

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Účinek derivátů 2-benzylthiopyridin-4-  
karbothioamidu na akumulaci isoflavonoidů a  
flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L.**

**Veronika Machová**

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.  
Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.  
Oponent: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Úvodem diplomové práce bych chtěla poděkovat PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. (vedoucí diplomové práce) za odborné vedení, cenné rady a připomínky při jejím zpracování.

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

## OBSAH

|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. ÚVOD</b>                                                           | <b>7</b>  |
| <b>2. CÍL PRÁCE</b>                                                      | <b>8</b>  |
| <b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b>                                                | <b>9</b>  |
| <b>3.1. Jetel luční – <i>Trifolium pratense</i> L. (<i>Fabaceae</i>)</b> | <b>9</b>  |
| 3.1.1. Původ rostliny a výskyt                                           | 9         |
| 3.1.2. Botanický popis rostliny                                          | 9         |
| 3.1.3. Odrůdy                                                            | 10        |
| 3.1.4. Sběr a úprava drogy                                               | 10        |
| 3.1.5. Použití                                                           | 11        |
| 3.1.6. Obsahové látky                                                    | 11        |
| 3.1.6.1. Flavonoidy                                                      | 12        |
| 3.1.6.2. Isoflavonoidy                                                   | 16        |
| <b>3.2. Rostlinné kultury <i>in vitro</i></b>                            | <b>19</b> |
| 3.2.1. Definice pojmů                                                    | 19        |
| 3.2.2. Explantátové kultury – rozdělení, vlastnosti                      | 20        |
| 3.2.3. Etapy kultivace explantátových kultur                             | 21        |
| 3.2.4. Kultivační podmínky                                               | 22        |
| 3.2.4.1. Makroelementy                                                   | 22        |
| 3.2.4.2. Mikroelementy                                                   | 22        |
| 3.2.4.3. Zdroj organického uhlíku                                        | 23        |
| 3.2.4.4. Prostředky pro odpeňování živných půd                           | 24        |
| 3.2.4.5. Vitamíny                                                        | 24        |
| 3.2.4.6. Aminokyseliny                                                   | 24        |
| 3.2.4.7. Nedefinované směsi přírodních látek                             | 25        |
| 3.2.4.8. Látky pro zpevnění média                                        | 25        |
| 3.2.4.9. Růstové regulátory                                              | 25        |
| 3.2.4.9.1. Auxiny                                                        | 26        |
| 3.2.4.9.2. Cytokininy                                                    | 27        |
| 3.2.4.9.3. Gibereliny                                                    | 27        |
| 3.2.4.9.4. Kyselina abscisová                                            | 28        |
| 3.2.4.10. Fyzikální podmínky                                             | 28        |
| 3.2.4.10.1. Světlo                                                       | 28        |

|             |                                                     |           |
|-------------|-----------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4.10.2. | Teplo                                               | 28        |
| 3.2.4.10.3. | Acidita živného média (pH)                          | 29        |
| 3.2.4.10.4. | Kyslík a homogenita média                           | 29        |
| 3.2.4.11.   | Fáze růstové kultury                                | 29        |
| 3.2.4.12.   | Produkce sekundárních metabolitů                    | 31        |
| 3.2.4.13.   | Biotechnologické využití                            | 31        |
| <b>3.3.</b> | <b>Elicitace rostlinných kultur <i>in vitro</i></b> | <b>32</b> |
| 3.3.1.      | Charakteristika                                     | 32        |
| 3.3.2.      | Elicitory                                           | 32        |
| 3.3.3.      | Podmínky                                            | 32        |
| 3.3.4.      | Mechanismus účinku                                  | 33        |
| 3.3.5.      | Syntetické elicitory                                | 34        |
| <b>4.</b>   | <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>                          | <b>35</b> |
| <b>4.1.</b> | <b>Použitý materiál, přístroje, pomůcky</b>         | <b>36</b> |
| 4.1.1.      | Rostlinný materiál                                  | 36        |
| 4.1.2.      | Chemikálie                                          | 36        |
| 4.1.3.      | Přístroje a pomůcky                                 | 37        |
| <b>4.2.</b> | <b>Kultivace explantátových kultur</b>              | <b>38</b> |
| 4.2.1.      | Kultivační nádoby a přístroje                       | 38        |
| 4.2.2.      | Příprava živného média                              | 38        |
| 4.2.3.      | Pasážování a kultivace                              | 39        |
| <b>4.3.</b> | <b>Elicitace a odběr kultur</b>                     | <b>40</b> |
| <b>4.4.</b> | <b>Stanovení obsahu flavonoidů</b>                  | <b>41</b> |
| <b>4.5.</b> | <b>Stanovení obsahu isoflavonoidů</b>               | <b>43</b> |
| 4.5.1.      | Příprava vzorku                                     | 43        |
| 4.5.2.      | Parametry HPLC analýzy                              | 43        |
| <b>4.6.</b> | <b>Statistické vyhodnocení</b>                      | <b>44</b> |
| <b>5.</b>   | <b>VÝSLEDKY</b>                                     | <b>46</b> |
| 5.1.        | Tabulky                                             | 46        |
| 5.2.        | Grafy                                               | 50        |
| <b>6.</b>   | <b>DISKUSE</b>                                      | <b>51</b> |
| <b>7.</b>   | <b>ZÁVĚR</b>                                        | <b>54</b> |
| <b>8.</b>   | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>                     | <b>55</b> |
| <b>9.</b>   | <b>LITERATURA</b>                                   | <b>57</b> |



## 1. ÚVOD

Rostliny jsou bohatým zdrojem sekundárních metabolitů, které nacházejí široké uplatnění v medicíně, potravinářství a kosmetice. U mnoha přírodních látek není ekonomicky schůdná chemická syntéza, a musí proto být získávány izolací z volně rostoucích nebo pěstovaných rostlin. Tento způsob má však svá omezení, jako jsou např. sezónnost, závislost na podmínkách prostředí, nebo choroby a škůdci. Slibnou alternativu představují rostlinné explantátové kultury. [26]

Biosyntéza u explantátových kultur však bohužel nedosahuje takových výsledků, jaké bychom chtěli, až na některé výjimky, a proto jsou hledány i jiné techniky, jako jsou například imobilizace, biotransformace, elicítace a jejich vzájemné kombinace nebo metody genového inženýrství [27], aby se produkce a akumulace sekundárních metabolitů v těchto kulturách zvýšila.

Elicítace je metoda, která využívá schopnosti rostlin reagovat na různá infekční agens celou řadou reakcí v kulturách *in vitro*, na jejichž konci nastává zvýšená tvorba sekundárních metabolitů. Je to ekonomicky výhodný způsob získávání přírodních látek. V nynější době je díky širokému spektru biologických účinků celkem velký zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů explantátovými kulturami.

Jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) je velmi nadějným zdrojem těchto látek. Droga se uplatňuje hlavně při průjmech, při bronchitidě, revmatismu, při oteklých lymfatických žlázách i při cukrovce. Zevně se používá jako kožní desinficiens a ke koupelím. [1]

Isoflavonoidy obsažené v jeteli lučním mají veliký význam zejména v preparátech na postmenopauzální potíže u žen. Biologický význam mají především čtyři isoflavonoidy: biochanin A, daidzein, formononetin a genistein. Typické označení pro tyto látky je obvykle fytoestrogeny. Fytoestrogeny hrají významnou roli v terapii postmenopauzálních symptomů, jako jsou návaly horka, schvácenost, silné menstruační krvácení a podobně. [39]

Problematikou elicítace rostlinných kultur se zabývá i tato práce.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je seznámit se s metodikou kultivace a elicitace rostlinných explantátových kultur *in vitro*.

Zjistit vliv působení tří různých koncentrací a doby aplikace 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu na produkci flavonoidů a isoflavonoidů v explantátové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8, varieta Tempus).



### 3. TEORETICKÁ ČÁST

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

##### 3.1.1. Původ rostliny a výskyt

Na lukách, v příkopech, v osvětlených částech lesa roste divoce a je také hojně pěstován na polích jako píce pro dobytek. [3] Je to rostlina značně proměnlivá, která roste z roviny až do hor skoro v celé Evropě a v západní Asii, kde zasahuje na východ až k Altaji, Bajkalskému jezeru a do Kašmíru. V severní Africe roste v Alžíru. V Severní a Jižní Americe a na Novém Zélandu roste jen zplaněle. [2]

##### 3.1.2. Botanický popis rostliny

Vytrvalá (u některých kulturních forem jen 2-3letá) bylina se silným, kulovým kořenem, který sahá i přes 60 cm hluboko do půdy, a s trsnatým oddenkem bez výběžků, z něhož vyrůstá přízemní růžice listů a přímé nebo vystoupavé, jednoduché nebo spoře rozvětvené, 20-50 cm vysoké, chlupaté a většinou trochu hranaté lodyhy o 3-5 článcích.

Listy jsou trojčetné, spodní dlouze řapíkaté, hořejší s řapíky kratšími až přisedlé, s palisty vejčité kopinatými, s řapíkem listu vysoko srostlými, ostře špičatými a vně chlupatými. Listy jsou složeny z lístků 7-15x15-30 mm velikých částí. [2] Podlouhle kopinaté, obvejčité až téměř okrouhlé, skoro celokrajné, obvykle na líci lysé, často s příčnou poloměsíčitou bělavou nebo červenohnědou skvrnou. Nezřetelně řapíčkaté s málo vyniklými žilkami. Palisty horních listů trojúhelníkovité, náhle zúžené v šídlovitou, obvykle brvitou špici. Většinou hnědé výrazně tmavěji žilkované, více než polovinu délky s řapíkem srostlé. U prostředních listů alespoň 3x kratší než řapíky. [4,5]

Drobné, masově růžové, červené nebo řidčeji vybledlé až bílé kvítky se skládají v počtu 30-60 v hlávkovitá květenství měřící 2-3 cm v průměru. Jsou kulatá nebo vejčitá, polozakrytá velikými palisty podpůrných listů. Na jedné lodyze bývají 1-3 květenství, rozmístěná tak, že postranní vyrůstají v paždí listů a hořejší je zdánlivě vrcholové.

Pětčetné kvítky jsou přisedlé, bez listenců, 13-18 mm dlouhé, přímé, složené z 10žilného kalichu, který je vně krátce chlupatý a má dolní zub delší, zbarvený bělozeleně nebo načervenalé. Motýlovitá koruna je k dolejšku srostlá a horní její plátek čili pavéza je delší nežli oba postranní (křídla) a dva spodní jsou srostlé ve člunek. Pestík se mění v jednosemenný lusk. Lusk je vejcovitý, v zobánek zúžený, otvírající se víčkem. Semena nesouměrně srdcovitá, poněkud zploštělá, 1,5-2,0 mm dlouhé, 1,2-1,5 mm široké, žlutá až pískově hnědá. Kvete od května do září. [2-5,15]

### 3.1.3. Odrůdy

Tento druh je mimořádně proměnlivý ve vzrůstu, velikosti i odění lodyh a palistů podpůrných listů. V některých pohořích střední a jižní Evropy a na mořských pobřežích tvoří morfologicky diferencované rasy, hodnocené obvykle jako subspecies nebo variety. V České republice se nejvíce vyskytují tři poddruhy, hodnocené také jako odrůdy.

- *Trifolium pratense* subsp. *pratense* – jetel luční pravý: vytrvalá bylina, léčivka. Pro obsah glykosidů, silic, tříslovin, organických kyselin a dalších látek bývají vykupována květenství bez palistů podpůrných listů. Obdobné obsahové látky mají i květenství subsp. *sativum*.
- *Trifolium pratense* subsp. *sativum* – jetel luční setý: u nás jedna z nejvýznamnějších píceňin. Kromě vlastní produkce zelené hmoty je také významný pro zlepšování kvality půdy.
- *Trifolium pratense* subsp. *americanum* – jetel luční americký: údajně vypěstován v Americe z rostlin anglického původu a k nám dovezen v 80. letech minulého století. Od jeho pěstování se však upustilo díky tomu, že ho dobytek odmítal. [4]

### 3.1.4. Sběr a úprava drogy

*Trifolium pratense* kvete od května do října. Jako droga se používají celé a nerozpadlé květní hlávky – *Trifolii pratensis flos*.

Sbírají se neporušené květní hlávky hned po rozkvětu. Překvetlé hlávky nesbíráme, protože při sušení hnědnou a rozpadají se. Před sušením odstraníme nahnědlé květy, květy napadené škůdci a listy. Květy sušíme první den na slunci a další dny dosoušíme ve stínu na dobře větraném místě. Při umělém sušení v sušárně nesmí teplota přesáhnout 35°C. Dobře usušené květy mají původní barvu. Zhnědlé květy odstraníme. Poměr seschnutí květů je 6:1. Skladují se v suchu a temnu v dobře uzavřených sklenicích nebo papírových sáčcích. [6,7]

### 3.1.5. Použití

Jetel luční se požívá vnitřně hlavně při průjmech (antidiarhoikum, adstringens), při bronchitidě, nadměrné tvorbě slin s poruchami žaludeční sekrece, revmatismu, při oteklých lymfatických žlázách i při cukrovce. Také jako korigens vůně a chuti. [1,7] Lze jej použít pro úpravu menstruačního cyklu a zmírnění projevů menopauzy. V současnosti je součástí mnoha přípravků na zmírnění příznaků menopauzy.

