

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium sekundárních metabolitů v rostlinných
explantátových kulturách I**

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

Pověřen vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Hradec Králové, září 2018

Adriana Blahušová

Úvodem své diplomové práce bych ráda poděkovala PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení v celém průběhu jejího zpracování. Zároveň děkuji za cenné rady, připomínky, ochotu a poskytnutí odborné literatury.

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

Adriana Blahušová

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE	2
3	TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1	Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L., <i>Fabaceae</i>)	3
3.1.1	Výskyt rostliny	3
3.1.2	Botanický popis rostliny	3
3.1.3	Odrůdy	5
3.1.4	Sběr a úprava drogy	5
3.1.5	Použití	5
3.1.6	Obsahové látky	6
3.1.6.1	Flavonoidy	6
3.1.6.2	Isoflavonoidy	8
3.2	Explantátové kultury rostlin	11
3.2.1	Obecná charakteristika	11
3.2.2	Základní pojmy	11
3.2.3	Vlastnosti kultur rostlinných explantátů	13
3.2.4	Odvození a udržování kultury	14
3.2.5	Buněčné suspenzní kultury	15
3.2.6	Fáze růstu kultury	15
3.2.7	Kultivační podmínky	17
3.2.7.1	Živná média	17
3.2.7.2	Fyzikální podmínky	19
3.2.8	Biotechnologické využití rostlinných explantátů	20
3.2.8.1	Produkce sekundárních metabolitů	20
3.3	Elicitace	22
3.3.1	Obranné reakce rostlin	22
3.3.2	Fytoalexiny	23
3.3.3	Elicitory	23
3.3.4	Mechanismus účinku elicitoru	24
3.3.5	Podmínky elicitace	26
3.3.6	Chitosan	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Použitý materiál, přístroje, pomůcky	29
4.1.1	Rostlinný materiál	29

4.1.2	Chemikálie	29
4.1.3	Přístroje a pomůcky	30
4.2	Kultivace explantátové kultury	31
4.2.1	Kultivační nádoby a nástroje	31
4.2.2	Příprava živného média	31
4.2.3	Pasážování a kultivace	32
4.3	Elicitace	33
4.3.1	Příprava roztoků elicitoru	33
4.3.2	Elicitace a odběr kultur	33
4.4	Stanovení obsahu flavonoidů	34
4.4.1	Princip stanovení	34
4.4.2	Postup stanovení	34
4.5	Statistické zpracování výsledků	36
5	VÝSLEDKY	38
5.1	Tabulky	38
5.2	Grafy	41
6	DISKUZE	44
7	ZÁVĚR	49
8	POUŽITÁ LITERATURA	50
9	ABSTRAKT	55
10	ABSTRACT	56

Seznam obrázků

Obr. 1 Jetel luční.....	4
Obr. 2 Struktura flavanu, isoflavanu a neoflavanu.....	6
Obr. 3 Struktura kvercetinu a apigeninu.....	7
Obr. 4 Struktura daidzeinu a daidzinu.....	8
Obr. 5 Schématické znázornění hlavních větví fenylypropanoidové dráhy.....	9
Obr. 6 Odvození explantátové kultury z rostliny.....	14
Obr. 7 Růstová křivka.....	16
Obr. 8 Schématické znázornění signální dráhy vedoucí k produkci sekundárních metabolitů rostlin.....	25
Obr. 9 Deacetylace chitinu.....	27

Seznam tabulek

Tab. 1 Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> L. (varieta Sprint) elicitované roztokem chitosanu.....	38
Tab. 2 Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> L. (varieta Tempus) elicitované roztokem chitosanu.....	39
Tab. 3 Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> L. (varieta DO-8) elicitované roztokem chitosanu.....	40

Seznam grafů

Graf 1 Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> L. (varieta Sprint) elicitované roztokem chitosanu.....	41
Graf 2 Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> L. (varieta Tempus) elicitované roztokem chitosanu.....	42
Graf 3 Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře <i>Trifolium pratense</i> L. (varieta DO-8) elicitované roztokem chitosanu.....	43

