

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Explantátová kultura *Trifolium pratense* L.

Jana Šnajdrová

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

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

Oponent:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

Hradec Králové

15. května 2006

Děkuji PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení v celém průběhu zpracovávání diplomové práce. Zároveň děkuji za poskytnutí literárních podkladů a také mnohých cenných rad a připomínek.

1. ÚVOD

Kultivaci rostlinných tkání a buněk v podmínkách *in vitro* je věnována v posledních letech stále větší pozornost. Explantátové kultury byly zprvu pouze vědeckým experimentem, dnes jsou perspektivním zdrojem pro produkci sekundárních metabolitů a používají se v rozmnožování a šlechtění rostlin. Získávání obsahových látek prostřednictvím kalusové kultury má mnohé výhody a některé z těchto látek jsou využívány ve farmacii, kosmetice či parfumerii, diagnostice a dalších odvětvích. I přes mnohá pozitiva této produkce zůstává stále náročné založit a udržovat tyto kultury, neboť jejich růst stejně jako produkce obsahových látek je ovlivněna řadou faktorů. Přesto je možné díky pravidelnému pasáží za splnění určitých nároků udržovat kultury v podmínkách *in vitro* neomezeně dlouho. Zřejmý je stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s širokým spektrem biologických účinků těchto látek [1-7].

Velmi nadějným zdrojem těchto sekundárních metabolitů je jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*), k jehož dalším obsahovým látkám patří např. třísloviny, kumariny, saponiny, kyanogenní glykosidy, fenolické glykosidy. Je používán v lidovém léčitelství, například zevně jako kožní dezinficiens na ekzémy nebo ve formě nálevu k úpravě stolice při průjmech a jako expektorans. Dále je také významnou hospodářskou plodinou. Jetel je v poslední době předmětem mnohých studií snažících se objasnit přínos podávání extraktů z drogy u žen v postmenopauzálním období. Pozitivní působení zatím nebylo jednoznačně potvrzeno. Na straně jedné některé studie dokazují ústup symptomů jako návaly, noční pocení a také příznivé účinky na redukci kostní hmoty a hladinu lipidů, jiné studie tyto účinky u postmenopauzálních žen neprokázaly [8-11].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo seznámit se s metodikou kultivace rostlinných explantátových kultur, odvodit kalusovou kulturu z klíčící rostliny čtyř odrůd *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8, DO-9, Tempus, Sprint), optimalizovat živné médium a na základě růstové a produkční charakteristiky stanovit vhodný subkultivační interval pro kultivaci této kultury.

3. TEORETICKÁ ČÁST

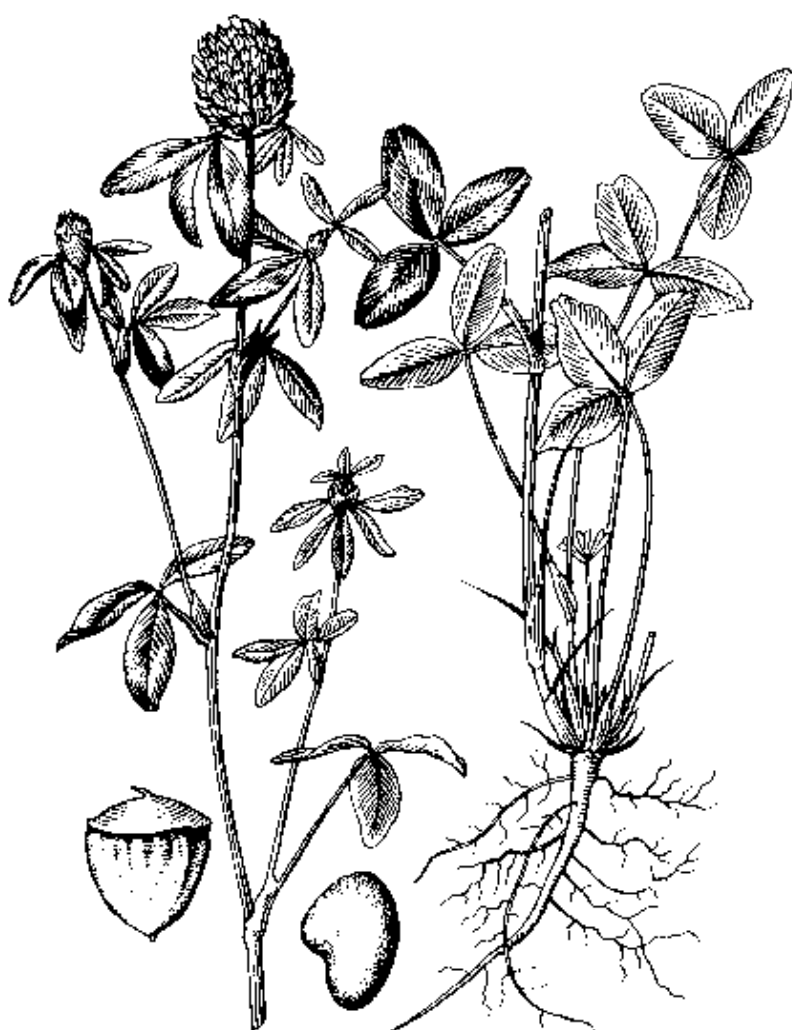
3.1. Jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*)

3.1.1. Popis rostliny, výskyt

Trifolium pratense je ve své anatomické stavbě velmi proměnlivý druh. Odlišnosti nacházíme ve vzrůstu rostlin, odění lodyh a dále u palistů podpůrných listů. V ČR se na celém území vyskytuje velmi hojně, od nížin po horské oblasti. Rozšířen je téměř po celé Evropě. Zavlečený, zdomácnělý a pěstovaný je ve východní Asii, severní a jižní Americe, v Austrálii, na Novém Zélandu a v jižní Africe. V některých oblastech vytváří morfologicky diferencované rasy, označované obvykle jako subspecies nebo variety [12-14].

Je to vytrvalá (u některých kulturních forem jen 2 až 3letá) bylina s mohutným kořenovým systémem, jehož základem je silný křivý kořen sahající i přes 60 cm do půdy. Z trsnatého oddenku bez výběžků vyrůstá přizemní růžice listů. Lodyhy mající 3-5 článků jsou přímé, vystoupavé až poléhavé, jednoduché nebo spoře rozvětvené, 20 až 50 cm vysoké, většinou trochu hranaté. Jsou bělavě chlupaté nebo téměř lysé, často načervenalé. Listy jsou trojčetné střídavé, spodní dlouze řapíkaté, hořejší s řapíky kratšími až přisedlé, s palisty. Listy jsou složeny z lístků v průměru 7-15×15-30 mm velikých, téměř celokrajných, obvejčitých až široce okrouhlých, na líci lysých a s příčnou bělavou nebo červenohnědou skvrnou ve tvaru půlměsíce. Na spodní straně jsou přisedle chlupaté a na okraji brvité. Palisty má vejčité kopinaté, ostře špičaté, s řapíkem listu vysoko srostlé a vně chlupaté. Na stonku vyrůstají hlávkovitá květenství měřící v průměru 2 až 3 cm, přičemž na jedné lodyze bývají 1-3 květenství rozmístěná tak, že postranní vyrůstají v paždí listů a hořejší je zdánlivě vrcholové. Jsou kulatá nebo vejčitá, polozakrytá velkými palisty podpůrných listů. Tato květenství se skládají z drobných, červených, karmínově růžových nebo řidčeji vybledlých až bílých kvítků v počtu 30 až 60. Pětčetné 13 až 18 mm dlouhé oboupohlavné kvítky jsou přisedlé, bez listenců, přímé, složeny z

desetižilného kalichu a ze spodu srostlé motýlovité koruny. Kalich je tvaru trubkovitě zvonovitého, zbarvený bělozeleně nebo načervenalé, vně je krátce chlupatý a má dolní zub delší. Koruna má horní plátek (pavéza) delší než oba postranní plátky (křídla) a ty jsou delší než dva spodní srostlé v tupý člunek. Plodem je nepukavý, vejčitý, tence blanitý, jednosemenný lusk otevírající se víčkem. Semena jsou nesouměrně srdcovitá, hladká, lesklá, zploštělá, žlutá až pískově hnědá o rozměrech 1,5-2,0 mm x 1,2-1,5 mm. Mají zřetelně vyznačenou rýhu [8,12,13,15,16].



Jetel luční roste na loukách, v příkopech, na okrajích lesů či ve světlých lesích a je rovněž pěstován na polích jako hospodářská plodina v různých vyšlechtěných odrůdách. Poskytuje píci bohatou bílkovinami a minerálními látkami. Roste v mírně vlhkém prostředí, nesnáší sucho, ale ani příliš velké vlhko. Je to významná medonosná rostlina. Opylení obstarávají hlavně čmeláci a někteří motýli, neboť ostatní hmyz má většinou kratší sosák, než je zapotřebí [8,12-16].

3.1.2. Odrůdy

V České republice nacházíme tři poddruhy, které bývají někdy hodnoceny jako odrůdy. Radíme tam *Trifolium pratense subsp. pratense*, vytrvalá bylina s významem léčivé rostliny; *subsp. sativum*, většinou 2-3letá bylina, která je významnou hospodářskou plodinu a *subsp. americanum*. Tento posledně jmenovaný vytrvalý poddruh k nám byl dovezen v 80. letech 19. století, ale od jeho pěstování bylo později upuštěno[12].

3.1.3. Sběr, úprava, použití

Trifolium pratense kvete od května do října. Jako droga se používají nerozpadlé hlávky – *Trifolii pratensis flos*. (Droga není oficiální v ČL 2002 ani v jeho Doplnčích.) Sbírají se v počátku květu. Odkvétající droga je méně hodnotná, jelikož hlávky při sušení hnědnou a rozpadají se. Droga se suší rychle v tenkých vrstvách. Je možno ji na jeden den vystavit přímému slunci a poté ji dosušit na stinném a vzdušném místě. Pokud sušíme umělým teplem, pak by neměla být teplota sušení větší než 35°C. Poměr seschnutí se udává asi 6:1. Během skladování je třeba drogu chránit před vlhkostí a světlem, neboť je značně náchylná ke změně kvality. Kvalitní droga si zachovává původní barvu, případně nepatrně ztmavne, barva se ale nesmí změnit do rezavé [8,16-19].

Užívá se v lidovém léčitelství proti průjmům, jako expektorans při bronchitidě, při revmatismu, na oteklé lymfatické žlázy a při cukrovce; zevně pak např. ve formě koupelí jako kožní dezinfekce na exémy a hnisavé rány, rovněž i k léčbě lupénky. Nejčastěji se užívá ve formě nálevu [8,10,11]. Dnes se užívá i jako korigens chuti a vůně do čajových směsí. Je součástí mnohých potravních doplňků na zmírnění projevů menopauzálních potíží. Mladý jetel je možno podobně jako špenát používat i jako zeleninu bohatou na vlákninu [13,16].

3.1.4. Obsahové látky

Spektrum obsahových látek je poměrně široké. Zahrnuje flavonoidy, isoflavonoidy, třísloviny, saponiny, kumariny, kyanogenní glykosidy, fenolické glykosidy, organické kyseliny, minerální kyseliny, barviva, silice, salicyláty, β -sitosterol, cholin, lecitin, vitaminy (vitamin A, C, B-komplex), vápník, hořčík, železo.

Z hlediska využití *Trifolium pratense* v terapii se jeví jako nejzajímavější skupina isoflavonoidů zahrnující biochanin A a formononetin, které jsou v jeteli zastoupeny nejvíce, a dále daidzein, genistein, genistin, koumestrol, ononin, trifoliol [11,20].

3.1.4.1. Flavonoidy

V dnešní době známe více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny tohoto typu.

Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany). Nejčastěji se vyskytují flavany, méně často isoflavany; neoflavany se vyskytují vzácně a jsou bez terapeutického významu. Všechny tři kruhy bývají hydroxylovány a methoxylovány, jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Právě podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavonoidy dělí do několika skupin (flaveny, flavany,

flavanoly, flavandioly, flavony, flavonoly flavanony, flavanonoly). Flavonoly jsou nejhojnější skupinou flavonoidů zastoupených v ovoci a zelenině, nejběžnějšími zástupci jsou potom kvercetin a kemferol. V rostlinách se flavonoidy vyskytují většinou glykosidně vázané, rozpuštěné v buněčné šťávě vakuoly. Lipofilnější methoxylované deriváty se nacházejí v silicích. V rostlinách se pravděpodobně účastní oxidačně-redukčních pochodů a chrání je tak před volnými radikály. Další funkcí flavonoidů v rostlinách je vábení opylovačů a ochrana před UV zářením.

Aglykony flavonoidních glykosidů vznikají dvěma hlavními cestami. Šestiuhlíkový fragment je odvozen z acetátového metabolismu a zbývající devíti-uhlíkatá část z kyseliny šikimové. Meziproduktem biosyntézy je patnácti-uhlíkatý chalkon (vzniklý z kyseliny skořicové a tří molekul acetátu), který je přetvářen na flavanon a tak dává základ i dalším strukturám flavonoidů.

Účinné jsou glykosidy i aglykony. Mohou se používat v čistém stavu, častěji ale jako drogy nebo extrakty. Terapeutické využití je založeno na schopnosti flavonoidů normalizovat permeabilitu kapilár a odstraňovat jejich lomivost. Působí tak antihemorhagicky a antiedematózně (P vitamínový účinek). Jsou inhibitory řady enzymů včetně hyaluronidázy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi a mohou být tedy podpůrnými prostředky při léčení infekčních nemocí. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy a snižují krevní tlak. Potencují účinek vitamínu C. Mají i aktivitu hepatoprotektivní, spasmolytickou, hypocholesterolemickou, antibakteriální a antivirovou. S Ca^{2+} ionty tvoří komplexní soli a brání tímto mechanismem srážení krve a zadržují vápník v těle.

Flavonoidy představují významný prvek antioxidačního systému. Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na strukturních aspektech molekuly, zejména počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace. Optimální radikálově likvidační vlastnosti byly nalezeny pro o-dihydroxy strukturu v kruhu B, 2,3 dvojnou vazbu a 4-oxo funkční skupinu v kruhu C a 3 a 5-hydroxyskupiny na kruzích A a C. Tuto strukturu mají právě flavonoly. Zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační ionty (železo, měď). Flavonoidy vzhledem k této aktivitě mohou významným způsobem působit při prevenci chorob, na nichž se významným způsobem podílí oxidační poškození biologických struktur (ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění). Vhodný způsob stravování a příjem

potravin s vyšším obsahem flavonoidů by mohl pomoci při léčbě těchto chorob a jejich předcházení [21,22,23].

3.1.4.2. Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou odvozené od 3-fenylchromanu, jeví tedy podobnost s flavonoidy (deriváty 2-fenylchromanu), ke kterým jsou také jako zvláštní skupina řazeny. U rostlin jsou ale na rozdíl od flavonoidů mnohem méně zastoupeny. To je dáno přítomností specifického enzymu zodpovědného za přeměnu 2-fenylchromanového cyklu na 3-fenylchroman. Isoflavonoidy jsou tak téměř specifickými obsahovými látkami čeledi *Fabaceae*. Vzácně je lze nalézt i v některých dalších čeledích, jako například *Iridaceae*, *Myristicaceae*, *Rosaceae* [24,25].

Nejčastěji se vyskytující skupinou těchto sekundárních metabolitů rostlin jsou isoflavony, které se v rostlině nacházejí častěji ve volné formě a méně často glykosidicky vázané. Nejvýznamnějšími zástupci z více než 360 zatím popsáných isoflavonů jsou genistein, daidzein, formononetin a biochanin A [25].

O významu isoflavonoidů v rostlině se zatím příliš neví. Pravděpodobně jsou produkovány jako odpověď na infekci patologickým agens (fytoalexiny) a mohou tak představovat jeden z obranných mechanismů rostliny [24]. Isoflavonoidy lze izolovat z většiny rostlinných tkání; v klíčcích, mladých výhoncích a pupenech se vyskytují více. Z toho se usuzuje, že by mohly zasahovat do regulace fyziologických procesů důležitých pro rostlinný růst [26,27].

Nejvýznamnějším zdrojem isoflavonoidů je sója a sojové produkty. Ostatní luštěniny (fazole, hrách) tyto látky obsahují také, v kvantitativním vyjádření je jich zde ale mnohem méně [25]. Dále byly nalezeny v olejnatých semenech, obilninách, ovoci, zelenině, kávě nebo čaji [28].

Isoflavony patří k nejvýznamnějším představitelům tzv. fytoestrogenů. Jsou to rostlinné látky, které přestože nemají steroidní strukturu, vyznačují se slabými estrogenními účinky [29]. Někdy se také označují jako selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERM). Působí tedy jako slabé estrogény, ovšem zároveň

mohou narušovat funkci endogenních receptorů v lidském organismu, vykazují tedy i estrogen antagonistický účinek. Dnes rozlišujeme dva typy estrogenních receptorů (ER); ER- α – nachází se převážně v děloze, mléčných žlázách a hypofýze a ER- β – exprimován v řadě tkání jako například v mozku, kostech, močovém měchýři a thymu [29-32]. Při působení na tkáň se u isoflavonů uplatňuje poněkud slabší vazba na estrogenní receptory ER- β v důsledku strukturní podobnosti s endogenním 17 β -estradiolem, který ale sám působí převážně na ER- α receptorech [33-37].

Isoflavonoidy mohou zasahovat do dalších procesů pomocí mechanismů jako inhibice tyroxinkinas, ovlivnění hladiny lipidů, syntézy proteinů, angiogeneze a buněčné apoptózy. Významné jsou i vzhledem k fenolickému charakteru molekuly účinky antioxidační, antialergické, antibakteriální [25,28,29].

3.2. Rostlinné explantáty

První pokusy zabývající problematikou rostlinných explantátů, provedl Haberlandt (1902), který bohužel pracoval s diferencovanými buňkami. Negativní výsledky jeho pokusů vedly k různým modifikacím média a podmínek kultivace. Teprve volba meristemických buněk místo vysoce diferencovaných dala pozitivní výsledky. První Hannig (1904) a až dlouho po něm další - Dietrich (1924), Thukey (1933) úspěšně kultivovali rostlinná embrya. První neomezeně rostoucí kalusové kultury odvodili z kambia Nobecourt (1937) a Gautheret (1938). Těchto výsledků dosáhli nezávisle na sobě.

V 50. letech došlo k vývoji aparatur. Byly používány různé druhy třepaček (Muir - 1954), White (1953) vyvinul roler, Nickell a Tulecke (1960) pracovali se suspenzemi rostlinných buněk ve fermentačních aparaturách [38].

Na počátku byly rostlinné kultury *in vitro* pouze vědeckým experimentem, v současné době je tato metoda využívána k produkci sekundárních metabolitů a ve šlechtitelství.

3.2.1. Obecná charakteristika

Rostlinný explantát - každý fragment živého pletiva, orgán nebo komplex orgánů, odebraný buď z intaktní rostliny nebo z již existující kultury s cílem pěstovat jej v podmínkách *in vitro*

Intaktní rostlina - původní rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách

Kultivace *in vitro* - pěstování rostlinného materiálu v podmínkách co nejúplněji definovatelných po stránce chemické i fyzikální a zabraňujících nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organizmy a buňkami

Kultura rostlinných explantátů - rostlinné explantáty pěstované po určitou dobu v podmínkách *in vitro*. Kultury rostlinných explantátů lze podle morfologické charakteristiky zařadit do některé z následujících pěti kategorií:

1. Kultura orgánová - orgánové systémy, orgány resp. jejich základy nebo části pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje diferenciaci a částečně zachovává i jejich stavbu a funkci

2. Kultura tkáňová - do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně, pomnožované buď na polotuhých či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě

3. Kultura suspenzní - volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendovány v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované

4. Kultura buněčná - volné jednotlivé buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotekuté půdě nebo na nosiči nasyceném živnou půdou

5. Kultura protoplastů - kultura buněk zbavených buněčných stěn, kde buněčný obsah je obalen jen pružnou elastickou plasmalemou

Primární explantát - rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny

Primární kultura - kultura primárních explantátů

Subkultivace, pasážování - přenos celé kultury nebo její části (**inokula**) do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat nebo zesílit růst kultury

Rozpadavost kultur - schopnost tkáňových či suspenzních kultur spontánně se rozpadat na buněčné shluky a volné buňky, schopné dalšího růstu, resp. pomnožování

Kalus, zával - v původním významu neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny, v přeneseném významu pletivo, které vzniká na povrchu nenádorových primárních explantátů a je schopné subkultivace

Kalusová kultura - kultura kalusu *in vitro* [38,39] .

3.2.2. Vlastnosti rostlinných kultur

- Rostlinné kultury lze odvodit z buňky či komplexu buněk pletiva kteréhokoliv orgánu rostlinného těla (s výjimkou některých velmi specializovaných buněk, např. sítkovice, sklereidy).
- Kulturu lze za vhodných kultivačních podmínek pěstovat *in vitro* neomezeně dlouho.
- Tkáňová a suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje, ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter, není však homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciaci.
- Suspenzní kultury, které lze z tkáně pěstované na pevné půdě získat buď enzymovým rozvolněním (např. pomocí pektináz) nebo mechanickou cestou, jsou tvořeny jednotlivými buněčnými shluky různé velikosti, jejichž tvorbu se dosud nepodařilo vyloučit; rozpadavost kultury je zřejmě geneticky podmíněna a lze ji ovlivnit složením média a kultivačními podmínkami.
- Buňky tkáňových ani buněčných kultur nejsou schopny tvořit jednovrstevnou kulturu (monolayer), neuchycují se na tuhé ani polotuhé podklady.
- Řada rostlinných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách.
- Vhodnou kombinací růstově aktivních látek a ostatních složek kultivačního média lze v kulturách indukovat histogenezi nebo organogenezi, takto je možné odvodit z jediné somatické buňky životaschopnou rostlinu [39].

3.2.3. Kultivace rostlinných kultur *in vitro*

3.2.3.1. Odvození kalusové kultury

Odvození kalusové kultury je obtížným úsekem experimentu. Cílem práce je získat sterilní rostlinný materiál, u něhož by nedošlo k poškození meristematických pletiv. V případě, že se nepodaří dosáhnout požadované sterility výchozího materiálu, dochází k plesnivění kultury a tím k jejímu znehodnocení.

Prvním krokem je výběr vhodné matečné rostliny a odvození primárního explantátu. Nejlepších výsledků je dosahováno, je-li explantát odebrán z rostliny

v aktivní fázi růstu nebo ze zásobních orgánů. Před vlastní explantací je nutné rostlinu pěstovat v aseptických podmínkách nebo povrchově sterilizovat. Redukci počtu mikroorganismů napomáhá oplachování rostlin pod tekoucí vodou. Je vhodné přidat detergent, protože zlepšuje smáčivost povrchu a zvyšuje účinek dezinfekčních činidel. Při sterilizaci by měl dezinfekční roztok usmrtit všechny mikroorganismy přítomné na povrchu explantované části rostliny a přitom nepoškodit vlastní explantát. Nejpoužívanějšími desinfekčními činidly jsou roztok chloraminu B (1-10 %), ethanol (70-95 %), peroxid vodíku (3-12 %), dusičnan stříbrný (1 %) atd. Po sterilizaci je třeba zbytky činidel dokonale opláchnout sterilní destilovanou vodou.

Z takto připraveného rostlinného materiálu se odebere část požadovaného orgánu a umístí se do kultivační nádoby s vhodným sterilním živným médiem a inkubuje se při teplotě 23 – 28 °C. Pokud je zajištěna sterilita a vhodné kultivační prostředí, probíhá u inokula organogeneze nebo produkce parenchymatických nediferencovaných buněk, které se nazývají kalusy.