Zevně se používá jako kožní dezinficiens a ke koupelím. Odvar květu se semenem v oleji, změkčuje tvrdé mozoly a vředy. [8]

### 3.1.6. Obsahové látky

Účinnými obsahovými látkami jetele lučního jsou flavonoidy a isoflavonoidy. Dalšími látkami jsou třísloviny, glukosidy trifolin a isotrifolin, organické kyseliny, barviva, fenolové látky, tanin, pratol a pratensol, což jsou flavonové substance. V listech se nachází asparagin a jiné aminokyseliny. [1,7]

Z hlediska potencionálního využití jako léčiv se jeví nejzajímavější skupinou látek isoflavonoidy s fytoestrogenní aktivitou (biochanin A, daidzein, formononetin a genistein). Dále jsou zastoupeny isoflavonoidy genistin, kumestrol, ononin, trifoliol. [9]

### 3.1.6.1. Flavonoidy

Flavonoidy jsou velmi bohatou skupinou řazenou mezi fenolické látky, které patří mezi sekundární metabolity produkované rozmanitými druhy rostlin. Nepodílejí se přímo na primárních metabolických procesech, jako jsou fotosyntéza nebo respirace, ale přesto hrají v životě rostlin četné důležité role. Pomáhají rostlinám reagovat na změny podmínek životního prostředí či ataky patogenů. [18]

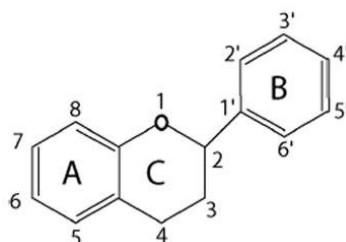
#### Struktura

V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek. Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu.

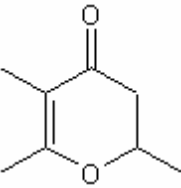
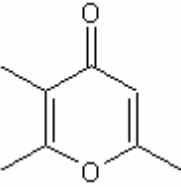
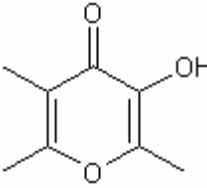
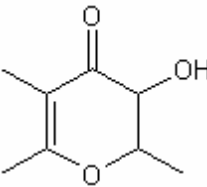
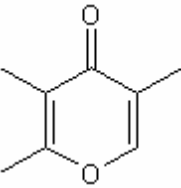
Flavanový skelet se skládá ze dvou substituovaných benzenových kruhu (A a B) a pyranového kruhu (C), napojeného na kruh A (Obr. 1.). Aromatický kruh vznikl acetát/malonovou cestou, zatímco kruh B je odvozen od fenylalaninu šikimátovou cestou. Heterocykl C, obsahující kyslíkový atom, je odpovědný za typické reakce flavonoidu. Fenyl B může být napojen na pyranový kruh v různých pozicích:

- v pozici 2 – normální flavonoidy, mezi něž patří většina flavonoidních barviv,
- v pozici 3 – isoflavonoidy, od nichž se odvozují insekticidy některých rostlin, zvané rotenoidy,
- v pozici 4 – neoflavonoidy.

Další klasifikace je založena na stupni oxidace pyranového kruhu (Tab. 1.) [20,21,23]



**Obrázek 1: vzorec flavanu (40)**

| Uspořádání C kruhu                                                                  | Název skeletu   | Příklad aglykonu | Glukosid,výskyt                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------------------------|
|    | flavanon        | eriodiktiol      | eriodiktin<br>v citrusech                        |
|    | flavon          | apigenin         | apiin<br>v petrželi, heřmánku,<br>rmenu, hledíku |
|                                                                                     |                 | luteolin         | rýt žlutý<br>(reseda žlutá)                      |
|    | flavonol        | kvercetin        | kvercitrin<br>v révě                             |
|                                                                                     |                 |                  | rutin<br>v pohance a routě                       |
|  | dihydroflavonol | taxifolin        | tis (Taxus)                                      |
|  | isoflavon       | genistein        | genistin<br>v sóji                               |

**Tabulka 1: Klasifikace flavonoidů [20]**

### **Biosyntéza**

Flavonoidy jsou v rostlině syntetizovány a dále modifikovány v jedné z větví fenylypropanoidové dráhy, která je klíčovou metabolickou drahou vedoucí k mnoha dalším látkám. [19] C6-C3-C6 struktura flavonoidů je výsledkem dvou samostatných cest biosyntézy. Aromatický kruh B tvořený fenylypropanoidovou jednotkou je syntetizován z p-coumaroyl-CoA. Šestiuhlíkatý kruh pocházejí z kondenzace tří acetátových jednotek cestou syntézy malonové kyseliny. Spojení těchto dvou částí

zahrnuje postupnou kondenzaci p-coumaroyl-CoA se třemi malonyl-CoA zbytky, z nichž každý věnuje dva atomy uhlíku, a to v reakci katalyzované chalkonsyntázou (CHS). Produktem této reakce je naringenin-chalkon. Dalším krokem v cestě biosyntézy flavonoidů je stereospecifická konverze naringenin-chalkon na naringenin pomocí chalkonisomerázy (CHI). (Obr. 2.) [41]

### **Využití**

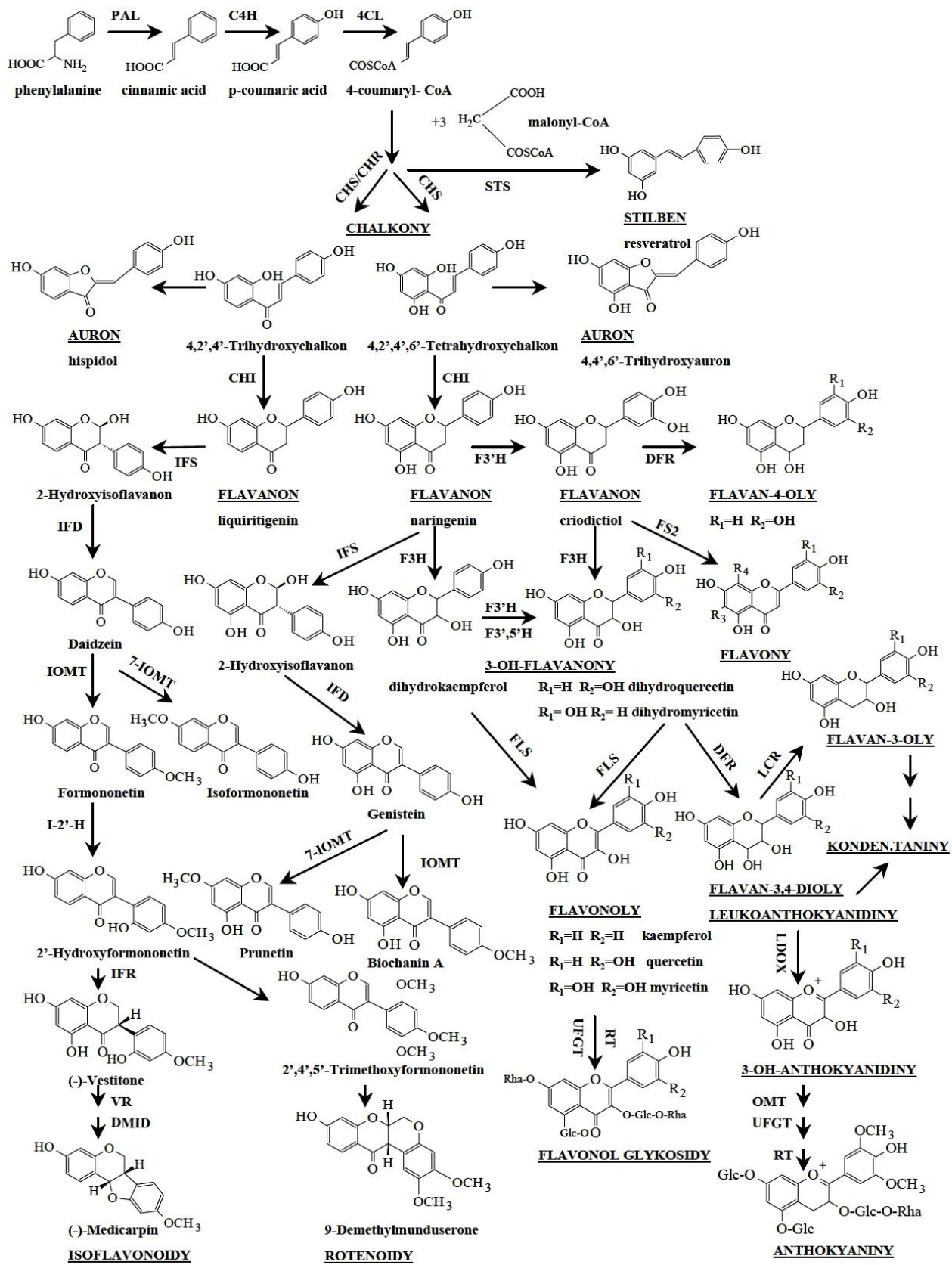
Flavonoidy byly zkoumány z hlediska ochrany zdraví člověka. Živočichové si flavonoidy sami netvoří, mohou je však v jakémkoliv množství přijímat v rostlinné stravě. Fermentací střevními bakteriemi jsou flavonoidy uvolněny ze struktur, jejichž součástí jsou v rostlinném organismu, a spolu s ostatními složkami potravy jsou vstřebány. Převážně ve formě konjugátů jsou pak vyloučeny močí, pouze zhruba jedna desetina je vyloučena jako čisté (nekonjugované) flavonoidy. Vrcholu koncentrace v krvi dosahují flavonoidy zhruba 4 hodiny po konzumaci potravy, po 24 hodinách klesá jejich koncentrace k nule, což znamená, že se v těle člověka ani hospodářských zvířat neakumulují. Flavonoidy mají řadu chemických vlastností, díky nimž mohou na různých úrovních zasahovat do dějů v organismu konzumenta.

Některé flavonoidy jsou účinnými inhibitory určitých enzymů. Jedna a tatáž látka může inhibovat více různých enzymů. Jevy pozorované na tkáňové úrovni jsou pak způsobeny kombinací jednotlivých účinků na úrovni enzymové. [18]

Flavonoidy zajišťují indukovanou obranu proti napadení houbami, mikroby, hmyzem. Odpuzují býložravce hořkostí, trpkostí – proanthokyanidiny. Také chrání rostliny proti UV-B záření, determinují kvalitu dřeva, jeho tvrdost, pevnost a odolnost proti hnití. Mají farmakologické účinky u živočichů, a to jako modulátory funkce hladkého svalstva, imunitního systému, dále protirakovinné [29], antivirové, antitoxické a hepatoprotektivní účinky.

Flavonoidy patří mezi významné antioxidanty. Zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, váží a inaktivují některé prooxidační ionty kovů (železo, měď). Jejich antioxidační aktivita závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule a také na jejich glykosylaci. Ukazuje se, že při terapii a prevenci například onemocnění kardiovaskulárního systému, nádorová onemocnění nebo zánětů je

konzumace potravin obsahujících flavonoidy vhodnější než podávání samotných antioxidantů, jako je vitamin C a E. [23]



Obrázek 2: Biosyntéza flavonoidů a isoflavonoidů [22]



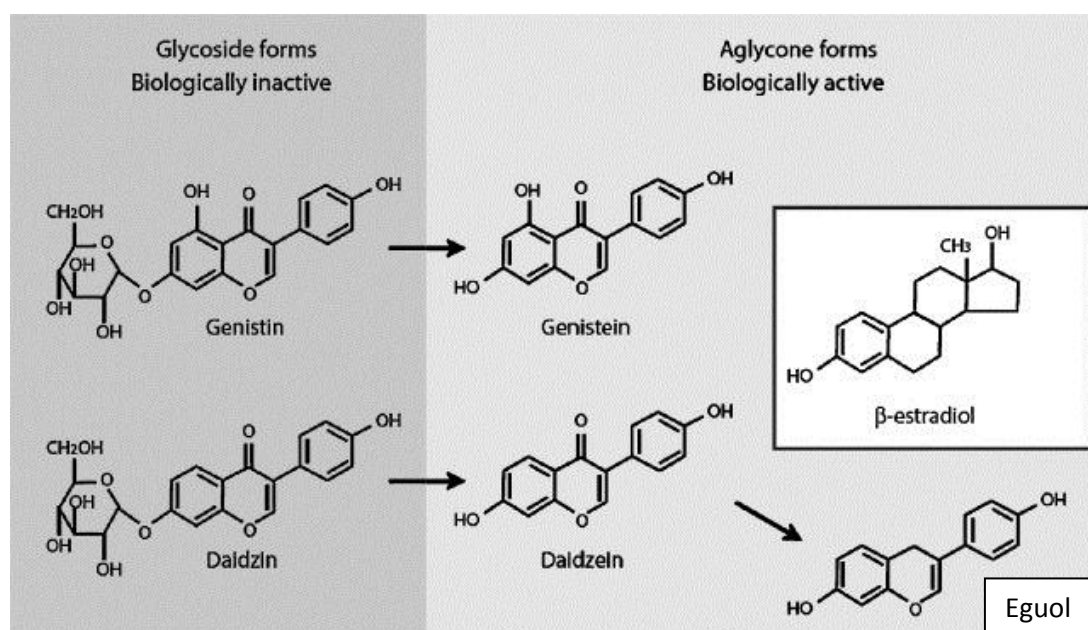
### 3.1.6.2. Isoflavonoidy

Isoflavonoidy tvoří významnou podskupinu patřící mezi flavonoidy. Existuje asi 700 známých struktur a z toho je popsáno okolo 370 aglykonů. Tyto sloučeniny se odlišují strukturně od dalších tříd flavonoidů vazbou fenylového kruhu (B-kruhu) v pozici 3-heterocyklického kruhu. [22]

