

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Explantátová kultura *Trifolium pratense* L.

Jitka Pelikánová

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

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

Oponent:

Úvodem bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a ochotu v celém průběhu zpracovávání diplomové práce.

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

Hradec Králové

15. května 2007

Obsah

1	ÚVOD	5
2	CÍL PRÁCE	6
3	TEORETICKÁ ČÁST	7
3.1	JETEL LUČNÍ (TRIFOLIUM PRATENSE L., FABACEAE)	7
3.1.1	<i>Botanický popis rostliny</i>	7
3.1.2	<i>Výskyt</i>	9
3.1.3	<i>Odrůdy</i>	9
3.1.4	<i>Sběr a použití drogy</i>	9
3.1.5	<i>Obsahové látky</i>	10
3.1.5.1	Flavonoidy	10
3.1.5.2	Isoflavonoidy	14
3.2	ROSTLINNÉ KULTURY IN VITRO	17
3.2.1	<i>Základní termíny</i>	17
3.2.2	<i>Vlastnosti kultur rostlinných explantátů</i>	19
3.2.3	<i>Kultivace rostlinných kultur in vitro</i>	20
3.2.3.1	Odvození kalusové kultury	21
3.2.3.2	Fyzikální podmínky kultivace	22
3.2.3.3	Živné médium	23
3.2.3.4	Růstové regulátory	25
3.2.3.5	Růstové fáze buněčných kultur	28
3.2.3.6	Etapy kultivace buněčných kultur	30
3.2.4	<i>Buněčné suspenzní kultury</i>	31
3.2.5	<i>Biotechnologické využití explantátových kultur</i>	32
3.2.5.1	Tvorba sekundárních metabolitů	32
3.2.5.2	Rozmnožování a šlechtění rostlin	34
3.3	ELICITACE	36
3.3.1	<i>Elicitory</i>	36
3.3.1.1	Abiotické elicitory	36
3.3.1.2	Biotické elicitory	37
3.3.1.3	Mechanismus účinku elicitorů	37
3.3.1.4	Podmínky elicitace	39
3.4	TĚŽKÉ KOVY	40
3.4.1	<i>Minerální výživa</i>	40
3.4.2	<i>Toxicita těžkých kovů</i>	40
3.4.3	<i>Měď</i>	41
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43

4.1	POUŽITÝ MATERIÁL, PŘÍSTROJE, POMŮCKY	43
4.1.1	<i>Rostlinný materiál</i>	43
4.1.2	<i>Stanovení ztráty sušením</i>	43
4.1.3	<i>Chemikálie</i>	43
4.1.4	<i>Přístroje a pomůcky</i>	44
4.2	KULTIVACE EXPLANTÁTOVÉ KULTURY	45
4.2.1	<i>Kultivační nádoby a nástroje</i>	45
4.2.2	<i>Příprava živného média</i>	45
4.2.3	<i>Odvození kalusové a suspenzní kultury</i>	46
4.2.4	<i>Podmínky pasážování a kultivace</i>	47
4.3	ELICITACE	47
4.3.1	<i>Příprava roztoků elicitoru</i>	47
4.3.2	<i>Elicitace a odběr kultur</i>	48
4.4	STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ	48
4.4.1	<i>Princip stanovení</i>	48
4.4.2	<i>Postup stanovení</i>	48
4.5	STANOVENÍ OBSAHU ISOFLAVONOIDŮ	50
4.5.1	<i>Princip stanovení</i>	50
4.5.2	<i>Postup stanovení</i>	50
4.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	51
5	VÝSLEDKY	53
5.1	TABULKY	53
5.2	GRAFY.....	56
6	DISKUSE	57
7	ZÁVĚR	60
8	SEZNAM LITERATURY	61

1 Úvod

Léčivé rostliny jsou již po staletí nenahraditelnou surovinou při léčbě pro lékaře a lékárníky. Přípravovaly z nich čaje, masti nebo kapky. Postupem času se z rostlin začaly izolovat chemicky čisté účinné látky (sekundární metabolity). Ty se užívají přímo nebo se dále upravují pro přípravu látek nových, které mají lepší terapeutické vlastnosti.

S moderní dobou ale přichází i zhoršování životního prostředí, což má za následek změnu kvality produkce léčivých rostlin. Proto do popředí vycházejí alternativní postupy pěstování rostlin.

Jednou z variant je biotechnologická kultivace rostlinných buněk v podmínkách *in vitro*. Produkce metabolitů je kontrolována námi předepsanými podmínkami. Nejsou přítomny nežádoucí příměsi a pěstování může probíhat po celý rok bez závislosti na ročním období (3).

Jedná se výhledově o velmi perspektivní oblast výzkumu, protože zvyšující se počet obyvatel na Zemi s sebou nese vyšší nároky na potraviny a rozličné rostlinné produkty využívané v kosmetice nebo farmacii. Náročné u této metody je nalezení optimálních podmínek pro kultivaci explantátových kultur *in vitro*.

V posledních letech nastává ve vývoji významný pokrok. Byly vyzkoušeny postupy, kterými lze dosáhnout zvýšené produkce a akumulace sekundárních metabolitů v buněčných kulturách *in vitro*. Jde např. o biotransformaci, imobilizaci, elicitaci a jejich vzájemné kombinování.

V současné době je stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty. A to díky jejich širokému spektru biologických účinků. Vykazují např. protizánětlivou a antialergickou aktivitu, dále mají antitrombotické, vasoprotektivní účinky a estrogenní aktivitu. Vhodným zdrojem se jeví jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*). V lidovém léčitelství je jetel užíván při bakteriálních infekcích, dýchacích obtížích, jako expektorans a na čištění krve. Zevně je užíván ve formě koupelí jako kožní dezinfekce na ekzémy, lupenku a hnisavé rány (11,12,13,23).

Tato diplomová práce se zabývá abiotickou elicitací síranem měďnatým na explantátové kultuře *Trifolium pratense*.

2 Cíl práce

- 1. Seznámit se s principy a postupy kultivace rostlinných tkáňových kultur *in vitro*.**
- 2. Pozorovat v různých časových rozmezích vliv působení čtyř rozdílných koncentrací síranu měďnatého na produkci flavonoidů a isoflavonoidů v explantátové kultuře *Trifolium pratense* L..**

3 Teoretická část

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

3.1.1 Botanický popis rostliny

Trifolium pratense L. je ve své anatomické stavbě velmi proměnlivý druh. Odlišnosti nalezneme ve vzrůstu rostlin, odění lodyh a dále u palistů podpůrných listů.

Tato vytrvalá bylina se vyskytuje i jako 2 – 3letá (některé kulturní formy). Celá rostlina dosahuje výšky 20 – 50 cm. Kulovité kořeny sahají do hloubky 0,5 m, více větvené jsou v orniční vrstvě. Pupy se na kořenovém krčku zakládají v horizontální poloze. Lodyhy vyrůstají z přízemní listové růžice, silné, přímé nebo mající 3 – 5 článků, vystupavé až poléhavé, jednoduché nebo spoře rozvětvené, většinou trochu hranaté. Listy jsou trojčetné střídavé, v přízemní růžici dlouze řapíkaté. Jednotlivé lístky mají tvar obvejčitý až široce okrouhlý, s výraznou bělavou skvrnou ve tvaru půlměsíce. Maximální velikost je 15 x 30 mm. Lodyžní lístky jsou krátce řapíkaté, horní až přisedlé. Čepele lístků jsou na okraji brvitě (8,9,14).



Květenstvím jsou úžlabní hlávky. Jejich průměrná velikost je 2 – 3 cm. Skládají se z 30 – 60 květů, které zdánlivě vyrůstají na vrcholu lodyhy. Jsou drobné, na krátké stopce nebo přisedlé, barvy karmínové až masově červené (zřídka bílé). Pětčetné 14 – 18 mm dlouhé oboupohlavné kvítky jsou bez listenů. Na chlupatém kalichu je možné rozeznat 10 žilek. Koruny jsou na bázi srostlé.

Plodem je nepukavý jednosemenný lusk s lehce oddělitelným váčkem. Semena mají tvar vejčitý až tupě trojhranný, o velikosti 1,5 – 2,3 mm x 1,2 – 2,0 mm. Jsou hladká, lesklá, citrónově žlutá až fialová. Často je spodní část žlutá a horní fialová (10-15).



3.1.2 Výskyt

Trifolium pratense L. je pěstován na polích v různých vyšlechtěných odrůdách, divoce roste na lukách, v příkopech, ve světlých lesích a na okrajích lesů. Je to rostlina značně proměnlivá, která roste z roviny až do hor v celé Evropě a v západní Asii, v severní Africe i v Austrálii. Na Novém Zélandu a v Severní Americe zplaněl. Nejlépe snáší mírně vlhké prostředí (11-13).

3.1.3 Odrůdy

V České republice můžeme najít tři poddruhy *Trifolium pratense* L., které někdy bývají označovány jako odrůdy. Jsou zde zařazeny

- *Trifolium pratense subsp. pratense* – vytrvalá bylina s významem léčivé rostliny
- *Trifolium pratense subsp. sativum* – 2 – 3 letá bylina považována za významnou hospodářskou plodinu
- *Trifolium pratense subsp. americanum* – vytrvalá bylina přivezena do České republiky v 80. letech 19. století, ale od jejího pěstování bylo později upuštěno (9).

3.1.4 Sběr a použití drogy

Jako droga se používají nerozpadlé hlávky ozn. *Trifolium pratense flos*. Jetel luční kvete od května do října. Sběr se provádí hned v počátku května, protože odkvétající droga je méně hodnotná, hlávky se totiž při sušení rozpadají a hnědnou. Sušení je uskutečňováno rychle a v tenkých vrstvách. Drogu je možné na jeden den vystavit přímému slunci a pak dosušit ve stinném a vzdušném místě. Při sušení umělým teplem se musí teplota držet do 35 °C. Poměr seschnutí je 6:1. Během skladování je třeba drogu chránit před světlem a vlhkostí, aby nedošlo ke změně kvality. Kvalitní droga si zachovává původní barvu, maximálně mírně ztmavne (8,10,15,21).

Je to významná medonosná rostlina. Opylení obstarávají hlavně čmeláci a někteří motýli, neboť ostatní hmyz má většinou kratší sosák, než je zapotřebí.

V lidovém léčitelství je jetel užíván při bakteriálních infekcích, dýchacích obtížích, jako expektorans při kašli a bronchitidě, na čištění krve. Zevně je užíván ve formě koupelí jako kožní dezinfekce na ekzémy, lupenku a hnisavé rány.

V současnosti je přidáván jako korigens chuti a vůně do čajových směsí, dále je součástí doplňků potravy pro zmírnění projevů menopauzálních potíží. Mladý jetel je možno podobně jako špenát použít jako zeleninu, která obsahuje více vlákniny než jiná (11,12,13,16).

3.1.5 Obsahové látky

Spektrum obsahových látek *Trifolium pratense* L. je rozsáhlé. Zahrnuje flavonoidy, isoflavonoidy, kyanogenní glykosidy, fenolické glykosidy, saponiny, třísloviny, kumariny, organické kyseliny, minerální kyseliny, barviva, silice, salicyláty, β -sitosterol, cholin, lecitin, vitaminy (vitamin A, C, B-komplex), vápník, hořčík, železo. Z hlediska využití *Trifolium pratense* L. v terapii se jeví jako nejzajímavější skupina isoflavonoidů zahrnující biochanin A a formononetin, které se vyskytují v největší míře. Dále jsou zde zastoupeny daidzein, genistein, genistin, koumestrol, ononin, trifoliol (22).

3.1.5.1 Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. Dnes jich známe asi 4000 a stále jsou objevovány další nové sloučeniny. Jedná se o ve vodě rozpustná barviva, zodpovědná za barvu květů, plodů a někdy i listů. Uložení flavonoidů v rostlinném organismu je druhově závislé. Všeobecně však platí, že ve vodě rozpustné glykosidy jsou nejčastěji uloženy ve vakuolách. Mohou být ukládány pouze do buněk epidermy listu nebo současně do epidermy i mezofylu listu. V obou typech tkání se mohou kumulovat odlišné typy flavonoidů. Aglykony nejčastěji nacházíme v kutikule listů, protože jsou lipofilnější (hydroxylové skupiny ve struktuře sloučeniny jsou částečně nebo

úplně methylované), a proto lépe rozpustné ve voskové vrstvě na povrchu listu. V květech jsou flavonoidy uloženy v epidermálních buňkách. Vyskytují se také v oplodí plodů a semenech, dokonce v pylových zrnech. Ve vnější vrstvě buněk stěny pylového zrna byly flavonolové glykosidy dokázány v roce 1970 – Wiermann. Methoxylované deriváty jsou lipofilní a vyskytují se v silicích (22,23).