Typ vývoje explantátu a intenzita proliferace je ovlivněna kultivačními podmínkami, především hormonálním složením média. Relativně vysoké koncentrace auxinu (1-10 mg/l) v kombinaci s nízkou koncentrací cytokininu vyvolávají dediferenciaci buněk primárního explantátu do meristemického stavu a vytvoření neorganizovaného kalusu. Opačný poměr růstových regulátorů indukuje regeneraci pupenů a prýtlů.

U prvních pasáží se mohou objevit morfologické a morfogenetické odchylky. Patrné jsou zejména změny pigmentace a regenerační schopnosti. Porušení pletiv při izolaci nebo sterilizaci vede k uvolnění a zvýšené syntéze oxidáz (polyfenoloxidáza, katecholoxidáza, tyrozináza aj.). Činností těchto enzymů dochází ke kumulaci fenolických látek, což se projeví hnědnutím až černáním – hrozí zastavení růstu a nekróza buněk. Nadměrnému zvýšení koncentrace fenolických sloučenin lze zabránit častým pasážováním na čerstvé médium, přidáním adsorbencí (aktivní uhlí) či antioxidačních látek (kyselina askorbová, kyselina citronová, L-cystein, glutathion) nebo substrátů potlačujících aktivitu oxidáz [40,41].

Během růstu pletiva dochází ke změnám ve složení živného média a to jak kvalitativním, tak kvantitativním. Nastává vysychání agarového gelu, vyčerpání živin z půdy, změna pH prostředí a do živné půdy jsou vylučovány exkrety kultivované tkáně. Také z těchto důvodů je důležité pravidelné pasážování. První pasážování se provádí v intervalu až 3 týdnů, přičemž se přenáší čerstvě narostlá tkáň bez

původního inokula. Další pasáže se provádějí v intervalech 3 týdnů až 2 měsíců. Stabilní a homogenní rostlinný materiál lze získat teprve po provedení většího počtu pasáží. Důležité je však také dodržení konstantních podmínek kultivace (teplota, osvit, složení živné půdy, frekvence pasážování atd.).

Z kalusové kultury lze enzymatickým nebo mechanickým způsobem odvodit kulturu suspenzní. V prvním případě se používají vhodné pektinázy, ve druhém pomaloběžné rolery a třepačky [38,42].

Pro úspěšnou kultivaci rostlinných kultur je velmi důležité připravit vhodné fyzikální podmínky a najít optimální složení živného média.

3.2.3.2. Fyzikální podmínky kultivace

Jedním z předpokladů úspěšného pěstování rostlin *in vitro* je jejich adaptabilita na podmínky kultivace dané kultury. Z fyzikálních faktorů sem lze zařadit osvětlení, teplotu, pH živného média, vlhkost vzduchu atd.

Osvětlení

Světlo ovlivňuje intenzitu biosyntézy a akumulaci sekundárních metabolitů v intaktní rostlině i explantátové kultuře. Světlo může být také induktorem některých biosyntéz, např. syntézy flavonoidů a anthokyanů. Pozitivní vliv světla byl dále prokázán u kultur produkujících digitoxin či diosgenin. Byl popsán i vliv světla o různých vlnových délkách na produkci sekundárních metabolitů.

Vliv světla na růst tkáňové kultury není jednoznačný. Jsou známy i případy inhibičního účinku světla na růst kultury. Obecně lze konstatovat, že růst rostlinné kultury je svým způsobem částečně inhibován přímým slunečním světlem. Pro většinu kultur je dostačující pro intenzivní růst osvětlení v rozmezí 500 až 1000 luxů. Je zajímavé, že kultury, které byly pěstovány při nepřetržitém osvětlení, vykazovaly nižší růst než kultury, u nichž se periodicky po 12 hodinách střídalo světlo a tma [38,39].

Sledováním účinku světla na růst a produkci kumarinů v kalusové kultuře *Angelica archangelica* bylo zjištěno, že permanentní světlo obojí inhibuje. Kultury pěstované ve tmě a při normálním světelném režimu měly srovnatelné výsledky, růst

i produkce kumarinů byly za těchto podmínek stimulovány. Po přidání prekurzorů do média se ukázalo, že nejlepší účinek na růst i produkci kumarinů kalusové kultury má denní perioda [43].

Teplota

Kultivační teplota je jedním z faktorů, který ovlivňuje průběh kultivace tkáňových kultur. Pokud je teplota příliš nízká, rychlost metabolismu se zpomalí až zastaví, pokud je teplota vysoká, dojde k poškození buněk. Teplota kultivace je většinou zvolena empiricky v těsném rozmezí kolem 25 °C. Její hodnota má vliv na rychlost růstu kultury a její zvýšení může indukovat i organogenezi kultur [38,44].

Hilton a Rhodes ve své studii zjistili, že pro růst tkáňové kultury *Datura stramonium* je optimální rozmezí teplot 25 až 30 °C. Nejvyšší produkce hyoscyaminu však byla zjištěna při 20 °C [45].

Acidita živného média

Rostlinné kultury nejsou na rozdíl od kultur živočišných nebo kultur mikroorganismů citlivé na přesnou hodnotu pH živného média. Živné půdy, na kterých jsou kultivovány, jsou obvykle slabě kyselé. Optimální hodnota pH živného média je závislá na typu kultury. Pro většinu kultur *in vitro* se doporučuje hodnota pH od 5,5 do 5,8; v některých případech i v rozmezí pH 6,0 až 7,0. K úpravě pH půdy se většinou používá hydroxid sodný nebo kyselina chlorovodíková, přičemž je třeba počítat i se změnou hodnot pH během autoklávování média [38,44]. Při studiu např. kalusové kultury *Crocus sativus* bylo zjištěno optimální pH 5,8 [46].

Atmosférická vlhkost

Mezi faktory umožňující optimální růst patří také vhodná atmosférická vlhkost. Je-li nízká, hrozí nebezpečí, že tkáň na povrchu zkorkovává nebo zahyne. Je-li vlhkost naopak vysoká, páry na povrchu živného média kondenzují a dochází k inhibici růstu. Atmosférická vlhkost bývá v kultivačních místnostech nastavena na určitou hodnotu v rozmezí 20-98 % - podle požadavků dané kultury [38].

3.2.3.3. Živné médium

Živné médium je prostředí, které umožňuje růst organismů. Musí obsahovat látky životně důležité pro růst kultury. Organismy z něho čerpají živiny pro syntézu potřebných buněčných složek a energii pro uskutečňování biochemických procesů. Médium může být tekuté nebo tuhé (s přísadou agaru). Složení živného média závisí na typu kultivace. Kvalitativní i kvantitativní zastoupení jednotlivých komponent má rozhodující význam nejen pro růst a morfogenezi explantátu, ovlivňuje například i rozpadavost kalusu při převádění do suspenzní kultury [39].

Každá kultura má specifické nároky, je třeba pro každou zvlášť experimentálně vybrat optimální základní půdu i druh, množství a poměr rostlinných regulátorů. Několika autory bylo publikováno složení půd téměř univerzálních, vhodných pro kultivaci většiny rostlinných druhů. Tato média lze rozdělit na [1]:

1) média bohatá na minerální a organické složky, která popsali

MS - Murashige, T., Skoog, F. [47]

SH - Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. [48]

2) média chudá na minerální a organické složky, která popsali

B-5 - Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. [49]

NN - Nitsch, C., Nitsch, J. P. [50]

Mill - Miller, C. O. [51]

MC - McCown, B., Lloyd, G. [52]

Složky živných půd se podle množství v půdě, svého charakteru nebo fyziologických účinků rozdělují do následujících skupin [39]:

• destilovaná voda

Voda používaná k přípravě živných půd může obsahovat jen minimální množství anorganických látek, musí být prostá pyrogenů, plynů a organických nečistot.

• směs anorganických makroprvků

K makroelementům, které jsou nezbytné pro kultivaci intaktních rostlin, patří dusík, síra, fosfor, hořčík, vápník, draslík. Přidávají se do živné půdy ve formě solí, jejich koncentrace v médiu je vyšší než 30 mg.l^{-1} .

- **směs anorganických mikroprvků**

K esenciálním mikroelementům patří železo, bor, mangan, jod a molybden; v mnoha případech jsou také nepostradatelné měď a zinek. Význam niklu, kobaltu a hliníku pro růst kultivovaných rostlinných tkání je zatím sporný.

- **zdroje organického uhlíku**

Základní stavební jednotkou pro nově vznikající pletiva je uhlík. Nejlepším zdrojem uhlíku jsou cukry (sacharóza, glukóza, laktóza, fruktóza, galaktóza, maltóza). Pro většinu rostlinných kultur je nejvhodnější sacharóza v koncentraci 2 - 5%.

Alkoholy nemají pro tkáňové kultury takový význam jako cukry, uspokojivým zdrojem uhlíku je glycerin. Ani organické kyseliny nejsou ideální, v koncentraci nižší než 2 % působí stimulačně, ve vyšších koncentracích působí inhibičně. Velmi příznivý vliv na růst kultur byl však zjištěn u kyseliny jablečné.

- **zdroje dusíku**

Kultivační médium by mělo obsahovat minimálně 25-60 mM anorganického dusíku. Rostlinné buňky mohou růst na médiu obsahujícím dusík pouze v nitrátové formě, mnohem lepšího růstu je však docíleno při dodání směsi nitrátů a amonných solí. Dostatečné množství redukovaného dusíku je možné zajistit také přidáním organických sloučenin (aminokyselin). Aminokyseliny jsou využívány hlavně při kultivaci buněčných suspenzí a protoplastů. Mohou buňkám sloužit nejen jako bezprostřední zdroj dusíku, ale také přímo k syntéze proteinů. Jejich přirozené směsi (např. hydrolyzát kaseinu) působí příznivě na růst a vývoj explantátu, podporují také organogenezi.

- **vitamíny**

Intaktní rostliny jsou schopny syntetizovat vitamíny potřebné k růstu a vývoji, množství produkované explantátovými kulturami je však většinou nedostatečné. Živné médium je proto obohacováno nejčastěji o pyridoxin, thiamin, kyselinu nikotinovou, biotin a myoinositol. Někdy se používá i kyselina listová, vitamín C a kyselina panthotenová.

Thiamin je pro růst kultur nepostradatelný, také myoinositol se přidává do většiny pūd, má totiž výrazně stimulační vliv [53].

- **nedefinované směsi přírodních látek**

Růst explantátové kultury je možné stimulovat přidáním celé řady organických extraktů, které obsahují např. aminokyseliny, organické kyseliny, cukry,

DNA, RNA. Jako příklad lze uvést hydrolyzát kaseinu, pepton, kokosové mléko, extrakty z koňského kaštanu, vlašského ořechu, kukuřice, pšenice nebo kvasnic a pomerančovou či rajčatovou šťávu. V současné době se dává přednost definovaným kombinacím látek a tím se přechází ke skutečně syntetickým médiím.

- **prostředky pro odpěňování živných půd**

Řadíme tam rostlinné oleje - sójový, řepkový, kokosový, slunečnicový, hořčičný, dále živočišné tuky - lůj, dezodorizovaný rybí tuk, tekutá frakce vepřového sádla a silikonové oleje - jako vodná emulze s obsahem 10% silikonu. Tyto prostředky jsou důležité především ve výrobě.

- **látky používané pro zpevnění média**

Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar, který má oproti jiným látkám řadu výhod. Agarové půdy jsou při kultivačních teplotách stabilní, nedochází k interakcím s ostatními složkami média, agar není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhost média je možné regulovat – závisí na použité koncentraci agaru, druhu agaru a pH média.

V případě, že není použito pevné médium, je možné explantát „fixovat“ na můstcích z filtračního papíru, v polyuretanové pěně, perforovaném celofánu apod. Výhodou oproti klasickým agarovým půdám je snadnější příjem živin (z tekutého média přes membránu), díky fúzi nedochází v okolí explantátu k akumulaci zplodin, u řady rostlinných druhů je zvýšen koeficient množení. Složení média se dá průběžně měnit, není tedy nutné provádět pasážování, celý kultivační proces je možno zautomatizovat [54].

