

**UNIVERZITA KARLOVA
V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA FARMAKOGNOZIE

Mgr. Andrea Dubová

Explantátová kultura *Trifolium pratense* L.

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

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

Oponent rigorózní práce:

Prohlašuji, že jsem na rigorózní práci pracovala samostatně a použila jsem pouze uvedenou literaturu.

Andruša Dulová

Úvodem své rigorózní práce bych chtěla poděkovat PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky a také Mgr. Janu Martinovi za pomoc při měření vzorků.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	3
3. TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1. Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L.)	4
3.1.1. <i>Botanický popis</i>	4
3.1.2. <i>Charakteristika drogy</i>	4
3.1.3. <i>Obsahové látky</i>	5
3.1.4. <i>Biologické účinky a použití drogy</i>	10
3.2. Rostlinné explantáty	12
3.2.1. <i>Charakteristika</i>	12
3.2.2. <i>Odvození a udržování kultury</i>	14
3.2.3. <i>Kultivační podmínky</i>	15
3.2.4. <i>Růstové fáze kultury</i>	16
3.3. Elicitace	18
3.3.1. <i>Obranné reakce rostlin</i>	18
3.3.2. <i>Elicitace</i>	23
3.3.3. <i>Mechanismus účinku elicitorů</i>	24
3.3.4. <i>Měď</i>	27
3.3.5. <i>Kyselina jasmínová</i>	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1. <i>Přístroje a pomůcky</i>	32
4.2. <i>Chemikálie</i>	32
4.3. <i>Rostlinný materiál</i>	33
4.4. <i>Stanovení ztráty sušením</i>	33
4.5. <i>Kultivace explantátové kultury</i>	33
4.5.1. <i>Kultivační nádoby a nástroje, podmínky pasážování</i>	33
4.5.2. <i>Příprava živného média</i>	34
4.5.3. <i>Odvození kalusové kultury</i>	35
4.5.4. <i>Odvození suspenzní kultury</i>	35
4.6. <i>Elicitace</i>	36
4.6.1. <i>Příprava roztoků elicitoru</i>	36
4.6.2. <i>Elicitace a odběr kultur</i>	37
4.7. <i>Stanovení obsahu flavonoidů</i>	37
4.7.1. <i>Princip stanovení</i>	37
4.7.2. <i>Postup stanovení</i>	37
4.8. <i>Stanovení obsahu isoflavonoidů</i>	39
4.9. <i>Statistické zpracování výsledků</i>	40
5. VÝSLEDKY	42
5.1. <i>Tabulky</i>	42
5.2. <i>Grafy</i>	46
6. DISKUSE	48
7. ZÁVĚR	54
8. SEZNAM LITERATURY	55

1. ÚVOD

Rostliny jsou již od nejstarších dob důležitým zdrojem potravy, olejů, barviv, vláknin a hlavně zdrojem velké řady chemických látek využívaných v medicíně. Terapeutické využití léčivých rostlin sahá hluboko do dějin lidstva. Ještě v 19. stol. tvořily rostlinné drogy a extrakty základ tehdejších léčebných prostředků. Léčivé rostliny a účinné látky v nich obsažené stále zaujímají v terapii a prevenci chorob své nezastupitelné místo. Chemická struktura mnohých přírodních látek se stala vzorem pro synteticky vyráběná léčiva. V důsledku velkého množství přírodních struktur je tato varianta přípravy velice komplikovaná, časově i ekonomicky náročná a pro průmyslovou výrobu tudíž nepoužitelná. V těchto případech zůstávají léčivé rostliny jediným využitelným zdrojem terapeuticky účinných látek.

Rostlinný materiál se získává buď sběrem intaktních rostlin nebo z polních monokultur. Ani jedna z jmenovaných metod není ideální. Sběr nelze provádět v případě, že je rostlina chráněná. Dále dochází ke zmenšování rostlinných zdrojů, způsobenému zabíráním půdy pro nezemědělské účely. Současně stoupá spotřeba léků a tím i nároky farmaceutického průmyslu na množství přírodních surovin. Planě rostoucí druhy často nemohou pokrýt spotřebu drog, hrozí také nebezpečí záměny. Při pěstování léčivých rostlin v monokulturách se zvyšuje riziko výskytu škůdců a chorob, nelze se proto vyhnout použití pesticidů, které mohou nepříznivě ovlivnit biosyntézu sekundárních metabolitů i znehodnotit rostlinnou drogu rezidui. Společnými nevýhodami sběru i pěstování je sezónní sklizeň, ovlivnění produkce účinných látek klimatickými faktory, jako jsou teplota, světlo, půdní a vodní podmínky, v jejichž závislosti se může měnit nejen množství jednotlivých rostlinných metabolitů, ale i jejich poměrné zastoupení (1).

Tyto obtíže vedly k hledání alternativních způsobů zajišťování přírodních surovin.

Jednou z možností je využití biotechnologických metod založených na kultivaci rostlinných buněk a tkání. Explantátové kultury mohou být odvozeny od jakékoli rostliny a její části. Velké množství látek je tak získáváno z obtížně pěstovaných a ohrožených druhů rostlin. Kultivace probíhá za řízených podmínek - bez závislosti na ročním období, klimatických podmínkách, výkyvech počasí, půdních poměrech apod. Produkovaná biomasa je sterilní (prostá kontaminujícími zárodky, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultur) a vysoce homogenní. Další předností tohoto způsobu pěstování rostlin je kontinuální produkce umožňující získávání požadovaných látek během celého roku. Výhodou je

i možnost zavést do genomu explantátových buněk cizí geny a následně vyselektovat vysokoprodukční kmeny (2).

Systematický výzkum vedoucí ke zvýšení produkce farmaceuticky významných sekundárních metabolitů je zaměřen na vyselektování nejvhodnější buněčné linie, charakteristiku optimálních růstových a produkčních podmínek. Také se zabývá biosyntézou žádaných primárních nebo sekundárních metabolitů, snaží se pojmenovat klíčové biosyntetické enzymy, charakterizovat kompartmentaci těchto enzymů a jednotlivých biosyntetických kroků a transportních mechanismů zajišťujících přesun látek z jednoho subcelulárního kompartmentu do druhého subcelulárního kompartmentu.

Zvýšení produkce a akumulace sekundárních metabolitů v rostlinách pěstovaných běžným způsobem i v kulturách *in vitro* lze dosáhnout pomocí elicítace. Jedná se o metodu, která je založena na signálem (elicítorem) indukované expresi genů, vedoucí k nárůstu hladiny metabolicky aktivních enzymů – a následně i k zintenzivnění syntézy sekundárních metabolitů (3).

V současné době je zřejmý stoupající zájem např. o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s širokým spektrem biologických účinků těchto sekundárních metabolitů. Velmi nadějným zdrojem flavonoidů a isoflavonoidů je jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*).

2. CÍL PRÁCE

1. Seznámení se s metodikou kultivace rostlinných explantátových kultur
2. Odvození kalusové a suspenzní kultury z klíčící rostliny *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint)
3. Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů u odvozených explantátových kultur metodou abiotické a biotické elicitace

3. TEORETICKÁ ČÁST

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

3.1.1. Botanický popis

Jetel luční je vytrvalá bylina z čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Podzemní část rostliny tvoří dlouhý kulový rozvětvený kořen. Lodyhy jsou četné, přímé, vystoupavé až poléhavé, jsou jednoduché nebo chudě větvené, často načervenalé. Dolní listy jsou dlouze řapíkaté, prostřední a horní s krátkými řapíky jsou až téměř přisedlé. Lístky jsou podlouhle kopinaté, obvejčité až téměř okrouhlé, obvykle na líci lysé, nezřetelně řapíkaté. Palisty horních listů jsou trojúhelníkovité, náhle zúžené v šídlovitou, obvykle brvitou špici. Květní hlávky jsou kulovité, mnohokvěté, jednotlivé nebo po dvou, podepřené velkými palisty podpůrných listů. Květy jsou obvykle přisedlé, které jsou vždy bez listenů. Koruny jsou karmínové nebo červené, vzácněji bílé (4).

Plodem jsou lusky, které jsou vejčité, na špičce ztlustlé (5).

Rostlina původně pochází z Evropy, je zdomácnělá a pěstovaná i ve východní Asii, v Severní i Jižní Americe, v Austrálii, na Novém Zélandu a v jižní Africe (4).

3.1.2. Charakteristika drogy

Drogu tvoří nerozpadlé usušené květní hlávky (strbouly), z kterých je při sběru nutné odstranit palisty podpůrných listů (6). Překvetlé jsou bezcenné, při sušení hnědnou. Květy se mohou jeden den vystavit v jednoduché vrstvě přímému slunci a pak dosušit ve stínu a v průvanu. Správně usušená droga zachovává původní barvu nebo trochu ztmavne, ale nesmí být rezavá. Hlavní podmínkou je, aby hlávky zůstaly v celku a nebyly uvnitř suché. Suší-li se uměle, nemá teplota překročit 35 °C. Drogu je potřeba při skladování chránit před vlhkostí a světlem, rychle podléhá zkáze (7).

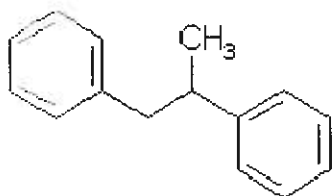
3.1.3. Obsahové látky

K terapeuticky účinným obsahovým látkám jetele lučního (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) patří především flavonoidy a isoflavonoidy. Dále droga obsahuje trísloviny, kumariny, saponiny, kyanogenní glykosidy, fenolické glykosidy, silice, organické kyseliny (salicylovou, oxalovou, kumarovou, hroznovou aj.).

Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany). Nejčastěji se v přírodě vyskytují flavany. Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavany dělí do několika skupin: flaven, flavanon, flavanol, flavanonol, flavandiol, flavon, flavonol. Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin (8). Flavonoidy se obvykle vyskytují v rostlinách ve formě glykosidů, rozpuštěných v buněčné šťávě vakuoly, spojených s cukernými substituenty, jako je např. galaktóza, rhamnóza nebo glukóza, nebo ve formě glukosidmalonátů. Malonáty mají určitý biologický význam, rostliny mohou využít tyto konjugované formy k uchování méně rozpustných flavonoidních aglykonů. V okamžiku mikrobiální infekce, jsou aglykony uvolněny z těchto prekurzorů hydrolýzou zásobních forem (9).

Mezi hlavní flavonoidní glykosidy patří rutin, který se používá k léčbě hemoragií, alergií, hypertenze a jako adjuvans při infekčních onemocněních. Dále hesperidin, který je obsažen v oplodí nezralých citrusových plodů. Používá se spolu s vit. C při lomivosti kapilár, hemorhagii a hypertenzi. Mezi další flavonoidy patří kvercitrin a myricitrin, které fungují jako diuretika (8).

Isoflavonoidy patří mezi rozsáhlou skupinu flavonoidů. Všechny isoflavonoidy jsou barevné látky, které jsou zodpovědné za barvu květů a plodů. Strukturně se od flavonoidů liší základním 1,2-difenylypropanovým skeletem.



Isoflavonoidy jsou strukturně více rozmanité než ostatní skupiny flavonoidů a tvoří několik skupin, které se liší stupněm oxidace pyranového kruhu.

Jsou to deriváty:

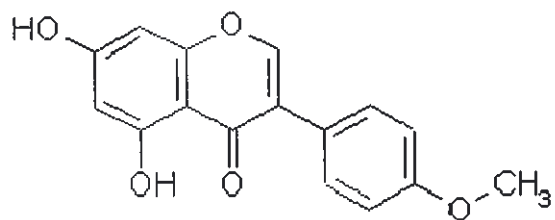
- **3-fenylchromonu** (isoflavony, isoflavanony, rotenoidy, kumaronochromony, 3-arylkumariny, 3-aryl-4-hydroxykumariny)
- **3-fenylchromanu** (isoflavany, pterokarpany, isoflavonoidní oligomery, isoflavonoly)
- **3-fenylchromenu** (isoflav-3-eny)
- **2-arylbenzofuranu** (2-arylbenzofurany)
- **Isoflavonoidy s otevřeným pyranovým cyklem** (methyldeoxybenzoiny)

Nejrozsáhlejší skupinou isoflavonoidů jsou isoflavony a druhou nejpočetnější pterokarpany. Isoflavony jsou taxonomicky úzce rozšířeny v přírodě na rozdíl od ostatních všudypřítomných flavonoidů. Isoflavonoidy se vyskytují v převážné většině v rostlinách bobovitých (*Fabaceae*), též vikvovitých (*Viciaceae*). 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*).

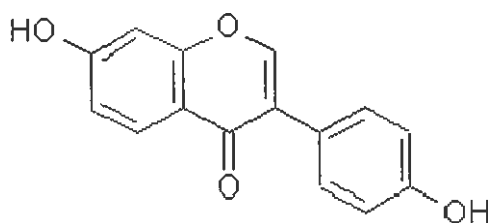
Isoflavonoidy existují jednak volné jako aglykony, jednak ve formě glykosidicky vázaných sloučenin. Isoflavonoidy se vyskytují ve vakuolách převážně jako více polární malonylglukosidy (10). Absorpce je zahájena hydrolyzou esterové vazby glykosidů. Dekonjugace isoflavonoidních malonylglukosidů je katalyzována 2 enzymy: isoflavonoidní malonylglukosid malonylesteráza (IEST) a isoflavonoidní glukosid glukozidáza (IGLC). IEST je enzym poutaný na tonoplastovou membránu vakuoly, kdežto IGLC je cytosolický protein lokalizovaný v apoplazmě (11). Po absorpci, která probíhá po celé délce střeva a pravděpodobně pasivní difúzí, jsou volné aglykony transformovány na glukuronidy a sulfoglukuronidy, ovšem převládá transformace na glukuronáty. Tato reakce je katalyzována UDP-glukuronyltransferázou. Tyto konjugáty jsou podobně jako u endogenních estrogenů vylučovány močí, ale ne více než 50 % a v menší míře stolicí. Eliminace močí probíhá ve dvou vlnách, ta druhá bývá vyvolána pravděpodobně uvolněním isoflavonoidů z enterohepatální cirkulace. Metabolismus isoflavonoidů závisí na řadě faktorů, jako je pohlaví, stáří, fáze menstruačního cyklu, dávka, doba expozice, apod.

Mezi hlavní isoflavonoidy patří biochanin A, daidzein, formononetin a genistein (12).