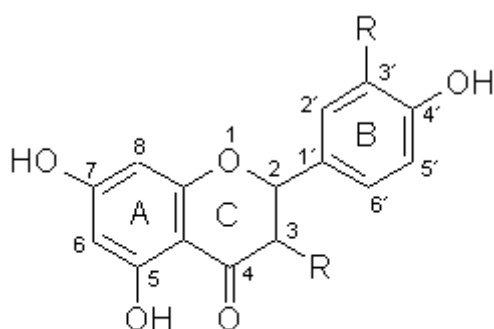
Chemická struktura

Flavonoidní látky jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami.

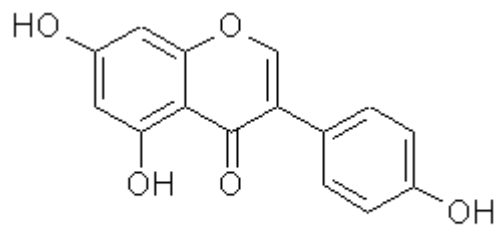
Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují v molekule složku cukernou a necukernou (aglykon). Volné aglykony se vyskytují pouze zřídka, ale v některých případech – např. technologické zpracování při vyšších teplotách a v kyselém prostředí – může docházet k vzrůstu koncentrace aglykonů hydrolýzou glykosidů.

Podle oxidace pyranového kruhu rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů: *flaveny*, *flavany*, *katechiny*, *leukoanthokyanidiny*, *flavanony*, *flavonony*, *flavony*, *flavonoly* a *anthokyanidiny* (22,23).

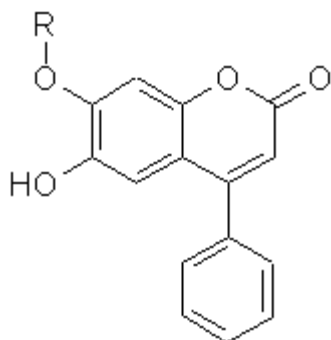
Všechny flavonoidy mají společnou základní strukturu odvozenou od chromanu s fenylem připojeným v poloze 2, isoflavonoidy v poloze 3 a neoflavonoidy v poloze 4.



flavonoid



isoflavonoid



neoflavonoid

Jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace pyranového cyklu (kruh C).

Funkce v rostlinném organismu

Flavonoidy nemusí být vždy barevné, ale přispívají k zbarvení jako kopigmenty, např. jako flavonové a flavonolové kopigmenty chránící anthokyany, které pomáhají lákat na rostliny opylovače. V některých případech flavonoidy absorbují záření blízké UV a vzniklá barva je vnímána pouze hmyzem. Dále jsou přítomny také v kutikule listů a epidermálních buňkách, kde chrání pletiva před ničivým účinkem UV záření.

Další hlavní funkce můžeme rozdělit do následujících kategorií:

- **Antioxidanty** – Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace. Optimální radikálově likvidační vlastnosti byly nalezeny pro o-dihydroxy strukturu v kruhu B, 2,3 dvojnou vazbu a 4-oxo funkční skupinu v kruhu C a 3 a 5 -OH skupiny na kruzích A a C. Tuto strukturu mají právě flavonoly. Flavonoidy ochraňují rostlinu před nadměrným UV zářením, při kterém se uvolňuje velké množství reaktivních forem kyslíku. Zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály,

mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (železo, měď). Vzhledem k převážné lokalizaci flavonoidů ve vakuole je nepravděpodobné, že by přímo zasahovaly proti vysoce reaktivním formám kyslíku, uvolňujícího se při fotosyntéze z chloroplastů. Reagují s peroxidem vodíku, který je stabilní a je schopen difundovat přes membránu.

- **Barviva** – je známo, že různá barva nebo vůně přitahují jiný typ opylovačů. Dalo by se říci, že vztah mezi barvou a opylovačem je alespoň částečně závislý na obsahu flavonoidů. Z pozorování vyplynulo, že hmyz je citlivý na barvu flavonů a flavonolových glykosidů absorbujících blízko 350 nm a na žluté flavonoidy jako chalkony, aurony, 3-deoxyanthokyaniny nebo flavonoly s hydroxylovou nebo methoxylovou skupinou v poloze 6, 8. Na základě barevného vidění hmyzu se zjistilo, že motýli si libují v růžové nebo bílé barvě, včely preferují žlutou a pro ptáky je atraktivní červená.

- **Inhibitory enzymů** – studie dokázaly, že flavonoidy inhibují např. malátdehydrogenázu nebo glutamátdekarboxylázu.

- **Fytoalexiny** – jedná se o nízkomolekulární látky s antimikrobiální aktivitou, které jsou syntetizovány po napadení mikroorganismy.

Flavonoidy v rostlinách vznikají kondenzací polyacetátu a aromatických aminokyselin (fenylalanin a tyrosin), které vznikají v biosyntetické cestě kyseliny šikimové.

Aglykony flavonoidních glykosidů vznikají dvěma hlavními cestami. Šestiuhlíkový fragment je odvozen z acetátového metabolismu a zbývající devíti-uhlíkatá část z kyseliny šikimové. Meziproduktem biosyntézy je chalkon (patnácti-uhlíkatý) vznikající z kyseliny skořicové a tří molekul acetátu, který je přetvářen na flavanon a tak dává základ i dalším strukturám flavonoidů (2,23).

Biologicky účinné jsou glykosidy i aglykony. Mohou se používat v čistém stavu, ale častěji ve formě drog nebo extraktů. V živých organismech se zapojují do oxidačně-redukčních procesů, mají schopnost normalizovat permeabilitu kapilár a odstraňovat jejich lomivost, pravděpodobně díky svému působení na metabolismus arachidonové kyseliny vykazují protizánětlivou a antialergickou aktivitu, dále antitrombotické a vasoprotektivní účinky. Mnoho rostlin obsahující flavonoidy působí jako diuretika a spasmolytika (22,23).

Flavonoidy dále vykazují tyto účinky:

- Estrogenní aktivita
- Spasmolytická aktivita
- Antiflogistická aktivita
- Antihepatotoxická aktivita
- Efekt na centrální vaskulární systém
- Antimikrobiální a antivirální systém
- Antifertilní aktivita
- Inhibice enzymů – aldosareduktázu, xanthinoxidázu, fosfodiesterázu, Ca^{2+} - dependentní ATP-ázu, isoenzymy cytochromu P450, tyrosinproteinkinázu, hexokinázu, elastázu a kolagenázu, hyaluronidázu, prostaglandincyklooxygenázu, histidindekarboxylázu, nespecifická inhibice katechol-O-methyltransferázy, inhibice adenosindeaminázy, inhibice angiotenzin konvertujícího enzymu
- Antimutagenní aktivita

Ukazuje se, že přírodní flavonoidy mohou významným způsobem působit při prevenci chorob majících svůj původ v oxidačním poškození biologických struktur (ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění). Vhodný způsob stravování a příjem potravin s vyšším příjmem flavonoidů by mohl pomoci při léčbě a předcházení těchto chorob. Tato cesta ke zvýšení příjmu antioxidantů je zřejmě vhodnější než podávání samotných antioxidačních preparátů jako vitamín C a E (22,23).

3.1.5.2 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou látky, které se vyskytují ve většině rostlinných tkání. Nejvíce ale byly izolovány z klíčků, pupenů a mladých výhonků. Z toho lze usuzovat, že by mohly zasahovat do regulace fyziologických procesů důležitých pro růst rostlin. O přesném významu isoflavonoidů se příliš neví, ale je pravděpodobné, že vznikají jako odpověď na infekci patologickým agens (fytotoxiny). Mohou tak představovat jeden z obranných mechanismů (27,28).

Nejčastěji se vyskytující skupinou těchto sekundárních látek jsou isoflavony. V rostlině se vyskytují převážně ve volné formě nebo glykosidicky vázané. V současné době je známo přibližně 360 zástupců, nejvýznamnějšími jsou biochanin A, daidzein, formononetin, genistein a glycitein. Jako další skupiny isoflavonoidů rozlišujeme lignany (matairesinol, secoisolariciresinol-diglucosid) a kumestany.

Isoflavonoidy řadíme mezi fytoestrogeny, což jsou látky nesteroidní povahy s estrogením účinkem. Jsou odvozeny od 3-fenylchromanu, jeví podobné účinky jako flavonoidy, které jsou deriváty 2-fenylchromanu. Na rozdíl od flavonoidů jsou isoflavonoidy v rostlinách mnohem méně zastoupeny. To je dáno potřebnou přítomností specifického enzymu zodpovědného za přeměnu 2-fenylchromanového cyklu na 3-fenylchroman (24,26).

Nejvýznamnějším zdrojem isoflavonoidů je sója a sojové produkty. V našich podmínkách - červený jetel nebo vojtěška. Dalšími zdroji jsou ploštičník, červená vinná réva, rýže, jahody, rybíz, česnek, lékořice nebo datle (26).

Isoflavony vykazují slabou estrogení aktivitu. Váží se na estrogení receptory, ovšem vykazují i estrogen antagonistický účinek, narušováním funkce endogenních receptorů v lidském organismu. Princip antiestrogenního působení je založen na stimulaci biosyntézy sexuální hormonu vázající globulin (SHBG) v játrech. U estrogeních receptorů rozeznáváme dva subtypy:

- ER- α – nachází se v děloze, mléčných žlázách a hypofýze
- ER- β – v mozku, kostech, močovém měchýři a thymu.

Isoflavonoidy vykazují i další účinky:

- Antioxidační aktivita
- Antiosteoporotická aktivita
- Antikarcinogenní aktivita
- Inhibující angiogeneze
- Antiatherogenní aktivita
- Hypocholesteromická aktivita
- Antivirová, antibakteriální, antifungální aktivita

- Larvicidní a insekticidní aktivita
- Imunosupresivní aktivita
- Antidotum proti některým pavoučím a hadím jedům (*Bothrops atrox*)

V dnešní době je věnováno mnoho pozornosti fytoestrogenům, protože by mohly být alternativou v léčbě klimakterického syndromu. Vede k tomu poměrně nedávné zjištění nežádoucích účinků vyskytujících se u žen v důsledku užívání hormonální substituční terapie.

Mohly by také pomáhat při léčbě nemocí kardiovaskulárního systému, osteoporózy, nepravidelné krvácení, ale i proti zhoubným nádorům (nejnovější publikace dokládají ochranný účinek pravidelného užívání isoflavonů na karcinom ovaria) (24,25,26).

3.2 Rostlinné kultury *in vitro*

Rostlinné tkáňové kultury (explantáty) jsou sterilně vyňatá a na umělé živné půdě rostoucí izolovaná pletiva s prakticky neomezenou životností. Podmínkou je pravidelné pasážování do nového živného prostředí (1).

První pokusy zabývající se touto problematikou, provedl Haberlandt (1902), který ovšem pracoval s diferencovanými buňkami, což vedlo k negativním výsledkům. Byly vyzkoušeny různé modifikace média a podmínek kultivace. K pozitivním výsledkům vedla až volba meristematických buněk na místo vysoce diferencovaných. První Hannig (1904) a po něm Dietrich (1924), Thukey (1933) úspěšně kultivovali rostlinná embrya. První neomezeně rostoucí kalusové kultury odvodili z kambia Nobecourt (1937) a Gautheret (1938) nezávisle na sobě.

50. léta vedla k vývoji nových aparatur. Používaly se různé druhy třepaček např. Muir (1954), White (1953) vyvinul roler, Nickell a Tulecke (1960) pracovali se suspenzemi rostlinných buněk ve fermentačních aparaturách (6).

Původně vědecký experiment se v současné době rozšířil na metodu využívanou ve šlechtitelství a k produkci sekundárních metabolitů.

3.2.1 Základní termíny

- **Rostlinný explantát** – každý fragment živého pletiva, orgán nebo komplex orgánů, odebraný buď z intaktní rostliny nebo již existující kultury s cílem pěstovat jej v podmínkách *in vitro*.
- **Intaktní rostlina** – původní rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách.
- **Kultivace *in vitro*** – pěstování rostlinného materiálu v podmínkách co nejúplněji definovatelných po stránce chemické i fyzikální a zabraňujících nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organizmy a buňkami.
- **Kultura rostlinných explantátů** – rostlinné explantáty pěstované po určitou dobu v podmínkách *in vitro*. Kultury rostlinných explantátů lze podle morfologické charakteristiky zařadit do některé z následujících pěti kategorií:

1. **kultura orgánová** – orgánové systémy, orgány resp. jejich základy a části pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje diferenciaci a částečně zachovává i jejich stavbu a funkci
2. **kultura tkáňová, pletivová** – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně, pomnožované buď na polotuhých či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě
3. **kultura suspenzní** – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendovány v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované
4. **kultura buněčná** – volné jednotlivé buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotuhé půdě nebo na nosiči nasyceném živnou půdou
5. **kultura protoplastů** – kultura buněk zbavených buněčných stěn, kde buněčný obsah je obalen jen pružnou elastickou plasmalemou.

- **Primární explantát** – rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny.

- **Primární kultura** – kultura primárních explantátů.