1 ÚVOD

Potenciál rostlinných metabolitů léčit lidské choroby je historicky známou a potvrzenou skutečností. Dokonce dnes, v postgenomové době, v době proteomiky a kombinatorní chemie, se rozrůstá zájem o tento zdroj nových biologicky aktivních „malých“ molekul. Odhaduje se, že asi 30 000 známých přírodních produktů je z více než 80 % rostlinného původu a asi třetina vyráběných léčivých přípravků obsahuje biogenní látky rostlinného původu nebo z nich získané deriváty. [1, 2]

Rostliny jsou bohatým zdrojem sekundárních metabolitů, které nacházejí široké uplatnění v medicíně, potravinářství a kosmetice. U mnoha přírodních látek není ekonomicky schůdná chemická syntéza, a musí proto být získávány izolací z volně rostoucích nebo pěstovaných rostlin. Tento způsob má však svá omezení, jako jsou např. sezónnost, závislost na podmínkách prostředí, nebo choroby a škůdci. Slibnou alternativu představují rostlinné explantátové kultury. Existuje mnoho faktorů, jež mohou vést ke zvýšení produkce, např. složení kultivačního média, typ a koncentrace růstových regulátorů, prekurzory, světelné podmínky, teplota, imobilizace, elicitace. [3]

Spektrum obsahových látek v jeteli lučním (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) je poměrně široké. Zahrnuje třísloviny, saponiny, organické kyseliny, barviva, silici, aj. Z hlediska možného terapeutického využití jsou nejdůležitější isoflavonoidy a flavonoidy. Jsou řazeny k nejvýznamnějším fytoestrogenům. Vzhledem k tomu, že až na výjimky je charakteristickým problémem kultivace rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* nízká produkce sekundárních metabolitů těmito kulturami, jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšené produkce sekundárních látek, je metoda elicitace. Ta je založena na faktu, že akumulace mnoha sekundárních látek v rostlinách i explantátových kulturách je součástí jejich obranné reakce vůči působení stresových vlivů - elicitorů. [2-5]

V této diplomové práci je zkoumán vliv elicitoru chitosanu na produkci sekundárních metabolitů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L.

2 CÍL PRÁCE

1. Seznámení se s metodikou kultivace a elicitace rostlinných explantátových kultur *in vitro*.
2. Sledování vlivu působení čtyř koncentrací roztoku chitosanu na produkci sekundárních metabolitů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint, Tempus a DO-8).

3 TEORETICKÁ ČÁST

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

3.1.1 Výskyt rostliny

Trifolium pratense L., je rostlina značně proměnlivá, která roste z roviny až do hor skoro v celé Evropě a v západní Asii, kde zasahuje na východ až k Altaji, Bajkalskému jezeru a do Kašmíru. V severní Africe roste v Alžíru. V Severní a Jižní Americe a na Novém Zélandu roste jen zplaněle. V některých pohořích střední a jižní Evropy a na mořských pobřežích tvoří morfologicky diferencované rasy, hodnocené obvykle jako subspecies nebo variety. [6, 7]

3.1.2 Botanický popis rostliny

Jetel luční je vytrvalá, proměnlivá, více či méně bělavě chlupatá bylina s mohutným, velmi dlouhým křovitým kořenem, který sahá i přes 60 cm hluboko do půdy, a početnými vedlejšími kořeny. Rostlinu tvoří listová růžice, z paždí přízemních listů vyrůstají vzpřímené, až 50 cm vysoké lodyhy o 3-5 člancích. Ty jsou často krátce větvené, rýhované až hranaté, poněkud smáčklé, chlupaté a často do červena zbarvené. Trojčetné listy jsou dlouze stopkaté, horní stonkové listy téměř přisedlé. Lístky jsou krátce stopkaté, obvejčité, podlouhle kopinaté až téměř okrouhlé, na obou stranách zaokrouhlené nebo na konci slabě vykrojené, na spodu chlupaté, na svrchní straně často lysé, svítivě zelené se světle hnědými nebo červenohnědými skvrnami, na okraji brvité. Palisty trojúhelníkovité, končící tenkou ostrou špičkou, horní široce s řapíkem srostlé. Karmínově až masově červené, vzácně žlutavé nebo bílé květy jsou uspořádány ve vícekvětvých, kulovitých nebo vejčitých hlávkách. Kalich trubkovitě zvonovitý, často červeně zbarvený, desetižilný, přitiskle chlupatý, spodní zoubek zřetelně delší. Korunní lístky jsou na bázi s tyčinkami srostlé v trubku obsahující nektar. Plodem je vejčitý lusk se ztloustlou špičkou, tence blanitý, jednosemenný.

