciálně využitelných v lékařství jako následek rostlinné obranné reakce na přítomnost elicitoru.

Cílem této diplomové práce bylo sledování vlivu různých koncentrací chloridu sodného na produkci sekundárních metabolitů, konkrétně flavonoidů a isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (var. Tempus).

Pro experiment byl jako elicitor použit chlorid sodný v koncentracích 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 a 175 mmol.l<sup>-1</sup>. Doba působení elicitoru (3 a 7 dnů) byla, stejně jako použité koncentrace, zvolena podle poznatků z již provedeného stanovení publikovaného v roce 2014. [46] Suspenzní kultura nevykazovala po žádné aplikaci elicitoru viditelnou změnu svého vzhledu, zůstala světle žlutá a dobře narůstala (obr. 9, 10). U všech elicitovaných a kontrolních suspenzních kultur bylo provedeno fotometrické stanovení flavonoidů podle ČL 2009 a HPLC stanovení isoflavonoidů s využitím fluorimetrické detekce.

Z výsledků 3denního působení různých koncentrací chloridu sodného je patrná tendence ke zvyšování produkce flavonoidů (tab. 3; graf 1).

Pro porovnání úspěšnosti produkce flavonoidů po elicitaci byla stanovena hodnota 0,104 %, jako obsah flavonoidů kontrolního vzorku, který byl kultivován bez přídavku chloridu sodného. Nejnižší koncentrace elicitoru 5 mmol.l<sup>-1</sup> navýšila obsah flavonoidů na 0,155 %, což znamená vzestup o 49 % oproti kontrole. U explantátových kultur s přídavkem 10, 25, 50, 75 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl byl zaznamenán nižší obsah flavonoidů než u kontrolního vzorku. Od koncentrace 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl produkce průběžně stoupala. Nejvyšší obsah 0,174 % byl naměřen u suspenzní kultury s přídavkem 175 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného, jedná se o statisticky významný nárůst produkce o 67 % v porovnání s kontrolní kulturou. K statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů o 62 % došlo i po aplikaci 150 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného.

Po 7 dnech působení elicitoru je patrný nárůst produkce flavonoidů oproti kontrolní kultuře u všech použitých koncentrací NaCl mimo koncentrace 10 a 25 mmol.l<sup>-1</sup> (tab. 4; graf 2). Výrazný nárůst o 61 % proti kontrole, byl zaznamenán, podobně jako u 3denní aplikace elicitoru, hned u nejnižší koncentrace NaCl 5 mmol.l<sup>-1</sup> (obsah 0,14 %). Po poklesu u následujících 2 koncentrací NaCl byl zaznamenán nárůst obsahu flavonoidů (0,14 %) u suspenzní kultury s přídavkem 50 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného, opět o 61 % oproti kontrole. Po dalších nevýrazných vzestupech obsahů nad kontrolní kulturu u kultur elicitovaných 75, 100 a 125 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl byl nejvyšší obsah flavonoidů (0,175 %) zaznamenán u suspenzní kultury s přídavkem 175 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného. Zde došlo k statisticky významnému zvýšení obsahu proti kontrole o 101 %.

Porovnáme-li dva sledované časové intervaly (3 dny a 7 dní) použité při elicitaci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L, je zřejmé, že u obou aplikací elicitoru byl zjištěn podobný průběh ovlivnění produkce (graf 3). Výrazný nárůst o 49 %, resp. 61 % proti kontrole byl zaznamenán již u nejnižší koncentrace NaCl 5 mmol.l<sup>-1</sup>. U silnějších koncentrací (100, 125, 150 a 175 mmol.l<sup>-1</sup>) je patrná tendence k postupnému zvyšování produkce (zejména u 3denní aplikace NaCl), nejvíce se osvědčila nejsilnější koncentrace

175 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného, kdy byl zjištěn statisticky významný nárůst obsahu flavonoidů oproti kontrolní kultuře o 67 %, resp. 101 %. Při porovnání vhodnosti délky působení chloridu sodného je po 7 denní elicitaci zřejmý nárůst produkce sekundárních metabolitů u více použitých koncentrací NaCl (díky nižší hodnotě kontroly), ovšem lepší stimulace obsahu flavonoidů bylo dosaženo u 3denního působení elicitoru. Také s ohledem na životaschopnost suspenzní kultury se jeví jako vhodnější kratší aplikace elicitoru.