- **Subkultivace, pasážování** – přenos celé kultury nebo její části (očka, inokula) do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat nebo zesílit růst kultury pro další subkultivační interval. Subkultivační interval je doba mezi dvěma pasážováními.

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

- **Kalus, zával, svalec** – v původním významu neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny, v přeneseném

významu pletivo, které vzniká na povrchu nenádorových primárních explantátů a je schopné subkultivace.

- **Kalusová kultura** – kultura kalusu *in vitro*.
- **Totipotence** – schopnost rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* obnovit v průběhu diferenciačních procesů specializované funkce a postupně regenerovat ve fertilní rostlinu. Umožňuje realizace genetických změn vyvolaných v jednotlivých buňkách na úrovni celého organismu.
- **Diferenciace** – chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech spočívající v aktivaci či inaktivaci určitých genů, jimiž se odlišily od tzv. eumeristemického stavu a získaly jinou specializaci. Opačný proces je nazýván dediferenciace.
- **Dediferenciace, embryonizace** – chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech, na jejichž základě získávají již specializované zralé buňky vlastnosti typické pro eumeristemický stav.
- **Rozpadavost kultur** – schopnost kultur rozpadat se na menší shluky buněk nebo volné buňky a dále růst (3,6).

3.2.2 Vlastnosti kultur rostlinných explantátů

- Tkáňovou, suspenzní či buněčnou kulturu lze odvodit z buňky či komplexu buněk kteréhokoliv orgánu rostlinného těla (výjimkou jsou některé velmi specializované buňky, např. sítkovice, sklereidy).
- Za vhodných kultivačních podmínek lze kulturu pěstovat *in vitro* neomezeně dlouho.
- Tkáňová a suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje, ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter. Není však homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciace.

- Buňky tkáňových ani buněčných kultur nejsou schopny tvořit jednovrstevnou kulturu (monolayer), neuchycují se na tuhé ani polotuhé podklady.
- Řada rostlinných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách.
- Explantátové orgány, resp. orgánové základy v kultuře *in vitro* mohou dorůstat.
- Jsou zachovány základní prvky totipotence buněk.
- Tkáňové, orgánové ani buněčné kultury nejsou schopny bez poškození podstoupit konzervaci mrazem.
- Suspenzní kultury, které lze z tkáně pěstované na pevné půdě získat buď enzymovým rozvolněním (např. pomocí pektinázy) nebo mechanickou cestou, jsou tvořeny jednotlivými buněčnými shluky různé velikosti, jejichž tvorbu se dosud nepodařilo vyloučit. Rozpadavost kultury je zřejmě podmíněna geneticky a lze ji ovlivnit složením média a kultivačními podmínkami.
- Vhodnou kombinací růstově aktivních látek a ostatních složek kultivačního média lze v kulturách indukovat histogenezi nebo organogenezi, takto můžeme z jediné somatické buňky odvodit životaschopnou rostlinu (3).

3.2.3 Kultivace rostlinných kultur *in vitro*

Explantátové kultury rostlin vznikají aseptickou kultivací izolovaných částí rostlin za definovaných experimentálních podmínek. Pro odvození explantátové kultury je vhodné jakékoliv rostlinné pletivo obsahující funkční totipotentní buňky. Růst a vývoj explantátových kultur výrazně ovlivňuje průběh kultivace (růstové médium, světelný režim, teplota atd.), případně může stimulovat a urychlovat průběh morfogenního procesu (organogenezi, somatickou embryogenezi, somatickou polyembryogenezi, pylovou embryogenezi, či androgenezi) (29).

Pro růst a produkci sekundárních metabolitů je potřeba nalézt optimální podmínky.

3.2.3.1 Odvození kalusové kultury

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

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

Z takto připraveného rostlinného materiálu se odebere část požadovaného orgánu a umístí se do kultivační nádoby s vhodným sterilním živným médiem a inkubuje se při teplotě 23-28 °C. Při zajištění sterility a vhodného kultivačního prostředí, probíhá u inokula organogeneze nebo produkce parenchymatických nediferencovaných buněk, které se nazývají kalusy (1).

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

U prvních pasáží se mohou objevit morfologické a morfogenetické odchylky. Patrné jsou zejména změny regenerační schopnosti a pigmentace.

Porušení pletiv při izolaci nebo sterilizaci vede k uvolnění a zvýšené syntéze oxidáz (polyfenoloxidáza, katecholoxidáza, tyrozináza aj.). Činnost těchto enzymů způsobuje kumulaci fenolických látek, což se projeví hnědnutím až červenáním. Hrozí nekróza buněk nebo zastavení růstu. Kumulaci fenolických látek lze zabránit častým pasážováním na čerstvé médium, přidáním adsorbencí (aktivní uhlí) nebo antioxidačních látek (kyselina citronová, kyselina askorbová, L-cystein, glutethion) nebo substrátů potlačujících aktivitu oxidáz (32,36).

Složení média se mění během kultivace kvalitativně i kvantitativně. Nastává vysychání agarového gelu, změna pH, vyčerpání živin z půdy a naopak do půdy jsou vylučovány odpadní látky kultivované tkáně. To je další důvod pro pravidelné pasážování, které je prováděno v intervalech až 3 týdnů. Při pasážování se přenáší čerstvě narostlá tkáň bez původního inokula. Stabilní a homogenní kulturu lze získat až po provedení většího počtu pasáží. Důležité je však dodržování konstantních podmínek kultivace (teplota, složení živné půdy, osvětlení, atd.).

Úspěšnost kultivace rostlinných kultur je podmíněna nalezením nejvhodnějších podmínek (fyzikálních nebo optimální složení živného média) (6,37).

3.2.3.2 Fyzikální podmínky kultivace

Pro úspěšný růst a ostatní životní procesy je nutné nalézt optimální hranice dané prostředím. Z fyzikálních faktorů sem lze zařadit teplotu, světlo, vodu, vlhkost vzduchu nebo pH živného média.

➤ Teplota

Teplota kultivace je většinou zvolena empiricky těsně kolem 25 °C. Její hodnota má vliv na rychlost metabolismu, dělení buněk a její zvýšení může indukovat organogenezi. Pokud je teplota příliš nízká, zpomalí se rychlost metabolismu někdy i zastaví, pokud je příliš vysoká, dojde k poškození buněk. Hilton a Rhodes ve své studii zjistili, že pro růst tkáňové kultury *Datura stramonium* je optimální rozmezí teplot 25 – 30 °C. Nejvyšší produkci hyoscyaminu ale zjistili při 20 °C (62).

➤ **Světlo**

V intaktních rostlinách i tkáňových kulturách světlo ovlivňuje intenzitu biosyntézy a akumulaci sekundárních metabolitů. Vliv na růst tkáňové kultury není jednoznačný. Jsou známy i inhibiční účinky. Obecně lze konstatovat, že růst rostlinné kultury je svým způsobem částečně inhibován přímým slunečním světlem. Pro většinu kultur je dostačující osvětlení v rozmezí 500 až 1000 luxů. Je zajímavé, že kultury, které byly pěstované při nepřetržitém osvětlení, vykazovaly menší růst než kultury, kde se periodicky střídalo 12 hodin světla a tmy (3,6).

➤ **Acidita živného média**

Optimální hodnota pH živného média je závislá na typu kultury. Na rozdíl od kultur živočišných nebo mikroorganismů nejsou rostlinné kultury citlivé na přesnou hodnotu pH. Pro většinu kultur *in vitro* se doporučuje pH od 5,5 – 5,8. V některých případech i v rozmezí pH 6,0 – 7,0. K úpravě pH se většinou používá hydroxid sodný nebo kyselina chlorovodíková (6,38).

➤ **Atmosférická vlhkost**

Pro optimální růst je zapotřebí vhodná atmosférická vlhkost. Je-li nízká, hrozí nebezpečí, že tkáň na povrchu zkorkovatí nebo zahynou. Je-li vlhkost naopak vysoká, páry na povrchu média kondenzují a dochází k inhibici růstu. Vlhkost v kultivačních místnostech bývá nastavena na hodnotu v rozmezí 20 – 98 % - podle požadavků dané kultury (6).

3.2.3.3 Živné médium

Živné médium je prostředí, umožňující růst organismů. Organismy z něho čerpají živiny pro syntézu potřebných buněčných složek a energii pro uskutečňování biochemických procesů. Médium je tekuté nebo tuhé (po přidání agaru). Složení se mění podle typu kultivace. Kvantitativní i kvalitativní zastoupení jednotlivých komponent má rozhodující význam pro růst ale i pro morfogenezi explantátu. Ovlivňuje např. rozpadavost kalusu při převádění do suspenzní kultury (3).

Složky živných půd se podle množství v půdě, svého charakteru nebo fyziologických účinků rozdělují do následujících skupin (3):

- **Makroelementy** – jsou nutné pro kultivaci intaktních rostlin. Jedná se o dusík, síru, fosfor, hořčík, vápník, draslík. Ionty se do živné půdy přidávají ve formě solí. Jejich koncentrace v médiu je vyšší než 30 mg.l^{-1} .
- **Mikroelementy** – jsou nezbytné pro růst explantátových kultur, řadí se sem železo, bor, mangan, jod a molybden. V mnoha případech je také nepostradatelná měď a zinek. Význam niklu, kobaltu a hliníku pro růst rostlinných tkání je zatím sporný.
- **Destilovaná voda** – voda pro přípravu živných půd může obsahovat jen minimální množství anorganických látek, musí být prostá pyrogenů, plynů i organických nečistot.
- **Vitamíny** – intaktní rostliny si dovedou vitamíny potřebné k růstu a vývoji syntetizovat v dostatečném množství sami, ale explantátové kultury většinou produkují nedostatečné množství. Největší význam mají vitamíny skupiny B. Nejčastěji se přidávají pyridoxin, thiamin, kyselina nikotinová, biotin a myoinositol. Někdy se také používají kyselina panthotenová, vitamín C a kyselina listová. Thiamin je v živných půdách nepostradatelnou součástí pro růst explantátových kultur, také myoinositol (sacharid) se přidává do většiny půd, pro svůj výrazný stimulační vliv (30).
- **Zdroje dusíku** – živné médium by mělo obsahovat minimálně 25 - 60 mM anorganického dusíku. Rostlinné buňky mohou růst na médiu obsahujícím dusík pouze v nitrátové formě, mnohem lepšího růstu je docíleno při dodání směsi nitrátů a amonných solí. Dostatečného množství redukovaného dusíku lze dosáhnout i přidáním organických sloučenin (aminokyselin). Mohou buňkám sloužit nejen jako zdroj dusíku, ale také přímo k syntéze proteinů.
- **Zdroje organického uhlíku** – uhlík je základní stavební jednotka pro nově vznikající pletiva. Nejlepším zdrojem jsou cukry (sacharóza, glukóza, laktóza, fruktóza, galaktóza a maltóza). Obvykle se používá sacharóza v koncentraci 2 – 5 %. Dalšími zdroji jsou alkoholy a organické kyseliny, ale ty už nemají takový význam jako cukry. Jako uspokojující zdroj může sloužit glycerin. Organické kyseliny působí stimulačně v koncentracích nižších než 2 %, ve vyšších už je inhibiční. Jako vhodný zdroj se jeví kyselina jablečná.

- **Nedefinované směsi přírodních látek** – nejčastěji se používá hydrolyzát kaseinu a pepton. Růst je ale možné stimulovat řadou dalších organických extraktů – např. z kokosového mléka, vlašského ořechu, koňského kaštanu, pšenice, kukuřice, sladu nebo kvasnic.
- **Prostředky pro odpěnění živných půd** – používají se rostlinné oleje – sójový, řepkový, kokosový, slunečnicový, hořčičný, dále živočišné tuky – lůj, dezodorizovaný rybí tuk, tekutá frakce vepřového sádla, silikonové oleje (ve formě vodné emulze s obsahem 10 % silikonu).
- **Látky používané pro zpevnění média** – pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. Ten vykazuje řadu výhod – stabilitu při kultivačních teplotách, není rozkládán rostlinnými enzymy a neinteraguje s ostatními složkami média. Tuhost média lze regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. V případě, že není použito pevné médium, lze explantát „fixovat“ na můstcích z filtračního papíru, v polyuretanové pěně, čedičové vatě nebo perforovaném celofánu.
- **Růstové regulátory** – rostlinné buňky jsou při pěstování *in vitro* závislé na růstových regulátorech, protože jejich endogenní syntéza není dostatečná pro zajištění růstu.

3.2.3.4 Růstové regulátory

Jedná se o specifické látky, které jsou rostliny schopny do určité míry syntetizovat. Řídí biosyntetické pochody v buňkách, čímž zajišťují optimální růst buněk a celé rostliny.

Důkaz existence růstových látek provedl v roce 1926 pan Went na koleoptilii trav (koleoptilie: soubor stejných buněk, které jsou schopny intenzivního růstu, neprobíhá v nich buněčné dělení). Z pokusu vyplynul závěr, že ve vrcholku koleoptile se tvoří látka podporující růst buněk.