- **růstové regulátory (auxiny, cytokininy, gibbereliny)**

Rostlinné buňky jsou při pěstování *in vitro* většinou závislé na přítomnosti růstových regulátorů, protože syntéza endogenních růstových regulátorů (fytormonů) není pro zajištění růstu dostatečná.

3.2.3.4. Růstové regulátory

Tyto specifické látky, které jsou rostliny schopny do určité míry syntetizovat, řídí biosyntetické pochody v buňkách a tak zajišťují optimální růst buněk i celé rostliny.

Jako **stimulátory růstu** se označují takové regulátory, které ve fyziologických koncentracích stimulují růst rostliny. **Růstovými inhibitory** se označují regulátory, které naopak ve fyziologických koncentracích růst inhibují. Tato fyziologická koncentrace je důležitá, protože stimulátory ve vyšších koncentracích mohou růst potlačovat a naopak růstové inhibitory při velmi nízkých koncentracích mohou růstové procesy stimulovat.

Růstové regulátory, které produkují rostliny a využívají je k regulaci růstu, se označují jako **nativní** (endogenní). K nativním růstovým stimulátorům patří auxiny, gibbereliny a cytokininy. Mezi nativní růstové inhibitory se řadí také kyselina abscisová a fenolické látky. Zvláštním typem růstového regulátoru je ethylen, který nelze považovat za stimulátor ani za inhibitor. Nativní růstové regulátory (fytohormony) jsou syntetizovány především v meristematických pletivech (vrcholové meristémy stébla a kořene). Kromě nativních regulátorů jsou známy i regulátory **syntetické**, které nahrazují nativní regulátory při exogenní aplikaci [38,39].

Předpokládá se, že fytohormony působí jednak na úrovni genů a v určitých případech stimulací syntézy i-RNA také umožňují syntézu bílkovin enzymů, které se pak podílejí na metabolických a fyziologických procesech v rostlinách. Fytohormony mohou na základě svého širokého působení [38]:

- měnit propustnost buněčných stěn pro různé substráty a vodu
- uvolňovat vázaný substrát pro předem vytvořený enzym
- kontrolovat koncentraci ATP a ADP
- působit na využití iontů kovů, které mají centrální úlohu v působení mnoha enzymů
- ovlivnit využití různých koenzymů nebo být samy koenzymy
- měnit intenzitu dýchání v mitochondriích
- působit na uvolňování jiných hormonů z jejich prekurzorů
- regulovat aktivitu enzymů
- působit na proteosyntetický aparát, tj. na replikaci DNA, transkripci RNA nebo translaci, a to zejména hormonální kontrolou DNA- a RNA-polymeráz nebo molekulárních derepresorů.

V tomto působení fytohormony různě interferují, jejich účinky jsou buď synergické nebo antagonistické v návaznosti na vnitřní či vnější podněty. Exogenní regulátory růstu působí v souhře s těmito procesy. Mohou účinky fytohormonů stimulovat nebo působit na syntézu, translokaci či inaktivaci hormonů.

Použití těchto růstově aktivních látek závisí nejen na jejich typu, koncentraci a druhu pěstované rostliny nebo kultury, ale často je důležitý pro růst explantátové kultury také jejich vzájemný poměr.

Rozlišují se **dvě základní skupiny přírodních regulátorů** [38]:

1. regulátory vznikající při metabolismu aminokyselin, mezi něž patří auxiny, některé fenolové látky, ethylen a kyselina glutamová (má svou úlohu především u hub)
2. regulátory odvozené od kyseliny mevalonové, které jsou tvořeny isoprenovými jednotkami - cytokininy, abscisiny, gibbereliny

Auxiny

Mezi auxiny patří látky indolového typu, jejichž přítomnost je důležitá pro dělení, růst a diferenciaci buněk. Hlavním účinkem *in vitro* je stimulace kořenotvorby, indukce tvorby kalusu. Nízké hladiny stimulují růst kořenů, zatímco vysoké hladiny v kombinaci s cytokininy indukují tvorbu kalusu a dediferencovaný růst.

Název této skupiny je odvozen od auxinu, kyseliny β -indolyloctové (IAA), která byla prvním objeveným rostlinným hormonem. Dalšími látkami s auxinovou aktivitou jsou již syntetické kyseliny, např. kyselina β -indolyl-4-máselná (IBA), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina α -naftyloctová (α -NAA).

Podářilo se objasnit vztah mezi růstem indukovaným auxinem a draselnými kanály. Předpokládá se, že auxin stimuluje protonovou pumpu, která způsobuje kyselost v okolí buněčných stěn, což vede ke ztrátě stěn a k následné expanzi buněčného obsahu. Podmínkou pro růst jsou však draselné ionty, které se pohybují ve směru elektrochemického gradientu, vznikajícího aktivací protonové pumpy [38,55].

Gibereliny

Hlavními zástupci jsou kyselina giberelová (GBA) a giberelin. Jsou to terpeny tetracyklické struktury složené ze čtyř isoprenových jednotek. Tvoří se v mladých listech, meristematických částech lodyh, apikálních částech kořenů, mladých plodech a klíčovících semenech. Gibereliny stimulují prodlužovací růst, ale jiným mechanismem než auxiny. Stimulují syntézu bílkovin a procesy kvetení. Mohou porušovat období vegetačního klidu semen mnohých rostlin.

Na syntéze giberelinů se významně podílejí kořeny, je však nutná přítomnost dalších růstových látek typu auxinů a cytokininů [38,55].

Cytokininy

Název této skupiny je odvozen od jejich hlavního účinku - stimulace buněčného dělení - cytogeneze. Jsou to purinové deriváty odvozené od adeninu. Tvoří se především v kořenových špičkách, ale i v malých plodech a semenech. Z kořenů jsou pak transportovány cévami transpiračním proudem do nadzemní části.

Zpomalují stárnutí rostlin, tj. rozklad chlorofylu, nukleových kyselin a bílkovin. Působí stimulačně na klíčení, zvláště u semen v období dormance, v kombinaci s IAA podporují zakořeňování a růst stonkových řízků. Stimulují diferenciaci chloroplastů a tvorbu některých pigmentů. Pravděpodobně se účastní i regulace vodního režimu zvýšením transpirace. Mají úlohu v regulaci nasazování plodů a procesu dozrávání.

Nejdůležitějšími přírodními cytokininy jsou zeatin a 6-izopentenylaminopurin a syntetickými 6-furfurylaminopurin (kinetin) a 6-benzylaminopurin (BA) [38].

Kyselina abscisová

Je to terpenoid velmi blízký vitamínu A, odvozený od kyseliny mevalonové. Všeobecně se kyselina abscisová (ABA) označuje za silného antagonistu giberelinů. Inhibuje růstové procesy, snižuje permeabilitu membrán, zabraňuje pronikání vody a dalších látek do buněk, urychluje procesy opadávání květů a plodů. ABA též reguluje vodní režim rostlin tím, že snižuje transpiraci. Redukuje negativní vliv nejen nedostatku vláhy (kdy její tvorba stoupá) ale i nízkých teplot a vyšších koncentrací solí. Proto je považována za důležitý faktor adaptace rostlin ke stresovým podmínkám [38].

Ethylen

Jedná se o růstový regulátor plynného skupenství, který se uplatňuje v řadě vývojových a se stresem spojených procesů rostlin. Účinky ethyleny se projevují při dozrávání plodů, opadávání listů, při vývoji kořene. Silně inhibuje transport auxinů. Ethylen se používá k urychlení nebo k inhibici kvetení.

Podobné účinky jako ethylen mají některé syntetické přípravky, např. fenolické kyseliny (kyselina salicylová, deriváty kyseliny benzoové), herbicidy (maleinhydrazid) [55].

Maleinhydrazid

Zadržuje růst rostliny jako celku. Nebrzdí pouze dělení buněk, ale i intenzitu dýchání rostlin. Inhibiční vliv maleinhydrazidu (MH) se někdy vysvětluje tak, že struktura MH je velmi podobná struktuře uracilu. Záměnou uracilu za MH dochází k blokadě proteosyntézy v ribozómech. Jiná hypotéza předpokládá aktivaci enzymu, který oxiduje auxin [55].

Další regulátory

Dalšími regulátory jsou spermidin, jeho prekurzor putrescin, fusicoccin, argostemin, brassiny. K nejnovějším regulátorům patří také meristimul, 3-allyl-6-nitro-2-benzothiazolinon, který vykazuje v závislosti na koncentraci inhibiční či stimulační účinky na růst a syntézu chlorofylu zelených řas, jedno- a dvouděložných rostlin a kalusových tkáňových kultur. V rozmezí koncentrací 10^{-5} - 10^{-15} mol.l⁻¹ stimuluje růst a syntézu chlorofylu rostlin a kalusových kultur a podporuje tvorbu rostlinných orgánů v kalusové kultuře analogicky jako kinetin [55].

Vznik a růst kalusových kultur ovlivňují hlavně auxiny a cytokininy. Tyto dvě skupiny mají v procesech morfogeneze různé účinky. Při zvýšené koncentraci auxinů v kalusové kultuře dochází k indukci kořenů (Skoog a Miller 1957), zatímco převaha cytokininů indukuje tvorbu výhonků. Při vyváženém poměru auxinů a cytokininů dochází ke vzniku kalusu. Intenzita růstu kalusové kultury závisí nejen na koncentraci a druhu růstových stimulantů, ale i na velikosti explantátů, citlivosti buněk nebo pletiv, na fyzikálních podmínkách a dalších faktorech [38].

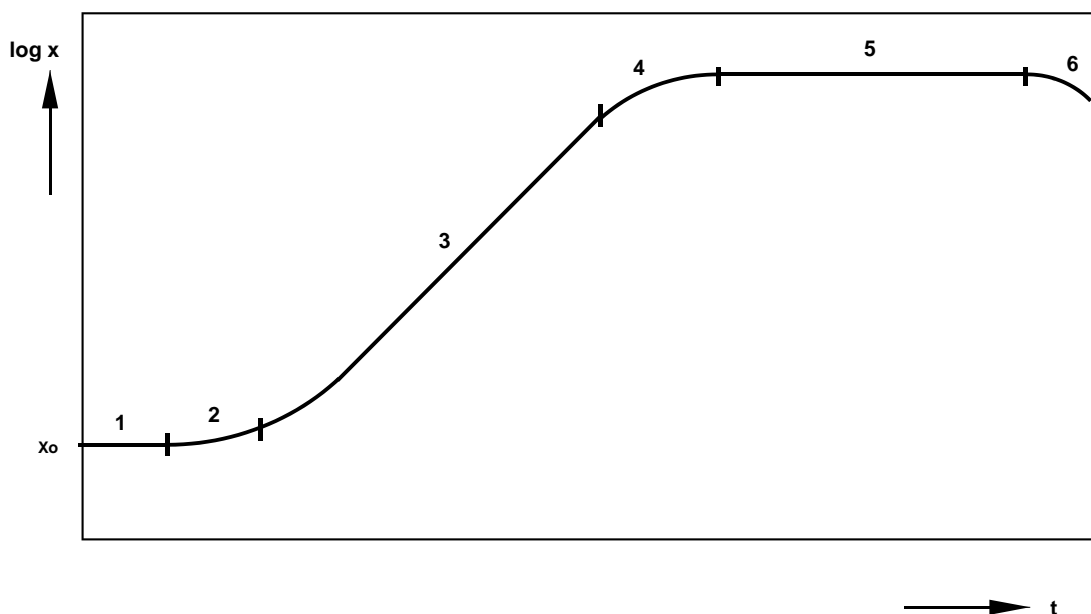
3.2.3.5. Růstové fáze kultury

Rostlinná kultura během prochází růstu několika fázemi. Po celou dobu je ovlivňována řadou faktorů, které určují její další vývoj. Vedle složení živného média a fyzikálních faktorů sem patří také typ a genetické vybavení explantátu, sterilita prostředí apod.