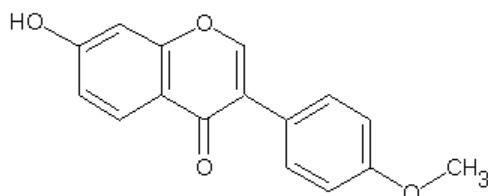
#### Zdroj

Isoflavony jsou zastoupeny v rostlinné říši v menší míře, než flavonoidy. Tato skutečnost je potvrzena faktem, že isoflavony jsou zastoupeny převážně v omezeném počtu čeledí, jako jsou *Fabaceae* a *Viciaceae*. V menší míře se vyskytují i v řadě dalších čeledí jako jsou *Papilionaceae*, *Iridaceae*, *Myristicaceae*, *Compositae*, *Amaranthaceae* a *Rosaceae*. [22] Nejbohatším zdrojem je sója luštinatá (*Glycine max*, *Fabaceae*). Dalšími významnými zdroji jsou jetel luční (*Trifolium pratense*, *Fabaceae*), jetel plazivý (*Trifolium repens*, *Fabaceae*) a tolíce vojtěška (*Medicago sativa*, *Fabaceae*). Isoflavonoidy byly také nalezeny v rybízu (*Ribes sp*, *Grossulariaceae*) a jiném drobném ovoci.

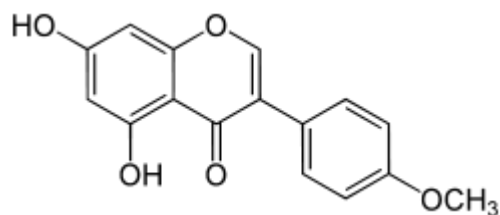
Mezi nejznámější isoflavony patří aglykony daidzein, genistein (Obr. 3.), formononetin (Obr. 4.) a biochanin A (Obr. 5.), jakož i jejich glykosidy daidzin, genistin (Obr. 3.).



Obrázek 3: Isoflavonoidy genistein, genistin, daidzin, daidzein a eguol [42]



**Obrázek 4: Formononetin** [43]



**Obrázek 5.: Biochanin A** [44]

### **Biosyntéza**

Biosyntetické dráhy vedoucí k isoflavonoidním fytoalexinům jsou důležitým potenciálním nástrojem genového a metabolického inženýrství pro zefektivnění antimikrobiální obrany rostlin. Isoflavonoidy jsou produkovány a využívány k obraně proti virům, bakteriím, houbám a hlísticím především bobovitými rostlinami. Vznik fytoalexinů je obecně aktivován na úrovni transkripce genů kódujících enzymy nezbytné k jejich syntéze, a to v buňkách sousedících s buňkami napadenými patogenem. Je-li v našem případě rostlina vystavena patogenu, dochází k výraznému posílení transkripce genů fenylypropanoidové dráhy (především pro phenylalaninamoniaklyasu, PAL) a její flavonoidní větve (hlavně pro chalkonsynthasu, CHS), tedy genů kódujících enzymy, které předcházejí v dané anabolické dráze vznik isoflavonoidů. [19]

V nejranějších fázích interakce mezi rostlinou a mikroblem (nejčastěji) jsou zapojeny mikrobiální produkty – elicitory, které slouží jako signál pro následnou produkci isoflavonoidů. Stejný efekt má také abiotický stres, zvláště pak příliš nízké či vysoké hladiny esenciálních minerálních látek (dusík, fosfor, síra, vápník), přítomnost  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ , jodoacetátu, detergentu TX-100, ethylenu, přílišné osvětlení či UV záření. Mechanismus působení těchto stresorů však zůstává nejasný. Biotické elicitory jsou nejčastěji sacharidy a v menší míře i proteiny a lipidy pocházející z buněčných stěn patogenních mikrobus. Rovněž napadená rostlina produkuje sacharidové elicitory stěnového původu, aby vyvolala produkci isoflavonoidů. [19]

## Využití

Díky široké paletě svých biologických účinků vyvolaly isoflavonoidy v posledních dvaceti letech mimořádný zájem rostlinných fyziologů a farmakologů. Isoflavonoidy se uplatňují jako fytoalexiny, fytoanticipiny, insekticidy a chemoatraktanty při navozování rhizobiální symbiosy. Značnou pozornost zasluhují rovněž pro svou fytoestrogenní aktivitu a jako zdraví prospěšná součást lidské stravy s antivirovým, antioxidačním [31] a kanceroprotektivním působením. [19]

Isoflavony jsou slabými estrogeny. Vykazují estrogenní účinky na centrální nervovou soustavu, vyvolávají falešnou říji a stimulují růst pohlavních orgánů samic savců. Studie v oblasti humánní a veterinární medicíny i pokusy s tkáňovými kulturami dokládají důležitou roli těchto fytoestrogenů přijímaných v potravě, v prevenci symptomu osteoporosy, menopausy. [30,32] Také u nádorových a srdečních onemocnění [22], jako inhibitory některých enzymů, například genistein byl testován jako specifický inhibitor tyrosin-protein kinasy. [28]

Pro svou antimikrobiální aktivitu byly isoflavonoidy zařazeny fytopatologi do skupiny více než 300 různých nízkomolekulárních látek známých jako fytoalexiny, které jsou syntetizovány bobovitými i některými nebobovitými rostlinami *de novo* v přímé odpovědi na napadení patogenem či v podmínkách abiotického stresu (těžké kovy, UV, herbicidy). Řada isoflavonoidů zároveň náleží do další skupiny obranných nízkomolekulárních látek – tzv. fytoanticipinů, jež jsou přítomny *in vivo* v rostlině i v nepřítomnosti patogenu. Některé isoflavonoidy jsou rovněž známy pro svou insekticidní aktivitu (především rotenonoidy) a jako insekticidy využívány v praxi (nejvýznamnější rotenon). [19]

## 3.2. Rostlinné kultury *in vitro*

Rostlinný materiál lze kromě přirozených podmínek pěstovat také v různých umělých podmínkách. Jednou z těchto možností je kultivace za specifických podmínek v uzavřených (nejčastěji skleněných) nádobách umožňující mimo pěstování celistvých rostlin také pěstovat jejich oddělené části. Odtud pocházejí i názvy těchto kultur: **kultury *in vitro*** (ve skle) anebo kultury rostlinných explantátů.

### 3.2.1. Definice pojmů

- **axenická kultura** = kultura jednoho organismu
- **enkapsulace** = uzavření explantátu (kalus, somatické embryo, meristém, buněčná suspenze) do gelové kapsle
- **ex plantare** = pěstovat mimo
- **explantát** = každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo soubor orgánů, který je vytržen z korelačních vztahů celku a je pěstován v umělých podmínkách (Bauer 1939)
- **in vitro** = ve skle, to znamená v umělých podmínkách
- **intaktní rostlina** = původní, mateřská rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách
- **meristém** = dělivé pletivo
- **primární explantát** = rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny
- **primární kultura** = kultura primárních explantátů
- **regenerace *de novo*** = regenerace rostlinných orgánů (prýtů, kořenů nebo květů) z buněk diferencovaných pletiv
- **subkultivace** = pasážování
- **tkáňová kultura** = historický termín přenesený z oblasti fyziologie živočichů, není správný pro kultury rostlinných pletiv
  
- **Plasticita** - rostliny si vzhledem k jejich povaze a dlouhé životnosti vyvinuly větší schopnost snášet extrémní podmínky, než jsou schopna zvířata. Tato plastičnost dovolí rostlinám měnit jejich metabolismus, růst a rozvoj, aby to co nejlépe vyhovovalo jejich prostředí. Je to zejména důležité i u rostlinných explantátových kultur, ty jsou díky tomuto schopny iniciovat buněčné dělení z téměř jakékoliv tkáně rostliny a obnovit ztracené orgány nebo podstoupit různé vývojové dráhy v reakci na konkrétní podněty.

Rostlinné buňky a tkáně kultivované *in vitro* obecně vykazují velmi vysoký stupeň plasticity, který umožňuje, aby tvorba jednoho typu tkáně nebo orgánu mohla být zahájena z jiného typu. [16]

- **Totipotence** - regenerace celých organismů závisí na představě, že všechny rostlinné buňky mohou, s ohledem na správné podněty, vyjadřovat celkový genetický potenciál mateřské rostliny. Tato údržba genetického potenciálu se nazývá "totipotencí". [13,16]

### 3.2.2. Explantátové kultury – rozdělení, vlastnosti

Jako explantátové kultury se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich části meristémových pletiv, protoplastů a kalusů. Explantátové kultury se využívají jak při šlechtění rostlin, tak při produkci rostlinných metabolitů. Hlavní výhodou je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk a z každé vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. Explantátové kultury umožňují též konzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin. [10]

Kultury rostlinných explantátů lze podle morfologické charakteristiky zařadit do některé z následujících kategorií:

1. **Kultury izolovaných semen (v různém stádiu vývoje či zralosti)**
2. **Kultury izolovaných embryí (v různém stádiu vývoje či zralosti)**
3. **Orgánové kultury** – orgánové systémy, orgány nebo jejich části pěstované *in vitro*
4. **Kultury vegetativních orgánů či jiných částí** (kořeny, stonky, listy, meristémy, pupeny)
5. **Kultury generativních orgánů** (květní pupeny, poupata, květy, pestíky, tyčinky, prašníky, pylová zrna, spory, gametofyty)
6. **Kalusové kultury** – rostlinné buňky pěstované v živném médiu jako nediferencované pletivo
7. **Protoplastové kultury** – buňky zbavené buněčných stěn, kde buněčný obsah je obalen nikoliv pevnou buněčnou stěnou, ale jen elastickou plasmalemou
8. **Suspenzní kultury** – volné buňky nebo buněčné shluky suspendované v živném médiu

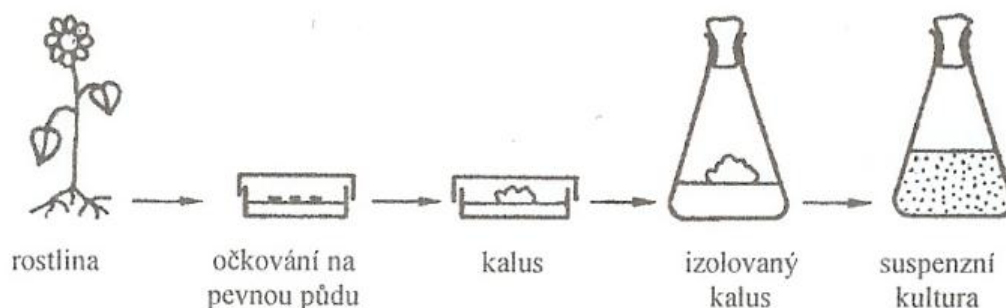
### 3.2.3. Etapy kultivace explantátových kultur (Obr. 6.)

1. Fáze: prvním krokem je výběr vhodné matečné rostliny. Matečná rostlina by měla být zdravá, pěstovaná v optimálních podmínkách a měla by mít vysokou produkci požadovaného sekundárního metabolitu. Nejlepších výsledků dosáhneme odebráním explantátu z rostliny během její fáze růstu nebo ze zásobních orgánů. Odebraný fragment se za sterilních podmínek inkubuje s vhodným živným médiem v kultivační nádobě při teplotě 23-28° C. Po několika týdnech se objeví primární kalus, schopný rozmnožování na vhodném médiu.

2. Fáze: Vhodná část primárního kalusu se pasáže na vhodné médium, kde může neomezeně proliferovat. Během prvních pasáží se často projevují morfologické (pigmentace) nebo morfogenetické (regenerace) změny. Stabilní a homogenní materiál se získá až po větším počtu pasáží. Je však velmi důležité zachování přísných konstantních podmínek kultivace, a to složení a zpracování živné půdy, osvětlení, teplota, prostředí a pravidelnost pasážování.

3. Fáze: Z kalusové kultury se mechanickou cestou ( maloběžné rolery a třepačky) nebo enzymatickým rozvolněním (např.: pomocí pektináz) odvodí suspenzní kultury.

4. Fáze: Suspenzní kultury jsou udržovány vsádkově v malých baňkách obvykle na rolerech nebo třepáčkách. Bývají pěstovány při teplotách mezi 25-30°C, v rozmezí 10-200 otáček roleru za minutu. Průměrná kultivace trvá 7-15 dní.