Látky, které stimulují ve fyziologických koncentracích růst rostliny, označujeme jako stimulatory růstu. Naopak růstovými inhibitory označujeme regulátory, které ve fyziologických koncentracích růst inhibují. Zdůraznění fyziologické koncentrace je důležité, protože stimulatory růstu mohou ve vyšších

koncentracích inhibovat a naopak růstové inhibitory při velmi nízkých koncentracích růst stimuluji.

Růstové regulátory můžeme rozdělit na produkované rostlinou ozn. **nativní** (endogenní) a exogenně aplikované **syntetické** regulátory.

Nativní růstové regulátory (fytohormony) jsou syntetizovány zejména v meristematických pletivech (vrcholové meristémy stébla a kořene). Řadíme mezi ně auxiny, gibereliny a cytokininy (3,6).

Fytohormony působí na úrovni genů a v určitých případech stimulací syntézy i-RNA umožňují syntézu bílkovin enzymů, podílejících se na metabolických a fyziologických procesech v rostlinách. Rozdělení působení fytohormonů (6):

- kontrola koncentrace ADP a ATP
- změna propustnosti buněčných stěn pro různé substráty a vodu
- působení na využití iontů kovů, které mají centrální úlohu v působení mnoha enzymů
- uvolnění vázaného substrátu pro předem vytvořený enzym
- ovlivnění využití různých koenzymů nebo mohou být sami koenzymy
- regulace aktivity enzymů
- působení na uvolnění jiných hormonů z jejich prekurzorů
- schopnost měnit intenzitu dýchání v mitochondriích
- působení na proteosyntetický aparát, tj. na replikaci DNA, transkripci RNA nebo translaci (zejména hormonální kontrolou DNA- a RNA- polymeráz nebo molekulárních depresorů).

Přírodní regulátory rozdělujeme na dvě základní skupiny (1,6,54):

1. regulátory vznikající při metabolismu aminokyselin, patří mezi ně auxiny, některé fenolové látky, ethylen a kyselina glutamová
2. regulátory odvozené od kyseliny mevalonové, tvořené isoprenovými jednotkami – cytokininy, abscisiny, gibereliny

Auxiny – látky indolového typu, jejichž přítomnost je důležitá pro dělení, růst a diferenciaci buněk. Používá se především kyselina indolyloctová, kyselina indolylmásečná, kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová a kyselina naftyloctová. Nízké

hladiny stimulují růst kořenů, oproti vysoké hladiny v kombinaci s cytokininy indukují tvorbu kalusu a dediferencovaný růst.

Cytokininy – název této skupiny je odvozen od hlavního účinku – *cytoogeneze* (stimulace buněčného dělení). Zpomalují stárnutí rostlin (tj. rozklad chlorofylu, nukleových kyselin a bílkovin), indukují tvorbu prýtů a kořenů. Tvoří se v kořenových špičkách, ale i v malých plodech a semenech. Zástupci jsou 6-benzylaminopurin, 6-dimethylaminopurin, 6-furfurylaminopurin a zeatin.

Gibereliny – hlavními zástupci jsou kyselina giberelová (GBA) a giberelin. Jde o terpeny tetracyklické struktury složené ze čtyř isoprenových jednotek. Tvoří se v mladých listech, meristematických částech lodyh, apikálních částech kořenů, mladých plodech a klíčících semenech. Podporují rovnoměrný růst v nižších koncentracích a ve vyšších koncentracích převažuje prodlužování nad tloustnutím, ovlivňují květní indukce a indukce klíčení semen, čímž mohou porušovat období vegetačního klidu. Dále brzdí tvorbu adventivních kořenů.

Kyselina abscisová – jde o terpenoid blízký vitamínu A, odvozený od kyseliny mevalonové. Můžeme ji označit za antagonistu giberelinů – snižuje permeabilitu membrán, zabraňuje pronikání vody a dalších látek do buněk, inhibuje růstové procesy, urychluje opadávání plodů a květů.

Ethylen – plyn jehož účinky se projevují v řadě vývojových procesů rostlin, např. při dozrávání plodů, opadávání listů, při vývoji kořenů. Silně inhibují transport auxinů. Používají se k urychlení nebo k inhibici kvetení. Podobné účinky jako ethylen mají i některé syntetické přípravky, např. fenolické kyseliny (kyselina salicylová, deriváty kyseliny benzoové), herbicidy (maleinhydrazid).

Maleinhydrazid – zadržuje růst rostliny jako celku, nebrzdí pouze dělení buněk, ale i intenzitu dýchání rostlin. Inhibiční vliv se vysvětluje podobností se strukturou uracilu, čímž dochází k blokádě proteosyntézy v ribozómech.

Další regulátory – spermidin, jeho prekurzor putrescin, argostemin, brassiny, fusicoccin. Nejnověji sem patří meristimul, 3-allyl-6-nitro-2-benzothiazolinon. Vykazují vliv na stimulaci růstu a syntézy chlorofylu zelených řas, jedno- a dvouděložných rostlin a kalusových tkáňových kultur.

Vznik a růst kalusových kultur ovlivňují hlavně auxiny a cytokininy. Při vyváženém poměru vzniká kalus. Intenzita růstu kalusové kultury závisí nejen na koncentraci a druhu růstových stimulantů, ale i na velikosti explantátů, citlivosti buněk nebo pletiv, na fyzikálních podmínkách a dalších faktorech. Při zvýšené koncentraci auxinů se indukuje tvorba výhonků (6).

3.2.3.5 Růstové fáze buněčných kultur

Růst buněčné kultury v uzavřeném systému, kdy se mění podmínky kultivace, prochází několika fázemi. Kultura je po celou dobu ovlivňována mnoha faktory: kromě složení živného média a fyzikálních faktorů sem lze zařadit také typ a genetické vybavení explantátu, sterilitu prostředí apod.

Vynese-li se do grafu experimentálně zjištěné množství biomasy za jednotku času, získá se charakteristická **růstová křivka**, na které lze rozlišit 6 následujících fází (3):

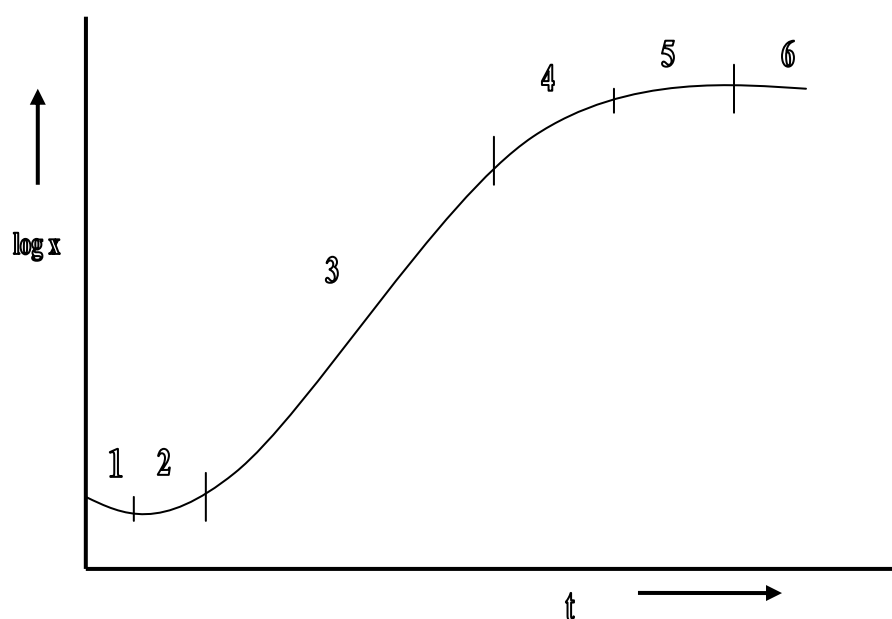
1. **Lag fáze** – období přizpůsobování naočkovaných buněk novému prostředí, jejich koncentrace zůstává konstantní, ale je možné, že poklesne.
2. **Fáze zrychlení** (akcelerační fáze) – období, kdy všechny důležité enzymové reakce dosahují konstantní maximální rychlosti, buňky se množí vzrůstající rychlostí, po dosažení maximální rychlosti růstu přechází do exponenciální fáze.
3. **Exponenciální fáze** – charakteristická je stále stejná maximální rychlost buněčného růstu. Buňka se z hlediska chemického složení nemění. Maximální růst trvá tak dlouho, dokud mají buňky k dispozici dostatečné množství živin a není inhibován vlastními odpadními produkty metabolismu.
4. **Fáze zpomalení** (deklinační fáze) – postupným vyčerpáním živin a hromaděním metabolických produktů dochází k poklesu růstové rychlosti, tvar

růstové křivky se v této fázi může velmi lišit, což také záleží na typu rostlinné kultury.

5. **Stacionární fáze** – populace buněk dosahuje maximální a po určitou dobu konstantní velikosti. Lze ji charakterizovat rovnovážným stavem mezi dělením a úhynem buněk. Maximální dosaženou koncentraci buněk určuje mnoho faktorů, např. počáteční koncentrace energetického zdroje, koncentrace kyslíku, zdroje dusíku a stopových prvků, způsob úpravy pH během kultivace.

6. **Fáze odumírání** – pro průběh této fáze neexistuje žádné obecné pravidlo. Živiny jsou prakticky vyčerpány, dochází k pomalému nebo rychlému odumírání buněk, spojené nebo nespojené s autolýzou buněk.

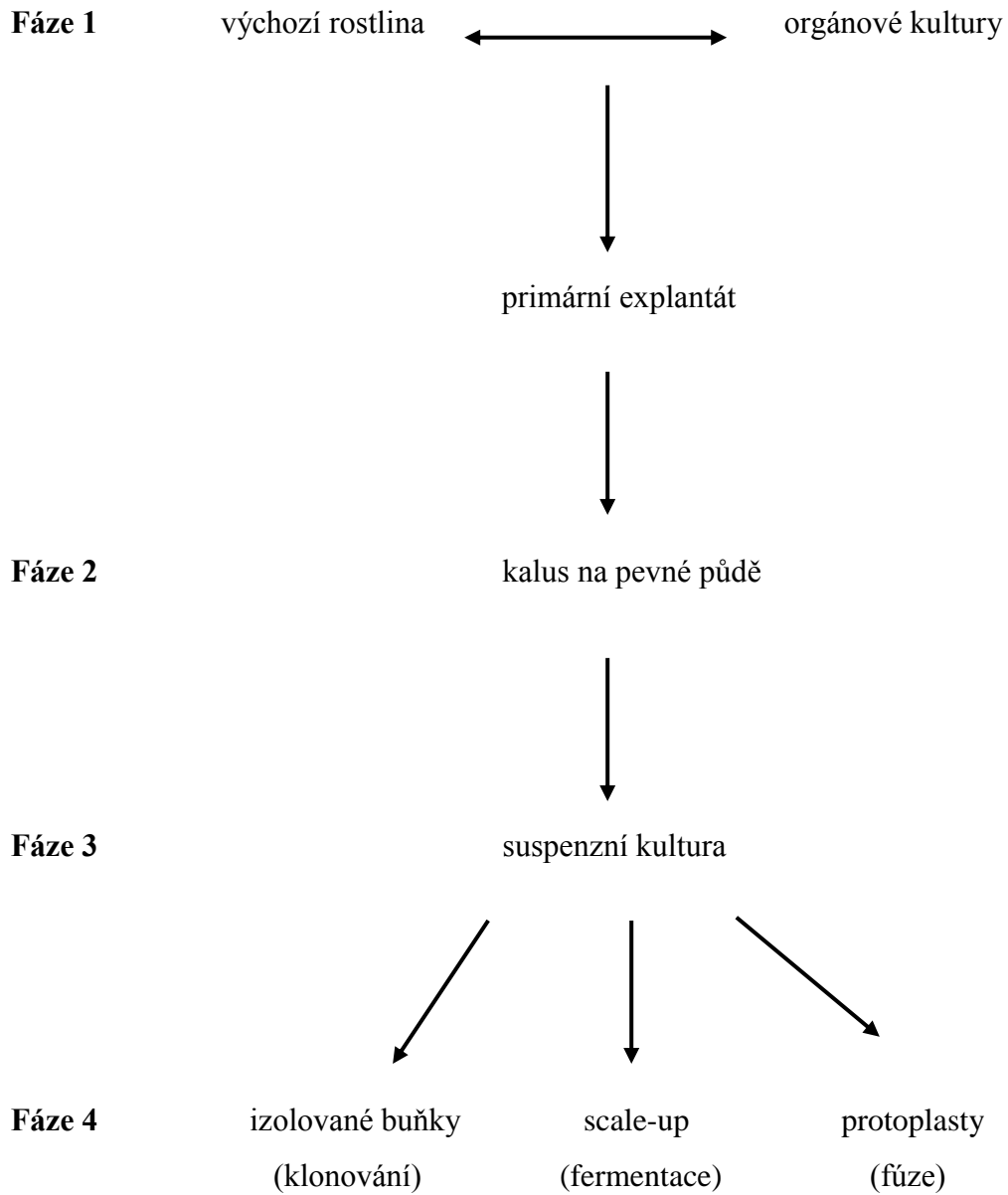
Obr. Růstová křivka



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

3.2.3.6 Etapy kultivace buněčných kultur

Všechny významné etapy kultivace lze rozdělit do čtyř fází:



Fáze 1:

Cílem je získat stabilní a primární explantát s vysokou produkcí metabolitu, proto je důležitý i samotný výběr matečné rostliny. Fragment některého orgánu z povrchově sterilní nebo asepticky pěstované rostliny se umístí *in vitro* na vhodné agarové médium, které má přesné složení, volené tak aby maximálně podporovalo růst a množení buněk. Po několika týdnech kultivace se objeví primární kalus, který je schopen růst na novém médiu.