Vynese-li se do grafu experimentálně zjištěné množství biomasy proti času, získá se charakteristická **růstová křivka**, na které lze rozlišit následující fáze [39]:

1. **lag fáze** - období přizpůsobování naočkovaných buněk novému prostředí, jejich koncentrace zůstává konstantní, někdy může i poklesnout
2. **fáze zrychlení** (akcelerační) - všechny důležité enzymové reakce dosahují konstantní (maximální) rychlosti, buňky se začínají množit se stále vzrůstající rychlostí, po dosažení maximální rychlosti růstu přechází ve fázi exponenciální
3. **exponenciální fáze** - buňky rostou stále stejnou maximální rychlostí, buňka se z hlediska chemického složení nemění; růst trvá tak dlouho, pokud mají buňky dostatečné množství živin a pokud není inhibován vlastními odpadními produkty metabolismu
4. **fáze zpomalení** (deklinační fáze) - v důsledku postupného vyčerpání živin a hromadění metabolických produktů dochází k poklesu růstové rychlosti, tvar růstové křivky se v této fázi může velmi lišit, což záleží také na typu rostlinné kultury
5. **stacionární fáze** - populace buněk dosahuje maximální a po určitou dobu konstantní velikosti, doba této fáze závisí stejně jako u předchozí fáze na způsobu měření koncentrace buněk; maximální dosaženou koncentraci buněk určuje řada faktorů, např. počáteční koncentrace energetického zdroje, zdroje dusíku a stopových prvků, koncentrace kyslíku, způsob úpravy pH během kultivace

6. **fáze odumírání** - pro průběh této fáze neexistuje žádné obecné pravidlo, odumírání může být pomalé nebo rychlé, spojené nebo nespojené s autolýzou buněk



Fáze růstové křivky: 1) lag-fáze, 2) akcelerační fáze, 3) exponenciální fáze, 4) deklinační fáze, 5) stacionární fáze, 6) fáze odumírání

Důležité jsou také vzájemné vztahy mezi intenzitou růstu kalusové kultury a velikostí explantátu. Bylo zjištěno, že čím je explantát větší, tím různorodější je složení buněk. Rostlinná pletiva mají různou fyziologickou polaritu. Vlivem této polaritě probíhá tvorba kalusu zvláště intenzivně na té straně explantátu, která je obrácená směrem ke kořeni. Malé inokulum zabezpečuje rychlé dělení buněk, ale prodlužuje lag-fázi. Délka subkultivačního intervalu (tj. doby od přenesení explantátu na živné médium do počátku stacionární fáze) závisí tedy na několika faktorech: na počáteční velikosti inokula (hustotě suspenze), době trvání lag fáze a délce buněčného cyklu. Je-li iniciální hustota buněk nízká, dochází k prodloužení lag fáze i exponenciální fáze. Růst je možné podpořit přidáním výtažku odebraného od kultury o vysoké hustotě buněk. Intenzivně se dělící buňky totiž vylučují dosud nedefinované substance, které stimulují růst okolních buněk. Díky pravidelnému

pasážování je možné udržovat kultury v podmínkách *in vitro* neomezeně dlouho [38,39].

3.2.4. Biotechnologické využití rostlinných explantátových kultur

V posledních letech bylo v Evropě založeno více než 500 středisek biotechnologického výzkumu, které se věnují jednak komerčnímu využívání rostlinných kultur *in vitro* a jednak základnímu výzkumu v této oblasti. Jedná se zejména o instituce v Německu, dále pak v Holandsku, Anglii, Itálii a Francii. Také v USA, Kanadě a Japonsku byla založena řada těchto pracovišť [2].

Využití kultur *in vitro* lze rozdělit na dvě oblasti, ve kterých je nejintenzivněji prováděn výzkum, který má i své praktické uplatnění. Jde o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami a o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin.

3.2.4.1. Produkce sekundárních metabolitů

Vyšší rostliny jsou bohatými zdroji léčivých látek. Jednou z možností, jak se vyhnout obtížím se zajištěním těchto látek, by mohlo být zavedení systému buněčných kultur pro jejich produkci.

Hlavní výhody buněčné kultivace oproti kultivaci celé rostliny jsou následující [39]:

- Sekundární metabolity mohou být produkovány za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických změnách nebo půdních podmínkách.
- Rostlinné explantáty jsou pěstovány sterilně, bez použití ochranných prostředků a hnojiv.
- Buňky jakékoliv rostliny, bez ohledu na její geografický původ, mohou být snadno pěstovány k získání jejich specifických metabolitů.
- Automatická kontrola buněčného růstu a racionální regulace metabolických procesů může přispět ke snížení pracovních nákladů a zvýšení produktivity.

- Kultivace rostlinných explantátů *in vitro* může probíhat během celého roku, pomocí pasážování jsou kultury udržovány za optimálních podmínek i několik let.

Rostliny i tkáňové kultury syntetizují sekundární metabolity většinou jen v určité ontogenetické fázi, v určitém období růstového cyklu. Často se stává, že převedením do kultury *in vitro* a ztrátou diference pletiva dochází ke změně či přerušení metabolických drah, jejichž důsledkem je kvalitativní změna spektra produkovaných látek. Může jít o vedlejší produkty metabolických drah, modifikované látky výchozích rostlin nebo látky dosud neznámé, které se v intaktní rostlině nevyskytují. Např. při porovnání produkce sekundárních metabolitů kalusové kultury a intaktní rostliny *Tenctona grandis* bylo zjištěno, že kalusová kultura produkuje jiné metabolity (antimikrobiální látky) než nativní rostlina [56].

Některé kultury zpočátku produkují látky shodné s výchozí rostlinou či orgánem, po čase však syntéza ustává. To lze pozorovat např. u *Digitalis purpurea* L., kde dochází ke zúžení spektra a nejpozději po 18. pasáži k úplnému zastavení produkce kardenolidů. Regenerované rostliny produkují ovšem celé spektrum látek [2].

Byla porovnávána také produkce sekundárních metabolitů v semeni nativní rostliny *Cassia pumila* a v kalusové kultuře odvozené ze semene *Cassia*. Obsah sekundárních metabolitů byl v kalusové kultuře výrazně nižší [57].

Následující příklady dokumentují úspěšné pokusy o vyprodukování sekundárních látek buněčnými kulturami v množství větším než v intaktní rostlině [2].

sekundární metabolit	rostlina
ajmalicin	<i>Catharanthus roseus</i>
anthrachinony	<i>Cassia tora</i> <i>Galium molugo</i> <i>Morinda citrifolia</i>
bisoclaurin	<i>Stephania cepharantha</i>
diosgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>
glutathion	<i>Nicotiana tabacum</i>
glycyrrhizin	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
harmin	<i>Peganum harmala</i>
kofein	<i>Nicotiana tabacum</i>
kyselina rosmarinová	<i>Coleus blumei</i>

L-Dopa	<i>Mucuna pruries</i>
nikotin	<i>Nicotiana tabacum</i>
paniculid B	<i>Andrographis paniculata</i>
protopin	<i>Macleaya microcarpa</i>
rotenon	<i>Teprosia</i>
saponiny	<i>Panax ginseng</i>
serpentin	<i>Catharanthus</i>
šikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
trigonelin	<i>Trigonella foenum-graecum</i>
tripdiolid	<i>Tripterygium wilfordii</i>
ubichinon-10	<i>Nicotiana tabacum</i>

Je možné uvést také přehled látek, které jsou nebo byly průmyslově získávány z kultur *in vitro* [2].

Produkt	Druh	využití	společnost	země
šikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	farmacie kosmetika barvířství	Mitsui Petrochemicals	JPN
berberin	<i>Coptis japonica</i>	farmacie	Mitsui Petrochemicals	JPN
biomasa	<i>Panax ginseng</i>	dietetika	Nitto Denki Kogyo	JPN
peroxidáza	<i>Raphanus</i>	diagnostika	Toyobo	JPN
geraniol	<i>Geranium</i>	parfumerie	Kanebo	JPN
kyselina rosmarinová	<i>Coleus blumei</i>	farmacie	Natterman	SRN
digoxin	<i>Digitalis</i>	farmacie	Boehringer Mannheim	SRN

Přes dosažené úspěchy zůstává stále nevyřešena celá řada problémů, které stojí v cestě využití tkáňových kultur pro produkci sekundárních metabolitů. Zřejmě nejvýznamnějším je nízký obsah žádaných látek, kombinovaný s často se vyskytující nestabilitou produkce.

V poslední době nastal významný pokrok ve vývoji nových technik, jako je např. biotransformace, imobilizace, elicitace a jejich vzájemné kombinace, kterými je možné dosáhnout zvýšení produkce a akumulace sekundárních přírodních látek v buněčných kulturách *in vitro*.

Budoucnost průmyslového využití buněčných kultur pro produkci přírodních látek v bioreaktorech závisí především na vývoji postupů a technologií zkracujících periodu fermentace a zvyšujících výtěžek.

Perspektivní je i přenos rostlinných genů, které kódují enzymy katalyzující reakce biosyntézy sekundární látky do bakteriální buňky nebo do buňky mikroskopických hub [2].

3.2.4.2. Rozmnožování a šlechtění rostlin

Kromě významné role v základním výzkumu mají kultury rostlinných buněk důležité využití v zemědělství. Slouží k množení, šlechtění a ozdravování rostlin. Z různých aplikací jsou nejdůležitější [39,42]:

- 1) **Vegetativní množení** umožňující rychlé získání tisíců shodných rostlinných jedinců (orchideje, karafiáty, gerbery).
- 2) **Meristémové kultury**, které umožňují získání ozdravených bezvirových rostlin (brambory, karafiáty). Z explantátů se dají získat rostliny prosté bakteriálních, virových i houbových nákaz. Infekce je eliminována již při vlastním zakládání sterilní kultury, následné kontaminaci lze zabránit přidáním antibiotik a antivirotik do média. K ozdravování kultury přispívají i běžné složky živných půd – výrazný efekt mají zvláště fytohormony (např. kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová. Virózy je možné potlačit také působením vyšších teplot, které rostlinná buňka ještě snáší, ale pro viry jsou již letální. K eliminaci infekce přispívá i to, že explantátem neprochází cévní svazky, které představují hlavní dráhu šíření řady rostlinných patogenů.
- 3) **Pylové kultury** umožňující získání haploidních rostlin a od nich odvozených čistých linií pro šlechtitelské účely (rýže, tabák, obilí).
- 4) **Fúze protoplastů** téhož nebo různého druhu umožňující tvorbu somatických hybridů (buněk nebo celých rostlin) s vlastnostmi epigenetické povahy z jiného druhu (přenos samčí cytoplazmatické sterility, rezistence apod.).
- 5) Tvorba různých **regenerovaných rostlin**, což umožňuje využití polymorfismu ve šlechtitelském programu a selekce produkčních klonů na úrovni izolované buňky.

- 6) **Genové inženýrství** u izolovaných buněk nebo protoplastů pro zavedení nových vlastností do rostliny (použití plazmidu z *Agrobacterium tumefaciens* jako vektoru k přenosu cizorodé DNA).

Mikropropagace

Mikropropagace představuje způsob vegetativního množení rostlin pomocí tkáňových kultur. Rychlost mikropropagace je mnohem vyšší než u metod tradičních. Průměrná teoretická výtěžnost meristémových kultur při mikropropagaci je 10^6 rostlin za rok z jednoho původního explantátu. Tato metodika umožňuje i produkci bezvirových rostlin a množení lze provádět po celý rok bez závislosti na ročním období.

Nevýhodami mikropropagace je poměrně vysoká pracnost těchto metod, které neumožňují mechanizaci, a relativně ekonomicky nákladné laboratorní vybavení. Metody mikropropagace nalézají v současné době uplatnění především tam, kde nejsou použitelné jiné metody vegetativního množení, kdy rychlost vegetativního množení je pomalá nebo kdy makropropagace je velmi nákladná [2].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál, přístroje a pomůcky

4.1.1. Rostlinný materiál

K odvození kalusové kultury byla použita semena jetele lučního *Trifolium pratense* L., *Fabaceae* (varieta DO-8, DO-9, Tempus, Sprint) získaná ze Šlechtitelské stanice Domoradice.