**Obrázek 6: Odvození explantátové suspenzní kultury z rostliny [10]**

### **3.2.4. Kultivační podmínky**

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin je složení kultivačního média. Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo další zdroj organického dusíku, sacharidy, další nedefinované organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory. Existuje celá řada médií používaných pro různé druhy rostlin a pro různé účely kultivace. [45]

#### **3.2.4.1. Makroelementy**

Tyto prvky jsou požadované ve velkých množstvích k růstu a vývoji rostlin. Za makroelementy jsou považovány dusík, fosfor, draslík, hořčík, vápník a síra (a uhlík, který je přidán zvlášť). Tyto prvky tvoří nejméně z 0,1% sušiny rostliny. [11-13]

#### **3.2.4.2. Mikroelementy**

Tyto prvky jsou důležité ve stopových množstvích pro růst rostlin a rozvoj, a mají velmi rozmanité role. Mangan, jód, měď, kobalt, bór, molybden, železo a zinek, ale i jiné prvky, jako je nikl a hliník se často mohou nacházet v některých médiích. Železo je obvykle přidáváno jako síran železnatý, ale může být také použit ve formě citrátu. Ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) se obvykle používá ve spojení se síranem železnatým. Tyto komplexy s EDTA a železa se používají pro pomalé a nepřetržité uvolňování železa do média. [11-13]

| <b>Element</b>  | <b>Funkce</b>                                                                                     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Dusík</b>    | Součást proteinů, nukleových kyselin a některých koenzymů. Prvek vyžadovaný v největším množství. |
| <b>Draslík</b>  | Reguluje osmotický potenciál, hlavní anorganický kationt.                                         |
| <b>Vápník</b>   | Syntéza buněčné stěny, funkce membrány, buněčné signály                                           |
| <b>Hořčík</b>   | Kofaktor enzymů, součást chlorofylu.                                                              |
| <b>Fosfor</b>   | Součást nukleových kyselin, přenos energie, součást meziproductů při dýchání a fotosyntéze.       |
| <b>Síra</b>     | Součástí některých aminokyselin (methionin, cystein) a některých kofaktorů.                       |
| <b>Chlór</b>    | Povinný pro fotosyntézu.                                                                          |
| <b>Železo</b>   | Jako součást cytochromů při přenosu elektronů.                                                    |
| <b>Mangan</b>   | Kofaktor enzymů.                                                                                  |
| <b>Cobalt</b>   | Součást některých vitamínů.                                                                       |
| <b>Měď</b>      | Kofaktor enzymů, reakce při přenosu elektronů.                                                    |
| <b>Zinek</b>    | Kofaktor enzymů, biosyntéza chlorofylu.                                                           |
| <b>Molybden</b> | Kofaktor enzymů, součást reduktázy dusičnanů.                                                     |

**Tabulka 2. Některé z prvků, důležité pro výživu rostlin a jejich fyziologické funkce. [13,16]**

### **3.2.4.3. Zdroj organického uhlíku**

Rostlinné explantáty nejsou schopny účinně fotosyntetizovat a mají blokovány některé další důležité anabolické funkce. Jako zdroj energie pro metabolické procesy bývá zpravidla používána sacharóza, glukóza, fruktóza nebo jiné cukry, např. manitol. [14]

Sacharóza je levná, snadno dostupná, snadno se přizpůsobující a je relativně stabilní, proto je nejvíce běžně používaným zdrojem uhlíku. Nejvíce používané koncentrace cukru v médiu jsou 1-5 % v závislosti na typu a stáří pěstovaného materiálu. Například mladé embrya potřebují pro svůj růst vyšší koncentraci uhlíkového zdroje v médiu.



Ostatní sacharidy (jako je glukóza, sladový cukr, galaktózy a sorbitol) mohou být také použity a ve specializovaných případech se mohou ukázat jako lepší zdroj než sacharóza. Také organické kyseliny mohou být považovány za přiměřený zdroj uhlíku, jako bylo například zjištěno u kyseliny jablečné. [11-13]

#### **3.2.4.4. Prostředky pro odpěňování živných půd**

Jsou to rostlinné oleje - sójový, řepkový kokosový, slunečnicový, hořčičný, dále živočišné tuky – lůj, dezodorizovaný rybí tuk, tekutá frakce vepřového sádla a silikonové oleje – používají se zpravidla jako emulze s obsahem 10% silikonu. Tyto prostředky jsou důležité především ve výrobě. [10]

#### **3.2.4.5. Vitamíny**

Jeden, nebo i více z těchto vitamínů mohou být použity v *in vitro* kultuře: inositol (myo-inositol, meso-inositol, 100-200 mg/l), vitamin B1 (thiamin, aneurin, 0,1 do 5,0 mg/l), pantotenát vápenatý nebo kyselina pantotenová (0,5-2.5 mg/l), kyselina listová (vitamin P, 0,1-0.5 mg/l), riboflavin (lactoflavin, vitamin B<sub>2</sub>; 0,1-10 mg/l), kyselina askorbová (vitamin C, 1-100 mg/l), kyselina nikotinová (vitamin PP, niacin, 0,1-5 mg/l), pyridoxin (0,1-1,0 mg/l), biotin (vitamin H, 0,01-1,00 mg/l, para-aminobenzoová kyselina (0,5-1,0 mg/l), tokoferol (vitamin E; 1-20 mg/l). Vitamíny jsou pro rostliny důležité jako katalyzátory různých metabolických reakcí. Avšak jejich přítomnost v médiu není zcela nezbytná, protože rostliny jsou schopny so je do určité míry syntetizovat samy. [11-13]

#### **3.2.4.6. Aminokyseliny**

Jsou nejčastěji používány jako zdroj dusíku, nebo k syntéze proteinů. [11] Jako přirozený zdroj se používá hydrolyzát kaseinu, který obsahuje směs asi 18 aminokyselin. Aminokyseliny působí pozitivně na růst a vývoj kultur a na organogenezi. Některé z aminokyselin nebo amidů, které nejčastěji vyvolávají pozitivní výsledky, jsou L-asparagová kyselina, L-asparagin, L-kyselina glutamová, L-glutamin a L-arginin.[11-13]

### 3.2.4.7. Nedefinované směsi přírodních látek

Zde můžeme zařadit látky jako kokosové mléko (tekutý endosperm z kokosu), pomerančová šťáva, rajčatová šťáva, hroznová šťáva, ananasová šťáva, míza z břízy, banán pyré apod. Použití těchto nedefinovaných směsí je však lépe vynechat, právě z důvodu jejich nedostatečného definování. [11-13,45]

### 3.2.4.8. Látky pro zpevnění média

Je-li ve statické kultuře použito kapalně médium, může se stát, že se tkáň dostane pod hladinu a odumře díky nedostatku kyslíku. Zpevňující látky jsou používány, aby tento nedostatek odstranily. Požadované vlastnosti pro zpevňující médium jsou, že by mělo být schopno sterilizace v autoklávu, po zahřátí být kapalně a po zchladnutí by si mělo udržet konzistenci polotuhého gelu. Většina těchto látek je přírodního původu a na trhu se vyskytuje různá kvalita.

- **Agar** je nejpoužívanější ztužovací látka, která se získává z červených řas, a to zejména *Gelidium amansii*. Agar se používá v různých koncentracích od 0,8 až 1%. Alternativou agaru může být polysacharid **phytagel** produkovaný bakterií *Sphingomonas elodea*.
- **Agarosa** se získává čištěním agaru a odstraněním agarpectinu s jeho vedlejšími sulfátovými skupinami. Používá se pouze v případě, kdy je potřeba velice tuhý gel jako například u jednobuněčných nebo protoplastových kultur. Agarosa se používá v koncentraci 0,4%.
- **Gelrite** je lineární polysacharid produkovaný bakterií *Pseudomonas Elodea*. Na rozdíl od agaru, který vyžaduje zahřátí, může být gelrite snadno připraven i za studena. [13,14,45]

### 3.2.4.9. Růstové regulátory:

Regulátory růstu rostlin nejčastěji používané jsou rostlinné hormony nebo jejich syntetické analogy. Každá rostlina je schopna si potřebné hormony nasyntetizovat a je to tak i s kulturami. Záleží však na druhu rostliny a typu kultury. Například buňky

schopné si syntetizovat auxiny již nepotřebují, aby jim auxiny byly dodávány a naopak. Je také známo, že hormony působí ve velmi malém množství.

Pro *in vitro* kultury vyšších rostlin jsou regulátory růstu velice důležité. Dá se říci, že některé *in vitro* kultury by bez nich nemohly růst a rozvíjet se nebo by byl jejich růst velice pomalý a omezený a neprodukovaly by potřebné množství požadovaných látek.

[11-13,16]

### 3.2.4.9.1. Auxiny

Auxiny (IAA, IBA, NAA a 2,4-D) se často přidávají do živného média. Přirozeně se vyskytující auxin IAA (indolyl-3octová kyselina) se přidává v koncentraci z 0,01-10 mg/l, ale jeho použití v rostlinných kulturách je omezeno díky jeho nestabilitě vůči teplu a světlu. Občas se mohou používat aminokyselinové konjugáty IAA (např. indol-acetyl-L-alaninu a indol-acetyl-L-glycin), které jsou stabilnější. Syntetické a relativně více aktivní auxiny (IBA, NAA a 2,4-D) se používají v koncentraci 0,001-10 mg/l. Auxiny obecně způsobí: prodloužení buněk a nabobtnání tkání, buněčné dělení (kalusové formace) a tvorbu náhodných kořenů a časnou embryogenezi v suspenzních kulturách. Použití 2,4-D by se mělo omezit co nejvíce, protože může vyvolávat mutace. Současně 2,4-D může zabránit fotosyntéze, což auxiny NAA, IBA a IAA nedokážou.

[11-13,16]

| Zkratka/ název  | Chemický název                            |
|-----------------|-------------------------------------------|
| <b>2,4-D</b>    | 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina          |
| <b>2,4,5-T</b>  | 2,4,5-trichlorfenoxycetová kyselina       |
| <b>Dicamba</b>  | 2-metoxi-3,6-dichlorbenzoová kyselina     |
| <b>IAA</b>      | indolyl-3-octová kyselina                 |
| <b>IBA</b>      | indolyl-3-máselná kyselina                |
| <b>MCPA</b>     | 2-metyl-4-chlorfenoxycetová kyselina      |
| <b>NAA</b>      | 1-naftylacetová kyselina                  |
| <b>NOA</b>      | 2-naftylacetová kyselina                  |
| <b>Picloram</b> | 4-amino-2,5,6-trichlorpikolinová kyselina |

**Tabulka 3: Běžně používané auxiny, jejich zkratky a chemické názvy**

### 3.2.4.9.2. Cytokininy

Cytokininy bývají často do kultivačního média přidávány společně s auxiny. Mohou však působit i samy, alespoň v některých fázích kultivace, nebo může jejich účinek silně převládat. Cytokininy jsou často používány ke stimulaci růstu a vývoje. Používané jsou kinetin, BAP a 2iP. Obvykle podporují dělení buněk, zejména v případě, kdy jsou používány spolu s auxiny. Ve vyšších koncentracích (1-10 mg/l) mohou vyvolat náhodné formování prýtů, ale kořenový růst je inhibován. Stejně tak mohou samy cytokininy indukovat tvorbu adventivních meristémů na kultivovaných segmentech stonků, listů a děloh. Také zpomalují stárnutí. [11-13,16]

| Zkratka/ název           | Chemický název                               |
|--------------------------|----------------------------------------------|
| BAP <sub>a</sub>         | 6-benzylaminopurin                           |
| 2iP (IPA) <sub>b</sub>   | [N6-(2-isopentyl)adenin]                     |
| Kinetin <sub>a</sub>     | 6-furfurylaminopurin                         |
| Thidiazuron <sub>c</sub> | 1-fenyl-3-(1,2,3-thiodiazol-5-yl)močovina    |
| Zeatin <sub>b</sub>      | 4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylaminopurin |

**Tabulka 4.: Běžně používané cytokininy, jejich zkratky a chemické názvy**

*a* Synthetické analogy

*b* V přírodě se vyskytující cytokininy

*c* Cytokinin typu substituované fenylmočoviny.

### 3.2.4.9.3. Gibereliny

Většina explantátů giberelin pro svůj růst v médiu nevyžaduje, ale v některých případech lze aplikací giberelinu stimulovat dlouhivý růst explantátu, případně zrušit endogenní dormanci semen.[14] Obecně platí, že gibereliny vyvolávají prodloužení internodií a růst meristémů nebo poupat v *in vitro* kultuře. Nejvíce používaný je GA<sub>3</sub> (kyselina giberelová).[11-13] GA<sub>3</sub> může být do média přidávána pro stimulaci růstu buněčných kultur, ke stimulaci růstu kalusu nebo stimulaci růstu zakrslých rostlin. K tomu, aby se projevil stimulační účinek giberelinu, je však nutná přítomnost auxinu ať již nativního v rostlinném explantátu nebo exogenního v živném médiu. [14,16]

#### **3.2.4.9.4. Kyselina abscisová**

Dodává se ke stimulaci proliferace prýtlů a k inhibici pozdějších fází embryogeneze a také ke stimulaci i inhibici růstu kalusů (v závislosti na daném druhu). [11-13,16]

#### **3.2.4.10. Fyzikální podmínky**

##### **3.2.4.10.1. Světlo**

Světlo je důležitý faktor lišící se u typu kultury. Posuzují se tři faktory: délka, typ záření a spektrální složení (silně závislé na typu lampy). Některé rostliny jsou velice citlivé na střídání období klidu a květu, pak je třeba dbát na výběr konkrétní jednodenní délky a intenzity svitu. Obvykle zvolená denní délka světla je 14 - 16 h, ale trvalý svit je také používán. Ve výjimečných případech může růst probíhat v nepřetržité tmě (např. semena orchidejí). [11,13] Působením světla často dochází v intaktních rostlinách a tkáňových kulturách k biosyntéze a k akumulaci sekundárních metabolitů. Světlo také může ovlivňovat orgánovou diferenciaci.