Fáze 2:

Získaný kalus je schopen neomezené proliferace po odstranění zbytku výchozího orgánu při pasážování na vhodném médiu. Během prvních pasáží se často projevují morfologické (pigmentační) a morfogenetické (regenerační) změny. K stabilnímu a homogennímu rostlinnému materiálu vede až vyšší počet pasáží, ovšem pouze za předpokladu přísného dodržování konstantních podmínek kultivace (složení živné půdy, teplota, osvětlení a pravidelnost pasáží).

Fáze 3:

Metodou enzymového (pomocí pektináz) nebo mechanického rozvolnění lze získat suspenzní kultury, a to z tkáně pěstované na pevném nosiči.

Fáze 4:

Pravidelným pasážováním v aseptických podmínkách předcházíme nežádoucí kontaminaci suspenzních kultur (3).

3.2.4 Buněčné suspenzní kultury

Podmínkou získání suspenzní kultury je odvození kalusového pletiva. Nejvhodnější je *kalus rozpadavý*, méně potom *kalus kompaktní*.

Buněčné suspenzní kultury jsou kultivovány v pohybujiícím se tekutém živném médiu, umístěném na třepačce nebo roleru. Tyto kultury reprezentují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů. Tekutá konzistence média umožňuje lepší přístupnost svých složek k buňkám suspenze. Tato rychlost umožňuje velmi rychlý růst buněčné suspenze (6).

Pasážování suspenzní kultury probíhá v intervalu 4 – 14 dní. Jde o podstatně kratší interval než u kultury kalusové, kde činí asi 3 – 6 týdnů. Obecně lze říci, že interval je určen rychlostí růstu a podmínkami kultivace.

3.2.5 Biotechnologické využití explantátových kultur

Využití explantátových kultur lze rozdělit na dvě hlavní skupiny. Jde o produkci sekundárních metabolitů a o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin.

V Evropě můžeme nalézt více než 500 středisek biotechnologického výzkumu. Jedná se o instituce v Německu, Holandsku, Anglii, Itálii a Francii. Dále jsou pracoviště soustředěna v Japonsku, USA a Kanadě (34).

3.2.5.1 Tvorba sekundárních metabolitů

Vyšší rostliny jsou bohatými zdroji léčivých látek. Jejich pěstování je ale doprovázeno mnoha komplikacemi, proto by jednou mohlo být řešením, zavedení systému pěstování explantátových kultur pro produkci léčivých látek.

Hlavní výhody buněčné kultivace oproti pěstování celých rostlin jsou:

- Sekundární metabolity mohou být produkovány za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických a půdních podmínkách.
- Buňky kterékoliv rostliny, bez ohledu na geografický původ, mohou být pěstovány k získání jejich specifických metabolitů.
- Rostlinné explantáty jsou pěstovány sterilně, bez použití ochranných prostředků a hnojiv.
- Kultivace může probíhat během celého roku. Pomocí pasážování jsou kultury udržovány za optimálních podmínek i několik let.

Sekundární metabolity jsou nejčastěji syntetizovány jen v určité ontogenetické fázi, v určitém období růstového cyklu. Často se stává, že

převedením do kultury *in vitro* a ztrátou diferenciací pletiva dochází ke změně či přerušení metabolických drah, čímž se kvalitativně změní spektrum produkovaných látek. Jedná se o vedlejší produkty metabolických drah, modifikované látky výchozích rostlin nebo látky nové, které nejsou v intaktní rostlině (53).

Některé kultury zpočátku produkují látky stejné s výchozí rostlinou či orgánem, postupně však syntéza ustává. Můžeme to pozorovat např. u *Digitalis purpurea* L.. U této kultury dochází k postupnému zužování spektra metabolitů a nejpozději po 18. pasáži k úplnému zastavení produkce kardenolidů. Po regeneraci rostliny ovšem dochází k obnovení celého spektra metabolitů (34).

V následující tabulce jsou uvedeny příklady úspěšných pokusů o vyprodukování sekundárních látek buněčnými kulturami v množství větším než v intaktní rostlině (34).

sekundární metabolit	rostlina
ajmalicin	<i>Catharanthus roseus</i>
anthrachinony	<i>Cassia tora</i> <i>Galium molugo</i> <i>Morinda citrifolia</i>
biscoclaurin	<i>Stephania cepharantha</i>
diosgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>
glutathion	<i>Nicotiana tabacum</i>
harmin	<i>Peganum harmala</i>
kofein	<i>Nicotiana tabacum</i>
kyselina rosmarinová	<i>Coleus blumei</i>
L-dopa	<i>Mucuna pruries</i>
nikotin	<i>Nicotiana tabacum</i>
saponiny	<i>Panax ginseng</i>
serpentin	<i>Catharanthus</i>
trigonelin	<i>Trigonella foenum-graecum</i>
tripdiolid	<i>Tripterygium wilfordii</i>
ubichinon-10	<i>Nicotiana tabacum</i>

Tabulka uvádějící látky, které byly průmyslově získávány z kultur *in vitro* (34).

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

V posledních letech nastává ve vývoji významný pokrok. Jde např. o biotransformaci, imobilizaci, elicitaci a jejich vzájemné kombinování. Těmito postupy můžeme dosáhnout zvýšené produkce a akumulace sekundárních metabolitů v buněčných kulturách *in vitro*.

Budoucnost průmyslového využití buněčných kultur pro produkci přírodních látek v bioreaktorech závisí na vývoji postupů a technologií zkracujících periodu fermentace a zvyšující výtěžek. Jako perspektivní se jeví i přenos rostlinných genů, kódující reakce katalyzující biosyntézy sekundární látky do bakteriální buňky nebo do buňky mikroskopických hub (34).

3.2.5.2 Rozmnožování a šlechtění rostlin

Buněčné kultury mají důležité využití nejen ve výzkumu, ale i v zemědělství, kde slouží k množení, šlechtění a ozdravování rostlin.

Z různých aplikací jsou nejdůležitější (3,37).

1. **vegetativní množení** – umožní rychlé získání tisíců shodných rostlinných jedinců (orchideje, karafiáty, gerbery).
2. **pylové kultury** – umožní získání haploidních rostlin a od nich odvozených čistých linií pro šlechtitelské účely (rýže, tabák, obilí).

3. **meristémové kultury** – umožní získání ozdravených rostlin (brambory, karafiáty). Z kultur lze získat rostliny prosté bakteriálních, virových i houbových nákaz. Infekce je eliminována už při zakládání sterilní kultury. Následné kontaminaci lze zabránit přidáním antibiotik a antivirotik do média. K ozdravování kultury přispívají i běžné složky živných půd – výrazný efekt mají zvláště fytohormony (např. kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová). Nepřítomnost cévních svazků přispívá k eliminaci infekce, protože chybí hlavní dráha šíření rostlinných patogenů. Virózu můžeme také potlačit vyšší teplotou, která je ještě snášena rostlinnou buňkou, ale pro viry je již letální.
4. **regenerované rostliny** – jejich tvorba umožňuje využití polymorfismu ve šlechtitelském programu a selekce produkčních klonů na úrovni izolované buňky.
5. **fúze protoplastů** – u téhož nebo různého druhu umožňují tvorbu somatických hybridů (buněk nebo celých rostlin) s vlastnostmi epigenetické povahy z jiného druhu (přenos samčí cytoplazmatické sterility, rezistence aj.)
6. **genové inženýrství** – pro zavedení nových vlastností do rostliny.

Mikropropagace

Je druhem vegetativního množení rostlin pomocí tkáňových kultur. Výhodou této metody je mnohem vyšší rychlost než u tradičních metod. Průměrná teoretická výtěžnost meristémových kultur při mikropropagaci je 10^6 rostlin za rok z jednoho původního explantátu. Tato metodika umožňuje i produkci bezvirových rostlin po celý rok bez závislosti na ročním období.

Mikropropagace se používá tam, kde nejsou použitelné jiné metody vegetativního množení, rychlost vegetativního množení je pomalá nebo je makropropagace příliš nákladná. Nevýhodami mikropropagace je vysoká pracnost, která neumožňuje mechanizaci, a relativně ekonomicky nákladné laboratorní vybavení (3).

3.3 Elicitace

Elicitace je proces, založený na signálem indukované expresi genů. Jeho výsledkem je aktivace enzymů nebo vzestup jejich hladin. Elicitace využívá schopnosti rostlin a rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na rozličné stresové podněty řadou obranných reakcí, které vedou ke zvýšené akumulaci sekundárních metabolitů.

Za stresové podněty lze považovat jakoukoliv odchylku životního prostředí od fyziologického standardu. Obranné mechanismy rostlin jsou aktivovány při prvním kontaktu se stresovým podnětem. V tu chvíli je zahájena syntéza tzv. fytoalexinů. Jedná se o nízkomolekulární látky, produkty sekundárního metabolismu, které se u nestresované rostliny nacházejí ve velmi nízkých koncentracích nebo vůbec. Výhodný je jejich lipofilní charakter, který umožňuje přestup přes plazmatickou membránu patogenů. K fytoalexinům řadíme např.: flavonoidy, terpeny, steroidy (50,51).

3.3.1 Elicitory

Elicitory jsou signální látky, které ovlivňují expresi genů, potřebných k syntéze fytoalexinů. Jejich působením se v buňkách infikovaných pletiv krátkodobě aktivují enzymy, které katalyzují tvorbu fytoalexinů. Zmíněné reakce probíhají u intaktních rostlin i v buněčných kulturách (48).

Elicitory jsou rozdělovány na dvě skupiny:

3.3.1.1 Abiotické elicitory

Jsou to chemické a fyzikální vlivy, které rostlinu stresují a vyvolávají tak tvorbu fytoalexinů. Výhodou abiotických elicitorů je schopnost chemické identifikace. Lze je tedy aplikovat v přesně určených množstvích. Většinou se také jedná o cenově dostupné látky (48,52).

Řadíme k nim:

- Soli těžkých kovů
- Detergenty
- Inhibitory látkové výměny (kyselina trichloroctová, 2,4-dinitrofenol)
- Rostlinné ochranné prostředky (pesticidy)
- Fyzikální vlivy (změny pH, UV záření, γ -záření, změny osmotického tlaku)

3.3.1.2 Biotické elicitory

Jedná se o organické sloučeniny nebo přímo organismy, které spouštějí tvorbu fytoalexinů již při nepatrných koncentracích.

Řadíme k nim:

- organické molekuly parazitických mikroorganismů (oligosacharidy, polypeptidy, glykoproteiny)
- celé intaktní patogenní i nepatogenní organismy nebo jejich části (bakterie, kvasinky, mykoplasmata, viry)
- endogenní konstitutivní elicitory – organické molekuly pocházející z buněk napadené rostliny (chitosan, oligogalakturonidy, kyselina salicylová) (48).

3.3.1.3 Mechanismus účinku elicitorů

Na základě dosavadních znalostí se předpokládá, že elicitory indukovaná produkce a akumulace fytoalexinů a jiných stresových metabolitů rostlinných kultur *in vitro* probíhá stejnými mechanismy jako v intaktní rostlině (48). Elicitory obvykle neovlivňují expresi genů (potřebných k obranné reakci) přímo, ale pomocí druhých posílů – G-proteiny, Ca^{2+} -proteiny, proteinkinasy. Ti pak v buňce přenášejí signály pomocí transdukčních signálních cest, což vede k expresi genů a biochemickým změnám.

Předpokládá se, že molekuly biotického elicitoru jsou rozpoznány specifickými receptory v plazmatické membráně. Po obsazení receptoru dojde

k aktivaci G-proteinů, otevření Ca^{2+} -kanálů a rychlému influxu vápenatých iontů do buňky.