Metodou HPLC byl stanoven obsah isoflavonoidů po elicitaci různými koncentracemi chloridu sodného (tab. 5, 6; graf 4 - 7). Isoflavonoidy byly testovány po 3denním a 7denním působení NaCl. Pro stanovení byly použity kontrolní vzorky genistinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A.

Přídavek chloridu sodného se projevil změnou obsahu pouze u 2 stanovovaných isoflavonoidů, genistinu a daidzeinu. U genistinu po 3denním působení elicitoru byly účinnější nižší koncentrace chloridu sodného. Vzestup byl patrný u 10 a 25 mmol.l<sup>-1</sup> s nejvyšším obsahem 0,14 % u druhé zmíněné koncentrace NaCl, což je nárůst oproti kontrolní kultuře o 1100 %. Naopak po 7denní kultivaci byl zaznamenán nárůst obsahu genistinu oproti kontrole od koncentrace 100 po 175 mmol.l<sup>-1</sup>. Nejvyšší obsah byl naměřen právě u 175 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl 0,34 %, tedy vzestup o 79 %.

Podobný průběh byl zaznamenán i u daidzeinu. Po 3denní aplikaci se ukázaly účinnější nižší koncentrace elicitoru. Vzestup byl zaznamenán od 10 do 100 mmol.l<sup>-1</sup>. Nejvyšší obsah po kratším působení NaCl byl zaznamenán při 25 mmol.l<sup>-1</sup> 0,06 %, což značí nárůst o 200 %. Při stanovení po týdenním působení vystoupal obsah nad kontrolní vzorek pouze u koncentrací 100 a 175 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného. Nejvyšší obsah byl o 16 % vyšší než kontrola. U přídaveků 5, 50 a 75 mmol.l<sup>-1</sup> obsah klesl pod obsah stanovený v kontrole.

V případě genisteinu a biochaninu A, jejichž obsah v kontrolních kulturách prokázán nebyl, byly u 3denní elicitace shodně nejúčinnější koncentrace 25, 50, 75 a 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl, které vyvolaly obsah isoflavonoidů 0,01 %.

U 7denní aplikace elicitoru byla nejlepší koncentrace 175 mmol.l<sup>-1</sup>. (v případě biochaninu A také koncentrace 100, 125, 150 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl), kdy byl zaznamenán opět obsah 0,01 %. Přítomnost formononetinu v žádných kulturách zjištěna nebyla.

Chlorid sodný je zástupcem abiotického elicitoru, často je testována jeho účinnost na zvýšení produkce sekundárních metabolitů u mnoha rostlinných druhů. V následujících odstavcích je popsáno několik úspěšných pokusů s využitím chloridu sodného k elicitaci.

V experimentu, kde byl pro 7denní elicitaci suspenzní kultury *Ginkgo biloba* použit NaCl ve stejných koncentracích, jako v této diplomové práci, byla celková produkce flavonoidů zvýšena přidavkem chloridu sodného. U všech vzorků byl obsah flavonoidů po elicitaci prokazatelně vyšší oproti kontrolnímu vzorku. Z výsledků jsou patrná 2 maxima obsahu flavonoidů a to v koncentraci 25 a 175 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl. U první zmíněné koncentrace je obsah v porovnání s kontrolou o 126 %, v případě druhé koncentrace o 212 % vyšší. Při stanovení isoflavonoidů pomocí HPLC bylo pozorováno první zvýšení od 5 do 25 mmol.l<sup>-1</sup>, mezi 50 a 75 mmol.l<sup>-1</sup> pokles a poté opět zvýšení obsahu. Quercetin a kaempferol měli maxima ve stejných koncentracích jako celkové flavonoidy, isorhamnetin v 50 a 150 mmol.l<sup>-1</sup> přídatku NaCl. Nejvyšší nárůst o 415 % oproti vzorku bez elicitoru byl zaznamenán u kaempferolu.[49]