4.1.2. Chemikálie

6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno
Dihydrogenfosforečnan draselný č., Lachema, Brno
Dusičnan draselný *p.a.*, Lachema, Brno
Dusičnan amonný *p.a.*, Lachema, Brno
Ethanol 96%, Lachema, Brno
Glycin č., Lachema, Brno
Chloramin B, Lachema, Brno
Chlorid kobaltnatý *p.a.*, Lachema, Brno
Chlorid pyridoxinia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
Chlorid thiaminia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
Chlorid vápenatý *p.a.*, Lachema, Brno
Jodid draselný *p.a.*, Lachema, Brno
Kinetin *p.a.*, Serva, Heidelberg
Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová č., Lachema, Brno
Kyselina α -naftyloctová č., Lachema, Brno
Kyselina boritá *p.a.*, Lachema, Brno
Kyselina chlorovodíková *p.a.*, Lachema, Brno
Kyselina mravenčí bezvodá *p.a.*, Lachema, Brno
Kyselina nikotinová č., Lachema, Brno
Kyselina octová bezvodá *p.a.*, Lachema, Brno
Kyselina octová ledová *p.a.*, Lachema, Brno
Kyselina šťavelová č., Lachema, Brno
Methanol *p.a.*, Lachema, Brno
Molybdenan sodný *p.a.*, Lachema, Brno
Myoinositol č., Sigma, St. Louis
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

4.1.3. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen
Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
Horkovzdušný sterilizátor HS 31A, Chirana, Brno
Box s laminárním prouděním Fatran LF, Žilina
Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
Třepačka Unimax 2010, Heidolph
UV-lampa CAMAG, Muttenz
Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
Kapalinový chromatograf Unicam Crystal, Cambridge
Kolona LiChrosper RP-18 s předkolumnou, Merck, Darmstadt

4.2. Kultivace explantátové kultury

4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje, podmínky pasážování

Pro odvození a kultivaci explantátových kultur bylo používáno varné sklo značky SIAL, které vyhovuje požadavkům kladeným na nádobí pro práci s tkáňovými kulturami a je dostatečně odolné vůči vodě, chemikáliím i rozdílům teplot. Používané kovové nástroje (pinzety, skalpely) byly opláchnuty 96 % ethanolem a zabaleny do hliníkové fólie. Potom byly sterilizovány 2 hodiny při 200 °C v horkovzdušném sterilizátoru.

Kalusové kultury byly odvozeny a kultivovány na můstcích z filtračního papíru vložených do 100 ml Erlenmeyerových baněk s obsahem 30 ml tekutého živného media. Odvozování a pasážování bylo prováděno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen nejméně 1 hodinu germicidní zářivkou. Při práci byly vždy zachovávány přísně aseptické podmínky, bylo používáno sterilní sklo a nástroje.

4.2.2. Příprava živného média

Explantátové kultury *Trifolium pratense* L. byly odvozeny a kultivovány:

1) na živném médiu podle Murashigeho a Skooga (MS) následujícího složení [47]:

CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440,00 mg.l ⁻¹
KNO ₃	1900,00 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370,00 mg.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650,00 mg.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄ . H ₂ O	170,00 mg.l ⁻¹
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,84 mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,34 mg.l ⁻¹
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22,30 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	11,50 mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	6,20 mg.l ⁻¹
KI	0,83 mg.l ⁻¹
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25 mg.l ⁻¹
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025 mg.l ⁻¹
inositol	100,00 mg.l ⁻¹
hydrolyzát kaseinu	1000,00 mg.l ⁻¹
glycin	2,00 mg.l ⁻¹
kyselina nikotinová	0,50 mg.l ⁻¹
pyridoxin hydrochlorid	0,50 mg.l ⁻¹
thiamin hydrochlorid	0,10 mg.l ⁻¹
sacharosa	30000,00 mg.l ⁻¹

2) na živném médiu podle Gamborga (B5) následujícího složení [49]:

KNO ₃	2 500,00 mg.l ⁻¹
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	150,00 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	250,00 mg.l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00 mg.l ⁻¹

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	150,00	mg.l ⁻¹
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,84	mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,34	mg.l ⁻¹
KI	0,75	mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	3,00	mg.l ⁻¹
MnSO ₄ · H ₂ O	10,00	mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,00	mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	mg.l ⁻¹
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	mg.l ⁻¹
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	mg.l ⁻¹
myoinositol	100,00	mg.l ⁻¹
kyselina nikotinová	1,00	mg.l ⁻¹
pyridoxin	1,00	mg.l ⁻¹
thiamin	10,00	mg.l ⁻¹
sacharosa	30 000,00	mg.l ⁻¹

Jednotlivé substance byly odváženy na analytických vahách (nízké koncentrace byly pipetovány z připravených zásobních roztoků). Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněno destilovanou vodou po značku. K připraveným médiím byly potom přidány různé koncentrace růstových stimulátorů, případně jejich vzájemné kombinace. Živná média byla rozlita po 30 ml do Erlenmeyerových baněk s předem vloženými papírovými můstky. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 min při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa.

4.2.3. Odvození kalusové kultury

Semena byla nejprve chemicky sterilizována ponořením na 3 minuty do 70 % lihu, dále ponořením na 2 minuty do 10 % chloraminu a nakonec vložena na 10 minut do 2 % chloraminu. Mezi každou lázní byla semena důkladně opláchnuta sterilní vodou. Vysterilizovaná semena byla vysévána na můstky z filtračního papíru

do Erlenmeyerových baněk s 30,0 ml živného média podle Murashigeho a Skooga nebo podle Gamborga. Po týdnu kultivace při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma byly získány sterilní klíční rostliny.

Kalusová kultura *Trifolium pratense* L. byla odvozena při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma ze sterilní klíční rostliny pasážováním na MS a B5 médiu (subkultivační interval 21 dní). K těmto médiím byly přidávány růstové stimulatory kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D), kyselina α -naftyloctová (NAA), 6-benzylaminopurin (BA) a kinetin v koncentracích 0,05 - 10 mg.l⁻¹ (stimulatory byly zkoušeny samostatně i vzájemně zkombinované) [58-64]. Byla vybrána nejvhodnější kombinace pro kultivaci kalusové kultury *Trifolium pratense* L.

4.3. Stanovení růstové a produkční charakteristiky

U kalusové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) kultivované při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma na médiu podle Gamborga s přídatkem 2,4-D (2 mg.l⁻¹) a BA (2 mg.l⁻¹) byla ve 30. pasáži v průběhu padesátidenní subkultivace sledována v sedmidenních intervalech dynamika růstu vyjádřením čerstvé hmotnosti a růstového faktoru [65] a produkce flavonoidů stanovená metodou dle ČL 2002 [66].

U ostatních odvozených kalusových kultur *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9, Tempus, Sprint) byl zjišťován ve 29. dni subkultivace obsah flavonoidů dle ČL 2002 [66].

4.3.1. Stanovení růstového faktoru

Hmotnost inokula (m_i) byla stanovena jako rozdíl hmotnosti kultivačních baněk před a po inokulaci. Po ukončení kultivace byly baňky znovu zváženy a stejně tak i po vyjmutí kalusů. Z rozdílu těchto hmotností byla zjištěna **hmotnost kalusu**

(m_k). Pro každou sledovanou baňku byl vypočten **přírůstek čerstvé hmotnosti** kultury, daný rozdílem hmotnosti kalusu a hmotnosti inokula, a také přírůstek čerstvé hmotnosti vyjádřený v procentech podle vzorce:

$$\text{přírůstek [\%]} = \frac{m_k - m_i}{m_i} \cdot 100$$

Růstový faktor (R_f) byl zjištěn ze vztahu:

$$R_f = \frac{\text{přírůstek \%}}{100}$$

Pro každý soubor, který byl tvořen pěti baňkami odebranými ve stejném čase, byla stanovena průměrná hmotnost inokula a kalusu, průměrný přírůstek čerstvé hmotnosti a průměrný růstový faktor [65].

4.3.2. Stanovení obsahu flavonoidů

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé [66].

Základní roztok: 0,400 g práškové drogy (250) se ve 250ml baňce smíchá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy ve 250ml baňce, přidá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 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 (2.2.25) zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$), se vypočítá podle vzorce:

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

M

v němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm;

M – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

4.4. Stanovení obsahu isoflavonoidů

Methanолоvé extrakty odvozených kalusových kultur *Trifolium pratense* L. (varietata DO-8, DO-9, Tempus, Sprint) byly pomocí HPLC zkoušeny na přítomnost isoflavonoidů [9].

Příprava extraktu

0,800 g práškové kultury se extrahuje 15 ml 80 % methanolu 30 minut ve vodní lázni při 80 °C pod zpětným chladičem. Extrakt se zfiltruje do odměrné baňky na 25,0 ml. Zbytek z filtru se extrahuje ještě jednou 30 minut ve vodní lázni 15 ml 80 % methanolu. Zfiltruje se do téže odměrné baňky a doplní se 80 % methanolem po značku.

5. VÝSLEDKY

5.1. Tabulková část

Tab. č.1 Vyhodnocení růstu kalusové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO- 8) v průběhu 50-ti denní subkultivace

8. den kultivace

číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	růstový faktor R_f
1	1,4606	1,6749	0,2143	14,6721	0,1467
2	1,8476	2,0009	0,1533	8,2973	0,0830
3	2,3217	2,6144	0,2927	12,6071	0,1261
4	1,8707	2,1029	0,2322	12,4125	0,1241
5	2,3583	2,7141	0,3558	15,0871	0,1509
průměr	1,9718	2,2214	0,2497	12,6152	0,1262

15.den kultivace

číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	růstový faktor R_f
1	1,3297	1,8975	0,5678	42,7014	0,4270
2	1,7131	1,9212	0,2081	12,1476	0,1215
3	2,2619	2,4614	0,1995	8,8200	0,0882
4	2,4322	2,6469	0,2147	8,8274	0,0883
5	1,9339	2,3540	0,4201	21,7229	0,2172
průměr	1,9342	2,2562	0,3222	18,8439	0,1884

22.den kultivace

číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	růstový faktor R_f
1	1,9133	2,4818	0,5685	29,7131	0,2971
2	1,9054	2,4618	0,5564	29,2012	0,2920
3	1,4167	1,7071	0,2904	20,4983	0,2050
4	1,5466	2,1170	0,5704	36,8809	0,3688
5	2,0772	2,4516	0,3744	18,0243	0,1802
průměr	1,7718	2,2439	0,4720	26,8636	0,2686

29.den kultivace

číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	růstový faktor R_f
1	2,7627	3,3191	0,5564	20,1397	0,2014
2	1,3676	1,8325	0,4649	33,9939	0,3399
3	1,6372	2,2087	0,5715	34,9072	0,3491
4	1,4334	2,0058	0,5724	39,9330	0,3993
5	2,0689	2,7574	0,6885	33,2786	0,3328
průměr	1,8540	2,4247	0,5707	32,4505	0,3245

36.den kultivace

číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	růstový faktor R_f
1	1,7175	2,3290	0,6115	35,6041	0,3560
2	1,3534	2,0533	0,6999	51,7142	0,5171
3	1,4388	2,2242	0,7854	54,5872	0,5459
4	1,1887	1,7863	0,5976	50,2734	0,5027
5	2,1901	3,0668	0,8767	40,0301	0,4003
průměr	1,5777	2,2919	0,7142	46,4418	0,4644

43.den kultivace

číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	růstový faktor R_f
1	1,1673	2,5359	1,3686	117,2449	1,1724
2	1,7590	3,7363	1,9773	112,4105	1,1241
3	1,0282	1,9915	0,9633	93,6880	0,9369
4	2,3294	4,2650	1,9356	83,0944	0,8309
5	1,2229	2,3632	1,1403	93,2456	0,9325
průměr	1,5014	2,9784	1,4770	99,9367	0,9994