Extracelulární vápník je považován za signál, který dovnitř buňky přináší informaci o poranění. Další zdroj Ca^{2+} iontů pochází z intracelulárních organel (mitochondrie, endoplazmatické retikulum). Jednou z cest vstupu Ca^{2+} iontů do cytoplasmy je přes plazmatickou membránu. Změnou membránového potenciálu je aktivován napětově závislý Ca^{2+} -permeabilní kanál, který zvyšuje koncentraci cytosolových Ca^{2+} iontů. Jakmile koncentrace Ca^{2+} iontů v intracelulárním prostoru dosáhne $1\mu\text{M}$, naváže se kalcium na kalmodulin. Tato bílkovina má 4 vazebná místa pro Ca^{2+} ionty a vzniklý komplex ovlivňuje aktivitu některých proteinkináz (52).

Další způsob přenosu signálu je zprostředkován pomocí fosfoinositolového systému. Kdy jsou hydrolýzou lipidů plazmatické membrány generovány dvě signální molekuly – inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol. Tyto látky pak vedou k aktivaci proteinkináz a expresi genů (52).

Velmi častým způsobem přenosu signálu je tvorba superoxidu a jiných aktivních forem kyslíku (hydroxylové radikály, hydrogen peroxidy). Expres genů je ovlivňována i nepřímo, kyslíkové deriváty způsobují peroxidaci membránových lipidů, což vede ke zvýšení syntézy stresových fytohormonů (kyseliny jasmínové) (52).

Abiotické elicitory se neváží na specifické receptory, jejich působení je např. ve spouštění peroxidace lipidů u těžkých kovů. To vede k prudkému nárůstu koncentrace signálně účinných stresových fytohormonů a také ke zvýšené propustnosti plazmatické membrány pro Ca^{2+} ionty. Ionty těžkých kovů aktivují transkripci genů tvorbu fytochelatinů. Jsou to malé peptidy syntetizované z glutathionu, které váží kovy a vznikají tak inaktivní komplexy. Takto se intracelulární těžké kovy detoxikují (63).

3.3.1.4 Podmínky elicítace

Pokud má být v buněčné kultuře indukována tvorba sekundárních metabolitů po přidání elicitorů, musí být vybrány vhodné podmínky pro vzájemnou interakci elicitoru a buněčné kultury:

- stáří kultury
- růstová fáze kultury
- složení živného média
- volba vhodného elicitoru
- optimální koncentrace elicitoru
- doba působení elicitoru na buněčnou kulturu
- volba vhodného rostlinného explantátu pro kultivaci

Pro úspěšnou elicítaci je nejdůležitější podmínkou výběr vhodného elicitoru. Existují případy, kdy působení elicitoru iniciovalo tvorbu látek, které kultura nevytvářela nebo ztratila schopnost tyto látky tvořit. Při zvolení nevhodného elicitoru může naopak dojít ke snížení produkce sekundárních metabolitů.

O podmínkách tvorby a akumulace sekundárních látek v rostlinných buněčných kulturách hovoří následující body:

- tvorba sekundárních metabolitů probíhá pod vlivem elicitoru zejména v buňkách, které jsou na konci růstové fáze
- probíhá jak v suspenzních kulturách, tak v kalusu
- začíná v průběhu několika hodin po působení elicitoru (12-48 hodin)
- sekundární metabolity jsou přítomny v buňkách i v médiu
- proces elicítace je opakovatelný, bez poškození buněk (34)

3.4 Těžké kovy

3.4.1 Minerální výživa

Minerální výživa je pro rostlinu důležitá, protože asimilované ionty (jejich přeměna ve struktury a účast v procesech rostliny) jsou nezbytné ve vývojových procesech.

Kvalitativně odpovídá obsah prvků v rostlině složení kořenového substrátu. Nepřítomnost prvků v půdě nebo v atmosféře znamená i jeho nepřítomnost v rostlině. Důležité je ovšem množství a poměr jednotlivých prvků v rostlině, které se od množství a poměru prvků v půdě nebo živném médiu mohou lišit (52,54,55).

Rostliny využívají minerální výživu jako

- kofaktory enzymů
- posly k přenosu signálů
- substráty v biochemických reakcích
- osmotika

3.4.2 Toxicita těžkých kovů

Ionty těžkých kovů představují problematickou zátěž životního prostředí. Jejich nebezpečnost je založena na pomalé akumulaci v potravních řetězcích, jež může mít za následek vážné poškození většiny organismů. Nejčastějšími zdroji kontaminace jsou doly, hutní a elektrochemický průmysl a rovněž také neřízené nakládání s rizikovými odpady. Do skupiny nejnebezpečnějších patří mj. ionty kadmia, mědi, niklu, kobaltu, zinku a olova.

Uvolňování iontů těžkých kovů do půdního roztoku je způsobeno okyselením půd. Ionty jsou poté snadno přijímány rostlinami přes kořeny, díky nedostatečné selektivitě transportních proteinů.

Základní mechanismy toxicity těžkých kovů:

- vytlačení základních kovových iontů z biomolekul
- produkce reaktivních forem kyslíku autooxidací
- blokování esenciálních funkčních skupin v biomolekulách (reakce byla prokázána u kovů neúčastnících se oxidačně-redukčních dějů – Cd, Hg)

Přesto se rostliny dokáží adaptovat na zvýšený výskyt těžkých kovů. A to způsoby označované jako:

tolerance – ionty těžkých kovů hromadící se v tkáňových buňkách jsou inaktivovány vazbou na nízkomolekulární bílkoviny, mající vysoký podíl cysteinu. Bílkoviny označujeme jako *fytochelatiny* nebo *metalotioneiny*.

rezistence – toxicita iontů je omezena až vyloučena díky tomu, že se rostlina chrání omezením vstupu iontů do buněk, hromaděním iontů ve vakuolách nebo omezením transportu do nadzemní části rostliny.

Rostliny se vyznačují rozdílným stupněm tolerance a rezistence na působení iontů těžkých kovů. Zajímavé jsou tzv. *akumulátory těžkých kovů*, které mají schopnost hromadit kovy ve velkém množství (52,54,55).

3.4.3 Měď

Měď společně se stříbrem a zlatem patří do I.B skupiny periodické soustavy. Čistá měď je načervenalá. V přírodě se vyskytuje v podobě rudy (převážně směs mědi, síry a železa). Ze sulfidových rud se získává složitým způsobem – pražením v peci.

Dále můžeme měď najít ve sloučeninách bronz (Sn, Cu), mosaz (Zn 50%, Cu), konstantan (Ni, Mn, Cu), alpaka (Ni, Zn, Cu) nebo dural (Mn, Cu, Mg, Al) (17,18).

Jednou z vlastností mědi je – *paramagnetismus* – způsobený nespárovanými valenčními elektrony. Projevem je, že kovy jsou vtahovány do magnetického pole.

Měď reaguje s vlhkým vzduchem, pokrývá se zelenou vrstvičkou hydrogenuhličitanů mědi – měděnkou. Dochází zde k redukci Cu na Cu^{2+} , což jsou nejstabilnější sloučeniny (17,18).

Měď je mikroživina, která je esenciální pro aktivitu některých enzymů a je součástí molekul, které hrají klíčovou úlohu při fotosyntetickém transportu elektronů. Vysoké koncentrace jsou však toxické. V důsledku toxicity může v rostlině dojít k nedostatku jiných esenciálních prvků. Měď inhibuje fotosyntetický transport elektronů a taky karboxylační aktivitu enzymů. Vysoké koncentrace mědi mohou poškozovat buněčné stěny a integritu plazmatických membrán, přičemž rostliny ztrácejí schopnost selektivity příjmu. Akumulace mědi v rostlině může snížit obsah Mn a Fe v rostlinných pletivech. Potvrdilo se, že Cu^{2+} ionty mají tendenci vytlačovat Ca^{2+} ionty z výměnných míst a jsou silně vázané v kořeni.

Měď se může v přírodě vyskytovat jak ve vodách sladkovodních, tak i mořských, činností člověka vzniká i voda odpadní a to zejména z průmyslu elektrolytického, stavebního, strojního, vojenského a průmyslu elektrolytického pokovování. Její toxicita je v koncentracích vyšších jak 100 ppm a je označena za největšího znečišťovatele podle US EPA. Podle nařízení vlády č. 61/2003 Sb. je přípustné znečištění pro měď v odpadních vodách v ČR $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

K odstraňování měďnatých iontů se obvykle používají metody elektrolytické, iontově výměnné, adsorpční na aktivním uhlí, srážecí, reverzibilní osmóza nebo extrakční. Ale všechny tyto metody nejsou dostatečně efektivní při nízkých koncentracích. Pro tyto koncentrace se osvědčilo odstraňování měďnatých iontů pomocí fotokatalytického procesu, který využívá jako fotokatalyzátor oxid titaničitý, lignit a jako donor elektronů ethanol (19).

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál, přístroje, pomůcky

4.1.1 Rostlinný materiál

K pokusům v této práci byla použita explantátová kultura, odvozená ze sterilní klíčící rostliny jetele lučního *Trifolium pratense* L., (*Fabaceae*) varieta DO-9. Semena byla získána ze Šlechtitelské stanice Domoradice. Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepače. Elicitace byla provedena u dvouleté kalusové a suspenzní kultury.

4.1.2 Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do váženky, předem vysušené 2 hodiny při 105 °C, byly odváženy asi 2,000 g explantátové kultury. Váženka s obsahem byla zvážena. Ztráta sušením byla vztažena na navážku explantátové kultury a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením 5,43 % je aritmetickým průměrem ze tří stanovení (7).

4.1.3 Chemikálie

6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno

dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno

dusičnan draselný p.a., Lachema, Brno

edetan disodný č., Lachema, Brno

chlorid kobaltnatý p.a., Lachema, Brno

chlorid pyridoxinia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook

chlorid thiaminia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook

chlorid vápenatý p.a., Lachema, Brno

jodid draselný p.a., Lachema, Brno

kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová č., Lachema, Brno

kyselina boritá p.a., Lachema, Brno
kyselina mravenčí bezvodá p.a., Lachema, Brno
kyselina nikotinová č., Lachema, Brno
kyselina octová bezvodá p.a., Lachema, Brno
kyselina octová ledová p.a., Lachema, Brno
kyselina šťavelová č., Lachema, Brno
methanol p.a., Lachema, Brno
molybdenan sodný p.a., Lachema, Brno
myoinositol č., Sigma, St. Louis
sacharosa p.a., Lachema, Brno
síran hořečnatý p.a., Lachema, Brno
síran železnatý p.a., Lachema, Brno
síran zinečnatý p.a., Lachema, Brno
síran manganatý p.a., Lachema, Brno
síran měďnatý p.a., Lachema, Brno

4.1.4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy A 200 S, Sartorius, Göttingen
- Autokláv PS 20 A, Chirana, Brno
- Horkovzdušný sterilizátor HS 31 AM, Chirana, Brno
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, výrobné družstvo Pokrok, Žilina
- Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- Vodní lázeň KL-1, Laboratorní přístroje, Praha
- Třepačka Unimax, 2010, Heidolph
- UV-lampa CAMAG, Muttenz
- Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
- Kapalinový chromatograf Unicam Crystal, Cambridge
- Kolona LiChrosper RP-18 s předkolonkou, Merck, Darmstadt

4.2 Kultivace explantátové kultury

4.2.1 Kultivační nádoby a nástroje

Pro odvození a kultivaci explantátových kultur bylo použito nádobí z varného skla SIAL, které vyhovuje požadavkům pro kultivaci tkáňových kultur a je dostatečně odolné vůči rozdílům teplot, chemikáliím i vodě. Kalusové kultury byly kultivovány na můstcích z filtračního papíru ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách. Suspenzní kultury byly kultivovány v 250 ml varných baňkách ze skla SIAL. Používané kovové pinzety byly opláchnuty 96 % ethanolem a zabaleny do hliníkové fólie. Poté byly sterilizovány 2 hodiny při 200°C v horkovzdušném sterilizátoru.

4.2.2 Příprava živného média

Pro kultivaci tkáňových kultur bylo použito živné médium **podle Gamborga (B5)** s následujícím složením (31):

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

Jako stimulátor růstu byla použita kombinace kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové (2 mg.l⁻¹) s 6-benzylaminopurinem (2 mg.l⁻¹) (35).

Jednotlivé substance, navážené na analytických vahách nebo v případě nízkých koncentrací, pipetované ze zásobních roztoků, byly rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1000ml a doplněné destilovanou vodou po značku. Až poté byly přidány růstové stimulátory. Nakonec se živné médium rozdělilo po 30 ml do Erlenmeyerových baněk s papírovými můstky. Baňky byly uzavřeny hliníkovou folií a sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

4.2.3 Odvození kalusové a suspenzní kultury

Kalusová kultura byla odvozena ze sterilní klíčící rostliny *Trifolium pratense* L. (*Fabaceae*). Semena byla nejprve sterilizována ponořením na 3 minuty do 70 % lihu, dále ponořením na 2 minuty do 10 % vodného roztoku 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 100 ml Erlenmeyerových baněk obsahujících 30,0 ml sterilního živného média podle Gamborga (B5). Po týdnu kultivace při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma byly získány sterilní klíčící rostliny.