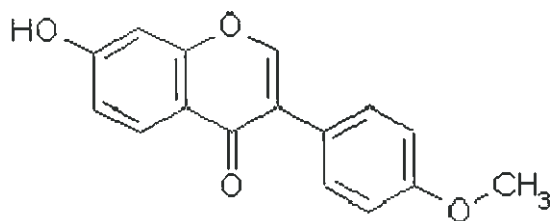
biochanin A



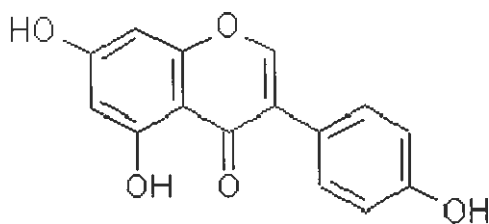
daidzein



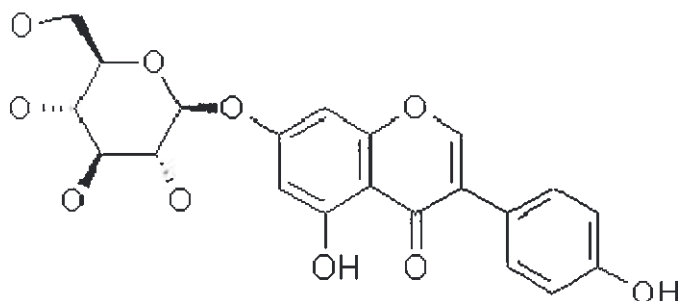
formononetin



genistein



genistin (genistein-7-glukosid)



Biochanin A je metabolizován ve střevě na genistein, formononetin se mění na daidzein a daidzein na equol (13,14).

Eva de Rijk a kol. se zabývali určením isoflavonoidů v extraktech *Trifolium pratense* L. a provedením stabilitních studií. Bylo zjištěno, že uchovávání extraktů je nejvhodnější při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy přinejmenším 1 – 2 týdny nebyly pozorovány významné ztráty malonátových esterů. Dále vzorky byly podrobeny zahřívání při $83\text{ }^{\circ}\text{C}$, nejdříve bez acidifikace, kde se prokázalo, že formononetin glukosidmalonát a biochanin A glukosidmalonát se během 2 hodin mění na příslušné glykosidy, jejichž koncentrace rychle roste. Stejný experiment byl proveden i s přidáním koncentrované HCl, kdy degradace malonátů byla mnohem rychlejší. Původní složky se změnily během 60 – 90 minut a tvořící se glykosidy byly následně rychle přeměněny na aglykony – formononetin a biochanin A. Tato celá přeměna trvala asi 2 hodiny. Z toho vyplývá, že pro kvantifikační záměry je preferována hydrolýza bez přítomnosti kyseliny (15).

V jedné studii byl hledán vhodný inhibitor rostlinné β -glukosidázy, která způsobuje rychlou degradaci malonylglukosidů na jejich příslušné aglykony z důvodu obtížné extrakce isoflavonoidních malonylglukosidů z drogy *Trifolium pratense* L.. Zjistilo se, že β -glukosidáza je odolná vůči vysokým teplotám a naopak extrakce za $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ poskytuje vysoký obsah isoflavonoidních malonátů v porovnání s extrakcí prováděnou za pokojové teploty. Dale a kol. (16) určili, že různé aminy mohou inhibovat tento enzym reverzibilně. Bylo identifikováno několik inhibitorů, avšak Tris byl určen jako nejlepší inhibitor β -glukosidázy. Z pokusu vyplývá, že 350 mM Tris při pH 7,2 je optimální pro extrakci isoflavonoidů.

Koncentrace nižší než 125 mM Tris způsobily nárůst obsahu aglykonů a pokles hladiny malonylglukosidů. Při alkalické extrakci dochází k rozdělení malonylové skupiny za vzniku 7-O-glukosidů. Na druhé straně kyselá extrakce produkuje více aglykonů paralelně se snížením obsahu isoflavonoidních glukosidů (17).

Také byl studován vliv akutního vystavení ozónu na dva druhy jetele – *Trifolium pratense* L. a *Trifolium repens* L. Viditelné poškození bylo patrné pouze u druhu *Trifolium pratense* L., kdy 24 hod od ukončení ozáření se na listech objevily hnědé nekrotické léze. Poškozená místa tvořily kolem 30 % celé plochy listů. Z biochemického hlediska, u obou druhů byly odhaleny určité změny indukované ozónem. Bylo pozorováno snížení fotosyntetické účinnosti, stejně tak i redoxního stavu askorbátu. Dále byl zjištěn pokles aktivity antioxidantních enzymů – peroxidázy a askorbátperoxidázy. Také bylo potvrzeno, že *Trifolium pratense* L. je citlivější vůči působení polutantů než *Trifolium repens* L. (18)

René Mascher a kol. zkoumali biochemické stresové reakce ve výhoncích *Trifolium pratense* L. po vystavení působení arzenu. Půda byla obohacena různými koncentracemi Na_2HAsO_4 nebo směsí těžkých kovů (Cd + Zn + As). Bylo zjištěno, že výrazné potlačení růstu výhonků bylo pozorováno pouze při vysokých koncentracích arzenu. Naopak přidání směsi těžkých kovů stimulovalo růst těchto výhonků a kořenů. Dále bylo pozorováno, že vysoké koncentrace arzenu snižují obsah chlorofylu a karotenoidů, což potvrzuje jedovatý efekt arzenu na zelené listy. Také pokles obsahu glutathionu byl zaznamenán po přidání kovu. Naopak vzrostla hladina antioxidantních polyaminů (sperminu, spermidinu a putrescinu) a antioxidantních enzymů, jako jsou superoxidodismutáza (SOD) a peroxidáza. Tato zjištění indukují oxidativní stres způsobený přidáním arzenu do půdy. Nárůstu SOD aktivity a hromadění polyaminů stejně tak jako ztrátě chlorofylu se může předejít přidáním směsi těžkých kovů, která potlačuje toxicitu arzenu (19).

3.1.4. Biologické účinky a použití drogy

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemorhagicky a antiedematózně. Jsou inhibitory hyaluronidázy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi, jsou proto podpůrnými prostředky při léčení infekčních nemocí. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S ionty Ca^{2+} tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C. Mají též vlastnosti cholaretické, cholagogní a spasmolytické (8).

Díky obsahu isoflavonoidů vykazuje droga fytoestrogenní aktivitu. Isoflavonoidní fytoestrogeny, založeny na strukturální podobnosti estrogenu – 17 β -estradiolu, projevují potenciální léčebný účinek na věkem ovlivněných a věkem závislých nemocech, zahrnujících rakovinu, menopauzální příznaky, kardiovaskulární obtíže a osteoporózu (20).

Účinek isoflavonoidů se neprojevuje pouze prostřednictvím estrogenních receptorů, ale mohou ovlivňovat různé enzymy, syntézu proteinů, transport vápníku, oxidaci lipidů, diferenciaci buněk nebo účinek růstových faktorů.

Váží se především na estrogenový receptor β , jehož prostřednictvím nedochází k proliferaci endometria a prsních buněk a díky tomu jsou vhodnými kandidáty pro alternativní menopauzální terapii, kde je nižší riziko prsní a děložní rakoviny, než při užívání syntetických estrogenů. Také ztráta kostní denzity, která je často pozorovaná během menopauzy, může být vhodně ovlivněna stravou obsahující fytoestrogeny z jetele lučního (21). Isoflavonoidy zvyšují vstřebávání vápníku a jeho utilizaci do kostí a také zvyšují činnost osteoclastů.

Isoflavonoidy mohou mít pozitivní vliv na srdeční onemocnění působením na estrogenní receptory, ale také snižováním koncentrace lipidů a lipoproteinů v plazmě. Na lipidové spektrum mají příznivější vliv spíše nižší dávky než příliš vysoké dávky isoflavonů. V prevenci aterosklerózy hrají významnou roli isoflavonoidy i vzhledem ke zlepšení vazodilatace u žen v menopauze.

U isoflavonoidů byly prokázány protektivní účinky vůči mnoha nádorům. Jedná se zejména o hormon dependentní tumory. Hlavní mechanismus protektivního účinku spočívá ve snížení koncentrace endogenních estrogenů. Ovšem i jiné mechanismy mají velký význam. Mnohdy klíčovým mechanismem bývá inhibice enzymů, které jsou spojeny s růstem buněk

(ornithindekarboxyláza, tyrosinproteinkináza, DNA-topoisomeráza I a II a histidinproteinkináza), nebo enzymů řídících produkci estronu z androgenů (aromatáza).

Předpokládá se také pozitivní vliv fytoestrogenů na výskyt a mortalitu hormonálně závislé rakoviny prostaty. Klinická data předpokládají interakci isoflavonoidů a dalších fytoestrogenů s androgenním receptorem (22). Zde mají význam biochanin A, daidzein, a genistein. Význam při léčbě onemocnění prostaty má i inhibiční vliv na 5 α -reduktázu, enzym, který zajišťuje přeměnu testosteronu na dihydrotestosteron. Isoflavonoidy hrají důležitou roli v prevenci rakoviny prsů, vaječníků a dělohy. Z dalších nádorových onemocnění isoflavonoidy (např. genistein) inhibují proliferaci leukemických buněk a melanomů. Inhibují také buněčnou proliferaci u některých solidních nádorů, jako jsou neuroblastomy, rhabdomyosarkomy či Ewingův sarkom.

Tyto produkty vykazují i jiné aktivity jako je inhibice nebo interference s aromatázou, hydroxysteroiddehydrogenázou a sulfotransferázou. Byly také prokázány antioxidační účinky (23).

Silice z jetele lučního má dezinfekční účinky, které se spolu s účinky tříslovin uplatňují při trávicích obtížích zapříčiněných přemnožením nežádoucí střevní flóry. Adstringentní a dezinfekční působení se terapeuticky využívá také na mokvající infikované kožní léze, při ekzémech a kožních vyrážkách. Éterický olej se vylučuje převážně dýchacími cestami, kde podporuje tvorbu ochranných hlenů a zároveň působí dezinfekčně. Využívá se proto i při akutních a chronických zápalech horních dýchacích cest (24).

3.2. Rostlinné explantáty

3.2.1. Charakteristika

Pro získávání přírodních farmaceuticky významných látek se stále více využívají biotechnologické metody než metody syntetické či semisyntetické. Obecným nedostatkem této metodiky je komplikovaná struktura mnoha rostlinných sekundárních metabolitů nutná pro kompletní a ekonomicky proveditelnou syntézu. Jednou z možností biotechnologické produkce jsou kultury rostlinných explantátů.

Rostlinný explantát je fragment živého pletiva, orgán nebo komplex orgánů odebraný z intaktní rostliny, nebo z již existující kultury, pěstovaný ve sterilních podmínkách *in vitro* na definované živné půdě.

Buněčné suspenzní kultury jsou relativně homogenní populace buněk, nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu. Buňky suspenze jsou v přímém kontaktu s živným médiem, což zaručuje snadný přístup živin a výměnu dýchacích plynů. Buněčné suspenzní kultury jsou nejvíce využívány ke studiu produkce sekundárních metabolitů, indukce enzymů, genové exprese atd. (25).

Syntézu a akumulaci sekundárních metabolitů je možné považovat za aspekt diferenciací, jev, který je charakterizován biochemicky, histochemicky a morfologicky. Bylo demonstrováno, že v rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se akumuluje malé množství metabolitů a že při procesech cytodiferenciací, buněčné agregace a morfologické organizace, dochází ke zpomalení růstu, což přímo koreluje se vzestupem syntézy sekundárních metabolitů v explantátové kultuře (25). K ekonomickému zvýhodnění produkce sekundárních metabolitů může výrazně přispět i imobilizace rostlinných buněk v polymerních gelech nebo na pevných nosičích, která skýtá některé výhodné vlastnosti (26,27).

Kultury se zakládají z matečné rostliny a lze je odvodit z kteréhokoliv orgánu rostliny, výjimkou jsou pouze úzce specializované buňky – např. sítkovice, sklereidy. V každé buňce je obsažen kompletní soubor genů (totipotence) daného genotypu, potřebný pro všechny rostlinné funkce zahrnující sekundární metabolismus typický pro intaktní rostlinu. Působením vhodných růstově aktivních látek a optimalizací kultivačních podmínek lze i z jedné somatické buňky vypěstovat životaschopnou rostlinu (2,28). Na agarovém médiu je z orgánu pletiva odvozen primární kalus (původně neorganizované pletivo vzniklé na povrchu nenádorových primárních explantátů). Pokud je kultura pravidelně pasážována, lze je pěstovat

neomezeně dlouho. V průběhu kultivace *in vitro* dochází k částečné ztrátě diferenciaci – explantát mění svůj původní morfologický charakter, stále však není homogenní.

Buněčné suspenze skládající se z buněčných agregátů, buněčných skupin a z jednotlivých buněk rostou mnohem rychleji než kultury kultivované na agaru. Tato technika poskytuje větší možnost kontroly a lepší podmínky růstu, protože většina buněk je obklopena živným médiem. Z toho důvodu bývá buněčný materiál také fyziologicky jednodušší (29).

Suspenzní kultury jsou většinou udržovány vsádkově v malých baňkách na rollerech nebo třepačkách. Přechod na větší objemy, nutný pro každé biotechnologické využití, je velmi náročný z hlediska nutnosti udržení dokonalé sterility, zajištění dostatku kyslíku a optimalizace dalších faktorů. Rostlinné buňky jsou velké, mají zhruba 1000x větší objem než buňky bakterií, a proto z nemíchaného nebo netřepaného média rychle sedimentují. Jsou křehké a špatně proto snášejí mechanické míchání. Proto se k míchání často používá procházejícího proudu sterilního vzduchu. Volba vhodného způsobu kultivace závisí na vlastnostech kultury, stupni agregace a diferenciaci i na hledaném produktu a zdali je cílem získat biomasu nebo metabolit uvolněný do média. Buňky jsou obecně pěstovány při teplotách mezi 25-30 °C, v rozmezí 10-200 otáček rolleru za minutu a průměrná vsádková kultivace trvá 10-15 dní (26).