##### **3.2.4.10.2. Teplo**

Teplota se obvykle udržuje konstantní při 24-26 °C. Někdy, v závislosti na druhu se teplota může snížit (18 °C, cibulové druhy), nebo zvýšit (28-29 °C pro tropické druhy). Optimální teplota pro růst a vývoj *in vitro* je obecně o 3-4 °C vyšší než *in vivo*. Vzhledem k tomu, že teplota ve zkumavkách je o 3-4 °C vyšší než teplota v místnosti, díky oteplovacímu účinku záření, teplota v místnosti může být udržována na optimální teplotě při *in vivo* růstu. Nižší teplota má být vybrána pro některé speciální postupy, jako je například formace zárodku květu, klíčení semen atd. Pokud dojde k nadměrnému překročení nebo snížení teploty u dané kultury než je předepsáno, může dojít k jejímu poškození. [11,13]

### 3.2.4.10.3. Acidita živného média (pH)

Předpokládá se, že ideální rozsah pH je 5,0-6,5. pH by však nemělo být ani moc nízké (nižší než 4,5), ani moc vysoké (vyšší než 7,0), protože může dojít k zastavení růstu a vývoje *in vitro* kultury.

Pokud je pH příliš nízké, mohou nastat tyto komplikace:

1. Sníží se stabilita auxinu IAA a kyseliny gibberelové
2. Změní se struktura agaru
3. Může se urychlit rozpad solí (fosfátové, železnaté soli)
4. Vitamín B1 a kyselina pantotenová budou méně stabilní
5. Příjem amonných iontů bude snížen

Pokud je během přípravy střední hodnota pH příliš nízká nebo příliš vysoká, pak může být opravena roztokem NaOH nebo HCl (0,1-1,0 mM) [11-13]

### 3.2.4.10.4. Kyslík a homogenita média

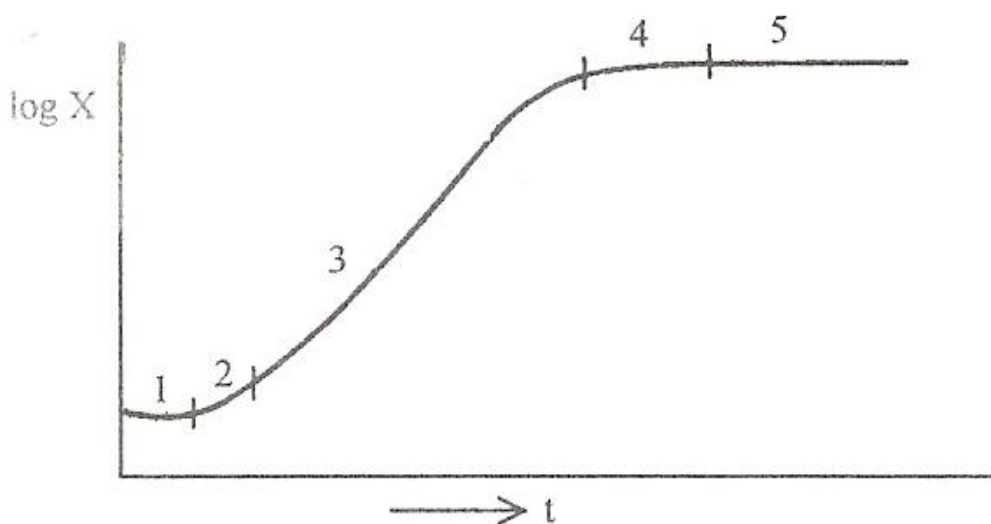
Dobré větrání může být také dalším důležitým faktorem pro růst buněk a tkání, což se dobře zajišťuje častým používáním třepacího stroje nebo otočného kola. Vhodné je to zejména u suspenzních kultur nebo kultur obsahujících kapalné médium. [12]

### 3.2.4.11. Fáze růstu kultury

Růst buněk lze vysvětlit, jako zvýšení počtu buněk nebo zvýšení hmotnosti buněk. Rostlinná kultura prochází během růstu několika fázemi, které jsou charakterizovány jako růstová křivka. Délka jednotlivých fází je ovlivněna složením původní živné půdy (v níž buňky rostly před přenosem do nové živné půdy), složením nové živné půdy (do níž byly buňky přeneseny), fyzikálními faktory (světlo, teplo, pH, oxidačně-redukční potenciál), typem buněk a jejich stářím, množstvím a genetickým vybavením. [10,45]

1. **Lag fáze** – je to období po naočkování buněk do nového média, kdy si buňky zvykají na nové prostředí. Během této fáze může dojít i k dočasnému poklesu koncentrace buněk.

2. **Fáze zrychlení (akcelerační fáze)** – období, kdy dochází k rapidnímu metabolismu a dělení buněk.
3. **Exponenciální fáze** – období, kdy buňky rostou stále stejnou maximální rychlostí, délka této fáze je však závislá na dostatečné zásobě živin v kultivačním médiu. Na konci této fáze je ideální kulturu přepasážovat, aby se udržela její aktivita.
4. **Fáze zpomalení (deklinační fáze)** – tato část křivky se může velmi lišit v závislosti na typu rostlinné kultury. Dochází zde k poklesu růstové rychlosti v důsledku vyčerpávání živin a kumulaci toxických metabolických produktů.
5. **Stacionární fáze** – populace buněk dosahuje maximální a po určitou dobu konstantní velikosti.
6. **Fáze odumírání** – odumírání buněk může být pomalé nebo rychlé, spojené nebo nespojené s autolýzou buněk. [10,13,45]



**Obrázek 7: Růstová křivka**, 1 – lag fáze, 2 – akcelerační fáze, 3 – exponenciální fáze, 4 – deklinační fáze, 5- stacionární fáze, X – hmotnost buněk, t – čas [10]

### 3.2.4.12. Produkce sekundárních metabolitů

Vedle mechanické obrany si rostliny vytvořily i obranu chemickou, jejímž základem je vytvoření řady sekundárních metabolitů, od chemicky jednoduchých (kyselina šťavelová či kyanid) až po chemicky složitější látky, jako jsou např. glykosidy, alkaloidy, apod. Uvedené sekundární metabolity mohou působit buď odpudivě nebo až toxicky na býložravce. V rostlině se tyto látky nevytvářejí ve stejném množství. Uvedené alkaloidy, glykosidy uvolňující kyanovodík, glukosinoláty a mnoho dalších, se v rostlině vyskytují v malém množství, ale jsou pro živočichy velice toxické. Tento obranný mechanismus byl prokázán např. u jetele plazivého (*Trifolium repens*), který při napadení pletiva uvolňuje kyanovodík. Tato schopnost tvorby kyanovodíku závisí na dvou párech alel, je tedy geneticky podmíněna. Rostliny, kterým chybí buď glykosid či enzym, případně obojí, jsou požírány slimáky a hlemýždi. Kyanogenní formy jsou sice nakousnuty, ale poté zanechány. [17]

### 3.2.4.13. Biotechnologické využití

Výzkum kultur *in vitro*, který má své praktické využití, je zaměřen zejména na problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin a na produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami.

- Alternativní příprava produktů získávaných z rostlin v polní kultuře. Předností je možnost vést proces za řízených podmínek, bez závislosti na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech. Výsledné produkty jsou po kvalitativní stránce homogenní, prosté kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultury.
- Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách.
- Získání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk. Z explantátových kultur byly izolovány látky, které nebyly zjištěny v mateřských rostlinách, z nichž byly kultury odvozeny.
- Produkty biotransformací, kdy z poměrně levných substrátů lze získat farmaceuticky významné látky, protože příslušné enzymy se u mikroorganismů nevyskytují. [10]



### **3.3. Elicitace rostlinných kultur *in vitro***

#### **3.3.1. Charakteristika**

Elicitace jejíž použití souvisí pravděpodobně i s rozvojem kultivace rostlin *in vitro*, je metoda, která využívá schopnosti rostlin reagovat na různá infekční agens celou řadou reakcí, na jejichž konci nastává zvýšená tvorba sekundárních metabolitů, které představují důležité suroviny pro farmaceutický průmysl. [17,24]

#### **3.3.2. Elicitory**

Elicitory užívané při kultivaci rostlin *in vitro* nebo i na menších zemědělských plochách mohou být organického i anorganického původu. Účinnost elicitace závisí na mnoha faktorech, které často působí synergicky, jako jsou stáří kultury, koncentrace elicitoru a v jakých časových periodách byl elicitor podáván. Velice důležitou podmínkou je, aby elicitor nesnižoval životaschopnost kultury, proto se obecně užívají nižší koncentrace elicitorů. Elicitory mohou být rozděleny například na abiotické a biotické. (Tab. 5.) Lze použít i jiný typ dělení, a to na exogenní elicitory a endogenní elicitory. Exogenní elicitory vznikají činností patogena, jedná se o jeho metabolity. Z chemického hlediska do této skupiny řadíme např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy. Endogenní elicitory se uvolňují z narušovaných buněčných stěn obou organismů. Mezi ně patří oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteiny uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub či oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky. [17,26]

#### **3.3.3. Podmínky**

Za nejdůležitější podmínku pro úspěšnou elicitaci je považována správná volba elicitoru pro danou kulturu. Kromě toho musíme také zajistit i další podmínky, jako například:

- Volba vhodného rostlinného explantátu pro kultivaci
- Volba vhodného média a jeho složení
- Optimální stáří kultury
- Optimální koncentrace elicitoru

- Doba působení elicitoru na kulturu
- Růstová fáze kultury (různá kultura reaguje s elicitem pozitivně v různém stádiu růstu – některé v lag fázi, jiné ve stacionární fázi) [47]

|                                                 |                  |                                            |
|-------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------|
| ABIOTICKÉ<br>FAKTORY                            | FYZIKÁLNÍ        | Mechanické účinky větru                    |
|                                                 |                  | Nadměrné záření (UV, viditelné)            |
|                                                 |                  | Extrémní teploty (horko, chlad, mráz)      |
|                                                 |                  | Nedostatek vody (sucho), zaplavení         |
|                                                 | CHEMICKÉ         | Nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)       |
|                                                 |                  | Nedostatek živin v půdě                    |
|                                                 |                  | Nadbytek iontů solí a vodíků v půdě        |
|                                                 |                  | Toxické kovy a organické látky v půdě      |
|                                                 |                  | Toxické plyny ve vzduchu                   |
|                                                 | BIOTICKÉ FAKTORY | Herbivorní živočichové (spásání, poranění) |
| Patogenní mikroorganismy (viry, mikroby, houby) |                  |                                            |
| Vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus) |                  |                                            |

**Tabulka 5: Abiotické a biotické faktory**

### 3.3.4. Mechanismus účinku

1. Odolnost rostlin je determinována přímo danými geny rezistence v genomu.
2. Odolnost rostlin je výsledkem genů kódujících pasivní i aktivní mechanismy obrany proti patogenům. Patří sem geny metabolických drah, které mají za následek zvýšenou odolnost rostliny vůči infekci či napadnutí patogenem, prostřednictvím produkce kalózy, ligninu (na zpevnění buněčných stěn) nebo fytoalexinů.
3. Odolnost rostlin je výsledkem genů řídících jiné buněčné procesy, např. časné zrání semen, které tak unikají hlavnímu náporu patogenu/elicitoru.

Všechny tyto typy rezistence se navzájem můžou překrývat ve svém působení, přičemž výsledná rezistence je otázkou společného velmi komplexního fungování jednotlivých mechanismů. [55,56]

Mnoho elicitorů působí jako avirulentní determinanty genetického systému rostlin, které poukazují na obecnou odpověď rezistence gen-proti-genu u vrozené imunity rostlin, ve které geny rostlinné rezistence (R geny) odolávají patogenům s odpovídající avirulencí (AVR) genu pomocí specifického rozpoznávání. Elicitory nebo avirulentní determinanty musí být rozpoznány rostlinnými receptory nebo R proteiny lokalizovanými v plazmatické membráně nebo cytoplasmě před zahájením signálních drah, které vedou k obranné reakci, jako například syntéza obranných sekundárních metabolitů. Molekulární rozpoznávání a fyzikální interakce mezi signálními molekulami elicitoru a specifickými receptory rostlin jsou složité procesy, ale jsou potřebné pro konkrétní transdukce signálu elicitoru. Způsobením změn v konformaci receptoru nebo aktivaci receptorové kinázy a následně elicitorů nebo nepřímé aktivaci jejich odpovídající efektorů, jako iontové kanály, G-proteiny, lipázy a kinázy, které pak transdukují signál elicitoru proudem obranné reakce. [48]

### 3.3.5. Syntetické elicitory

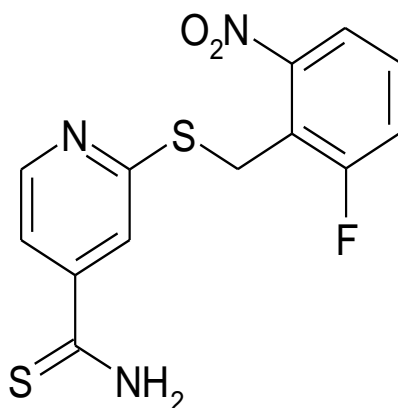
V poslední době jsou jako elicitory testovány na rostlinných kulturách *in vitro* také nově syntetizované chemické látky. U mnoha z nich se prokázalo, že mají silný elicitální účinek. Například fluoroderiváty jasmonové kyseliny [49] nebo deriváty chlorovaných pyridinů [50] jsou považovány za vhodné induktory signálu pro sekundární metabolismus rostlin.