Dalším příkladem pozitivního efektu chloridu sodného na produkci rostlinných metabolitů byl pokus, při němž byla kultivována explantátová kultura šťovíku kyperského na MS médiu, doplněném abiotickými a biotickými faktory. Kultivační médium bylo obohaceno o NaCl (0, 25, 50, 75, 100 mmol.l<sup>-1</sup>) nebo manitol (100 mmol.l<sup>-1</sup>), výtažek z kvasnic a chitosan. Kultivace probíhala 6 týdnů. Po uplynutí této doby, byly vzorky extrahovány methanolem a použity ke stanovení účinku použitých elicitorů na produkci fenolických látek a volné kyseliny fenolové. Obsah fenolů se výrazně zvýšil



při použití 50, 75 a 100 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného. Maximální obsah fenolu 1,8 mg.g<sup>-1</sup> byl zaznamenán ve vzorku s přídatkem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl. [57]

Za zmínku stojí i testování snášenlivosti soli a produkce sekundárních metabolitů pro medicínské využití u *Andrographis paniculata* po elicitaci chloridem sodným. Pro experiment byly použity koncentrace 41,1; 92,4; 143,7; 193,4 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl. Výsledky naznačují, že hladina prolinu nejprve klesla a následně prudce vzrostla na 193,4 mmol.l<sup>-1</sup>. Obsah sekundárních metabolitů se neustále zvyšoval u koncentrací nižších než 143,7 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl. Z naměřených hodnot bylo vyhodnoceno, že *A. paniculata* vykazuje rezistenci vůči chloridu sodnému a na jeho přítomnost reaguje obrannými reakcemi vedoucími k aktivaci enzymů a zvýšení produkce sekundárních metabolitů. [58]

V roce 2014 byla publikována studie účinku soli a uhličitanu sodného na produkci fenolických glykosidů u kalusové a suspenzní kultury *Stevia rebaudiana*. Kultury byly kultivovány na MS médiu doplněném o NaCl v koncentracích 0,05 – 0,20 % a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v koncentracích 0,0125 – 0,10 %. Doba působení elicitoru byla stanovena na 2 týdny. Kalusová i suspenzní kultura vykazovala po přídatku elicitoru pomalejší růst a kultivační médium zhnědlo, u kontrolního vzorku tato změna nenastala. Po 15denní kultivaci byl metodou HPLC stanoven obsah steviaglykosidů. U kalusové kultury se obsah zvýšil z 0,27 % kontroly na 1,43 a 1,57 % elicitovaných vzorků s přídatkem 0,10% NaCl a 0,025% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. U suspenzní kultury se stejnou koncentrací elicitoru jako u kalusové kultury byl zaznamenán přírůstek obsahu z 1,36 % u vzorku bez elicitoru na 2,61 a 5,14 % po 10denním působení chloridu sodného a uhličitanu sodného. [59]

Dosažené výsledky a publikované údaje potvrzují, že abiotický elicitor chlorid sodný může u rostlinných explantátových kultur stimulovat produkci sekundárních metabolitů.

## 7. ZÁVĚR

Výsledky této práce lze shrnout následovně:

1. Nejvyšší obsah flavonoidů (0,174 %) po 3denním působení elicitoru u pětileté suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta *Tempus*) byl zaznamenán po aplikaci 175 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného. Při porovnání s kontrolní kulturou vzestup obsahu flavonoidů činil 67 %, jde o statisticky významné zvýšení produkce.
2. Nejvyšší obsah flavonoidů (0,175 %) po 7denním působení elicitoru u pětileté suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta *Tempus*) byl zaznamenán po aplikaci 175 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného. V porovnání s kontrolní kulturou došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 101 %.
3. Metodou HPLC byl stanoven obsah isoflavonoidů. V kontrolní kultuře byly detekovány pouze genistin a daidzein. Maximální zvýšení produkce genistinu o 1100 % i daidzeinu o 200 % v porovnání s kontrolní kulturou bylo zaznamenáno po 3denní elicitaci koncentrací 25 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl.
4. Pozitivní vliv elicitoru byl patrný jak u produkce flavonoidů tak i isoflavonoidů. Po 3denním i 7denním působení chloridu sodného se pro zvýšení produkce flavonoidů nejvíce osvědčily koncentrace 5, 150, 175 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl. Při stanovení isoflavonoidů se projevil rozdíl v závislosti na délce působení elicitoru. Zatímco po 3denní elicitaci se jevila nejúčinnější koncentrace 25 mmol.l<sup>-1</sup> elicitoru, po 7denní aplikaci se produkce nejvíce zvýšila u koncentrace 175 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: *Farmakognosie I*. Praha, SPN, 1989, s. 8
2. Jahodář, L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Praha, Karolinum, 2009, s. 9-13
3. Kašparová, M. et al.: New Synthetic Pyridine Derivate as Potential Elicitor in Production of Isoflavonoids and Flavonoids in *Trifolium pratense* L. Suspension Culture. *The Scientific Word Journal*, 2012, ID 746412, s. 1 – 5
4. Spilková, J. et al.: *Farmakognosie*. Praha, Karolinum, 2016, s. 102 - 105
5. Dubová, J.: Sekundární metabolity rostlin 11., Definice, Příklady a využití, Biotechnologie.  
[https://is.muni.cz/el/1431/jaro2011/Bi6120/um/11\\_sek\\_metab2011.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2011/Bi6120/um/11_sek_metab2011.pdf);  
(19.11.2016)
6. Ahsyee, R. et al.: Enetic Diversity in Red Clover (*Trifolium pratense* L.) Using SSR Markers. *Genetika*, 2014, 46(3), s. 949-961
7. Krejčík, V., Černá, D.: *Malý herbář léčivých rostlin*. Praha, Avicenum, 1973, s. 54
8. Slavík, B. et al.: *Květena České republiky*. Praha, Academia, 1995, s. 474-476
9. Kašparová, M.: Fytoestrogeny z jetele lučního. *Praktické lékařství*, 2013, 9(4-5), s. 201-203
10. Deyl, M., Hísek, K.: *Naše květiny*, Praha. Academia, 2001, s. 91
11. Mika, K.: *Fytoterapie pro lékaře*. 2. Doplněné vydání, Martin, Osveta, 1991, s. 216-217
12. Esmaeili, A. et al.: Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contend of Various Solvent Extracts from *In Vivo* and *In Vitro*Grown *Trifolium partense* L. (Red Clover). *BioMed Research International*, 2015, ID 643285, s. 1 – 11
13. Dietz, B. M. et al.: Botanicals and Their Bioactive Phytochemicals for Women's Health; *Pharmacological Reviews*, 2016, 68, s. 1026 – 1073

14. Engelmann, N. J. et al.: In Vitro Production of Radiolabeled Red Clover (*Trifolium pratense*) Isoflavones. *PlantCellTissue and Organ Culture*, 2009, 98(2), s. 147 – 156
15. Lin, V. C. et al.: *In Vitro* and *in Vivo* Melanogenesis Inhibition by Biochanin A from *Trifolium pratense*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75(5), s. 914 – 918
16. Liu, X. et al.: Transforming growth factor  $\beta$ 1 increase of hydroxysteroid dehydrogenase proteins is partly suppressed by red clover isoflavones in human primary prostate cancer-derived stromal cells. *Carcinogenesis*, 2011, 32(11), s. 1648 – 1654
17. Huang, J. et al.: Antiproliferative effects of formononetin on human colorectal cancer via suppressing cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Process Biochemistry*, 2015, 50, s. 912 – 917
18. Jirásek, V., Starý, F.: *Atlas léčivých rostlin*. Praha, SPN, 1986, s. 20 -21
19. Hess, D.: *Fyziologie rostlin*. Praha, Academia, 1983, s. 144 – 146
20. Harmatha, J.: *Chemie a biochemie přírodních látek. Cyklus Organická chemie*. Praha, ÚOCHB-AVČR, 2002, s. 133
21. Ferreyra, M. L. F. et al.: Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3(222), s. 1-15
22. Winkel-Shirley, B.: Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2002, 5, s. 218 – 223
23. Miadoková, E.: Isoflavonoids – an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology*, 2009, 2(4), s. 211 – 218
24. Cheng, A-X. et al.: The Function and Catalysis of 2-Oxoglutarate – Dependent Oxygenases Involved in Plant Flavonoid Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15, s. 1080 – 1095
25. Rhodes, D.: HORT 640 - Metabolic Plant Physiology.  
<https://hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/SECPROD/se00008.htm>;  
(26.11.2016)
26. Macková, Z. et al.: Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa – An update. *Phytochemistry*, 2006, 67, s. 849 – 855