Z morfologického hlediska dělíme kultury rostlinných explantátů :

- *kultury orgánové* – orgánové systémy, orgány nebo jejich základy, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a vcelku zachovává jejich stavbu a funkci
- *kultury tkáňové (pletivové)* – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy pletiva, pomnožované na pevných či polotuhých nosičích nasycených živným médiem nebo (výjimečně) v tekuté živné půdě
- *kultury suspenzní* – volné buňky a malé buněčné shluky rozptýlené v promíchané a provzdušňované tekuté živné půdě
- *kultury buněčné* – volné jednotlivé buňky pomnožované v tekuté či polotuhé živné půdě nebo na pevném nosiči nasyceném půdou
- *kultury protoplastů* – buňky zbavené pevných buněčných stěn, obalené pružnou, elastickou plazmolemou (2,28)

Využití rostlinných tkáňových kultur skýtá mnoho výhod, ale i nevýhod. Mezi výhody patří především standardizace kultivačních podmínek, nezávislost na ročním období, ulehčená genová manipulovatelnost, aseptičnost, automatizovatelnost nebo dosažitelnost vyšších hladin obsahových látek. Existuje také celá řada nevýhod a překážek, znemožňujících úspěšné použití této metody, jakou je finanční náročnost, udržení aseptičnosti, genetická labilita a variabilita kultur, vazba produkce požadované látky na určitý orgán či tkáň rostliny, produkční nestabilita kultur, rozdílná genetická exprese klíčových biosyntetických enzymů v intaktní rostlině a rostlinné tkáňové kultuře, nedostatečné fyzikálně chemické podmínky, katabolismus sekundárních látek atd.

3.2.2. Odvození a udržování kultury

Pro úspěšné odvození stabilní kultury je důležitý výběr vhodné matečné rostliny i části rostlinného těla. Před vlastní explantací je nutné rostlinu povrchově sterilizovat nebo pěstovat v aseptických podmínkách. Poté se odebere fragment a přenesse na tuhou živnou půdu a inkubuje v teplotním rozmezí 23 – 28 °C. Primární kalus se objevuje po několika týdnech kultivace. Jde o pletivo vzniklé dělením povrchových vrstev primárních explantátů, jehož buňky jsou při pravidelném pasážování schopné trvalé proliferace.

Stabilní a homogenní materiál (bez morfologických a morfogenetických odchylek jako změny pigmentace a regenerační schopnosti) lze získat až po provedení většího počtu pasáží při dodržení konstantních podmínek kultivace.

Z kalusové kultury lze enzymatickým nebo mechanickým způsobem odvodit kulturu suspenzní. Dosáhne se toho buď použitím vhodných pektináz nebo ve druhém případě pomocí pomaloběžných rolerů a třepáček. Získané kultury lze udržovat za podmínek *in vitro* neomezeně dlouho. Kultura musí být pravidelně pasážována za aseptických podmínek, aby se zabránilo nežádoucí kontaminaci rostlinného explantátu (2).

3.2.3. Kultivační podmínky

Kultivace rostlinných explantátů probíhá za přesně definovaných podmínek. Ide především o sterilní prostředí, optimální složení živného média, vhodné fyzikální podmínky a opatření zabraňující kontaminaci kultury.

Živné půdy:

Živné půdy mohou být tekuté, polotuhé nebo tuhé (s přísadou agarů či agarózy). Jejich složení je dáno zvoleným způsobem kultivace. Jednotlivé zastoupení komponent, jak kvalitativní tak kvantitativní, má rozhodující význam nejen pro růst explantátů, ale například i pro rozpadavost kalusu při převádění do suspenzní kultury.

Základní složky živných půd:

- *voda* – destilovaná, může obsahovat jen minimální množství anorganických látek, musí být prostá pyrogenů a organických nečistot
- *makroelementy* – dusík, fosfor, vápník, hořčík, draslík a síra, do živné půdy se přidávají ve formě solí, jejich množství v médiu přesahuje 30 mg/l
- *mikroelementy* – železo, mangan, měď, zinek, bor a molybden, jsou pro růst tkáňové kultury nezbytné, jejich potřeba je však velmi malá
- *zdroj organického uhlíku* – nejlepším zdrojem jsou sacharidy (nejčastěji sacharóza v koncentraci 2 – 5 %, lze ji nahradit glukózou, laktózou nebo škrobem)
- *zdroj dusíku* – kultivační médium může obsahovat dusík pouze v nitrátové formě, a však mnohem lepšího růstu je dosaženo při dodání směsi nitrátů a amonných solí. Dostatečného množství redukovaného dusíku je možné zajistit také přidáním organických sloučenin (aminokyselin)
- *vitamíny* – explantátové buňky na rozdíl od intaktní rostliny nejsou schopny produkovat dostatečné množství vitamínů pro svůj růst a vývoj, nejčastěji se dodává pyridoxin, thiamin, kyselina nikotinová, biotin, vitamin C
- *nedefinované směsi přírodních organických látek* – růst je možné stimulovat přidáním celé řady organických extraktů, např. hydrolyzát kaseinu, kokosové mléko, extrakty z kukuřice, pšenice, kvasnic a další
- *růstové regulátory (fytohormony)* – auxiny, cytokiny, gibereliny (2,28)

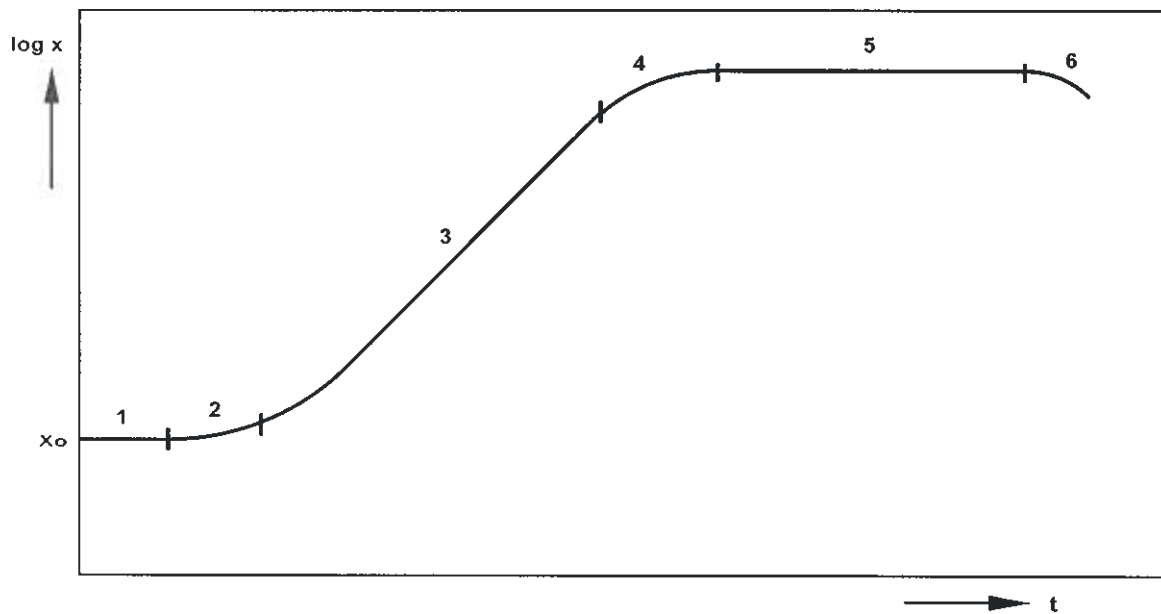
Fyzikální podmínky:

- *osvětlení* - světlo ovlivňuje intenzitu biosyntézy a akumulaci účinných látek i v intaktní rostlině. Intenzita osvětlení se pohybuje od 2000 do 5000 luxů
- *teplota* - kultivační prostory musí mít regulovanou teplotu; nejvhodnější se jeví kultivace v teplotním rozmezí 23 až 28 °C. Teplota ovlivňuje rychlost metabolismu, růst, vývoj a dělení buněk; při nízkých teplotách se zpomaluje metabolismus, vysoké teploty poškozují buňky
- *pH živného média* - většinou se používají slabě kyselá média v okolí hodnot 5,5 – 6,0; pH se upravuje kyselinou chlorovodíkovou nebo hydroxidem sodným
- *vlhkost vzduchu* - vzdušná vlhkost bývá v kultivačních místnostech nastavena na hodnoty v rozmezí 20 – 98 % podle požadavků dané kultury (2,28)

3.2.4. Růstové fáze kultury

Jednotlivé fáze jsou charakterizovány růstovou křivkou, která vyjadřuje závislost koncentrace biomasy na čase.

1. Lag-fáze: období přizpůsobení se buněk novým podmínkám. Po umístění buněk do živného média je jejich koncentrace po určitou dobu konstantní nebo může přechodně poklesnout. Délka fáze závisí na složení média, na typu a stáří buněk, jejich množství a genetickém vybavení, fyzikálních faktorech
2. Fáze zrychlení (akcelerační fáze): všechny důležité enzymové reakce postupně dosahují maximálních konstantních rychlostí a přecházejí do ustáleného stavu
3. Exponenciální fáze: buňky rostou stále stejnou, maximální rychlostí. Trvá dokud mají buňky dostatek živin nebo dokud nenastane inhibice růstu vlastními produkty metabolismu
4. Fáze zpomalení (deklinační fáze): s hromaděním toxických metabolitů a s úbytkem živin klesá růstová rychlost
5. Stacionární fáze: populace buněk dosahuje maximální, po určitou dobu konstantní, velikosti. Došlo k vyrovnání rychlosti množení a odumírání
6. Fáze odumírání: pro tuto fázi neexistuje specifické pravidlo (2)



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

3.3. Elicitace

3.3.1. Obranné reakce rostlin

Rostliny jsou vystaveny velmi proměnlivým životním podmínkám. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které svou intenzitou překračují hranici tolerance, jsou označovány jako stresové faktory (stresory). Je to konkrétní molekula, která se váže na rostlinný receptor a spouští kaskádu reakcí, které vedou k žádoucímu produktu nebo reakci. Elicitory jsou látky schopné indukovat obranné reakce proti infekcím a dalším stresovým faktorům zvláště produkcí fytoalexinů. Nejdůležitější stresové faktory jsou uvedeny v následujícím přehledu:

ABIOTICKÉ FAKTORY	FYZIKÁLNÍ	mechanické účinky větru
		nadměrné záření (UV, viditelné)
		extrémní teploty (horko, chlad, mráz)
BIOTICKÉ FAKTORY	CHEMICKÉ	nedostatek vody (sucho)
		nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
		nedostatek živin v půdě
		nadbytek iontů solí a vodíku v půdě
		toxické kovy a organické látky v půdě
		toxické plyny ve vzduchu
		herbivorní živočichové (spásání, poranění)
		patogeny (viry, bakterie, houby)
		vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus)

Rostliny představují téměř neomezený zdroj fytochemikálií. Produkují různé sekundární metabolity, které jsou užitečné svou interakcí s okolním prostředím, různými stresovými faktory a rozvojem rezistence proti napadení patogeny (30).

Rostliny si proti stresu vyvinuly rozmanité obranné mechanismy. Pasivní (dlouhodobý) způsob ochrany je založen na zamezení (nebo alespoň výrazném omezení) průniku stresových faktorů do vnitřního prostředí – jedná se tedy o schopnost vyhnout se stresu. K tomuto účelu slouží především speciální anatomické ochranné struktury (trny, ostny,

trichomy, ztlustlá kutikula, impregnovaná buněčná stěna). Jiné rostliny využívají vhodného načasování životních cyklů či vytváření rezervoárů vody a akumulace zásobních látek.

Pronikne-li stresor k plazmatické membráně buněk a do symplastu, je jeho negativní dopad omezen spuštěním mechanismů aktivní odolnosti. Průběh této stresové reakce a její konečný výsledek závisí jednak na charakteru, intenzitě a délce působení stresového faktoru (či faktorů), jednak na geneticky zakódovaných (adaptačních) i přechodných – indukovaných (aklimačních) schopnostech napadených rostlin (31).

Aktivní odpovědi rostlin na napadající mikroorganismy vyžadují detekci signálů patogenu, které mohou spustit rostlinnou odpověď.

Vyšší rostliny indukují různé obranné odpovědi při jejich napadení mikrobiálními patogeny. Tyto obranné odpovědi zahrnují sebezničení napadené hostitelské buňky (tzv. hypersenzitivní odpověď); tvorbu antimikrobiálních sekundárních metabolitů (označených jako fytoalexiny); tvorbu proteinů souvisejících s patogenezou, z nichž mnoho vykazuje antimikrobiální vlastnosti. (32).

Obecné mechanismy stresových reakcí:

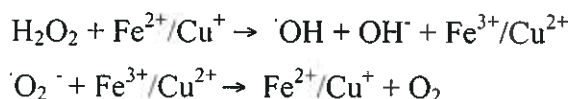
I. Tvorba aktivních forem kyslíku

Singletový kyslík, superoxidový anion, hydroxylový radikál a peroxid vodíku mají v rostlinách rozporuplnou úlohu. Vznikají sice jako nebezpečné produkty při působení řady stresových faktorů a rostliny tudíž musí mít účinné systémy na jejich deaktivaci, na druhé straně mohou hrát důležitou roli jako signály či ochranné látky při některých typech stresových reakcí a je tudíž žádoucí jejich koncentraci udržovat na určité úrovni.

Negativní působení aktivních forem kyslíku spočívá v peroxidaci membránových lipidů s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin, poškozeny mohou být i nukleové kyseliny, některé aminokyseliny a proteiny.

Ochranná úloha aktivních forem kyslíku je patrná zejména při hypersenzitivní reakci (viz dále). V kombinaci s kyselinou salicylovou indukuje tvorbu některých stresových proteinů. Tvorba těchto forem kyslíku může mít i přímý antimikrobiální účinek a může přispívat ke zpevnění buněčné stěny, a tím i k větší odolnosti vůči různým stresovým faktorům (31). Superoxidový anion například indukuje akumulaci fytoalexinů u buněčných kultur petržele, což je obranná odpověď, která vyžaduje koordinovanou aktivaci několika genů z odpovídajícího biosyntetického procesu (33).

V přítomnosti redoxně aktivních kovů (jako je Cu^+ , Fe^{2+}), peroxid vodíku může být přeměněn na více reaktivní hydroxylový radikál v reakci katalyzované těmito kovy. Tato reakce se nazývá Fentonova reakce. Oxidované kovové ionty dále podléhají re-redukci v dílčí reakci se superoxidovým radikálem (34).