50.den kultivace

číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	růstový faktor R_f
1	1,1387	2,1607	1,0220	89,7515	0,8975
2	1,0901	1,7840	0,6939	63,6547	0,6365
3	1,1037	2,0851	0,9814	88,9191	0,8892
4	1,1444	2,1385	0,9941	86,8665	0,8687
5	1,6732	3,0342	1,3610	81,3411	0,8134
průměr	1,2300	2,2405	1,0105	82,1066	0,8211

Tab. č. 2 Produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L.
(varietá DO-8) v průběhu 50-ti denní subkultivace

den kultivace	navážka [g]	absorbance	obsah flavonoidů [%]	průměrný obsah flavonoidů [%]
8.	0,2108	0,020	0,117	0,107
	0,2311	0,018	0,096	
15.	0,1982	0,010	0,062	0,073
	0,1924	0,013	0,083	
22.	0,1738	0,009	0,064	0,061
	0,1743	0,008	0,057	
29.	0,2199	0,017	0,095	0,084
	0,2211	0,013	0,073	
36.	0,2298	0,011	0,059	0,066
	0,2234	0,013	0,072	
43.	0,2213	0,012	0,067	0,068
	0,2160	0,012	0,069	
50.	0,2072	0,010	0,060	0,056
	0,1868	0,008	0,053	

Tab. č. 3 Růst a produkce kalusové kultury *Trifolium pratense* L.
(varietá DO-8) v průběhu 50-ti denní subkultivace

den kultivace	růst kultury				produkce kultury
	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	růstový faktor R_f	obsah flavonoidů [%]
8.	1,97 ± 0,36	2,22 ± 0,39	12,62 ± 2,41	0,13 ± 0,02	0,107 ± 0,011
15.	1,93 ± 0,39	2,26 ± 0,30	18,84 ± 12,83	0,19 ± 0,13	0,073 ± 0,011
22.	1,77 ± 0,25	2,24 ± 0,30	26,86 ± 6,82	0,27 ± 0,07	0,061 ± 0,004
29.	1,85 ± 0,52	2,42 ± 0,54	32,45 ± 6,58	0,32 ± 0,07	0,084 ± 0,014
36.	1,58 ± 0,35	2,29 ± 0,43	46,44 ± 7,31	0,46 ± 0,07	0,066 ± 0,006
43.	1,50 ± 0,48	2,98 ± 0,87	99,94 ± 12,83	1,00 ± 0,13	0,068 ± 0,001
50.	1,23 ± 0,22	2,24 ± 0,42	82,11 ± 9,68	0,82 ± 0,10	0,056 ± 0,004

Tab. č. 4 Produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L.

(varietà Tempus, Sprint, DO-9) ve 29. dni subkultivace

varietà	navážka [g]	absorbance	obsah flavonoidů [%]	průměr obsahu flavonoidů [%]
Tempus	0,2637	0,018	0,084	
	0,2658	0,016	0,074	0,079
Sprint	0,2724	0,028	0,127	
	0,2553	0,024	0,116	0,122
DO-9	0,1325	0,008	0,075	0,075

Tab. č. 5 Produkce isoflavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L.

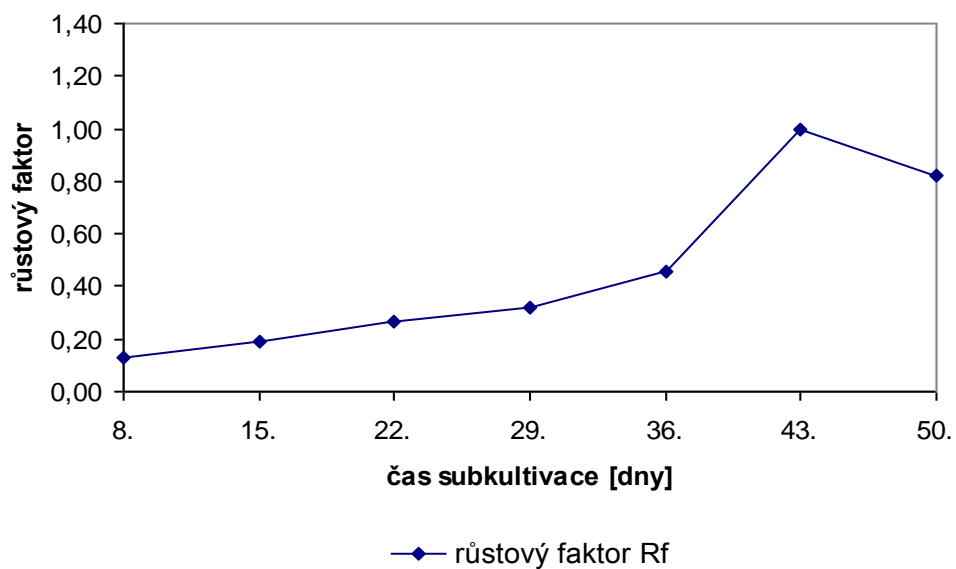
(varietà Tempus, Sprint, DO-8, DO-9) v 29. den subkultivace

varietà	navážka [g]	obsah formononetinu [%]
Tempus	0,8197	0,02
Sprint	0,8287	0,01
DO-8	0,8173	0,01
DO-9	0,8227	0,02

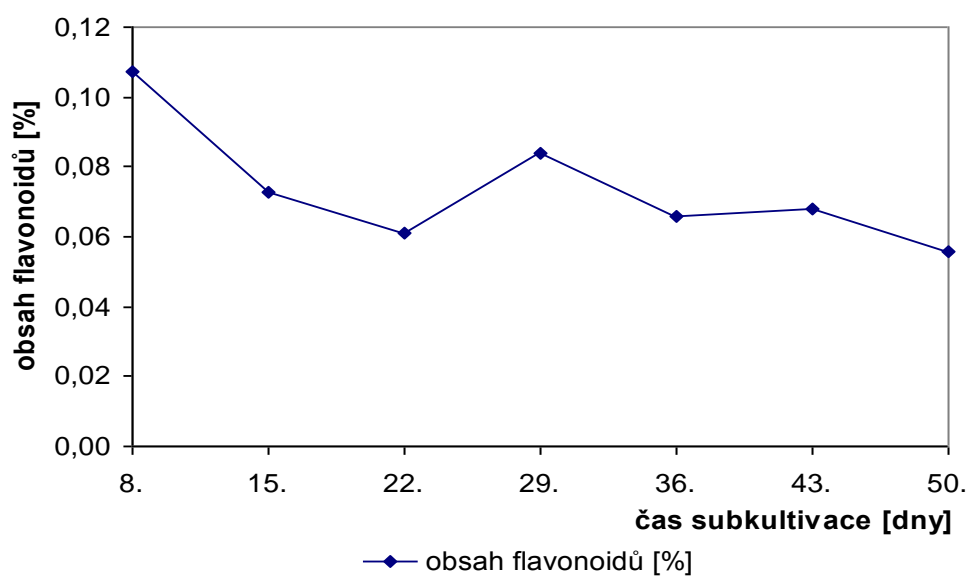
5.2. Obrazová část

Na základě výsledků (tab. č. 3) byla získána růstová křivka (graf č. 1) a produkční křivka (graf č. 2) kultury *Trifolium pratense* L. - varieta DO-8.

Graf č.1



Graf č.2



6. DISKUSE

Využití explantátových kultur jako zdroje důležitých rostlinných metabolitů se jeví jako velmi perspektivní. Růst rostlinných kultur *in vitro* a produkce sekundárních metabolitů těmito kulturami jsou však ovlivňovány celou řadou faktorů. Proto je nutné nejprve experimentálně určit u každé konkrétní kultury optimální podmínky kultivace, zejména stanovit růstovou a produkční charakteristiku s ohledem na vhodnou délku kultivace. Nezbytné je také najít vhodné živné médium, které by současně zaručovalo dobrou produkci žádaných sekundárních metabolitů a rychlý kontinuální růst kalusu.

V současné době je zřejmý stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s širokým spektrem biologických účinků těchto sekundárních metabolitů [1,3-7]. Velmi nadějným zdrojem těchto přírodních látek je jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*). Je používán v lidovém léčení a jako hospodářská plodina. V poslední době se objevuje množství přípravků s obsahem výtažků z jetele lučního, které jsou doporučovány ženám na odstranění či zmírnění příznaků menopauzy. Mnohé studie se snaží potvrdit toto příznivé působení na postmenopauzální potíže, jejich výsledky ale nejsou jednotné [9,11].

Cílem této práce bylo odvodit kalusovou kulturu z klíčící rostliny čtyř odrůd *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8, DO-9, Tempus, Sprint), určit vhodné složení živného média a na základě růstové a produkční charakteristiky stanovit vhodný subkultivační interval pro kultivaci této kultury.

Jednu z významných složek živného média u rostlinných explantátových kultur představují růstové regulátory. Proto byla nejprve vyzkoušena řada stimulatorů v rozmezí koncentrací obvykle používaných při kultivaci explantátových kultur a v koncentracích, které vycházely z publikovaných údajů [58-64], s cílem najít optimální růstový stimulator. Tvorbu kalusu iniciovaly především následující množství auxinů a cytokininů přidávané na 1 litr základního média: 10 mg NAA; 10 mg NAA+1mg BA; 2 mg NAA+2 mg 2,4-D+2 mg kinetin; 0,5mg NAA+1,25 mg

2,4-D+0,5 mg kinetin; 0,05 mg NAA+0,5 mg kinetin; 5 mg 2,4-D+1 mg NAA; 3 mg 2,4-D; 2 mg 2,4-D+2 mg BA; 5 mg 2,4-D+2 mg BA.

Na základě všech pozorování je možné uvést, že pro kultivaci explantátové kultury *Trifolium pratense* L. je optimální živné médium podle Gamborga [49] s přidavkem 2 mg.l^{-1} 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 2 mg.l^{-1} 6-benzylaminopurinu. K tvorbě kalusu došlo po pěti až sedmi dnech kultivace klíčící rostliny. Kalusy byly většinou světle žluté, křehké, vykazovaly uspokojivý růst bez tendence k morfogenezi. Stabilní a homogenní rostlinný materiál byl získán až po jednom roce pravidelného pasážování při dodržování konstantních podmínek kultivace (teplota, osvětlení, složení živné půdy, frekvence pasážování). Mezi jednotlivými kalusovými kulturami odvozenými od různých odrůd *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8, DO-9, Tempus, Sprint) nebyly zjištěny patrné rozdíly v charakteru kalusů.

U jednoleté kalusové kultury *Trifolium pratense* L. odrůdy DO-8 (20. pasáž), která vykazovala nejlepší životaschopnost a tak poskytla nejvíce homogenního materiálu, byla stanovena růstová a produkční charakteristika. Od 8. dne kultivace byly v sedmidenních intervalech po dobu padesáti dnů odebírány kalusy (vždy z pěti baněk), u kterých byl zjištěn přírůstek čerstvé hmotnosti a vypočítán růstový faktor. V těchto vzorcích byl po usušení za laboratorní teploty dále spektrofotometricky stanoven obsah flavonoidů podle ČL 2002 [66].

Z charakteru růstové křivky (graf č. 1) vyplývá, že po lag fázi (tj. asi od 15. dne kultivace) následuje dlouhá exponenciální fáze, přičemž maxima růstu je dosaženo až ve 43. dni kultivace, po kterém dochází pravděpodobně v důsledku postupného vyčerpávání živin a hromadění metabolických produktů k poklesu rychlosti růstu.