27. <https://en.wikipedia.org/wiki/Isoflavones>; (23.11.2016)
28. Kubíková, D.: Menopauzální symptomy a hormonální substituční terapie. Praktické lékárenství, 2014, 10(2), s. 68 – 73
29. Kollba, P.: Výhody transdermálních forem HRT z pohledu gynekologa. Klinická farmakologie a farmacie, 2015, 29(2), s. 80 – 83
30. Fait, T.: Klimakterium a hormonální substituční terapie. Moderní babičtví, 2004, 3, s. 1 – 12
31. Dubey, R. K. et al.: Phytoestrogens Inhibit Growth and MAP Kinase Activity in Human Aortic Smooth Muscle Cells. Hypertension, 1999, 33(2), s. 177 – 182
32. Chen, M-N. et al.: Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. Climacteric, 2015, 18, s. 260 – 269
33. Del Giorno, C. et al.: Effects of Trifolium pratense on climacteric and sexual symptoms in postmenopausal women. Revista Da Associacao Medica Brasileira, 2010, 56(5), s. 558 – 562
34. Kang, S. J. et al.: Selection of the optimal Herbal Composition of Red Clover and Pomegranate According to Their Protective Effect against Climacteric Symptoms in Ovariectomized Mice. Nutrients, 2016, 8(447), s. 1 – 23
35. Landa, Z. et al.: *Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění rostlin*. Praha, Academia, 1980, s. 7 – 8
36. Petruš, E., Řetovský, R.: *Rostlinné explantáty*. Praha, Nakladatelství Československé akademie věd, 1956, s. 7
37. Sikyta, B., Dušek, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*. Praha, Karolinum, 2001, s. 24, 75, 79 – 80
38. Opatrný, Z. et al.: Biotechnologie a genové inženýrství rostlin. <http://readgur.com/doc/961830/biotechnologie-a-genov%C3%A9-in%C5%BEen%C3%BDrstv%C3%AD-rostlin>, (6.12.2016)
39. Dubová, J., Smíšková, A.: Od rostlinné kultury „*in vitro*“ k biotechnologiím. <https://educoland.muni.cz/down-50/>, (6.12.2016)
40. Kováč, J.: *Explantátové kultury rostlin*. Olomouc, Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, 1995, s. 1– 3, 13 – 18, 33, 50– 54, 84 – 85
41. Procházka, S. et al.: *Regulátory rostlinného růstu*. Praha, Academia, 1997, s. 43 – 44, 55 – 56, 65, 69, 75, 80 – 81, 87 – 88, 147 – 148, 151, 156

42. Kutina, J.: *Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví*. Praha, Státní zemědělské nakladatelství, 1988, s. 15 – 17, 19 – 21, 57 – 64
43. Tůmová, L., Tůma, J.: Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat. *Chemické Listy*, 2009, 103, s. 503 – 510
44. Giri, Ch. Ch., Zaheer, M.: Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2016, 126, s. 1 – 18
45. Baenas, N. et al.: Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules*, 2014, 19, s. 13541 – 13563
46. Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R.: Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 2005, 23, s. 283 – 333
47. Wang, G., Nauseef, M.: Salt, chloride, bleach, and ikate host defense. *Journal of Leucocyte Biology*, 2015, 98 (2), s. 163 – 172
48. Flowers, T. J., Munns, R., Colmer, T. D.: Sodium chloride toxicity and cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany*, 2015, 115, s. 419 – 431
49. Ying, Ch. et al.: Effect of varying NaCl doses of flavonoid production in suspension cell sof Ginkgo biloba: relationship to chlorophyll fluorescence, ion homeostasis, antioxidant systém and ultrastructure. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36, s. 3173 – 3187
50. Mrinalini, S., Swati, S., Pratibha, M.: Elicitation Based Enhancement of Secondary Metabolites in *Rauwolfia serpentina* and *Solanum khasianum* Hairy Root Cultures. *Pharmacognosy Magazine*, 2016, 12 (3), s. 312 – 320
51. Ni, J., Yang, X., Zhu, J. et al.: Salinity-induced metabolit profile ganges in *Nitraria tangutorum* Bobr. suspension cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(1), s. 239 – 248
52. Klimeš, J.: *Kontrola chemických léčiv I*. Praha, Karolinum, 2008, s. 29 - 33
53. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 1968, 50, s. 151 - 158