2. Hypersenzitivní reakce

Poměrně častá a účinná reakce na průnik patogenů je řízená tvorba ochranných nekrot. V napadené buňce mohou být během několika desítek minut po kontaktu škůdce s plasmalemou spuštěny biochemické pochody vedoucí k rychlé zkáze jak vlastní buňky, tak i škůdce. Při této reakci dochází k rozpadu membránového systému hlavně náhlým zvýšením koncentrace vysoce reaktivních volných radikálů a peroxidu vodíku (oxidative burst). Tvorba volných radikálů obvykle začíná aktivací NADPH-oxidázy v plasmatické membráně vhodnými elicitory vylučovanými buď přímo patogenem či vznikajícími při narušení rostlinné buněčné stěny. Volné radikály způsobí nekrotizaci patogenem poškozených buněk i jejich bezprostředního okolí a zabrání tak dalšímu šíření infekce. V delší vzdálenosti od nekrotického ložiska je již koncentrace peroxidu vodíku nižší – nezpůsobuje tedy odumření rostlinných buněk. Uvnitř nekrotózy lze dokázat přítomnost látek s antibiotickým působením, tzv. fytoalexinů (31).

3. Tvorba „stresových“ fytohormonů

Mezi tyto endogenní látky patří především kyselina jasmínová, methyljasmonát, kyselina abscisová, ethylen a polyaminy.

Charakteristika kyseliny jasmínové viz dále.

Nejdůležitější funkcí kyseliny abscisové je regulace vodního režimu rostlin. Při nedostatku vláhy nebo při působení stresových faktorů, které vyvolávají snížení obsahu vody v buňkách (mráz, zasolení), dochází k prudkému nárůstu její koncentrace, což vede k uzavření průduchů a zvýšení hydraulické vodivosti kořenů.

Ethylen je jediný dosud známý plynný hormon, což jej výrazně odlišuje od ostatních fytohormonů. Nejvýraznějším účinkem ethylenu je stimulace dozrávání některých plodů. Při zrání se mnohonásobně zvýší tvorba ethylenu, který pak indukuje biochemické procesy zrání. Podobně jako zrání stimuluje stárnutí a opad listů, květů a plodů. Zvýšení tvorby ethylenu je jednou z prvních reakcí rostlin na působení stresorů.

Ethylen má rovněž funkci druhého posla – aktivuje geny podílející se na ochraně rostlin. Např. při nízkém obsahu kyslíku v půdě (mokřady, záplavové oblasti) vyvolává tvorbu enzymů rozkládající pektinové střední lamely buněčných stěn parenchymu kořenů a stonků, vznikajícími intercelulárními kanálky pak difunduje kyslík z nadzemních částí do hypoxických kořenů (31).

Akumulace a zvýšené aktivity biosyntetických enzymů ethylenu ACC syntetázy a ACC oxidázy byly lokalizovány v chlorotické tkáni, která přímo obklopuje primární léze v listech tabáku jako odpověď na infekci vyvolanou tabákovým mozaikovým virem (35). Lokalizované aktivity těchto enzymů naznačují, že produkce ethylenu v hostitelské tkáni může být odpovědí na buněčnou smrt, která vzniká během tvorby primární léze (36).

Z polyaminů se v rostlinách nejčastěji vyskytuje putrescin, spermin a spermidin. Polyaminy často stimulují růst, a to zejména v systémech *in vitro*, ve kterých probíhá intenzivní buněčné dělení, dále stimulují somatickou embryogenezi u mnoha rostlinných druhů. Polyaminy hrají významnou úlohu v obraně rostlin proti stresům. Je to dáno zejména jejich ochranným působením na membrány a na DNA. Polyaminy jako polykationty snadno reagují s DNA a mohou ovlivnit její konformaci, a tedy i expresi genů. Interakce polyaminů s DNA vede také k její stabilizaci vůči denaturaci (31).

Akumulace putrescinu byla zaznamenána jako odpověď na deficit K^+ a Mg^{2+} (37). Putrescin může být tedy tvořen u rostlin ječmene s deficitem hořčíku, aby nahradil tento bivalentní ion působící v regulaci metabolismu a funkci nukleové kyseliny. Ke zvýšení koncentrace putrescinu a doprovodnému zvýšení uvolňování ethylenu došlo u rostlin rajčete, které byly vystaveny toxickému účinku amoniaku a nedostatku draslíku (38). Z toho vyplývá, že akumulace putrescinu se zdá být u rostlin univerzální odpovědí na stres.

4. Depozice kalózy

Dalším mechanismem, který brání šíření infekčního agens, je depozice kalózy (1,3-D-glukanu) v okolí infikovaného ložiska. Tento polysacharid je odolný vůči houbovým hydrolázám (31).

5. Indukovaná syntéza fytoalexinů

Zvláštní skupinu specifických nízkomolekulárních obranných látek tvoří fytoalexiny, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začnou se vytvářet až po napadení patogenem.

V současné době je známo více než 300 fytoalexinů. Jejich mechanismus účinku je založen na poškození membránových funkcí infekčních agens. Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plasmatickou membránu patogenů. Na patogenní houby působí již v minimálních koncentracích, bakterie jsou méně citlivé.

Z chemického hlediska se jedná o velmi různorodou skupinu látek – u systematicky příbuzných rostlinných druhů se však obvykle setkáváme se strukturálně podobnými fytoalexiny (isoflavonoidy v čeledi *Fabaceae*, diterpeny jsou charakteristické pro *Poaceae*, fúranokumariny pro *Apiaceae*, stilbeny nacházíme u rostlin čeledi *Vitaceae*). V jedné rostlině se však může současně tvořit i více různých fytoalexinů (31).

3.3.2. Elicitace

Elicitaci lze charakterizovat jako indukční proces, který vede ke zvýšení hladiny enzymů nebo k jejich aktivaci, čímž dochází ke stimulaci produkce sekundárních metabolitů v rostlinách i v rostlinných kulturách *in vitro*.

Elicitory jsou látky se signálním účinkem používané k elicitaci. Působí jako stresové faktory – spouští obrannou odpověď exponovaných buněk. Dávají podnět k expresi genů, syntéze enzymů a tímto způsobem navozují zvýšení syntézy fytoalexinů i jiných sekundárních metabolitů.

Podle původu se elicitory rozdělují do dvou základních skupin:

Biotické elicitory

Jedná se o organické signálně účinné látky, jejichž zdrojem mohou být:

- *intaktní patogenní organismy* – bakterie, viry, mykoplazmy, kvasinky a plísně
- *metabolity vylučované patogeny* – některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy
- *sloučeniny uvolněné z narušených stěn infekčních agens* – oligomery chitinu, glykoproteiny, oligoglukany
- *endogenní elicitory pocházející z napadených rostlinných buněk a jejich buněčných stěn* – oligogalakturonany, kyselina jasmínová.

Abiotické elicitory

Abiotickými elicitory se rozumí fyzikální a chemické stresové faktory spouštějící obranné reakce. Patří sem:

- *extrémní teploty* – chlad nebo naopak vysoké teploty
- *různé typy záření*
- *ionty těžkých kovů* – Cu, Hg, Cd, Pb, Al, Fe, Mn
- *změny pH*
- *změny osmotického tlaku*
- *detergenty*
- *inhibitory látkové výměny* – kyselina trichloroctová, 2,4-dinitrofenol
- *pesticidy* (3,31)

3.3.3. Mechanismus účinku elicitorů

Na základě dosavadních znalostí se předpokládá, že elicitory indukovaná produkce a akumulace fytoalexinů a jiných stresových metabolitů rostlinnými kulturami *in vitro* je regulována stejnými mechanismy jako v případě intaktní rostliny (3).

Většina obranných reakcí je závislá na aktivaci vhodných genů. Podněty jsou vnímány membránovými receptory. Elicitory obvykle neovlivňují expresi přímo, ale zprostředkovaně pomocí druhých posílů. Ty pak přenášejí signály v buňce transdukčními signálními cestami, což vede ke genové expresi a biochemickým změnám. V současné době je popsáno několik mechanismů přenosu extracelulárního signálu do intracelulárního signálního systému a následně k DNA v jádře.

Předpokládá se, že molekuly **biotického elicitoru** jsou rozpoznány specifickými receptory (obvykle v plazmatické membráně). Obsazení receptoru může vést k aktivaci G-proteinů, otevření vápenatých kanálů a rychlému influxu vápenatých iontů do buňky (39). Extracelulární vápník je považován za signál, který přináší informace o poranění dovnitř buňky. G-protein leží na vnitřní straně plazmatické membrány. Vazbou signálu na receptor se mění jeho konformace a tím je umožněn jeho kontakt s G-proteinem.

Jednou z cest, kterou ionty Ca^{2+} vstupují do cytoplasmy, je přesun přes plazmatickou membránu. Napětově závislý Ca^{2+} -permeabilní kanál, který může být aktivován změnou membránového potenciálu, je schopný přispívat ke zvýšení koncentrace cytosolových vápenatých iontů. Jakmile dojde ke zvýšení koncentrace intracelulárního kalcia na nejméně $1\mu\text{M}$ (40), váže se kalcium na kalmodulin a narůstající komplex kalcium-kalmodulin moduluje mnoho fyziologických procesů. Vzniklý komplex ovlivňuje aktivitu určitých proteinkináz. Kalmodulin je jedním z nejběžnějších intracelulárních receptorů pro kalcium.

Jiný způsob přenosu signálu je zprostředkován pomocí fosfoinositolového systému – hydrolyzou lipidů plazmatické membrány jsou generovány dvě signální molekuly – inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol, které za účasti iontů vápníku také vedou k aktivaci proteinkináz a k expresi genů (31).

Některé pokusy dokazují, že velmi častým a rychlým způsobem přenosu signálu je také tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku (hydroxylové radikály, hydrogen peroxidy). Zvýšené množství peroxidu je možné zjistit po 5 až 10 minutách působení elicitoru (31). Reaktivní kyslíkové deriváty mohou ovlivňovat expresi genů i nepřímo – způsobují totiž

peroxidaci membránových lipidů, což vede ke zvýšení syntézy stresových fytohormonů (kyseliny jasmínové a methyljasmonátu), jejichž signální funkce jsou již dlouho známy (31).

Mechanismus účinků **abiotických elicitorů** se nedá objasnit vazbou na specifický receptor, navození indukce syntézy fytoalexinů lze však vysvětlit – a to několika způsoby. Prvním z nich je stresově podmíněné uvolnění endogenních (biotických) elicitorů z narušené buněčné stěny (31).

Častými abiotickými elicitory jsou těžké kovy. Jsou definovány jako kovy s hustotou vyšší než 5 g/cm^3 . Avšak ne všechny těžké kovy mají biologický význam, asi 17 těžkých kovů může být dostupných pro žijící buňky a mít význam pro organismus a ekosystém (41). Tak např. Fe, Mo, Mn jsou důležité jako mikroživiny. Zn, Ni, Cu, V, Co, W, Cr jsou toxické prvky s vyšším či nižším významem jako stopové prvky. As, Hg, Ag, Sb, Cd, Pb, U nemají žádnou známou funkci jako živiny a zdají se být více či méně toxické k rostlinám a mikroorganismům (41).

I při snaze snížit co nejvíce množství odpadních produktů, které vznikají při zpracování kovů, stále více těžkých kovů se dostává do ovzduší, vody i půdy. Ty pak mohou pozitivně nebo negativně ovlivnit metabolické děje v organismu. V rostlinách mohou vyvolat obranné reakce, které jsou příčinou tvorby ochranných látek rostlin. Využití těchto reakcí u rostlinných explantátů umožňuje produkci důležitých sekundárních látek (42).

Těžké kovy spouštějí peroxidaci lipidů, což jednak vede k prudkému nárůstu koncentrace signálně účinných stresových fytohormonů, jednak dochází ke zvýšení propustnosti plasmatické membrány pro vápenaté ionty, které mají funkci druhého posla (3).

Ionty těžkých kovů vyvolávají aktivaci transkripce několika genů tvorbu fytochelatinů. Jsou to malé peptidy syntetizované z glutathionu, které váží kovy a vznikají tak inaktivní komplexy. Tím se tyto intracelulární těžké kovy detoxikují (43).

Chlorid rtuťnatý způsobuje v buněčné kultuře *Zea mays* změny v transkripci genů podobných těm, které byly pozorovány jako odpověď na infekci patogenem. Po působení chloridu rtuťnatého se aktivovaly proteiny bohaté na glycin, proteiny tepelného šoku a membránových kanálů. Snahou studie bylo zjistit, zda pozorované změny mohou být považovány za specifickou odpověď na stres těžkými kovy, nebo zda se jedná o všeobecnou odpověď na abiotický stres.

Pro tento účel byl sledován účinek chloridu sodného, tepla, chladu, UV záření a zranění na expresi genů, které jsou indukovány právě chloridem rtuťnatým. Zjistilo se,

žc proteiny, syntetizované jako odpověď na chlorid rtuťnatý, nejsou specifické pro stres těžkými kovy, ale že se jedná zřejmě o obecnou reakci na abiotické elicitory (44).

Toxicita těžkých kovů

Schützendübel a kol. popsal 3 základní mechanismy toxicity těžkých kovů:

1. produkce reaktivních forem kyslíku autooxidací
2. blokování esenciálních funkčních skupin v biomolekulách – tato reakce byla prokázána u kovů, které se nezapojují do oxidačně-redukčních dějů – kadmium a rtuť
3. vytlačení základních kovových iontů z biomolekul – tato reakce se vyskytuje u různých kovů.

Přechod kovů způsobí oxidativní zranění v rostlinné tkáni, ale nejsou důkazy, že tento druh stresu může být zmírněn zvyšující se hladinou antioxidantů. Důvod může být ten, že přechod kovů iniciuje produkci hydroxylových radikálů, která nemůže být kontrolována antioxidanty.

Kadmium a ještě některé další kovy způsobují přechodnou ztrátu GSH a inhibici antioxidantních enzymů, speciálně glutathion-reduktázy. Dostupná data poukazují, že pokud není kadmium dostatečně rychle detoxifikováno, může spustit sekvenci reakcí vedoucích k inhibici růstu, stimulaci sekundárního metabolismu a nakonec k buněčné smrti.

Mnoho enzymů obsahuje kovy v pozici, která je důležitá pro jejich aktivitu, záměna jednoho za druhý obvykle vede k inhibici nebo ztrátě enzymatické aktivity. Bivalentní ionty jako např. Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} nahrazují Mg^{2+} v ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza a to vede ke ztrátě její aktivity (41). Záměna Cd^{2+} za Ca^{2+} v proteinu kalmodulinu vede k inhibici kalmodulin závislé fosfodiesterázové aktivity v ředkvičce (41).