Z produkční křivky (graf č. 2) je zřejmé, že obsah flavonoidů až do 22. dne kultivace nejprve klesal, což lze vysvětlit tím, že v počáteční růstové fázi kultury se v buňkách neuskutečňuje syntéza nových metabolitů a růstem biomasy kultury dochází zřejmě k ředění obsahových látek vnesených do baňky inokulem (1. maximum produkce v 8. dni subkultivace - 0,107 %). Ve 29. dni subkultivace bylo pak zjištěno druhé maximum produkce (0,084 %). V následujících dnech kultivace došlo k poklesu obsahu flavonoidů, pravděpodobně v důsledku intenzivnějšího růstu kultury mezi 29. a 43. dnem kultivace. Na základě těchto poznatků je možné

doporučit pro kalusovou kulturu *Trifolium pratense* L. subkultivační interval 29 až 43 dní.

Obsah flavonoidů ve 29. dni kultivace, tedy ve dni, kdy bylo u kalusové kultury odvozené z variety DO-8 zjištěno druhé maximum produkce, byl sledován také v kalusových kulturách odvozených z dalších odrůd *Trifolium pratense* L. Obsahy v jednotlivých kulturách byly následující: varieta DO-9 0,075 %, Tempus 0,079 % a odrůda Sprint 0,122 %. Z uvedeného vyplývá, že kalusová kultura odvozená z odrůdy Sprint vykazovala, podobně jako u intaktní rostliny odrůdy Sprint [9], nejvyšší produkci flavonoidů, a proto z ní bude odvozena suspenzní kultura.

Vztah mezi růstem explantátových kultur a sekundárním metabolismem není přesně vymezen, většinou však existuje nepřímá závislost mezi rychlostí růstu a akumulací sekundárních metabolitů, podobně jako u námi sledované explantátové kultury *Trifolium pratense* L. Tento poznatek naznačuje určitý antagonismus primárního a sekundárního metabolismu, což na molekulární úrovni představuje rozdílné využívání společných prekurzorů [38].

Vedle sledování růstu a produkce flavonoidů bylo dále orientačně zkoušeno, zda nově odvozené explantátové kultury *Trifolium pratense* L. jsou schopny produkovat isoflavonoidy (genistein, daidzein, formononetin a biochanin A). Pomocí HPLC [9] byla zjištěna u všech kultur pouze malá přítomnost isoflavonoidu formononetinu (0,01-0,02 %). Nově odvozená explantátová kultura je tedy schopna produkovat v malém množství také isoflavonoidy, a proto bude dále použita pro další studie metabolismu těchto významných látek.

7. ZÁVĚR

Dosažené výsledky práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Byla odvozena kalusová kultura z klíčnicí rostliny čtyř odrůd *Trifolium pratense* L. (variety DO-8, DO-9, Tempus, Sprint).
- 2) Pro kultivaci kalusové kultury *Trifolium pratense* L. je optimální živné médium podle Gamborga s přidavkem 2 mg.l^{-1} 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2 mg.l^{-1} 6-benzylaminopurinu.
- 3) Z růstové a produkční charakteristiky vyplývá, že pro kalusovou kulturu *Trifolium pratense* L. je vhodný subkultivační interval 29 až 43 dní, neboť v tomto období subkultivace byl zaznamenán intenzivní růst kultury a vrchol produkce flavonoidů.
- 4) Nejvyšší produkce flavonoidů byla zjištěna u kalusové kultury odvozené z variety Sprint, a proto z ní bude odvozena suspenzní kultura.
- 5) U kalusové kultury *Trifolium pratense* L. (variety DO-8, DO-9, Tempus, Sprint) byl stanoven isoflavonoid formononetin.

8. SEZNAM LITERATURY

- [1] Luczkiewicz, M., Glód, D.: *Plant Sci.* 165, 1101 (2003)
- [2] Dušek, J. et al.: *Čes. a Slov. Farm* 45, 204 (1996)
- [3] Thiem, B.: *Plant Sci.* 165, 1123 (2003)
- [4] Lozovaya, V. V. et al.: *Plant Physiol. Biochem.* 42, 671 (2004)
- [5] Federici, E. et al.: *Phytochemistry* 64, 717 (2003)
- [6] Li, W. et al.: *Phytochemistry* 58, 595 (2001)
- [7] Fedoreyev, K. et al.: *Fitoterapia* 71, 365 (2000)
- [8] Korbelář, J., Endris, Z.: *Naše rostliny v lékařství*, Avicenum, Praha 1981, s. 178
- [9] Pízová, R.: *Fytochemický výzkum nadzemní části *Trifolium pratense* L.* (diplomová práce), Farmaceutická fakulta UK, 2004
- [10] Rijke, E. D. et al.: *J. Chromatogr. A* 932, 55 (2001)
- [11] Wu, Q. et al.: *J. Chromatogr. A* 1016, 195 (2003)
- [12] Slavík, B. et al.: *Květena České republiky*, Academia, Praha 1995, s. 474
- [13] Pilát, A., Ušák, O.: *Atlas rostlin*, SPN, Praha 1964, s. 108
- [14] <http://rostliny.prirodou.cz>, 1.10.2005
- [15] Hron, F., Zejbrlík, O.: *Rostliny polí a zahrad*, SPN, Praha 1974, s. 192-193
- [16] Gran, J., Jung, R., Münker, B.: *Bobulovité užitkové a léčivé rostliny*, Ikar, Praha 1996, s. 102
- [17] Tsunoda, N., Pomeroy, S., Nestel, P.: *J. Nutr.* 132, 2199 (2002)
- [18] Berman, A., Kronenberg, F.: *J. North Americ. Menopause Soc.* 8, 335 (2001)
- [19] Zand, R. S. R., Jenkins, D. J. A., Diamandis, E. P.: *Clinica Chimica Acta* 312, 213 (2001)
- [20] <http://faf.vfu.cz/index.php>, 5.10.2005
- [21] Hubík, J. et al.: *Obecná farmakognosie II., Sekundární látky*, SPN, Praha 1989, s. 31-36
- [22] <http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/texty/flavon.htm>, 7.10.2005
- [23] <http://mail.faf.cuni.cz/public>, 7.10.2005
- [24] Bruneton, J.: *Pharmacognosy*, Lavoisier Publ., Paris 1999, s. 172
- [25] Mazur, W., Adlelercreutz, H.: *Pure Appl. Chem.* 70, 1759 (1998)

- [26] Kaufman, P. B. et al.: *J. Altern. Complem. Med.* 3, 7 (1997)
- [27] Adlelercreutz, H., Mazur, W.: *Ann. Med.* 29, 95 (1997)
- [28] Kroyer, G. T.: *Innovat. Food Sci. Emerging Technol.* 5, 101 (2004)
- [29] Ren, M. Q. et al.: *Eur. J. Nutr.* 40, 135 (2001)
- [30] Routledge, E. J. et al.: *J. Biol. Chem.* 275, 35986 (2000)
- [31] Harris, H. A. et al.: *Steroids* 67, 379 (2002)
- [32] Setchell, K. D., Cassidy, A.: *J. Nutr.* 129, 758 (1999)
- [33] Kass-Annase, B.: *Clin. Obstet. Gynecol.* 43, 162 (2000)
- [34] Miksicek, R. J.: *Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 44 (1995)
- [35] Hong, T. et al.: *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* 317, 259 (2004)
- [36] Kuiper, G. G. et al.: *Endocrinology* 139, 4252 (1998)
- [37] Kuiper, G. G. et al.: *Endocrinology* 138, 863 (1997)
- [38] Kováč, J.: *Explantátové kultury rostlin*, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1995, s. 13-21, 26-27, 50-95
- [39] Sikyta, B., Dušek, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*, 1. vydání, Karolinum, Praha 1992, s. 84-97
- [40] Mayer, A. M.: *Phytochemistry* 22, 1329 (1983)
- [41] Ziv, M., Halevy, A. M.: *Hort. Sci.* 18, 434 (1983)
- [42] Novák, F. J.: *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*, Academia, Praha 1990, s. 5-57
- [43] Siatka, T.: *Čes. a Slov. Farm.* 44, 252 (1995)
- [44] Kamenická, A., Rypák, M.: *Explantáty v rozmnožování dřevín*, Veda, Bratislava 1989, s. 42-45
- [45] Hilton, M. G., Rhodes, M. J. C.: *Planta Med.* 59, 340 (1993)
- [46] Dufresne, Ch., Cormier, F., Dorion, S.: *Planta Med.* 63, 150 (1997)
- [47] Murashige, T., Skoog, F.: *Physiol. Plant.* 15, 475 (1962)
- [48] Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C.: *Can. J. Bot.* 50, 199 (1972)
- [49] Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: *Exp. Cell Res.* 50, 151 (1968)
- [50] Nitsch, C., Nitsch, J. P.: *Planta* 72, 355 (1967)
- [51] Miller, C., O.: In: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* 6, 194 (1963)
- [52] McCown, B., Lloyd, G.: *Hort. Sci.* 16, 453 (1981)
- [53] Sepehr, M. F., Ghornbanli, M.: *Plant Cell Tis. Org.* 68, 171 (2002)
- [54] Landa, Z. et al.: *Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění*, SPN, Praha 1980, s. 7-45

- [55] Kincl, M., Causy, L.: *Základy fyziologie rostlin*, SPN, Praha 1977, s. 103-106
- [56] Marvani, E.: *Nat. Prod. Sci.* 3, 75 (1997)
- [57] Jain, S. C., Purohit, M.: *Herba Pol.* 31, 115 (1985)
- [58] Poerba, Y. S.: *Plant Physiol.* 57, 5399 (1997)
- [59] Pederson, G. A.: *Plant Sci.* 45, 101 (1986)
- [60] Wang, H., Holl, F. B.: *Plant Sci.* 55, 159 (1988)
- [61] Bond, J. E., Webb, K. J.: *Plant Sci.* 61, 119 (1989)
- [62] Mizuhiro, M. et al.: *Plant Sci.* 160, 1221 (2001)
- [63] Beach, K. H., Smith, R. R.: *Plant Sci. Lett.* 16, 231 (1979)
- [64] Matkowski, A.: *J. Plant Physiol.* 161, 343 (2004)
- [65] Dušek, J., Zahradníček, M., Hubík, J.: *Českoslov. Farm.* 35, 313 (1986)
- [66] Kolektiv autorů: *Český lékopis 2002*, Grada, Praha 2002, s. 2155

OBSAH

1. ÚVOD.....	4
2. CÍL PRÁCE	5
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
3.1. Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L., <i>Fabaceae</i>).....	6
3.1.1. Popis rostliny, výskyt.....	6
3.1.2. Odrůdy	8
3.1.3. Sběr, úprava, použití	8
3.1.4. Obsahové látky	9
3.1.4.1. Flavonoidy	9
3.1.4.2. Isoflavonoidy	11
3.2. Rostlinné explantáty.....	13
3.2.1. Obecná charakteristika	13
3.2.2. Vlastnosti rostlinných kultur	15
3.2.3. Kultivace rostlinných kultur in vitro	15
3.2.3.1. Odvození kalusové kultury	15
3.2.3.2. Fyzikální podmínky kultivace.....	17
3.2.3.3. Živné médium	19
3.2.3.4. Růstové regulátory	21
3.2.3.5. Růstové fáze kultury	26
3.2.4. Biotechnologické využití rostlinných explantátových kultur	28
3.2.4.1. Produkce sekundárních metabolitů	28
3.2.4.2. Rozmnožování a šlechtění rostlin	31

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1. Použitý materiál, přístroje a pomůcky.....	33
4.1.1. Rostlinný materiál	33
4.1.2. Chemikálie	33
4.1.3. Přístroje a pomůcky	34
4.2. Kultivace explantátové kultury.....	34
4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje, podmínky pasážování.....	34
4.2.2. Příprava živného média	35
4.2.3. Odvození kalusové kultury.....	36
4.3. Stanovení růstové a produkční charakteristiky	37
4.3.1. Stanovení růstového faktoru.....	37
4.3.2. Stanovení obsahu flavonoidů.....	38
4.4. Stanovení obsahu isoflavonoidů.....	39
5. VÝSLEDKY	41
5.1. Tabulková část.....	41
5.2. Obrazová část.....	46
6. DISKUSE.....	47
7. ZÁVĚR	50
8. SEZNAM LITERATURY	51