54. Kolektiv autorů: *Český lékopis 2009*. Praha, Grada, 2009, s. 1801
55. De Rijke, E. et al.: Natively fluorescent isoflavones exhibiting anomalous Stokes' shifts. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 468(1), s. 3 – 11
56. Klemra, P., Klemrová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. Praha, Karolinum, 1999, s. 37 – 39
57. Al Khateeb, W., Alu'datt, M., Al Zghoul, H. et al.: Enhancement of phenolic compounds production in *in vitro* grown *Rumex cyprius* Murb. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017, 39, s. 1 - 13
58. Shao, Y.-H., Gao, J.-L., Wu, X.-W. et al.: Effect of salt treatment on growth, isoenzymes and metabolites of *Andrographis paniculata*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, 37(2), s. 1 - 12
59. Gupta, P., Sharma, S., Saxena, S.: Effect of salts (NaCl and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviolglykoside production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(6), s. 2894 – 2906

## **Abstrakt**

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

**Katedra farmakognosie**

**Kandidát:** Pavlína Zlochová

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

**Název diplomové práce:** Sekundární metabolity rostlinných kultur *in vitro* I.

**Klíčová slova:** Suspenzní kultura, *Trifolium pratense*, fytoestrogeny, flavonoidy, isoflavonoidy

Explantátové kultury jsou zdrojem sekundárních metabolitů rostlin. Avšak produkce sekundárních metabolitů bývá u explantátových kultur nízká. Produkce může být zvýšena metodou zvanou elicítace. Vhodný elicitor přidaný do kultivačního média vede u rostliny ke genové expresi a produkci sekundárních metabolitů jako obranná reakce na působící stresor.

Cílem této práce bylo sledování vlivu chloridu sodného na produkci flavonoidů a isoflavonoidů u suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta *Tempus*).

Kultura byla kultivována na živném médiu dle Gamborga. Médium bylo obohaceno o 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2 mg.l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinu. Kultivace probíhala při 25°C a fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Následně bylo provedeno stanovení flavonoidů dle Českého lékopisu 2009 a isoflavonoidů metodou HPLC.

Nejlepší elicitační účinek na produkci flavonoidů byl zaznamenán po 3 i 7denní elicítaci u koncentrace 175 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu sodného. Obsah se navýšil o 67 a 101 % ve srovnání s kontrolní kulturou. Elicítace se pozitivně projevila u produkce isoflavonoidů genistinu a daidzeinu. U těchto látek se jako účinnější jeví 3denní působení elicitoru a maximem při použití 25 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl.



## **Abstract**

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

**Department of Pharmacognosy**

**Candidate:** Pavlína Zlochová

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

**Title of diploma thesis:** Secondary metabolites of plant cultures *in vitro* I.

**Key words:** Suspension cultures, *Trifolium pratense*, phytoestrogens, flavonoids, isoflavonoids

Explant cultures are source of plant secondary metabolites. Nevertheless the production of secondary metabolites is usually low in explant cultures. This production can be increased by elicitation methods. Suitable elicitor is added into the cultivate medium and leads to gene expression and production of secondary metabolites.

The aim of this study was to observe the influence of sodium chloride on the production of flavonoids and isoflavonoids by the *Trifolium pratense* L. suspension culture (Tempus variety).

The culture was cultivated on Gamborg nutrient medium with addition of 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2 mg.l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine. Cultivation proceeded in 25°C temperature and 16 hours light/8 hours dark period. Then determination of flavonoids according to Czech Pharmacopoeia 2009 and the determination of isoflavonoids by HPLC method was performed.

The best elicitation effect on the production of flavonoids was 175 mmol.l<sup>-1</sup> of sodium chloride after a 3 and 7 days elicitation. Accumulation was enhanced about 67 % and 101 % in comparison with control culture. Elicitation had a positive effect on the production of isoflavonoids genistin and daidzein. Three days effect of sodium chloride was more effective on production of this isoflavonoids. 25 mmol.l<sup>-1</sup> was the most effective concentration of the sodium chloride.