Jiné látky, u kterých byla prokázána elicitální aktivita jsou deriváty pyrazin-2-karboxamidu. Substituované pyrazin-2-karboxamidy byly testovány na kalusové kultuře *Genista tinctoria* (kručinka barvířská) ve formě dvou látek. Látka A (N-(3-jod-4-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid) a látka B (5-terc-butyl-6-chlor-N-(3-jod-4-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid). Vhodnějším elicitem se pro produkci isoflavonoidů ukázala být látka A, protože bylo dosaženo vyrovnanějších výsledků (zvýšené tvorby isoflavonoidů) v průřezu jednotlivých odběrových časů i koncentrací. I

když maximální produkce genistinu (57 násobné) bylo dosaženo u látky B v koncentraci  $c_{B1} = 100\text{mg}/100\text{ml}$  ( $2,33 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ ) oproti kontrole. [51]

Další nově syntetizované látky typu substituovaných pyrazin-2-karboxamidů byly použity k elicitaci kalusové a suspenzní kultury *Silybum marianum* L. (ostropestřec mariánský). [52]

V této práci je jako elicitor na suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. testován 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid. Jedná se o látku, která byla původně syntetizována pro své antimykobakteriální a antifungální vlastnosti. Tento nově nasyntetizovaný derivát pyridinu ovlivňuje také rostlinný metabolismus – inhibuje fotosyntézu v chloroplastech špenátu, [53] a proto byla snaha ověřit jeho účinek i na produkci isoflavonoidů a flavonoidů (fenylpropanový metabolismus). [54]



**Obrázek 8:** 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid ( $M_r$  323,4; teplota tání  $152\text{ }^\circ\text{C}$  až  $155\text{ }^\circ\text{C}$ )

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Použitý materiál, přístroje, pomůcky

#### 4.1.1. Rostlinný materiál

K experimentu uvedenému v této diplomové práci byla použita suspenzní kultura odvozená od sterilní klíčící rostliny jetele lučního *Trifolium pratense* L., *Fabaceae* (varieta DO-8, varieta Tempus). Semena byla získána ze Šlechtitelské stanice Domoradice. Elicitace byla provedena u dvouleté suspenzní kultury.

#### 4.1.2. Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do váženky, předem vysušené 2 hodiny při 105 °C, byly odváženy asi 2,000 g explantátové kultury. Váženka s obsahem byla zvážena a sušena 2 hodiny v sušárně při 105 °C. Po vysušení a vychladnutí v exsikatoru byla zvážena. Ztráta sušením byla vztažena na navážku explantátové kultury a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením 5,69 % (DO-8) a 5,53 % (Tempus) je aritmetickým průměrem ze tří stanovení. [33]

#### 4.1.3. Chemikálie

- 6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno
- Dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno
- Dusičnan draselný *p.a.*, Lachema, Brno
- Etanol 96%, Lachema, Brno
- Chloramin B, Lachema, Brno
- Chlorid kobaltnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- Chlorid pyridoxinia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- Chlorid thiaminia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- Chlorid vápenatý *p.a.*, Lachema, Brno
- Jodid draselný *p.a.*, Lachema, Brno
- Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová č., Lachema, Brno
- Kyselina boritá *p.a.*, Lachema, Brno

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

#### **4.1.4. Přístroje a pomůcky**

- Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen
- Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
- 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), Merk, Darmstadt
- Kolona LiChrosper RP-18 250x4 (5 $\mu$ m) s předkolonou, Merc, Darsmstadt
- Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- Spektrofotometr CE 1010, Cecil instruments, Cambridge
- Třepačka Unimax 2010, Heidolph

## 4.2. Kultivace explantátových kultur

### 4.2.1. Kultivační nádoby a přístroje

Ke kultivaci explantátových kultur bylo použito nádobí z varného skla značky SIAL, které vyhovuje požadavkům na nádobí pro práci s tkáňovými kulturami a je dostatečně odolné vůči chemikáliím, vodě a rozdílům teplot.

Suspenzní kultury byly kultivovány ve 250 ml varných baňkách.

Použité kovové nástroje byly opláchnuty 96% ethanolem a po zabalení do hliníkové fólie sterilizovány při teplotě 200°C 2 hodiny v horkovzdušném sterilizátoru. Také pipety byly sterilizovány v hliníkové fólii 15 min při teplotě 121°C v autoklávu.

### 4.2.2. Příprava živného média

Pro kultivace suspenzních kultur bylo použito živné médium podle Gamborga, které má následující složení: [25]

|                                                      |                              |
|------------------------------------------------------|------------------------------|
| KNO <sub>3</sub>                                     | 2500,00 mg · l <sup>-1</sup> |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 250,00 mg · l <sup>-1</sup>  |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                | 150,00 mg · l <sup>-1</sup>  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> · H <sub>2</sub> O  | 150,00 mg · l <sup>-1</sup>  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 134,00 mg · l <sup>-1</sup>  |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 37,34 mg · l <sup>-1</sup>   |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 27,84 mg · l <sup>-1</sup>   |
| MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O                 | 10,00 mg · l <sup>-1</sup>   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 3,00 mg · l <sup>-1</sup>    |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O               | 2,00 mg · l <sup>-1</sup>    |
| KI                                                   | 0,75 mg · l <sup>-1</sup>    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0,25 mg · l <sup>-1</sup>    |
| CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O               | 0,025 mg · l <sup>-1</sup>   |
| CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O               | 0,025 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>    |
| Myoinositol | 100,00 mg · l <sup>-1</sup>   |
| Sacharosa   | 30000,00 mg · l <sup>-1</sup> |

Jako růstový stimulátor byla použita 2 mg · l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina v kombinaci s 2 mg · l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinem. [46]

Půda připravená pro kultivaci suspenzních kultur byla rozlita po 25 ml do varných baněk. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 min při teplotě 121°C a tlaku páry 0,1 MPa.

#### 4.2.3. Pasážování a kultivace

Pasážování bylo prováděno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen nejméně 1 hodinu germicidní zářivkou. Aseptický box musel být vždy nejméně 15 min před začátkem práce zapnut, aby se ustálilo laminární proudění vzduchu. Během pasážování byly vždy po celou dobu zachovány přísně aseptické podmínky a bylo používáno sterilní sklo a nástroje.

Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepačce a následně kultivována na pomaloběžném roleru při teplotě 25°C a světelné periodě 16 hodin světlo/ 8 hodin tma. Pasážování bylo prováděno vždy po 14 dnech subkultivace přenesením části narostlé suspenze do baněk s čerstvým médiem. [46]



### 4.3. Elicitace a odběr kultur

K elicítaci byly použity lihové roztoky (v 96% lihu) 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu o koncentraci:

$$c_1 = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$$

$$c_2 = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$$

$$c_3 = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$$

-připravenými roztoky elicitoru byla provedena elicítace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L.

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

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

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

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

#### 4.4. Stanovení obsahu flavonoidů

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé. [33]

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

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

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

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

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

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

m

v němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

## 4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů

Stanovení daidzeinu, genistinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A prováděné vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a fluorimetrickou detekcí. [34]

### 4.5.1. Příprava vzorku

Asi 0,2000 – 0,4000 g upráškované kultury se ve 100,0 ml baňce smíchá s 15 ml methanolu 80% a extrahuje se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 25,0 ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku kultury ve 100,0 ml baňce, přidá se 15,0 ml methanolu 80% a extrahuje se ještě jednou 20 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky a spojené extrakty se zředí methanolem 80% na 25,0 ml. Roztok se převede přes mikrofiltr do vialek a analyzuje se metodou HPLC.

### 4.5.2. Parametry HPLC analýzy

HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (autosampler AS-2055 Plus, čerpadlo PU-2089 Plus, detektor MD-2015, MD-2020) vybavené kolonou LiChrospher RP-18 (250x4 mm, velikost částic 5 $\mu$ m) s ochranou předkolonkou.

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

Průtok byl 1,1 ml/min. Mobilní fázi A tvořil methanolický roztok kyseliny o-fosforečné (0,15% m/v), mobilní fázi B vodný roztok kyseliny o-fosforečné (0,15% m/v).

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

## 4.6. Statistické vyhodnocení

Ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na produkci flavonoidů v kulturách *Trifolium pratense* L. byl použit T- test (test významnosti rozdílů dvou průměrů), pro zvolenou hladinu významnosti  $p = 0,05$ . [35]

Pro výpočet testovacího kritéria byl použit tento vztah: [36]

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

t .....testovací kritérium

$n_1$ .....počet členů pokusného souboru

$n_2$ .....počet členů kontrolního souboru

$\bar{x}_1$ .....aritmetický průměr pokusného souboru

$\bar{x}_2$ .....aritmetický průměr kontrolního souboru

$s_1$ .....směrodatná odchylka pokusného souboru

$s_2$ .....směrodatná odchylka kontrolního souboru

Aritmetický průměr byl vypočítán ze vztahu: [37]

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

**Směrodatná odchylka byla vypočítána ze vztahu: [38]**

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

n.....rozsah souboru

$x_i$ ..... naměřené hodnoty

$\bar{x}$ .....aritmetický průměr

s.....směrodatná odchylka

Testovacímu kritériu přísluší **t** rozdělení se stupněm volnosti (**v**) vypočítaného podle: **v**  
**= n<sub>1</sub> + n<sub>2</sub> - 2**

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

Hodnota testovacího kritéria (**t**) byla porovnána s příslušnou kritickou hodnotou **t(v)<sub>p</sub>** pro vypočítaný stupeň volnosti (**v**) a zvolenou hladinu významnosti (**p**). Je-li hodnota (**t**) větší než hodnota **t(v)<sub>p</sub>**, je rozdíl  $|x_1 - x_2|$  statisticky významný na hladině významnosti (**p**).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Tabulky

Tabulka 1: Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po elicitaci různými koncentracemi 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu.

| Koncentrace elicitoru ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) | Doba aplikace elicitoru (hod) | Průměrný obsah (%) elicitace | Směrodatná odchylka elicitace | Průměrný obsah (%) kontrola | Směrodatná odchylka kontrola | T - test |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------|
| 1                                                | 6                             | <b>0,137</b>                 | 0,004                         | 0,071                       | 0,012                        | 5,247    |
|                                                  | 24                            | 0,073                        | 0,023                         | 0,071                       | 0,012                        | 0,072    |
|                                                  | 48                            | 0,039                        | 0,009                         | 0,071                       | 0,012                        | 2,098    |
|                                                  | 168                           | 0,017                        | 0,000                         | 0,073                       | 0,014                        | 3,986    |
| 10                                               | 6                             | 0,079                        | 0,007                         | 0,071                       | 0,012                        | 0,602    |
|                                                  | 24                            | 0,109                        | 0,012                         | 0,071                       | 0,012                        | 2,226    |
|                                                  | 48                            | <b>0,109</b>                 | 0,002                         | 0,071                       | 0,012                        | 3,183    |
|                                                  | 168                           | 0,091                        | 0,015                         | 0,073                       | 0,014                        | 0,901    |
| 100                                              | 6                             | 0,087                        | 0,010                         | 0,071                       | 0,012                        | 1,054    |
|                                                  | 24                            | 0,114                        | 0,018                         | 0,071                       | 0,012                        | 1,859    |
|                                                  | 48                            | <b>0,141</b>                 | 0,020                         | 0,071                       | 0,012                        | 3,222    |
|                                                  | 168                           | 0,128                        | 0,024                         | 0,073                       | 0,014                        | 1,990    |

Zvýrazněnými hodnotami průměrného obsahu je znázorněno statisticky významné zvýšení obsahu flavonoidů v elicitovaných kulturách vzhledem ke kontrolním kulturám.