3.3.4. Měď

Měď je kovový prvek II.b skupiny periodické soustavy s atomovou hmotností 63,546. Podle elektrochemického potenciálu jej řadíme mezi ušlechtilé kovy. Na čerstvém lomu je červená, kovově lesklá, oxidací tmavne a pokrývá se černým oxidem Cu^{2+} a zelenými či modrými solemi Cu^{2+} . Je bez štěpnosti, kujná, tažná, je výborným vodičem elektřiny a tepla. Tvrdost 2,5 – 3, hustota 8,3 – 9,94 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, červený vryp. Tvoří nejčastěji plíšky, dendrity, často protažené nebo zploštělé.

Vzniká (1) hypogenními, (2) supergenními pochody. Hypogenní měď je vázána téměř výhradně na bazická efuziva, zejména čediče, případně vzniká reakcí čedičového magmatu s okolními horninami. Supergenní měď vzniká redukcí Cu^{2+} sloučenin v cementační zóně žilných, impregnačních nebo stratiformních ložisek mědi.

Měď má velmi široké využití především v elektrotechnice (dráty, kontakty apod.); slouží k výrobě slitin (mosazi, bronzy); sloučeniny Cu^{2+} se uplatňují jako dezinfekční přípravky, impregnace, barvy atd.

V přírodě se ryzí měď vyskytuje vzácně, častěji se nachází ve formě sloučenin, které tvoří různé minerály (např. chalkopyrit, chalkosin, malachit, azurit). Její obsah v zemské kůře činí asi 7×10^{-3} %.

Do životního prostředí se měď dostává při těžbě a zpracování rud i jako součást prostředků užívaných k ochraně rostlin a hubení mechů (45).

Pro člověka je měď nezbytným stopovým prvkem, který je součástí některých enzymů nebo je nezbytná pro jejich správnou funkci. Např. tvoří součást červených krvinek (erytrokuperin), mozkové tkáně (cerebrokuperin) nebo krevní plazmy (ceruloplasmin). Vylučována je především střevem. Tělo dospělého člověka obsahuje asi 100 – 150 mg mědi. Zdrojem mědi jsou běžné potraviny, proto onemocnění z nedostatku mědi nebyla u člověka spolehlivě prokázána (46).

Toxické působení mědi na lidský organizmus lze pozorovat jednak v hutích, kde se působení měďného prachu a dýmu projevuje horečkou a na rozdíl od jiných těžkých kovů i postižením GIT. Dále po požití síranu měďnatého, který již v dávce 0,1 g vyvolává zvracení, při vyšších dávkách se obvykle přidává i krvavý průjem, poškození jater, ledvin a hemolýza. Smrtelné množství se pohybuje kolem 10 g látky (47). Terapeuticky je doporučováno podání mléka nebo bílku s následným výplachem žaludku s živočišným uhlím, výhodná je aplikace Ca EDTA (48).

V jedné studii byl zjišťován vliv elicitace roztokem chloridu měďnatého a chitosanu na obsah isoflavonoidů v explantátové kultuře *Lupinus albus*. Maximální zvýšení produkce nastalo po přidání 300 μ M roztoku chloridu měďnatého (49).

Byl sledován vliv CuCl_2 a chitohexózy na obsah isoflavonoidních konjugátů u kořenu 5 dní starého semenáčku *Trifolium pratense* L.. Zjistilo se, že po přidání 1mM CuCl_2 a chitohexózy došlo k výraznému poklesu hladiny konstitutivních glukosid konjugátů formononetinu a maackianinu. Obsah volného formononetinu a maackianinu, které nebyly detekovány v kontrolní tkáni, rychle vzrostl a dosáhl maxima během 24 hod od zahájení elicitace a poté opět klesal. Souvisí to s aktivitou konjugát tvořících enzymů – glukosyl a malonyltransferázou, jejichž aktivita se po elicitaci významně zmenšila až téměř vymizela. Na druhé straně účinnost enzymů katalyzující degradaci konjugátů, jako je malonylesteráza a glukosidáza, zůstala nezměněná nebo slabě vzrostla. V důsledku neúčinnosti transferázy, esteráza hydrolyzuje malonylglukosidy a vznikající glukosidy jsou rychle přeměněny prostřednictvím glukosidázy na příslušné aglykony. Na jedné straně vápenaté ionty a chitosan indukují obranné reakce zahrnující akumulaci fytoalexinů, na druhé straně způsobují desintegraci membrán a to vyústí v kontakt konjugátů s hydrolytickými enzymy vedoucí k uvolnění volných aglykonů (50).

Roztok chloridu měďnatého (1mM) byl použit k elicitaci explantátové kultury *Helianthus annuus*, u níž se zjišťoval vliv na kumulaci kumarinových fytoalexinů – skopoletinu a ayapinu. Byla prokázána produkce ayapinu, avšak nízké koncentrace skopoletinu a žádný obsah skopoletin 7-O-glukosidu. Selektivní indukce ayapinu chloridem měďnatým byla spojována s inhibicí O-glukosyltransferázy, která je odpovědná za glykosylaci skopoletinu a také s indukcí peroxidázy, která metabolizuje skopoletin, ale ne ayapin (51).

U explantátové kultury *Sinapis alba* se sledoval vliv biotické a abiotické elicitace na produkci fytoalexinů sinalbinu A a B. Analýzy byly provedeny metodou HPLC. Například po elicitaci destruxinem B a CuCl_2 (2 mM) bylo dosaženo maximální produkce po 24hodinovém intervalu elicitace (52).

V explantátové kultuře *Phyllanthus tenellus* bylo studováno rozmístění fenolických sloučenin a fenylalaninamoniaklyasy (PAL) po elicitaci roztokem CuSO_4 . Před elicitací se fenolické látky kumulovaly hlavně ve vakuolách buněk houbovitého parenchymu, po elicitaci se začaly tvořit léze nekrotických buněk a fenolické sloučeniny se hromadily převážně zde. Ultrastrukturální analýza však ukázala, že po 3hodinové elicitaci došlo ke kolapsu organel buněk lézí a vzrostl obsah fenolických látek ve vakuolách houbovitých

buněk. Syntéza PAL probíhá převážně v cytoplazmě a chloroplastech buněk houbovitého a palisádového parenchymu. Měďnaté ionty indukovaly kumulaci PAL v subcelulárních kompartmentech palisádových buněk. Hromadění PAL začalo růst po 3hodinové elicitaci, dosáhlo maxima po 6 hodinách elicitace a snižovalo se po 12hodinové indukci. Nárůst množství PAL byl evidentně vyšší v nekrotických oblastech než v okolních buňkách (53).

Byly studovány obranné mechanismy a oxidativní poškození v primárních listech *Phaseolus vulgaris* jako výsledek kořenové asimilace toxického množství mědi (630 μM). Měď stimulovala kapacitu katalázy a askorbát – peroxidázy, což jsou enzymy ochraňující tkáň proti oxidativnímu stresu (54).

3.3.5. Kyselina jasmínová

Kyselina jasmínová (JA) a její methylester (MeJA) jsou sice obsaženy ve všech rostlinných orgánech i za normálních okolností, avšak při stresových situacích jejich obsah prudce stoupá. Nejznámějším fyziologickým účinkem JA je urychlující účinek na stárnutí listových segmentů. Ve stárnoucích listech se akumuluje MeJA. Někdy může být urychlení stárnutí způsobeno ethylenem, jehož tvorba byla po aplikaci JA či MeJA zvýšena (31).

Bylo prokázáno, že JA a MeJA jsou signálními molekulami při působení biotických a abiotických stresových faktorů (55). Jasmonáty tedy indukují genovou expresi vedoucí k syntéze mnoha proteinů (56), z nichž některé jsou spojovány s akumulací sekundárních metabolitů, které také tvoří část obranné odpovědi. Jasmonáty buď přímo nebo nepřímo spouštějí aktivaci genů, která vede k lokální obranné odpovědi (57,58). Kyselina jasmínová, která může v případě exogenní aplikace také sama působit jako elicitor, indukuje transkripci genů klíčových enzymů fenylypropanové dráhy (fenylalaninamoniaklyázy) (59). Jasmonáty jsou syntetizovány z kyseliny linoleové jako odpověď na různé stresové podněty včetně poranění (60,61).

Byl sledován vliv kyseliny jasmínové na sekundární metabolismus v droze *Trifolium pratense* L.. Byla pozorována tvorba 4 amidů v kořenu jetele po 48hodinovém působení 50 μM JA. Tyto složky byly izolovány a identifikovány jako caffeoylDOPA (clovamid), caffeoyltyrosin, p-coumaroylDOPA, p-coumaroyltyrosin. Nejvíce bylo stanoveno clovamidu, ostatní amidy představovaly pouze nepatrné množství. Obsah clovamidu začal stoupat během 24 – 36 hod působení elicitoru a dosáhl maxima po 96 hod. Začátek jeho tvorby byl pozorován již po přidání 5 μM JA a obsah rostl až do koncentrace 100 μM JA. Přidání 1 mM CuCl_2 způsobilo pokles produkce clovamidu. Mechanismus vedoucí ke snížení obsahu clovamidu není přesně znám. Možným vysvětlením se zdá být oxidativní polymerizace clovamidu, protože clovamid může být v kontaktu s oxidativními enzymy, které jsou umístěny v rozdílných kompartmentech, v případě, že je porušena integrita membrán toxickým působením CuCl_2 (62).

Methyljasmonát indukuje sekundární metabolismus řady rostlinných suspenzních kultur, např. *Rauwolfia canescens*, *Crotalaria cobalticola*, *Glycine max*, *Lactuca sativa*, *Rubia tinctorum*, *Ruta Chalepensis* (63).

Také v kultuře kořenových vlásků *Lactuca virosa* byl sledován vliv methyljasmonátu na akumulaci seskviterpenických laktonů. Elicitor v koncentraci 100 μM na litr média byl

přidán k šest dní staré kultuře. Po 24 a 48hodinové elicítaci došlo k zvýšení obsahu laktonů (64).

Podobně elicítorem indukovaná exprese indolových alkaloidů biosyntetickým genem striktosidinsyntázou v *Cantharantus roseus* je umožněna prostřednictvím rostlinného stresového jasmonátu (65). Největší akumulace paklitaxelu v buněčných suspenzních kulturách *Taxus cuspidata* a *Taxus canadensis* bylo dosaženo po přidání 200 μM kyseliny jasmínové v 7. den kultivačního cyklu (66). Účinky elicítace na akumulaci taxanového diterpenu taxuynaninu C byly pozorovány také v suspenzní kultuře *Taxus chinensis*. Po přidání 100 μM methyljasmonátu se významně zvýšila aktivita klíčového enzymu taxadiensyntetázy a došlo ke stimulaci produkce taxuynaninu C (67).

Kyselina jasmínová indukuje zvýšenou produkci hypericinu a zvýšený růst buněk v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum*. Zvýšené hladiny hypericinu se projeví u elicítace probíhající za tmy (68).

Elicítace methyljasmonátem vyvolává zvýšenou akumulaci anthrachinonů v kalusové kultuře *Rubia cordifolia* a to i u genově upravené kultury (69). Pozitivní vliv kyseliny jasmínové na produkci anthracenových derivátů byl zjištěn také u explantátové kultury *Rheum palmatum* L. Optimální byla, podobně jako při stimulaci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L., 12hodinová aplikace koncentrace 5 mM (70).

Také elicítace kořenů geneticky transformované mořeny (*Rubia tinctorum* L.) 0,1 μM roztokem methyljasmonátu vedla k 5 až 8 násobnému zvýšení obsahu anthrachinonů. Methyljasmonát vyvolává biosyntézu jednoho z klíčových enzymů odpovědných za biosyntézu anthrachinonů v kořenech mořeny (71).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. 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;
Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge;
Kapalinový chromatograf Unicam Crystal, Cambridge; kolona LiChrosper RP-18
s předkolonkou, Merck, Darmstadt.

4.2. 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

4.3. Rostlinný materiál

K pokusům uvedeným v této práci byla použita explantátová kultura odvozená z klíčící rostliny jetele lučního *Trifolium pratense* L., *Fabaceae* (varietata Sprint). Semena byla získána ze Šlechtitelské stanice Domoradice.

4.4. 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 exsikátoru byla zvážena. Ztráta sušením byla vztažena na navážku explantátové kultury a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením 5,69 % je aritmetickým průměrem ze tří stanovení (72).

4.5. Kultivace explantátové kultury

4.5.1. 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 rozdílným 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 100ml Erlenmeyerových baněk s obsahem 30 ml tekutého živného média. Suspenzní kultury byly kultivovány ve 250ml varných baňkách z téhož skla.

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.

4.5.2. Příprava živného média

Explantátová kultura *Trifolium pratense* L. byla odvozena a kultivována na živném médiu podle Gamborga (B5) následujícího složení (73):

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.

Jako stimulatory růstu byly použity kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová v koncentraci 2 mg.l⁻¹ a 6-benzylaminopurin také v koncentraci 2 mg.l⁻¹ živného média (74).

Živné médium bylo rozlito po 30 ml do Erlenmeyerových a varných baněk. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 min při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa.

4.5.3. Odvození kalusové kultury

Semena jetele lučního (odrůda Sprint) 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 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 pasážíváním na B5 médiu (subkultivační interval 21 dní).

4.5.4. Odvození suspenzní kultury

Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury v 16. pasáži mechanickým rozvolněním na třepačce a následně kultivována na pomaloběžném roleru za stejných podmínek jako kultura kalusová (subkultivační interval 14 dní).

4.6. Elicitace

4.6.1. Příprava roztoků elicitoru

Abiotický elicitor:

Byly připraveny 4 vodné roztoky síranu měďnatého o koncentraci:

I	100 μM
II	10 μM
III	1 μM
IV	0,1 μM

Z nejsilnější koncentrace síranu měďnatého byly naředěním destilovanou vodou připraveny roztoky o nižší koncentraci. Všechny roztoky elicitoru byly sterilizovány v autoklávu 15 min při 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

Nejslabší koncentrace síranu měďnatého použitá při elicitaci explantátové kultury *Trifolium pratense* odpovídá množství obsaženému v živném médiu podle Gamborga a ostatní koncentrace představují deseti-, sto- a tisícinásobek tohoto množství.

Biotický elicitor:

Byly připraveny 4 lihové roztoky kyseliny jasmínové o koncentraci:

I	5 000 μM
II	500 μM
III	50 μM
IV	5 μM

Také tyto koncentrace byly připraveny naředěním nejsilnější koncentrace kyseliny jasmínové 96% lihem.