Ze sterilní klíčící rostliny *Trifolium pratense* L. (*Fabaceae*) byla kalusová kultura odvozena pasážováním na B5 médiu (subkultivační interval 21 dní). K médiu byly přidávány růstové stimulátory kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2 mg.l⁻¹) a 6-benzylaminopurin (2 mg.l⁻¹).

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

4.2.4 Podmínky pasážování a kultivace

Pasážování kultur bylo provedeno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen nejméně minimálně 1 hodinu germicidní zářivkou. Po celý průběh práce byly zachovány přísně aseptické podmínky, bylo používáno sterilní sklo a nástroje.

4.3 Elicitace

4.3.1 Příprava roztoků elicitoru

K pokusům byly připraveny čtyři vodné roztoky síranu měďnatého o různých koncentracích:

- ★ Koncentrace 100 μM
- ★ Koncentrace 10 μM
- ★ Koncentrace 1 μM
- ★ Koncentrace 0,1 μM

Roztoky o nižších koncentracích byly připraveny z nejsilnější koncentrace (100 μM) naředěním destilovanou vodou. Všechny roztoky elicitoru byly sterilizovány v autoklávu 15 minut při 121 °C a tlaku 0,1 MPa. Připravené roztoky byly uchovávány v lednici.

4.3.2 Elicitace a odběr kultur

Elicitace kalusové a suspenzí kultury byla prováděna rozdílnými koncentracemi síranu měďnatého za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu ve 21. dni kultivace.

Při elicítaci se postupovalo tak, že ke kulturám byl vždy napipetován 1,00 ml elicitoru o příslušné koncentraci. Byl zde také soubor baněk bez elicitoru, které sloužil jako kultura kontrolní. Poté byly všechny baňky pečlivě uzavřeny hliníkovou fólií a dále kultivovány za již uvedených podmínek.

Stejný postup byl veden i u suspenzní kultury.

Elicitované kultury byly odebrány po 6, 24, 48 a 168 hodinách působení elicitoru. Odběry kontrolních vzorků byly provedeny po 6 a 168 hodinách. U kalusových kultur byly kalusy vyjmuty pinzetou na filtrační papír a sušeny při laboratorní teplotě. Buňky suspenzních kultur byly odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a sušeny při laboratorní teplotě.

U každého vzorku bylo provedeno stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2005 a statistické vyhodnocení výsledků.

4.4 Stanovení obsahu flavonoidů

4.4.1 Princip stanovení

Obsah flavonoidů se stanoví spektrofotometricky pro reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé (7).

4.4.2 Postup stanovení

Základní roztok

0,400 g práškované 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 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid (C₂₁H₂₀O₁₂), se vypočítá podle vzorce:

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

v němž značí:

A - absorbanci roztoku v maximu při 410 nm,

M - hmotnost zkoušené kultury v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

4.5 Stanovení obsahu isoflavonoidů

Methanolové extrakty suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. varieta DO-9 byly zkoušeny na přítomnost isoflavonoidů. Stanovení daidzeinu, genistinu, genisteinu, formononetinu bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí (59).

4.5.1 Princip stanovení

Kapalinová chromatografie je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž mobilní fází je kapalina, která prostupuje stacionární fází naplněnou do kolony. Kapalinová chromatografie je založena zejména na mechanismu adsorpce, rozdělování, výměny iontů, vylučování nebo stereochemických interakcích (7).

4.5.2 Postup stanovení

Příprava vzorku

Asi 0,5000 g upráškované kultury se ve 100ml baňce smíchá s 15 ml methanolu 80 % a extrahuje se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes malý chomáček vaty do 25ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku kultury ve 100ml baňce, přidá se 15 ml methanolu 80 % a extrahuje se ještě jednou 20 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky a spojené extrakty se zředí methanolem 80 % na 25,0 ml. Roztok se převede přes mikrofiltr do vialek a analyzuje se metodou HPLC. Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

Parametry HPLC analýzy

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

Kolona: kolona LiChrospher R-18 (250 x 4 mm, velikost částic 5 μm)
s ochrannou předkolonkou

Objem nástřiku: 20 μl

Mobilní fáze: fáze A: methanolický roztok kyseliny o-fosforečné (0,15 % m/v)

fáze B: vodný roztok kyseliny o-fosforečné (0,15 % m/v)

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

Standardy: genistin, genistein, daidzein, formononetin

Průtok: 1,1 ml/min

Detekce: DAD Jasco MD-2015, $\lambda = 200 - 650$ nm, vyhodnoceno při 260 nm

4.6 Statistické vyhodnocení

Vyhodnocení naměřených hodnot obsahu flavonoidů v kulturách *Trifolium pratense* L. bylo statisticky provedeno na základě T-testu, pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ (33).

aritmetický průměr

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

směrodatná odchylka

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

n rozsah souboru

x_i naměřené hodnoty

\bar{x} aritmetický průměr

s směrodatná odchylka

T – test

T – test je test významnosti rozdílu dvou průměrů, vypočítaný dle vzorce:

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

t.....testovací kritérium

\bar{x}_1aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x}_2aritmetický průměr pokusného souboru

n_1počet členů kontrolního souboru

n_2počet členů pokusného souboru

s_1směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2směrodatná odchylka pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t rozdělení se stupněm volnosti (**v**), vypočítaného dle vzorce: **v = n₁ + n₂ – 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**) (33).

Pro dvě paralelní stanovení obsahu platí, že počet členů souboru kontrolního a pokusného souboru je shodný **n₁ = n₂ = 2** a počet stupňů volnosti **v = 3**.

Kritická hodnota **t(v)_p** pro **p(0,05) = 3,182**.

5 Výsledky

5.1 Tabulky

Tabulka 1 Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicitované síranem měďnatým

koncentrace elictoru (μ M)	čas odběru (hod)	elicitovaná kultura		kontrola		T- test
		průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
0,1	6	0,0744	0,0061	0,1807	0,0007	19,0062
	24	0,0876	0,0028	0,1807	0,0007	35,6876
	48	0,1338	0,0261	0,1807	0,0007	1,9680
	168	0,1490	0,0084	0,1036	0,0025	5,1802
1	6	0,0820	0,0018	0,1807	0,0007	57,2501
	24	0,1218	0,0037	0,1807	0,0007	17,2339
	48	0,1082	0,0010	0,1807	0,0007	68,9521
	168	0,1438	0,0087	0,1036	0,0025	4,9279
10	6	0,1780	0,0069	0,1807	0,0007	0,3893
	24	0,2972	0,0073	0,1807	0,0007	15,8860
	48	0,1276	0,0042	0,1807	0,0007	12,4708
	168	0,2105	0,0015	0,1036	0,0025	36,6664
100	6	0,2410	0,0043	0,1807	0,0007	13,8411
	24	0,1074	0,0007	0,1807	0,0007	74,0442
	48	0,1062	0,0031	0,1807	0,0007	23,4420
	168	0,1359	0,0018	0,1036	0,0025	10,4850

Zvýrazněné hodnoty obsahu flavonoidů jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly; $p = 0,05$.

Tabulka 2 **Produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. elicítované síranem měďnatým**

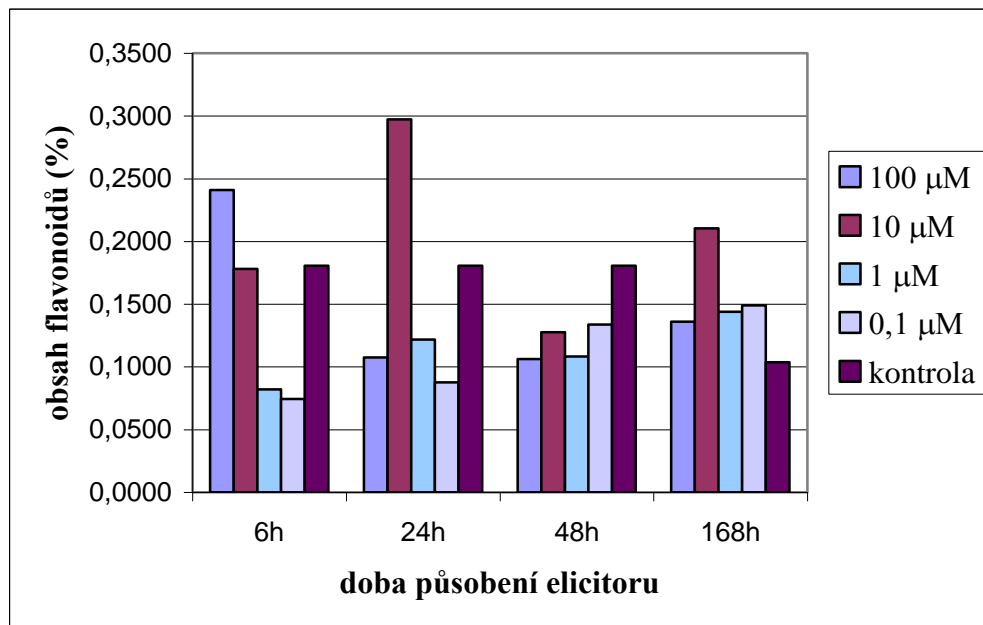
koncentrace elicitoru (μM)	čas odběru (hod)	elicítovaná kultura	kontrola
		průměrný obsah flavonoidů (%)	průměrný obsah flavonoidů (%)
0,1	6	0,0476	0,0680
	24	0,0416	0,0680
	48	0,0156	0,0680
	168	0,0302	0,0579
1	6	0,0303	0,0680
	24	0,0463	0,0680
	48	0,0579	0,0680
	168	0,0408	0,0579
10	6	0,0576	0,0680
	24	0,1196	0,0680
	48	0,0632	0,0680
	168	0,0184	0,0579
100	6	0,0954	0,0680
	24	0,0556	0,0680
	48	0,0352	0,0680
	168	0,0972	0,0579

Tabulka 3 Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicítované síranem měďnatým

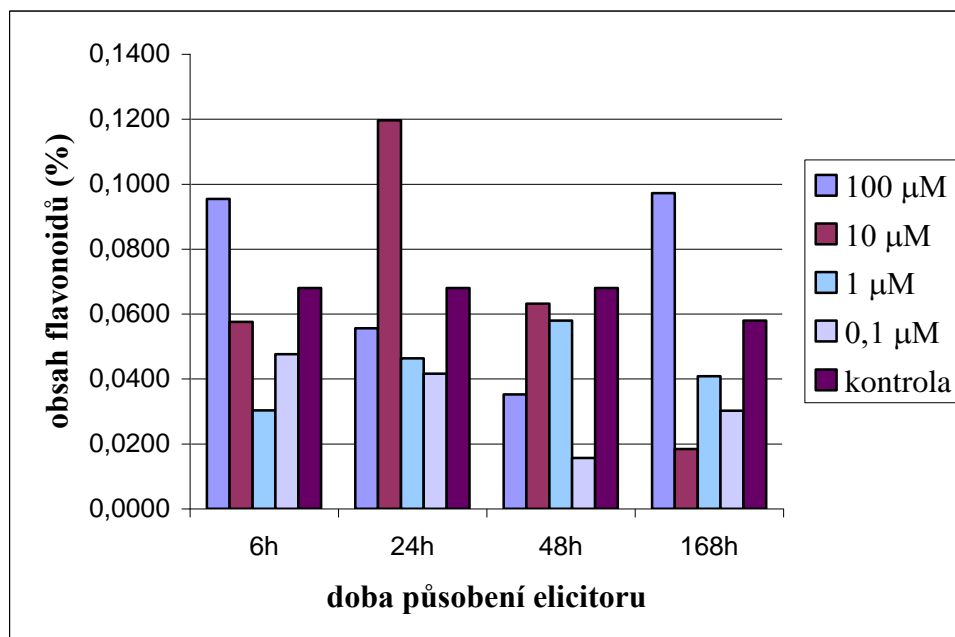
koncentrace elicitoru (μM)	čas odběru (hod)	obsah isoflavonoidů (%)			
		genistin	daidzein	genistein	formononetin
kontrola	6	0,22	0,01	0,01	-
	24	0,22	0,01	0,01	-
	48	0,22	0,01	0,01	-
	168	0,17	0,01	0,01	-
0,1	6	0,11	0,02	0,01	0,01
	24	0,08	0,01	0,01	0,01
	48	0,08	0,01	0,01	0,01
	168	0,25	0,02	0,02	0,01
1	6	0,08	0,02	0,01	0,01
	24	0,08	0,01	0,01	0,01
	48	0,11	0,01	0,01	0,01
	168	0,07	0,02	0,02	0,01
10	6	0,16	0,03	0,02	0,01
	24	0,36	0,03	0,01	0,01
	48	0,36	0,04	0,01	0,02
	168	0,38	0,04	0,02	0,02
100	6	0,19	0,02	-	-
	24	0,22	0,02	-	-
	48	0,25	0,03	-	-
	168	0,36	0,03	-	-

5.2 Grafy

Graf 1 Elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L.



Graf 2 Elicitace kalusové kultury *Trifolium pratense* L.