Tabulka 2: Obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) po elicitaci různými koncentracemi 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu.

| Koncentrace elicitoru ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) | Doba aplikace elicitoru (hod) | Průměrný obsah (%) elicitace | Směrodatná odchylka elicitace | Průměrný obsah (%) kontrola | Směrodatná odchylka kontrola | T - test |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------|
| 1                                                | 6                             | 0,020                        | 0,006                         | 0,021                       | 0,004                        | 0,205    |
|                                                  | 24                            | 0,037                        | 0,010                         | 0,021                       | 0,004                        | 1,463    |
|                                                  | 48                            | <b>0,066</b>                 | 0,003                         | 0,021                       | 0,004                        | 8,502    |
|                                                  | 168                           | 0,036                        | 0,005                         | 0,017                       | 0,005                        | 2,727    |
| 10                                               | 6                             | 0,024                        | 0,004                         | 0,021                       | 0,004                        | 0,532    |
|                                                  | 24                            | <b>0,090</b>                 | 0,004                         | 0,021                       | 0,004                        | 11,755   |
|                                                  | 48                            | <b>0,113</b>                 | 0,015                         | 0,021                       | 0,004                        | 5,949    |
|                                                  | 168                           | 0,076                        | 0,046                         | 0,017                       | 0,005                        | 1,265    |
| 100                                              | 6                             | 0,046                        | 0,015                         | 0,021                       | 0,004                        | 1,610    |
|                                                  | 24                            | 0,044                        | 0,015                         | 0,021                       | 0,004                        | 1,504    |
|                                                  | 48                            | <b>0,095</b>                 | 0,016                         | 0,021                       | 0,004                        | 4,796    |
|                                                  | 168                           | 0,035                        | 0,018                         | 0,017                       | 0,005                        | 0,973    |

Zvýrazněnými hodnotami průměrného obsahu je znázorněno statisticky významné zvýšení obsahu flavonoidů v elicitovaných kulturách vzhledem ke kontrolním kulturám.



Tabulky 3: Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) po elicitaci různými koncentracemi 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu.

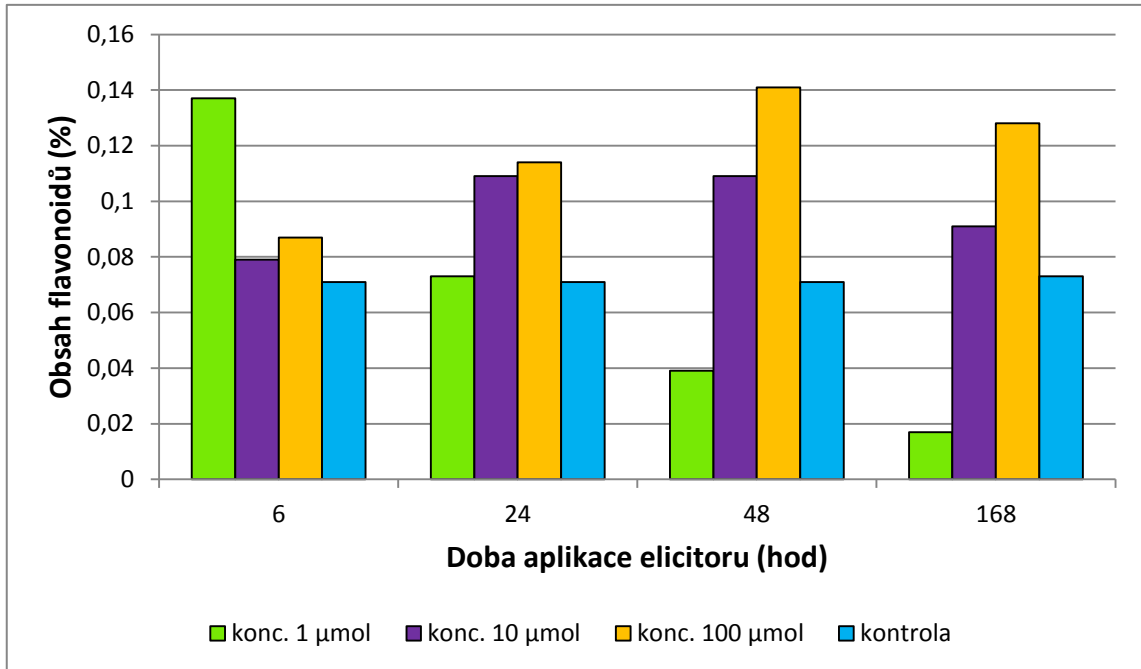
| Koncentrace elicitoru ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) | Doba aplikace elicitoru (hod) | Obsah isoflavonoidů (%) |          |           |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------|-----------|
|                               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

Tabulka 4: Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) po elicitaci různými koncentracemi 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu.

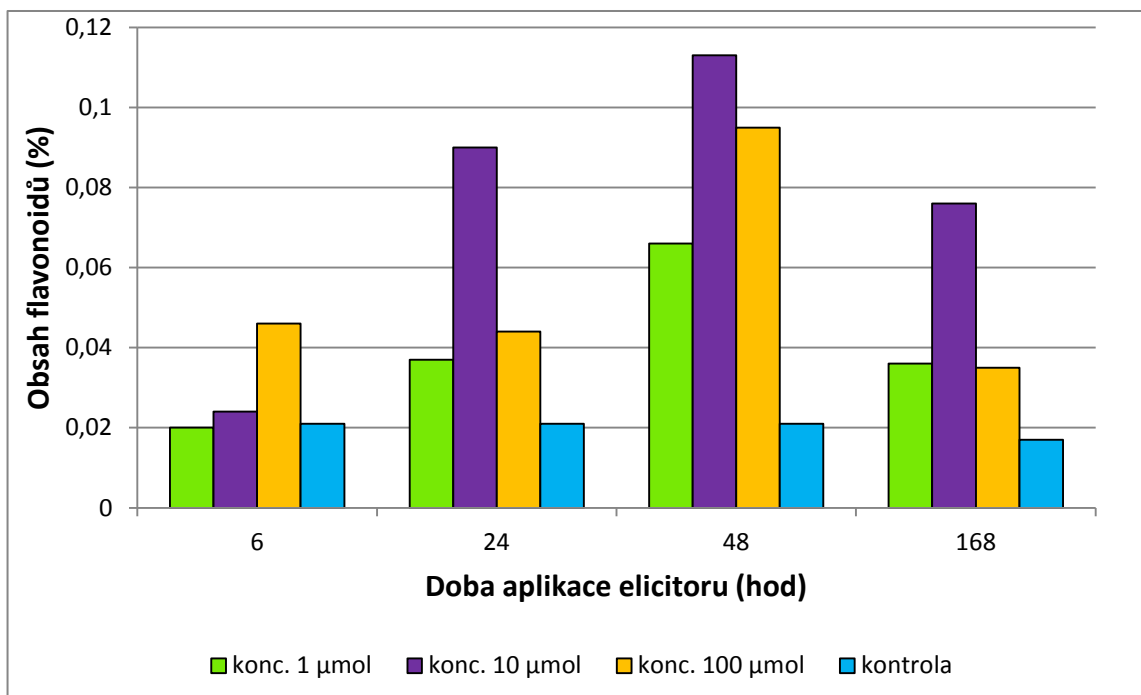
| Koncentrace elicitoru ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) | Doba aplikace elicitoru (hod) | Obsah isoflavonoidů (%) |          |           |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------|-----------|
|                                                  |                               | genistin                | daidzein | genistein |
| Kontrola                                         | 6                             | 0                       | 0,02     | 0,01      |
|                                                  | 168                           | 0,01                    | 0,01     | 0,00      |
| 1                                                | 6                             | 0,01                    | 0,02     | 0         |
|                                                  | 24                            | 0                       | 0,01     | 0         |
|                                                  | 48                            | 0                       | 0,01     | 0         |
|                                                  | 168                           | 0                       | 0        | 0         |
| 10                                               | 6                             | 0                       | 0,02     | 0         |
|                                                  | 24                            | 0                       | 0,01     | 0         |
|                                                  | 48                            | 0                       | 0,01     | 0         |
|                                                  | 168                           | 0                       | 0        | 0         |
| 100                                              | 6                             | 0,01                    | 0,01     | 0         |
|                                                  | 24                            | 0                       | 0,01     | 0         |
|                                                  | 48                            | 0                       | 0        | 0         |
|                                                  | 168                           | 0                       | 0        | 0         |

## 5.2. Grafy

Graf 1: Suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) elicitovaná 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidem.



Graf 2: Suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) elicitovaná 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidem.



## 6. DISKUSE

Jetel luční (*Trifolium pratense* L.) je používán jako hospodářská plodina a má dlouhou tradici v přírodním lidovém léčitelství. V současné době si získává pozornost díky perspektivnímu využití v léčbě rakoviny prsu, vaječníků, prostaty a lymfatických uzlin. Také proti příznakům provázejícím menopauzu a snižuje riziko vzniku osteoporózy. [1] Hlavní isoflavonoidy, které mají tento vliv, jsou genistein, daidzein, genistin, formononetin, biochanin A. Kultura *Trifolium pratense* L. produkuje tyto isoflavonoidy ve velmi malém množství, a proto byla snaha zvýšit jejich produkci působením elicitoru.

U rostlinných kultur *in vitro* jsou v poslední době testovány jako potenciální elicitory také některé nově syntetizované chemické látky, např. alkylsulfanylderiváty pyridinu - slibná potencionální antituberkulotika. [52] 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4- karbothioamid připravený jako antimykobakteriální nebo antifungální sloučenina inhibuje fotosyntézu v chloroplastech špenátu. [50] Působení tohoto syntetického derivátu na rostlinný metabolismus bylo stimulem pro sledování jeho elicitálního účinku na produkci flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L, což bylo cílem této práce.

Úspěšná elicitace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor a pro každou explantátovou kulturu. V této práci byla sledována koncentrace a doba působení elicitoru. Koncentrace byly zvoleny v rozmezí koncentrací ( $1\ \mu\text{mol l}^{-1}$ ,  $10\ \mu\text{mol l}^{-1}$ ,  $100\ \mu\text{mol l}^{-1}$ ) obvykle používaných u tohoto typu elicitoru. [50,52,57] Doby působení elicitoru vycházely z poznatků již provedených pokusů a z publikovaných údajů. [52,58,59]

Nejprve byl zjišťován vliv pyridinového derivátu na produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8). Z výsledků (Tabulka 1) je zřejmé, že všechny použité koncentrace elicitoru měly pozitivní elicitální účinek. U nejslabší koncentrace  $1\ \mu\text{mol l}^{-1}$  byla nejúčinnější 6hodinová aplikace elicitoru, zatímco delší působení (48 a 168 hodin) způsobilo snížení produkce. Silnější koncentrace  $10\ \mu\text{mol l}^{-1}$  a  $100\ \mu\text{mol l}^{-1}$  produkci ve všech sledovaných časových intervalech zvýšily. Maximální obsah flavonoidů (0,137

%) byl zjištěn po 48hodinovém působení nejsilnější koncentrace elicitoru  $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ , kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 93 % oproti kontrole.

U variety Tempus (Tabulka 2) všechny koncentrace elicitoru ve všech sledovaných časových intervalech (s výjimkou 6hodinové aplikace koncentrace  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) produkci zvýšily. Nejlepší elicitální účinek byl prokázán u všech koncentrací opět po 48hodinové aplikaci elicitoru. Maximální obsah flavonoidů (0,113 %) byl stanoven po 48hodinové aplikaci koncentrace  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ , což představuje statisticky významné zvýšení produkce v porovnání s kontrolou o 438 %.

Porovnáme-li výsledky u obou sledovaných variet, je možné uvést, že 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid produkci flavonoidů ovlivnil pozitivně. Nejlépe lze hodnotit jeho 48hodinovou aplikaci. Nižší elicitální účinek elicitoru u variety DO-8 lze pravděpodobně vysvětlit poměrně vysokou produkcí u této kontrolní kultury. Proces elicitace má totiž pozitivní vliv, především na ty kultury, u nichž jsou výchozí hladiny sekundárních látek nízké.

Dále byl sledován vliv zkoušeného elicitoru na produkci isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* (varieta DO-8 a varieta Tempus). Z výsledků shrnutých v tabulce 3 a 4 vyplývá, že sledovaná elicitace nebyla úspěšná. U variety DO-8 pouze po 168hodinové aplikaci nejsilnější koncentrace elicitoru byl zjištěn nízký obsah genistinu a daidzeinu, který v kontrolní kultuře prokázán nebyl. U variety Tempus byl pozitivní vliv elicitace zaznamenán jen u genistinu po 6hodinové aplikaci koncentrace elicitoru  $1$  a  $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

Z uvedeného je zřejmé, že u sledované suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. je produkce isoflavonoidů nízká. Jedním z důvodů může být to, že se jednalo o rychle rostoucí suspenzní kulturu, a ta většinou akumuluje jen malé množství metabolitů. Produkci však může zvýšit vliv určitého stresu – např. snížení koncentrace živin v roztoku, vynechání růstového regulátoru nebo aplikace elicitoru do média, což se u sledovaného elicitoru potvrdilo pouze u produkce flavonoidů.