4.6.2. Elicitace a odběr kultur

Ve 21. dni kultivace byla provedena za aseptických podmínek elicítace kalusové kultury (v 25. pasáži) a suspenzní kultury (v 10. pasáži) síranem měďnatým a elicítace suspenzní kultury (v 13. pasáži) kyselinou jasmínovou.

K pokusu bylo vzato 72 kultivačních baněk s explantátovou kulturou. Soubor 8 neelicítovaných baněk sloužil jako kultura kontrolní. Do ostatních 64 baněk s kulturou byl napipetován vždy 1,00 ml elicítoru o příslušné koncentraci. Potom byly elicítované kultury dále kultivovány za již uvedených podmínek. Po 6, 24, 48 a 168 hodinách aplikace elicítoru byly elicítované kultury odebrány. Odběry kontrolních kultur byly provedeny po 6 hodinách a 168 hodinách. U kalusových kultur byly kalusy vyjmuty pinzetou na filtrační papír, u suspenzních kultur byly buňky odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a sušeny při laboratorní teplotě.

U každého vzorku bylo provedeno stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2002 a stanovení isoflavonoidů pomocí HPLC.

4.7. Stanovení obsahu flavonoidů

4.7.1. Princip stanovení

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé. (72).

4.7.2. Postup stanovení

Základní roztok: 0,400 g usušené práškové kultury se ve 250ml baňce smíchá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy ve 250ml baňce, přidá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 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 (C₂₁H₂₀O₁₂), 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 kultury v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

4.8. Stanovení obsahu isoflavonoidů

Methanolové extrakty explantátové kultury *Trifolium pratense* L. byly pomocí HPLC zkoušeny na přítomnost isoflavonoidů (75).

Příprava extraktu:

Asi 0,2000 g práškové kultury (rozetřené v třecí misce) se ve 100ml baňce smíchá s 15 ml methanolu 80% a vaří se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes malý chomáček vaty do 25ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku kultury ve 100ml baňce, přidá se 15 ml methanolu 80% a extrahuje se ještě jednou 20 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky. Spojené roztoky se zředí metanolem 80% na 25,0 ml a roztok se zfiltruje.

4.9. Statistické zpracování výsledků

Získané výsledky obsahu anthracenových derivátů ve sledovaných kulturách byly statisticky zhodnoceny pomocí F testu (test významnosti rozdílu mezi dvěma rozptyly) a t testem (test významnosti rozdílu dvou průměrů). F testem bylo zjištěno, že nelze zamítnout nulovou hypotézu $s_1^2 = s_2^2$ a soubory mohou být použity pro statistické zpracování t testem za podmínky $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$. K výpočtu testovacího kritéria bylo použito vztahu:

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

t...testovací kritérium

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

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

s_1 ...směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 ...směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 ...počet členů kontrolního souboru

n_2 ...počet členů pokusného souboru

K výpočtu směrodatné odchylky bylo použito vztahu:

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

K výpočtu aritmetického průměru bylo použito vztahu:

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

x_i ...naměřené hodnoty

nrozsah souboru

Testovacímu kritériu přísluší t rozdělení se stupněm volnosti (v) vypočteného podle vztahu:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Vypočtená hodnota testovacího kritéria (t) se porovná s příslušnou kritickou hodnotou $t(v)_p$ pro vypočtený stupeň volnosti (v) a zvolenou hladinu významnosti (p). Je-li hodnota t větší než hodnota $t(v)_p$ je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti (p) (76).

V případě provedení tří paralelních stanovení obsahu byl počet členů souboru $n_1 = n_2 = 3$ a počet stupňů volnosti $v = 4$. Pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ a pro $v = 4$ je kritická hodnota $t(v)_p = 2,776$.

V případě provedení dvou stanovení obsahu byl vypočtený počet stupňů volnosti $v = 3$ a kritická hodnota $t(v)_p$ pro $p(0,05) = 3,182$.

5. VÝSLEDKY

5.1. Tabulky

Tab. 1 Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře elicitované síranem měďnatým

Elicitor	Doba Odběru [hod]	Elicitace		Kontrola		t-test
		Obsah [%]	Směrodatná odchylka	Obsah [%]	Směrodatná odchylka	
CuSO ₄ I 100 μM	6	0,022	0,001	0,023	0,003	0,316
	24	0,065*	0,004	0,023	0,003	8,401
	48	0,079*	0,004	0,023	0,003	11,202
	168	0,119*	0,011	0,053	0,002	5,903
CuSO ₄ II 10 μM	6	0,094*	0,001	0,023	0,003	22,452
	24	0,116*	0,004	0,023	0,003	18,603
	48	0,023	0,007	0,023	0,003	0,000
	168	0,045	0,013	0,053	0,002	0,608
CuSO ₄ III 1 μM	6	0,041	0,008	0,023	0,003	2,107
	24	0,055*	0,003	0,023	0,003	7,542
	48	0,033	0,002	0,023	0,003	2,774
	168	0,034	0,017	0,053	0,002	1,110
CuSO ₄ IV 0,1 μM	6	0,031	0,013	0,023	0,003	0,600
	24	0,039	0,010	0,023	0,003	1,533
	48	0,028	0,011	0,023	0,003	0,439
	168	0,026	0,006	0,053	0,002	4,269

* hodnoty obsahu flavonoidních derivátů označené * jsou statisticky významně zvýšené než hodnoty kontroly; p=0,05

Tab. 2 Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře elicitované kyselinou jasmínovou (JA)

Elicitor	Doba Odběru [hod]	Elicitace		Kontrola		t-test
		Obsah [%]	Směrodatná odchylka	Obsah [%]	Směrodatná odchylka	
JA I 5 000 μ M	6	0,010	0,002	0,020	0,006	1,581
	24	0,059*	0,004	0,020	0,006	5,408
	48	0,025	0,002	0,020	0,006	0,791
	168	0,049	0,009	0,053	0,002	0,434
JA II 500 μ M	6	0,074*	0,002	0,020	0,006	8,538
	24	0,036	0,002	0,020	0,006	2,566
	48	0,044*	0,003	0,020	0,006	3,682
	168	0,055	0,000	0,053	0,002	1,014
JA III 50 μ M	6	0,016	0,004	0,020	0,006	0,563
	24	0,059*	0,004	0,020	0,006	5,485
	48	0,030	0,010	0,020	0,006	0,870
	168	0,075*	0,001	0,053	0,002	9,978
JA IV 5 μ M	6	0,048	0,019	0,020	0,006	1,425
	24	0,032	0,001	0,020	0,006	2,001
	48	0,058*	0,006	0,020	0,006	3,586
	168	0,063*	0,002	0,053	0,002	3,586

* hodnoty obsahu flavonoidních derivátů označené * jsou statisticky významně zvýšené než hodnoty kontroly; $p=0,05$

Tab. 3 Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře elicitované síranem měďnatým

Elicitor	Doba Odběru [hod]	Obsah isoflavonoidů [%]			
		GIN	D	G	F
CuSO ₄ I 100 μM	6	-	-	-	-
	24	0,035	0,04	0,01	-
	48	0,05	0,055	0,01	0,01
	168	0,08	0,19	0,01	0,01
CuSO ₄ II 10 μM	6	0,06	0,13	0,01	-
	24	0,08	0,18	0,02	0,01
	48	0,01	0,01	-	-
	168	0,02	0,02	-	-
CuSO ₄ III 1 μM	6	-	-	-	0,01
	24	-	-	-	-
	48	-	-	-	-
	168	-	0,01	-	-
CuSO ₄ IV 0,1 μM	6	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	48	-	-	-	-
	168	-	0,01	0,01	-
kontrola	6	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	48	-	-	-	-
	168	0,02	0,03	0,01	-

Zkratky: GIN – genistin

D – daidzein

G – genistein

F – formononetin

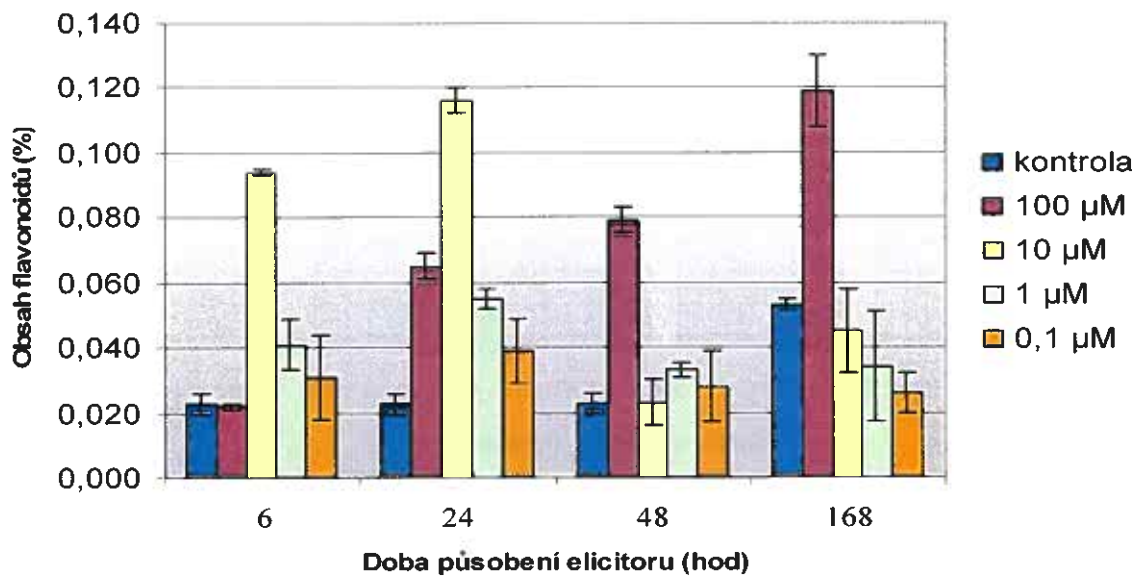
Tab. 4 Produkce flavonoidů v kalusové kultuře elicitované síranem měďnatým

Elicitor	Doba	Elicitace	Kontrola
	Odběru [hod]	Obsah [%]	Obsah [%]
CuSO ₄ I 100 μM	6	0,107	0,046
	24	0,074	0,046
	48	0,085	0,046
	168	0,054	0,061
CuSO ₄ II 10 μM	6	0,083	0,046
	24	0,108	0,046
	48	0,112	0,046
	168	0,107	0,061
CuSO ₄ III 1 μM	6	0,280	0,046
	24	0,202	0,046
	48	0,054	0,046
	168	0,054	0,061
CuSO ₄ IV 0,1 μM	6	0,098	0,046
	24	0,065	0,046
	48	0,027	0,046
	168	0,023	0,061

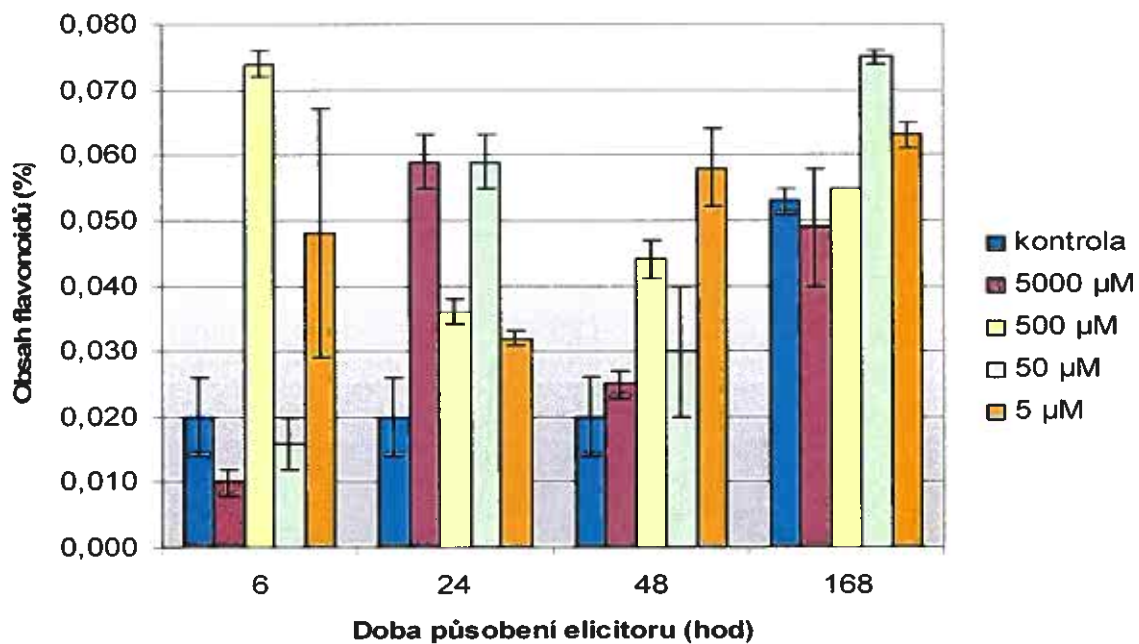
U kalusové kultury byly pouze u kontrol zjišťovány isoflavonoidy. Po 6 hod byl zaznamenán obsah G: 0,03 %, D: 0,01 %. Po 168 hod byl obsah G: 0,01 % a D: 0,01 %.