6 Diskuse

Součástí lidské výživy jsou vedle tradičních potravin i potravní doplňky. Mezi nimi se často objevují přípravky, které obsahují rostliny a extrakty z rostlin. Ve farmacii se využívají fytofarmaka, obsahující jako účinné složky extrakty z nadzemní nebo podzemní části rostlin. Účinné látky z *Trifolium pratense* flavonoidy, isoflavonoidy působí v organismu mnoha způsoby např. mají protizánětlivou, antialergickou a estrogenní aktivitu, dále antitrombotické nebo vasoprotektivní účinky.

Sekundární metabolity hrají významnou roli při adaptaci rostlin na podmínky prostředí. V řadě případů je při výrobě léčiv výhodné vycházet přímo z rostlinného materiálu. Jindy jsou dalším možným zdrojem léčiv kultury rostlinných explantátů. Problémem *in vitro* kultur je velmi nízká nebo nulová koncentrace požadovaných metabolitů. A to v souvislosti se snížením nebo zablokováním enzymové aktivity a metabolismu. Efektivní způsob pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních je využití metaloelicitace (56).

Experimenty provedené v minulých letech prokázaly, že elicitace solemi těžkých kovů zvyšuje produkci sekundárních látek v rostlinných tkáních. Příkladem je kultura *Ononis arvensis in vitro*, kdy bylo pozorováno zvýšení produkce flavonoidů po aplikaci NiCl_2 , CoCl_2 , CrCl_3 , CuSO_4 a CdCl_2 , $\text{Hg}(\text{Cl})_2$ (56). Obsah isoflavonoidů byl zjišťován v explantátové kultuře *Lupinus albus* po elicitaci roztokem chloridu měďnatého a chitosanu. Maximální zvýšení produkce nastalo po přidání $300 \mu\text{M}$ roztoku CuCl_2 (20).

Jiným příkladem může být aplikace síranu měďnatého ke tkáňové kultuře *Bupleurum sp.* produkující saponiny. Tvorbu pisatinu, fytoalexinu rostlin hrachu, je možné vyvolat kromě biotických elicitorů i roztokem HgCl_2 , CuCl_2 a FeCl_3 (60). Obdobně měďnaté ionty stimulují tvorbu šikoninu v kultuře *Lithospermum erythrorhizon* (61).

Cílem této práce bylo sledovat vliv čtyř koncentrací síranu měďnatého (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) na produkci flavonoidů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L. Sledované doby působení elicitoru (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dnů po aplikaci těžkých kovů (57,58). Vzorky kontrolní kultury byly odebírány po 6 a 168 hodinách, neboť produkce sekundárních metabolitů se v tak krátkých časových intervalech příliš nemění.

Z výsledků elicítace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) síranem měďnatým (tab.1, graf 1) je zřejmé, že u dvou nejnižších koncentrací bylo dosaženo pozitivního elicitačního účinku až po 168 hodinách působení. S rostoucí koncentrací elicitoru se snižovala potřebná doba aplikace elicitoru. Maximální produkci flavonoidů (0,297 %) vykazovala suspenzní kultura po 24 hodinách působení síranu měďnatého o koncentraci 10 μ M, což představuje statisticky významné zvýšení o 65 % v porovnání s kontrolou. Po 168 hodinové aplikaci vyvolala tato koncentrace nejvyšší zvýšení produkce o 103 %. Nejsilnější koncentrace 100 μ M měla nejlepší elicitační účinek již po 6 hodinách, pak se obsah flavonoidů výrazně snížil (z 0,24 % na 0,10 %).

U kalusové kultury *Trifolium pratense* L. byla také zjištěna maximální koncentrace flavonoidů (0,120 %) po 24 hodinách působení síranu měďnatého o koncentraci 10 μ M, kdy došlo ke zvýšení produkce o 76 % oproti kontrole. Pozitivní elicitační účinek prokázala také 6hodinová a 168hodinová aplikace nejsilnější koncentrace 100 μ M (0,095 % a 0,097 %). U všech zbylých vzorků se projevil negativní vliv působení elicitoru.

Porovnáme-li produkci flavonoidů v elicítované suspenzní a kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9), je zřejmé, že maximální obsah flavonoidů vyvolala v obou případech 24hodinová aplikace síranu měďnatého o koncentraci 10 μ M. Dále je zřejmé, že vliv abiotické elicítace síranem měďnatým na produkci flavonoidů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L. se projevil výrazněji u suspenzní kultury. Buňky suspenzní kultury totiž snadněji přicházejí

do přímého kontaktu s živným médiem a tím je usnadněn přístup živin, elicitoru i výměna dýchacích plynů.

V suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicítované síranem měďnatým byla metodou HPLC sledována také produkce isoflavonoidů. U kontrolní kultury varieta DO-9 byly zjištěny isoflavonoidy genistein, genistin a daidzein (tab.3).

Největší elicitační účinek měla koncentrace 10 μM a zejména 168hodinová aplikace, která stimulovala produkci všech těchto isoflavonoidů. Maximální obsah isoflavonoidu (0,38 %) a zvýšení produkce v porovnání s kontrolou o 124 % bylo zjištěno u genistinu. Velmi nízký obsah daidzeinu a genisteinu v kontrolní kultuře zvýšila tato elicítace o 300 % a 100 %, u formononetinu došlo dokonce i indukci (v kontrolní kultuře totiž zjištěn nebyl).

Z výsledků je zřejmé, že v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. je produkce sledovaných sekundárních metabolitů nízká. Jedním z důvodů může být to, že se jedná o mladou, rychle rostoucí suspenzní kulturu a ta většinou akumuluje jen malé množství metabolitů. Produkci však může zvýšit vliv určitého stresu – např. snížení koncentrace živin v roztoku, vynechání růstového regulátoru nebo aplikace elicitoru do média, což se v případě elicítace měďnatými ionty u explantátové kultury *Trifolium pratense* potvrdilo.

Elicítace je tedy jedním z efektivních způsobů, jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních. Jedná se o ekonomicky výhodný způsob, který má stále větší význam a bude mu věnována další pozornost.

7 Závěr

Dosažené výsledky lze shrnout do následujících bodů:

1. Nejvyšší produkce flavonoidů (0,297 %) v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. byla zjištěna po 24 hodinách abiotické elicitace roztokem síranu měďnatého o koncentraci 10 μM . V porovnání s kontrolní kulturou došlo ke zvýšení produkce o 65 %.
2. V kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. bylo taktéž dosaženo nejvyšší produkce flavonoidů (0,120 %) po 24 hodinách abiotické elicitace roztokem síranu měďnatého o koncentraci 10 μM . V porovnání s kontrolní kulturou došlo ke zvýšení produkce o 76 %.
3. Výsledky potvrzují, že abiotická elicitace síranem měďnatým více stimuluje produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. než v kultuře kalusové, neboť všechny sledované koncentrace elicitoru zvýšily produkci v porovnání s kontrolní kulturou.
4. Sledovaná abiotická elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. zvýšila také produkci isoflavonoidů. Maximální obsah byl zjištěn u genistinu (0,38 %) po 168 hodinové aplikaci koncentrace 10 μM , což představuje zvýšení produkce v porovnání s kontrolní kulturou o 124 %.

8 Seznam literatury

1. Jahodář, L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1995, s. 33-45
2. Hubík, J., Dušek, J., Řezáčová, A., Štarhová, H.: Obecná farmakognosie II, SPN, Praha 1989, s. 31-34
3. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1992, s. 84-97
4. Šnajdrová, J.: Explantátová kultura *Trifolium pratense* L., diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, 2006
5. Šostý, R.: Abiotická elicitace explantátové kultury *Rheum palmatum* L., diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, 2006
6. Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1995, s. 13-21, 50-95
7. Kolektiv autorů: Český lékopis 2005, Grada, Praha 2005, s. 161, 162, 1368
8. Korbelař, J., Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha 1981, s. 178
9. Slavík, B. et al.: Květena České republiky, Academia, Praha 1995, s. 474
10. Kresánek, J., Krejča, J.: Atlas léčivých rostlin a lesných plodů, Osveta 1982, s. 192, 193
11. <http://rostliny.prirodou.cz>, 27.2.2007
12. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K69.php>, 27.2.2007
13. <http://botanika.borec.cz>, 18.2.2007
14. Pilát, A., Ušák, O.: Atlas rostlin, SPN, Praha 1964, s. 108
15. Gran, J., Jung, R., Münker, B.: Bobulovité užitkové a léčivé rostliny, Ikar, Praha 1996, s. 102
16. <http://www.af.mendelu.cz/external/prezentace/picniny/uctext>, 18.2.2007
17. Vacík, J. et al.: Přehled středoškolské chemie, SPN, Praha 1996, s. 148-151, 209-218
18. Lory, J. et al.: Larousse encyklopedie pro mládež, Librairie Larousse, Paříž 1984, s. 739
19. http://www.vscht.cz-chem/listy-docs-full-2006_08_709-722.pdf, 20.2.2007
20. Gangon, R., Ibrahim, R. K.: Phytochemistry **44**, 1463 (1997)

21. Zand, R. S. R., Jenkins, D. J. A., Diamandis, E. P.: Clin. Chim. Acta **213**, 312 (2001)
22. <http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/texty/flavon.htm>, 27.2.2007
23. <http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html>, 27.2.2007
24. <http://faf.vfu.cz/html/txts/isoflav/biolakt.html>, 27.2.2007
25. <http://edukafarm.cz/clanek.php?id=618>, 1.3.2007
26. <http://edukafarm.cz/clanek.php?id=583>, 1.3.2007
27. Adlelercreutz, H., Mazur, W.: Ann. Med. **95**, 29 (1997)
28. Kaufman, P. B. et al.: J. Altern. Complem. Med **7**, 3 (1997)
29. <http://old.af.mendelu.cz/mendlnet2003/obsahy/fyto/petrek.pdf>, 27.2.2007
30. Sepehr, M. F., Ghornbanli, M.: Plant Cell Tis. Org. **68**, 171 (2002)
31. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: Exp. Cell Res. **50**, 151 (1968)
32. Mayer, A. M.: Phytochemistry **22**, 1329 (1983)
33. Klemera, P., Klemmerová, V.: Základy aplikované statistiky pro studující farmacie, Karolinum, Praha 1993, s. 30, 80
34. Dušek, J. et al.: Čes. Slov. Farm. **45**, 204 (1996)
35. Kašparová, M. et al.: Čes. Slov. Farm. **55**, 44 (2006)
36. Ziv, M., Halevy, A. M.: Hort. Sci. **18**, 434 (1983)
37. Novák, F. J.: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin, Academia, Praha 1990, s. 5-57
38. Kamenická, A., Rypák, M.: Explantáty v rozmnožování dřevín, Veda, Bratislava 1989, s. 42-45
39. Landa, Z. et al.: Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění, SPN, Praha 1980, s. 7-45
40. Jain, S. C., Purohit, M.: Herba Pol. **31**, 115 (1985)
41. Bond, J. E., Webb, K. J.: Plant Sci. **61**, 119 (1989)
42. Poerba, Y. S.: Plant Physiol. **57**, 5399 (1997)
43. Wang, H., Holl, F. B.: Plant Sci. **55**, 159 (1988)
44. Beach, K. H., Smith, R. R.: Plant Sci. Lett. **16**, 231 (1979)
45. Mizuhiro, M. et al: Plant Sci. **160**, 1221 (2001)
46. Pederson, G. A.: Plant Sci. **45**, 101 (1986)
47. Matkowski, A. J.: Plant Physiol. **161**, 343 (2004)
48. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie **3**, 188 (1989)
49. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie **5**, 453 (1989)

50. Rokem, J. S., Schwarzberg, J., Goldberg, I.: *Plant Cell Rep.* **159**, 3 (1984)
51. Cline, S. D., Coscia, E. J.: *Plant Physiol.* **161**, 86 (1988)
52. Procházka, S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha 1998, s. 89-92, 110-116, 424
53. Marvani, E.: *Nat. Prod. Sci.* **3**, 75 (1997)
54. Kincl, M., Causy, L.: *Základy fyziologie rostlin*, SPN, Praha 1977, s. 103-106
55. Pastýrik, L. et al.: *Fyziológia rastlín*, SPN, Bratislava 1979, s. 138
56. Tůmová, L. et al.: *Čes. slov. Farm.* **55**, 186 (2006)
57. Tůmová, L., Blažková, R.: *Čes. slov. Farm.* **51**, 44 (2002)
58. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. Slov. Farm.* **52**, 248 (2003)
59. Rijke, E. et al.: *Anal. Chim. Acta* **468**, 3 (2002)
60. Kováčik, A.: *Genetika rostlin*, SZN, Praha 1983, s. 425
61. Heinstejn, P.: *J. Nat. Prod.* **48**, 1 (1985)
62. Hilton, M. G., Rhodes, M. J. C.: *Planta Med.* **59**, 340 (1993)
63. Kneer, R., Zenk, M. H.: *Phytochemistry* **44**, 69 (1997)