Tento syntetizovaný 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid byl testován jako potenciální elicitor biosyntézy isoflavonoidů a flavonoidů také u nově odvozené suspenzní kultury jetele lučního. Zde došlo k pozitivnímu ovlivnění produkce obou sledovaných sekundárních metabolitů. [54]

Také u jiných nově syntetizovaných chemických látek byl prokázán silný elicitální účinek a bylo zjištěno, že vyvolávají obranné rostlinné reakce, včetně zvýšení koncentrace peroxidu vodíku a v menší míře i ostatních aktivních forem kyslíku a aktivace enzymu fenylalaninamoniaklyázy. Například v suspenzní kultuře *Taxus chinensis* substituované benzothiodiazoly způsobily téměř 40% nárůst produkce taxinu C v porovnání s dříve často používaným elicitorem methyljasmonatem. [57] Podobně také fluorované deriváty kyseliny jasmonové [49] a chlorované pyridinové deriváty lze hodnotit jako vhodné chemické indukční signály biosyntézy taxinů. [50] Další nově syntetizované látky typu substituovaných pyrazin-2-karboxamidů použité jako elicitory u kalusových a suspenzních kultur *Ononis arvensis*, *Silybum marianum* a *Genista tinctoria* významně ovlivnily produkci flavonoidů, isoflavonoidů a flavolignanů. Nejvyšší zvýšení produkce flavonoidů o 900 % bylo zjištěno u kalusové kultury *Ononis arvensis*. [52,60,61]

Také výsledky našeho experimentu naznačují, že sledovaný elicitor 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamid ovlivňuje produkci flavonoidů a isoflavonoidů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L. pozitivně. Což znamená, že vede ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů.

## 7. ZÁVĚR

Výsledky této práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Maximální obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) vyvolala 48hodinová elicitace 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  roztokem 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 93 % oproti kontrolní kultuře.
- 2) Maximální obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) vyvolala 48hodinová elicitace 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  roztokem 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 438 % oproti kontrolní kultuře.
- 3) Pomocí metody HPLC bylo zjištěno, že explantátová kultura *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8 a Tempus) obsahují isoflavonoidy: genistin a daidzein. Biotická elicitace roztokem 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu tuto produkci nijak zvlášť neovlivnila. U variety DO-8 pouze po 168hodinové aplikaci nejsilnější koncentrace elicitatoru byl zjištěn nízký obsah genistinu a daidzeinu, který v kontrolní kultuře prokázán nebyl. U variety Tempus byl pozitivní vliv elicitace zaznamenán jen u genistinu po 6hodinové aplikaci koncentrace elicitatoru 1 a 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ .

## **8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

**CHS** – chalkonsyntáza

**C4H** – cinamát-4-hydroxyláza

**CHI** – chalkonisomeráza

**CHR** – chalkonreduktáza

**4CL** – 4-kumaryl –CoA ligáza

**DFR** – dihydroflavonol-4-reduktáza

**DMID** – 7,2'-dihydroxy -4'-methoxyisoflavanol dehydratáza

**F3H** – flavanon 3-hydroxyláza

**FSI** – flavon syntáza I

**FSII** - flavon syntáza II

**F3'H** – flavonoid 3-hydroxyláza

**F3',5'H** – flavonoid 3',5'-hydroxyláza

**IFD** – isoflavon syntáza

**LDOX** – leukoanthokyanidindioxogenáza

**LCR** – leukoanthokyanidin reduktáza

**OMT** – *O*-methyltransferáza

**PAL** – fenylalaninamoniak lyáza

**RT** – rhamnosyl transferáza

**STS** – stylbensyntáza

**UFGT** – **UDPG**-flavonoidglukosyl tranferáza

**VR** – vestiton reduktáza

**EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina



**2,4-D** - 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina

**2,4,5-T** - 2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina

**IAA** - indolyl-3-octová kyselina

**IBA** - indolyl-3-máselná kyselina

**MCPA** - 2-metyl-4-chlorfenoxyoctová kyselina

**NAA** - 1-naftyloctová kyselina

**NOA** - 2-naftyloxyoctová kyselina

**BAP** - 6-benzylaminopurin

**2iP (IPA)** - [N6-(2-isopentyl)adenin]

## 9. LITERATURA

1. Janča, J., Zentrich, J. A.: *Herbář léčivých rostlin 2. díl*, Eminent, Praha 1995, s. 144
2. Pilát, A., Ušák, O.: *Atlas rostlin*, SPN, Praha 1964, s. 37
3. Aichele, D., Golteová – Bechtleová, M.: *Co tu kvete?*, Ikar, Bratislava 2005, s. 258
4. Slavík, B. et al.: *Květena české republiky*, Academia, Praha 1995, s. 474
5. Dostál, J.: *Nová květena*, Academia, Praha, 1989, s. 560
6. Melicharová, E., Potrusilová, D.: *Farmakognozie*, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno 1993, s. 22, 23
7. Kresánek, J., Krejča, J.: *Atlas léčivých rostlin a lesných plodov*, Osveta, Martin 1988, s. 96, 97
8. Novotný, R.: *Naše léčivé byliny v lékařství*, Alois Koníček, Praha 1944, s. 60
9. Zdražilová, L.: *Biotická elicítace explantátové kultury *Trifolium pratense* L.*, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2009, s. 12.
10. Sikyta, B., Dušek, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha 1992, s. 75-83
11. Pierik, R. L. M.: *In vitro culture of higher plants*, Martinus Nijhoff Publisher, Wageningen 1987, s. 54-82
12. Dodds, J. H., Roberts, L. W.: *Experiments in plant tissue culture*, Cambridge university press, Cambridge 1985, s. 35-42
13. Bhojwani, S. S., Razdan, M. K.: *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Elsevier Science B.V., Amsterdam 1996, s. 41-52
14. Vašíčková, Š.: *Genetická diverzita ex situ a in situ genetických zdrojů vybraných léčivých rostlin*, Disertační práce, Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha 2011, s. 20-22.
15. Götzová, I.: *Opylování a opylovači nadčeledi včel (Apoidea, Hymenoptera) čeledi Fabaceae se zaměřením na rody Lotus, Melilotus, Trifolium*, Diplomová práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2010, s. 15, 16.
16. Procházka, S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha 1998, s. 412, 424, 425.

17. Šrámek, J.: *Léčivé rostliny, jejich hnojení a ošetření elicitory s cílem maximální produkce některých účinných látek*, Diplomová práce, Jihočeská Univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice 2007, s. 28-39.
18. Protivová, V.: *Flavonoidy a jejich role ve vývoji rostlin*, Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2006, s. 7-13.
19. Pičmanova, M.: *Isoflavonoidy v nebobovitych rostlinách: fytochemie, biologické funkce a molekulární biologie*, Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta Praha 2008, s. 10-14.
20. Magdechová, A.: *Možnosti identifikace flavonoidu v environmentálních matricích*, Bakalářská práce, Vysoké učení technické, Chemická fakulta, Brno 2009, s. 7-9.
21. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S.: *J. Agricul. Food Chem.*, 99, 191 (2006).
22. Klejdus, B.: *Separace a identifikace isoflavonoidů v rostlinném materiálu*, Habilitační práce, Palackého univerzita, Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2004, s. 7-9.
23. Martináková, Z.: *Stanovení antioxidační aktivity fenolických látek v pivu*, Bakalářská práce, Univerzita Pardubice, Pardubice 2009, s. 15, 16.
24. Mulabagal, V., Tsay, H. S.: *Int. J. Appl. Sci. Eng.*, 2, 29 (2004).
25. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: *Exp. Cel. Res.*, 50, 151 (1968).
26. Siatka, T. et al.: *Chem. Listy* 105, 367 (2011).
27. Kaur, N., Murphy, J. B.: *Plant Mol. Biol. Biotechnol* 3, 1 (2012).
28. Akiyama, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 262, 5592 (1987).
29. Boros, L. G. et al.: *Pancreas*, 22, 1 (2001).
30. Del Giorno, C. et al.: *Rev. Assoc. Med. Bras.*; 56, 558 (2010).
31. Han, R. M. et al.: *J. Agricul. Food Chem.*, 57, 3780 (2009).
32. Tice, J. A. et al.: *JAMA*, 290, 207 (2003).
33. Kolektiv autorů: *Český lékopis 2009*, Grada, Praha 2009, s. 114, 1801
34. Rijke, E., et al.: *Anal. Chim. Acta.*, 468, 3 (2002).
35. Klemera, P., Klemmerová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacii*, Karolinum, Praha 1993, s. 30, 80
36. <http://aplikacergsg.sci.muni.cz/teorie/sluzby> (5. 4. 2012)
37. <http://www.pbsoft.wz.cz/soubory/programy/statisti/help/vzorce.html> (5. 4. 2012)
38. [http://gymnazium.milevsko.cz/ruzne/maturita\\_ikt\\_11/variabilita.html](http://gymnazium.milevsko.cz/ruzne/maturita_ikt_11/variabilita.html) (5. 4. 2012)

39. McCue, P., Shetty, K.: *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 4, 361 (2004).
40. <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/arvores-cacaueiro/arvores-cacaueiro-3.php> (6. 4. 2012)
41. Crozier, A., Clifford, N. M., Ashihara, H.: *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell Publishing Ltd, United Kingdom 2006, s. 3,11-14, 17,18
42. Cederroth, Ch. R., Nef, S.: *Mol. Cell. Endocrin.*, 304, 30 (2009).
43. [http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol\\_id=7812](http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7812) (8. 4. 2012)
44. [http://en.wikipedia.org/wiki/Biochanin\\_A](http://en.wikipedia.org/wiki/Biochanin_A) (8. 4. 2012)
45. Kováč J.: *Explantátové kultury rostlin*, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1995, s. 1-3, 13-21
46. Kašparová, M. et al.: *Čes. Slov. Farm.*, 55, 44 (2006).
47. Biederberg, R., Reichling, J.: *Biologie*, 3, 188 (1989).
48. Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R.: *Biotech. Advan.*, 23, 283 (2005).
49. Qian, Z. G. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 98 (2005).
50. Qian Z. G et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 164 (2006).
51. Tůmová, L., Tůma, J., Doležal, M., Danielová, B.: *Čes. Slov. Farm.*, 59, 117 (2010).
52. Tůmová, L., Tůma, J., Megušar, K., Doležal, M.: *Molecules*, 15, 331 (2010).
53. Klimešová, V. et al.: *Eur. J. Med. Chem.*, 34, 433 (1999).
54. Kašparová, M., Siatka, T., Klimešová, V., Dušek, J.: TSWJ, 2012, ID 746412, 5 stran
55. Ištváněk, J.: *Molekulární genetiky rezistence k chorobám u Hordeum vulgare.*, Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2009, s. 5, 6.
56. Psočková, R.: *Lokalizace nových genů rezistence k Blumeria graminis f. sp. hordei u Hordeum vulgare pomocí DNA markerů*, Diplomová práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2007, s. 6-8.
57. Xu, Y. et al.: *J. Agricul. Food Chem.* 54, 8793 (2006).
58. Goral, S., Ramawat, K. G.: *Ind. J. Biotechnol.* 7, 378 (2008).
59. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.* 56, 225 (2007).
60. Doležal, M. et al.: *Molecules* 12, 2589 (2007).
61. Tůmová, L. et al.: *Acta. Physiol. Plant.* 27, 357 (2005).

## 10. ABSTRAKT

Veronika Machová

### Účinek derivátů 2-benzylthiopyridin-4-karbothioamidu na akumulaci isoflavonoidů a flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L.

V této práci byl sledován vliv tří koncentrací 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu na produkci flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8, varieta Tempus).

Kultury byly kultivovány při teplotě 25° C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma na živném médiu podle Gamborga s přidavkem 2 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 2 mg·l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinu. U elicitovaných i kontrolních vzorků bylo provedeno fotometrické stanovení flavonoidů podle Českého lékopisu 2009 a stanovení isoflavonoidů metodou HPLC.

Z výsledků vyplývá, že maximální obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) vyvolala 48hodinová elicitace 100 μmol l<sup>-1</sup> roztokem 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 93 % oproti kontrolní kultuře. Maximální obsah flavonoidů u variety Tempus vyvolala 48hodinová elicitace 10 μmol l<sup>-1</sup> roztokem 2-(2-fluor-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridin-4-karbothioamidu, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 438 % oproti kontrolní kultuře. Vliv tohoto elicitoru na produkci isoflavonoidů nebyl nijak významný.

**Veronika Machová**

**Effect of 2-benzylthiopyridine-4-carbothioamide derivatives on isoflavonoids and flavonoids accumulation in suspension culture of *Trifolium pratense* L.**

The paper examine the effect of three concentration of 2-(2-fluoro-6-nitrobenzylsulfanyl) pyridine-4-carbothioamide on the production of flavonoids and isoflavonoids by the *Trifolium pratense* L. (variety DO-8, variety Tempus).

The culture were cultivated in the Gamborg nutrient media with addition of  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid a  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  6-benzylaminopurine, at the temperature of  $25^\circ\text{C}$ , 16-hr light/8-hr dark period. The elicited and the inspection samples underwent the photometric determination of flavonoids in accordance with the Czech Pharmacopoeia 2009 and the determination of isoflavonoids via the HPLC method.

The results show that the maximum content of flavonoids in suspension cultures of *Trifolium pratense* L. (variety DO-8) was caused by 48-hour elicitation by  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  solution of 2-(2-fluoro-6-nitrobenzylsulfanyl) pyridine-4-carbothioamide, when the a statistically significant increase in production was 93% compared to control cultures. The maximum content of flavonoids in variety Tempus was caused by 48-hour elicitation by  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  solution of 2-(2-fluoro-6-nitrobenzylsulfanyl) pyridine-4-carbothioamide, when a statistically significant increase in production was 438% compared to control cultures. The elicitation effect on the production of isoflavones was not at all significant.