5.2. Grafy

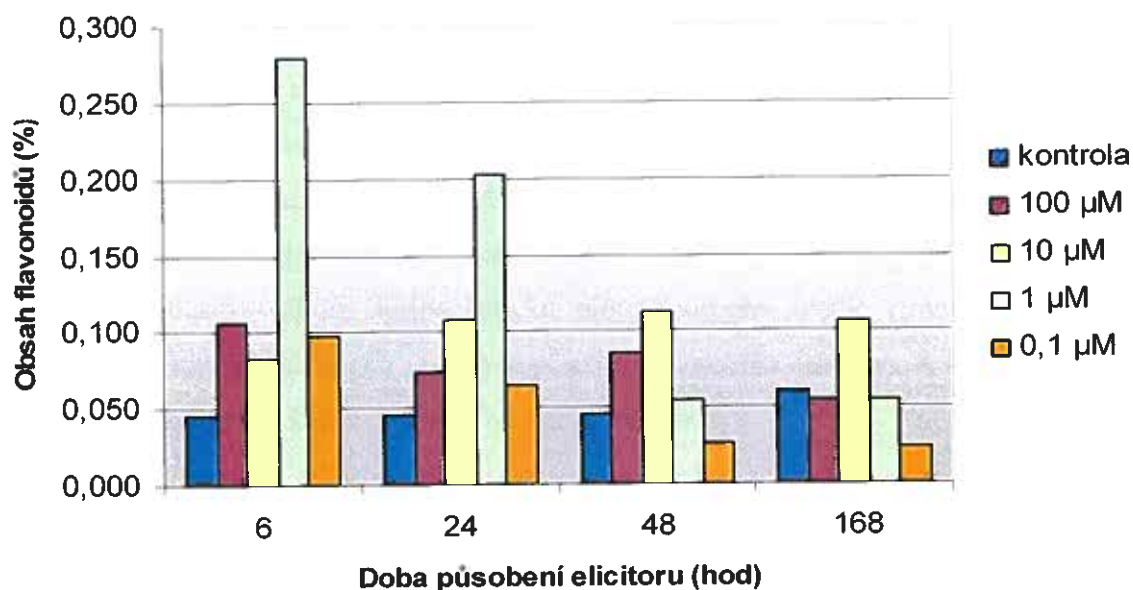
Graf 1: Elicitace suspenzní kultury CuSO₄



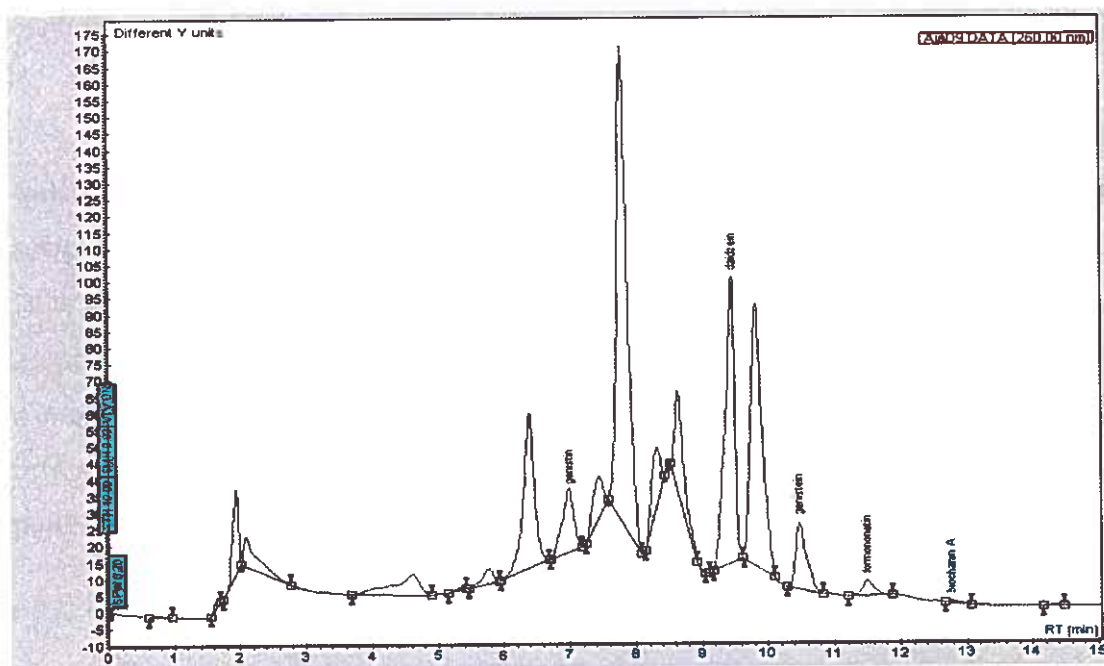
Graf 2: Elicitace suspenzní kultury JA



Graf 3: Elicitace kalusové kultury CuSO4



Obr. č. 1: Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicítované síranem měďnatým (koncentrace 100 µM, doba aplikace 168 hod)



6. DISKUSE

Buňky explantátových kultur mohou díky své totipotenci syntetizovat sekundární metabolity, které jsou typické pro matečnou rostlinu. Jejich produkce oproti intaktním rostlinám však zpravidla bývá nižší, a proto se hledají způsoby, jimiž by bylo možné dosáhnout zvýšené akumulace sekundárních metabolitů. Problematika zvýšení produkce terapeuticky významných sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro* je jednou z intenzivně sledovaných oblastí v oboru farmaceutické biotechnologie. Vedle genetické manipulace a přidávání prekurzorů do média je možné použít také metodu elicitace. A konkrétně metoda elicitace explantátových kultur je metodou velmi nadějnou.

Elicitací vyvolaný stres aktivuje obranné reakce rostliny nebo rostlinného explantátu, které vedou mimo jiné ke změně transkripce genů kódujících enzymy ovlivňující biosyntézu sekundárních metabolitů. Podle původu se elicitory rozdělují na biotické elicitory a na abiotické elicitory, mezi které lze zařadit např. soli těžkých kovů. Jsou známy některé mechanismy, kterými těžké kovy ovlivňují (v kladném i záporném smyslu) intenzitu biosyntetických dějů. Při optimalizaci podmínek lze tedy elicitacních účinků iontů těžkých kovů využít k cílené produkci sekundárních metabolitů.

K endogenním signálním látkám rostlinných obranných reakcí, které se podílejí na změnách v genové expresi, patří kyselina jasmínová, její prekurzory a deriváty, což potvrdily experimenty zabývající se genetickým a biochemickým rozbořem signálních cest (77).

V současné době je zřejmý stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s širokým spektrem biologických účinků těchto sekundárních metabolitů (78,79,80,81,82,83). Velmi nadějným zdrojem těchto přírodních látek je jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*). Je používán v lidovém léčitelství a jako hospodářská plodina. V poslední době se objevuje množství přípravků s obsahem výtažku z jetele lučního, které jsou doporučovány ženám na odstranění či zmírnění příznaků menopauzy. Mnohé studie se proto snaží potvrdit toto příznivé působení na postmenopauzální potíže, jejich výsledky nejsou ale jednotné (84,85,86).

Cílem této práce bylo nejprve odvodit kalusovou a suspenzní kulturu z klíčící rostliny *Trifolium pratense* L. (varietata Sprint) a dále u této explantátové kultury ovlivnit produkci sekundárních metabolitů metodou elicitace.

Na základě předcházejících experimentů (74) bylo pro odvození a kultivaci explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (odrůdy Sprint) použito živné médium podle Gamborga s přídavkem 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 pomalý růst bez tendence k morfogenesi. Po získání stabilního a homogenního materiálu (při pravidelném pasážování a dodržování konstantních podmínek kultivace – teplota, osvětlení, složení živné půdy) byla z této kalusové kultury v 16. pasáži odvozena kultura suspenzní. Ta rostla rychleji a tak poskytla pro experimenty více materiálu než kultura kalusová.

U odvozených explantátových kultur byl dále sledován vliv abiotického elicitoru síranu měďnatého a biotického elicitoru kyseliny jasmínové na produkci flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní a kalusovou kulturou *Trifolium pratense* L.

Úspěšná elicitace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor a pro každou explantátovou kulturu. Jedná se např. o koncentraci a dobu působení elicitoru. Z těchto důvodů byly zkoušeny čtyři koncentrace vodného roztoku síranu měďnatého ($100 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ a $0,1 \mu\text{M}$), které byly zvoleny v rozmezí koncentrací obvykle používaných u tohoto typu elicitoru (50,87,88,89,90) a lihové roztoky kyseliny jasmínové o koncentraci $5\,000 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ a $5 \mu\text{M}$ (62,71,91).

Sledované doby působení elicitoru (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z poznatků již provedených pokusů (92,93,94) a z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po přidání elicitoru (50,89,90,95). Kontrolní kultury byly odebrány po 6 a 168 hodinách, neboť jejich produkce se v takto krátkých časových intervalech významně nemění.

Dalším faktorem, který může ovlivnit úspěšnost elicitace, je fyziologický stav kultury, respektive její růstová fáze. Z předcházejících pokusů vyplývá (74), že pro elitaci suspenzní i kalusové kultury *Trifolium pratense* L. je optimální 21. den subkultivace, a proto elitace kultury byla provedena v tomto dni kultivace.

Sledujeme-li vliv měďnatých iontů na produkci flavonoidních derivátů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L. v závislosti na délce působení a koncentraci použitého elicitoru je zřejmé, že u suspenzní kultury (tab. č. 1, graf č. 1) se nejvyšší elicitální účinek projevil po 24hodinové aplikaci všech použitých koncentrací elicitoru. Maximální obsah flavonoidních derivátů (0,116 %) byl zjištěn po 24hodinovém působení 10 μM koncentrace síranu měďnatého, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 404 % oproti kontrole. Ovšem i ostatní použité koncentrace síranu měďnatého vyvolaly staticky významné zvýšení obsahu flavonoidů po 24hodinovém působení, kromě nejnižší koncentrace elicitoru.

Nejsilnější 100 μM koncentrace CuSO_4 způsobila také zvýšení produkce, přičemž se ukázalo, že obsah sledovaných metabolitů rovnoměrně rostl s dobou působení elicitoru a nejvyšší obsah byl zaznamenán po 168hodinovém působení síranu měďnatého, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 124 % oproti kontrolnímu vzorku.

Zatímco nižší koncentrace takto jednoznačný pozitivní účinek již nevykázaly. Z výsledků vyplývá, že k nepatrnému zvýšení produkce metabolitů dochází také u 1 μM a 0,1 μM koncentrace elicitoru, ovšem statisticky významný je pouze nárůst obsahu po 24hodinové aplikaci 1 μM koncentrace CuSO_4 . Naopak nejvyšší snížení bylo pozorováno po 168hodinovém působení 0,1 μM roztoku síranu měďnatého, kdy došlo ke statisticky významnému poklesu produkce o 49 % v porovnání s kulturou kontrolní.

V suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicítované roztokem síranu měďnatého byla sledována metodou HPLC také produkce isoflavonoidů (tab. č. 3). V kontrolní kultuře nebyly zjištěny žádné isoflavonoidy, pouze v časovém intervalu 168 hodin bylo zaznamenáno 0,03 % daidzeinu, 0,02 % genistinu, 0,01 % genisteinu. Elicitace měďnatými ionty obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře zvýšila a v případě formononetinu dokonce indukovala (v kontrole nebyl zjištěn). Kladně lze hodnotit, podobně jako v případě ovlivnění produkce flavonoidů, zejména koncentraci 100 μM , která s výjimkou 6hodinové aplikace zvýšila v ostatních časových intervalech obsah všech sledovaných isoflavonoidů. Nejhojněji zastoupený se ukázal být daidzein. Nejvyšší obsah daidzeinu (0,19 %) byl zaznamenán po 168hodinovém působení 100 μM koncentrace síranu měďnatého (obr. č. 1), což představovalo nárůst obsahu o 533 % oproti kontrolnímu vzorku. Vysoký obsah tohoto isoflavonoidu byl zaznamenán i po 6 (0,13 %) a 24 (0,18 %) hodinové aplikaci 10 μM koncentrace elicitoru. Ostatní sledované deriváty už nebyly zaznamenány v tak vysokém množství, významnější byl už jen obsah genistinu, který činil po 168hodinovém působení 100 μM roztoku CuSO_4 0,08 % a po 24hodinové aplikaci 10 μM roztoku CuSO_4 také 0,08 %.

Sledujeme-li vliv kyseliny jasmínové na obsah flavonoidů u téže suspenzní kultury (tab. č. 2, graf č. 2) můžeme konstatovat, že všechny koncentrace kyseliny jasmínové způsobily v určitém časovém intervalu statisticky významné zvýšení produkce v porovnání s kontrolní kulturou. Nejvyšší pozitivní účinek elicítace byl zaznamenán opět po 24hodinovém působení všech použitých koncentrací elicitoru, ovšem maximální obsah flavonoidů (0,074 %) byl zaznamenán již po 6hodinové aplikaci 500 μM koncentrace kyseliny jasmínové, což představuje statisticky významné zvýšení produkce o 270 % oproti kontrole.

Na rozdíl od elicítace nejnižší koncentrací CuSO_4 , při použití 5 μM kyseliny jasmínové došlo ve všech sledovaných časových intervalech ke zvýšení produkce sledovaných metabolitů a naopak nejvyšší snížení obsahu flavonoidních derivátů bylo zaznamenáno po 6hodinovém působení 5 000 μM roztoku kyseliny jasmínové, kdy došlo ke statisticky významnému poklesu produkce o 50 % v porovnání s kulturou kontrolní.

Jak již bylo uvedeno, kalusová kultura *Trifolium pratense* L. na rozdíl od suspenzní kultury rostla pomalu, a proto byla u ní provedena jen abiotická elicítace síranem měďnatým. Ke stanovení obsahu flavonoidů byl získán pouze omezený počet vzorků. U kalusové kultury (tab. č. 4, graf č. 3) se na rozdíl od kultury suspenzní nejvyšší elicitační účinek projevil již po 6hodinové elicítaci roztokem síranu měďnatého, kdy všechny použité koncentrace elicitoru způsobily zvýšenou produkci flavonoidních derivátů. Maximální obsah flavonoidů v této kultuře (0,280 %) byl zjištěn po 6hodinové aplikaci 1 μM koncentrace síranu měďnatého, kdy došlo oproti kontrole ke zvýšení o 509 %. Avšak i po 24hodinovém působení této koncentrace elicitoru se projevil vysoký elicitační účinek na produkci sledovaných metabolitů, kdy obsah vzrostl na 0,202 %, což představuje v porovnání s kulturou kontrolní nárůst o 339 %.

V ostatních sledovaných časových intervalech (48 a 168 hodin) tato i ostatní použité koncentrace elicitoru nevykázaly už takto pozitivní výsledky. Výjimku tvoří pouze 10 μM roztok CuSO_4 , který způsobil zvýšení obsahu flavonoidů i po 48 a 168hodinovém působení. Nejvyšší snížení bylo pozorováno po 168hodinovém působení nejslabší (0,1 μM) koncentrace roztoku síranu měďnatého, kdy došlo k poklesu produkce o 38 % v porovnání s kulturou kontrolní.

Porovnáme-li produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L., je zřejmé, že vyšší obsah sledovaných metabolitů byl zaznamenán v kultuře kalusové než suspenzní. Jedním z důvodů může být to, že se jedná o nově odvozenou (10. pasáž), rychle rostoucí suspenzní kulturu a právě v těchto rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se akumuluje malé množství metabolitů. Ukazuje se, že faktory zpomalující růst buněčných kultur působí často stimulačně na produkci sekundárních metabolitů, především cestou omezení primárního metabolismu. Tento poznatek naznačuje určitý antagonismus primárního a sekundárního metabolismu, což na molekulární úrovni představuje rozdílné využívání společných prekurzorů. Také při procesech cytodiferenciace, buněčné agregace a morfologické organizace dochází ke zpomalení růstu, což přímo koreluje se vzestupem syntézy sekundárních metabolitů v explantátové kultuře. Stimulačně na produkci sekundárních metabolitů může působit vliv určitého stresu – snížení koncentrace živin v roztoku, vynechání růstového regulátoru, aplikace elicitorů do média (25), což se v případě elicítace měďnatými ionty a kyselinou jasmínovou u explantátové kultury *Trifolium pratense* L. potvrdilo.

Těžkých kovů jako abiotických elicitorů se využívá k ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v řadě případů. V suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. byl zjišťován vliv různých koncentrací Mn^{2+} , Co^{2+} a Zn^{2+} iontů na produkci kumarinů při kultivaci kultury za tmy a světla. Produkce sledovaných metabolitů byla stimulována zejména roztokem síranu zinečnatého při kultivaci za tmy (96,97).

Vliv iontů Pb^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} a Al^{3+} na produkci flavonoidů byl sledován také u suspenzní a kalusové kultury *Ononis arvensis* L. Všechny použité elicitory stimulovaly produkci, přičemž 24hodinová elicítace kalusové kultury roztokem $NiCl_2$ v koncentraci $0,4 \mu M$ způsobila až sedminásobné zvýšení tvorby flavonoidů (89,98,99).

Jiným příkladem může být roztok $CuSO_4$ aplikovaný ke tkáňové kultuře *Bupleurum* sp. produkující saponiny. Síran měďnatý zvýšil také produkci anthracenových derivátů v suspenzní kultuře *Rheum palmatum* L. Maximální obsah způsobila 48hodinová aplikace koncentrace $1 \mu M$ (100). Tvorbu pisatinu, fytoalexinu rostlin hrachu, je možné vyvolat kromě biotických elicitorů i roztokem $NiCl_2$, $HgCl_2$, $CuCl_2$, a $FeCl_3$ (101). Obdobně rtuťnaté ionty stimulují např. produkci medikarpinu v suspenzních kulturách *Canavalia ensiformis* a *Medicago sativa* (102), měďnaté ionty tvorbu šikoninu v kultuře *Lithospermum erythrorhizon* (103).

Příkladem úspěšné elicitace je také experiment (104), kde byla kyselina jasmínová použita v koncentracích 0,1 – 50 mM u geneticky transformované kultury kořenových vlásků *Hyoscyamus muticosus*. Doba elicitace byla 12 až 120 hodin. Po 72hodinové elitaci 5 mM roztokem kyseliny jasmínové, došlo ke dvojnásobnému zvýšení produkce hyoscyaminu.

Obdobný účinek koncentrace a expoziční doby kyseliny jasmínové na biosyntézu indolových alkaloidů byl sledován také na kořenové kultuře *Catharanthus roseus*. Přidání kyseliny jasmínové způsobilo vzestup obsahu ajmalicinu o 80 %, serpentinu o 60 %, lochnericinu o 150 % a horhammericinu o 500 %. Obsah sledovaných metabolitů se měnil v závislosti na rostoucí nebo klesající koncentraci přidávané kyseliny (91).

Podobně v explantátové kultuře *Ononis arvensis* L. maximální stimulace produkce flavonoidů se projevila po 12hodinové aplikaci 4,8 mM roztoku kyseliny jasmínové, kdy u suspenzní kultury došlo ke zvýšení produkce o 38 % a u kalusové kultury o 55 % (105).

Také výsledky našich pokusů naznačují, že sledované elicitory ovlivnily produkci flavonoidů a isoflavonoidů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L. pozitivně, a proto by tato nově odvozená kultura mohla být dobrým experimentálním systémem pro další studie metabolismu těchto významných přírodních látek.

7. ZÁVĚR

Výsledky této práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Z klíčnické rostliny *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) byla odvozena kalusová a suspenzní kultura.
2. Nejvyšší obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicitované roztokem síranu měďnatého (0,116 %) způsobila 24hodinová abiotická elicitace 10 μM roztokem elicitoru, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 404 % v porovnání s kontrolní kulturou.
3. U suspenzní kultury elicitované roztokem síranu měďnatého byl sledován i obsah isoflavonoidů. V nejvyšším množství byl zastoupený daidzein. Maximální obsah daidzeinu (0,19 %) byl zaznamenán po 168hodinovém působení 100 μM koncentrace síranu měďnatého, což představovalo nárůst obsahu o 533 % oproti kontrolnímu vzorku.
4. Maximální obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicitované roztokem kyseliny jasmínové (0,074 %) vyvolala 6hodinová biotická elicitace 500 μM roztokem elicitoru, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 270 % v porovnání s kontrolní kulturou.
5. Nejvyšší obsah flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. elicitované roztokem síranu měďnatého (0,280 %) způsobila 6hodinová abiotická elicitace 1 μM roztokem elicitoru, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 509 % v porovnání s kontrolní kulturou.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: Farmakognosie I. Praha, SPN, 1989, s. 11
2. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty. Praha, Karolinum, 1992, s. 24, 84-88, 94
3. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie, 1989; 3, 188
4. Slavík, B.: Květena České republiky 4. Praha, Academia, 1995, s. 474
5. Dostál, J.: Nová květena ČSSR 1. Praha, Academia, 1989, s. 560
6. Karmazín, M., Hubík, J., Dušek, J.: Seznam léčiv rostlinného původu. Praha, Avicenum, 1984, s. 175
7. Korbelař, J., Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství. 6. vyd. Praha, Avicenum, 1984, s.175
8. Hubík, J. et al.: Obecná farmakognosie II. Praha, SPN, 1989, s. 31
9. Summer, L. W. et al.: J. Mass Spectrom., 1996; 31, 472
10. Mackenbrock, U. et al.: J. Plant Physiol., 1993; 142, 385
11. Hsieh, M., Graham, T. L.: Phytochemistry, 2001; 58, 995
12. Wu, Q. et al.: J. Chromatogr., 2003; 1016, 195
13. Xu, X. et al.: J. Nutr., 1995; 125, 2302
14. Knight, D. C. et al.: Obstet. Gynecol., 1996; 87, 897
15. De Rijk, E. et al.: J. Chromatogr., 2001; 932, 55
16. Dale, M. P. et al.: Biochemistry, 1985; 24, 3530
17. Toebes, A. H. W. et al.: J. Agric. Food. Chem., 2005; 53, 4660
18. Scebbba, F., Soldatini, G., Ranieri, A.: Environment. Poll., 2003; 123, 209
19. Mascher, R. et al.: Plant Sci., 2002; 163, 961
20. Tham, D. M. et al.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 1998; 83, 2223
21. Beck, V. et al.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2003; 84, 259

22. Zava, D. T. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1998; 217, 369
23. Harper, A. et al.: Free Radic. Res., 1999; 31, 149
24. Mika, K.: Fytoterapia pre lekárov. Martin, Osveta, 1988, s. 216
25. Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin. Olomouc, Univerzita Palackého, 1995, s. 13-18, 50-52, 54
26. Dušek, J. et al.: Čes. slov. Farm., 1996; 45, 204
27. Vodrážka, Z.: Biotechnologie. Praha, Academia, 1992, s. 63-72
28. Kolektiv autorů: Československý lékopis. 4. vyd. Praha, Avicenum, 1987, s. 105, 814
29. Votruba, M. et al.: Explantátové techniky. Praha, VŠZ, 1987, s.7
30. Sudha, G., Ravishankar, G. A.: Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2002; 71, 181
31. Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin. Praha, Academia, 1998, s. 108-109, 256-279, 412-430
32. Penninckx, I. A. M. et al.: Plant Cell Tiss. Org. Cult., 1998; 10, 2103
33. Jabs, T. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997; 94, 4800
34. Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W.: FEBS Lett., 2004; 566, 1
35. De Laat, C. M. M., Van Loon, L. C.: Physiol. Plant Pathol., 1983; 22, 261
36. Lund, S. T., Stall, R. E., Klee, H. J.: Plant Cell. Tiss. Org. Cult., 1998; 10, 371
37. Murthy, K. S., Smith, T. A., Bould, C.: Ann. Bot., 1971; 35, 687
38. Corey, K. A., Barker, A. V.: J. Am. Soc. Hortic. Sci., 1989; 114, 651
39. Gelli, A., Higgins, V. J., Blumwald, E.: Plant Physiol., 1997; 113, 269
40. Saunders, M. J., Hepler, P. K.: Dev. Biol., 1983; 99, 41
41. Schützendübel, A., Polle, A.: J. Exp. Bot., 2002; 53, 1351
42. Bencko, V., Cikrt, M., Lener, J.: Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. Praha, Avicenum, 1995, s. 125, 209
43. Kneer, R., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1997; 44, 69

44. Didierjean, L. et al.: *Planta*, 1996; 199, 1
45. Krätzmár – Šmogrovič, J. et al.: *Všeobecná a anorganická chémia*. Martin, Osveta, 1994, s. 384-385
46. Harper, H. A.: *Přehled fyziologické chemie*. 15. vyd. Praha, Avicenum, 1977, s. 478-479
47. Vopršalová, M., Žáčková, P.: *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Praha, UK v Praze, 2000, s. 105-107
48. Kolektiv autorů: *Lékařské repetitorium*. 4. vyd. Praha, Avicenum, 1982, s. 1315-1316
49. Gangon, R., Ibrahim, R. K.: *Phytochemistry*, 1997; 44, 1463
50. Tebayashi, S., Ishihara, A., Iwamura, H.: *J. Exp. Bot.*, 2001; 52, 681
51. Gutierrez, M. C. et al.: *Phytochemistry*, 1995; 38, 1185
52. Soledade, M., Pedros, C., Zaharia, I. L.: *Phytochemistry*, 2000; 55, 213
53. Santiago, L. J. M., Louro, R. P., De Oliveira, D. E.: *Ann. Bot.*, 2000; 86, 1023
54. Weckx, J. E. J., Cliesters, H. M. M.: *Physiol. Plant.*, 1996; 96, 506
55. Enyedi, A. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89, 2480
56. Reinbothe, C. et al.: *Plant Sci.*, 1994; 104, 59
57. Dittrich, H., Kutchan, T. M., Zenk, M. H.: *FEBS Lett.*, 1992; 309, 33
58. Blechert, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92, 4099
59. Gundlach, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89, 2389
60. Pena-Cortes, H. et al.: *Planta*, 1993; 191, 123
61. Schenk, P. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97, 11655
62. Tebayashi, S. et al.: *Phytochemistry*, 2000; 54, 387
63. Gerasimenko, I. M. et al.: 44th Annual Congress of the Society, Prague 1996. Abstract of Lectures and Poster Presentations, s. 99

64. Malarz, J., Kisiel, W.: 44th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research and a Joint Meeting with the Czech Biotechnology Society, Prague 1996. Abstract of Lectures and Poster Presentations, s. 99
65. Memelink, J. et al.: *Plant. Mol. Biol.*, 2000; 44, 675
66. Ketchum, R. E. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 1999; 62, 97
67. Hao-Di, D. et al.: *Biochem. Eng. J.*, 2000; 26, 145
68. Walker, T. S., Bais, P. H., Viranco J. M.: *Phytochemistry*, 2002; 60, 289
69. Buľgakov, V. P. et al.: *J. Biotechnol.*, 2002; 97, 213
70. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.*, 2003; 52, 148
71. Mantrova, O. V. et al.: *Russ. J. Plant Physiol.*, 1999; 46, 248
72. Kolektiv autorů: *Český lékopis 2002*. Praha, Grada, 2002, s. 154, 2155
73. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: *Exp. Cell Res.*, 1968; 50, 151
74. Kašparová, M. et al.: *Čes. slov. Farm.*, 2006; 55, 44
75. Pízová R.: *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2004
76. Reisenauer, R.: *Metody matematické statistiky a jejich aplikace*. Praha, SNTL, 1970, s. 82, 207
77. Nürnberger, T., Scheel, D.: *Trends Plant Sci.*, 2001; 6, 372
78. Luczkiewicz, M., Glód, D.: *Plant Sci.*, 2003; 165, 1101
79. Thiem, B.: *Plant Sci.*, 2003; 165, 1123
80. Lozovaya, V. V. et al.: *Plant Physiol. Biochem.*, 2004; 42, 671
81. Federici, E. et al.: *Phytochemistry*, 2003; 64, 717
82. Li, W. et al.: *Phytochemistry*, 2001; 58, 595
83. Fedoreyev, K. et al.: *Fitoterapia*, 2000; 71, 365
84. Ren, M. Q. et al.: *Eur. J. Nutr.*, 2001; 40, 135
85. Knight, D. C. et al.: *Climacteric*, 1999; 2, 79

86. Baber, R. J. et al.: *Climacteric*, 1999; 2, 85
87. Zhang, W. H. et al.: *Ann. Bot.*, 1999; 84, 559
88. Kartosentono, S. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 2002; 24, 687
89. Tůmová, L., Blažková, R.: *Čes. slov. Farm.*, 2002; 51, 44
90. Tůmová, L., Poustková, J., Tůma, J.: *Acta Pharmaceutica*, 2001; 51, 159
91. Rijhwani, S. K., Shanks, J. V.: *Biotechnol. Prog.*, 1998; 14, 442
92. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.*, 2003; 52, 248
93. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.*, 2004; 53, 252
94. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.*, 2003; 52, 148
95. Repcak, M., Imrich, J., Franková, M.: *J. Plant Physiol.*, 2001; 158, 1085
96. Skrbková, E.: Diplomová práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2002
97. Kolarczyková, D.: Diplomová práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2002
98. Tůmová, L., Tůma, J., Staňková, J.: *Herba Pol.*, 1998; 44, 27
99. Tůmová, L., Rusková, R.: *Čes. slov. Farm.*, 1998; 47, 204
100. Potužáková, J.: Diplomová práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2005
101. Kováčik, A.: *Genetika rostlin*. Praha, SZN, 1983, s. 425
102. Gustine, D. L., Moyer, B. G.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1982; 1, 255
103. Heinstejn, P.: *J. Nat. Prod.*, 1985; 48, 1
104. Eeva, M., Oksman – Caldentey, K. M., Hiltunen, R.: 44th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research and a Joint Meeting with the Czech Biotechnology Society, Prague 1996. Abstract of Lectures and Poster Presentations, s. 99
105. Tůmová, L., Zápalková, L.: *Čes. slov. Farm.*, 2002; 51, 96