[6-8]



Trifolium pratense L.

Obr. 1 Jetel luční [9]

3.1.3 Odrůdy

Tento druh je mimořádně proměnlivý ve vzrůstu, velikosti i v odění lodyh a palistů podpůrných listů. V České republice se nachází tři poddruhy, které bývají někdy hodnoceny jako odrůdy.

Patří sem:

- *Trifolium pratense* subsp. *pratense* (jetel luční pravý) - vytrvalá bylina, léčivka. Významná pro obsah glykosidů, silic, tříslovin, organických kyselin a dalších látek. Obdobné obsahové látky mají i květenství subsp. *sativum*.
- *Trifolium pratense* subsp. *sativum* (jetel luční setý) - obvykle dvou až tří letá rostlina patřící mezi nejvýznamnější pícniny. Výrazně zlepšuje kvalitu půdy.
- *Trifolium pratense* subsp. *americanum* (jetel luční americký) - vytrvalá rostlina, k nám dovezena v 80. letech 19. století, ale od pěstování později upuštěno. [7]

3.1.4 Sběr a úprava drogy

Rostlina kvete od května do září, mnohdy až do pozdního podzimu. Jako droga se používají nerozpadlé hlávky - *Trifolii pratensis flos* (není uvedena v lékopise). Sbírají se v počátku květu. Překvetlé jsou bezcenné, při sušení hnědnou. Květy můžeme jeden den vystavit v jednoduché vrstvě přímému slunci a pak dosušit ve stínu a v průvanu. Přehrabáváním se hlávky snadno rozpadají a dávají bezcennou drť. Správně usušená droga zachová 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 chráníme při skladování před světlem a vlhkem, rychle podléhá zkáze. [4, 10]

3.1.5 Použití

V lidovém léčitelství se droga uplatňuje nejčastěji ve formě nálevu (2 čajové lžičky drogy na šálek vody) při průjmech, bronchitidě, revmatismu, při oteklých lymfatických žlázách i při cukrovce. Zevně se užívá jako kožní desinficiens na ekzémy a hnisavé rány, do obkladů při příušnicích, také při zánětech dutiny ústní.

Dnes se upotřebuje jako chuťové a vonné korigens do čajových směsí (aromatikum). Kromě toho je také součástí potravních doplňků pro zmírnění klimakterických obtíží a má nezanedbatelný význam při prevenci osteoporózy, kardiovaskulárních a nádorových onemocnění.

Kvůli obsahu fytoestrogenů naopak není vhodný pro pacienty, kteří prodělali endometriózu, rakovinu prsu, vaječníků nebo dělohy. [4, 10, 11]

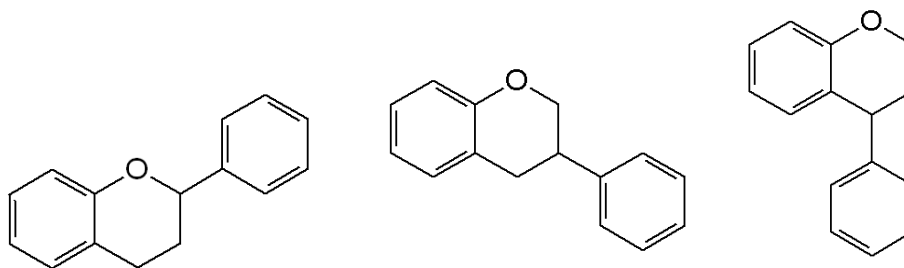
3.1.6 Obsahové látky

Jak již bylo zmíněno, spektrum obsahových látek v jeteli lučním je široké. Vedle tríslovin, saponinů, organických kyselin (salicylové, šťavelové, kumarové či hroznové), barviv a silice zahrnuje také salicyláty, bílkoviny, vitaminy (A, C, B-komplex), vápník, hořčík, železo. Nejvýznamnějšími látkami jsou však flavonoidy a isoflavonoidy. [4]

3.1.6.1 Flavonoidy

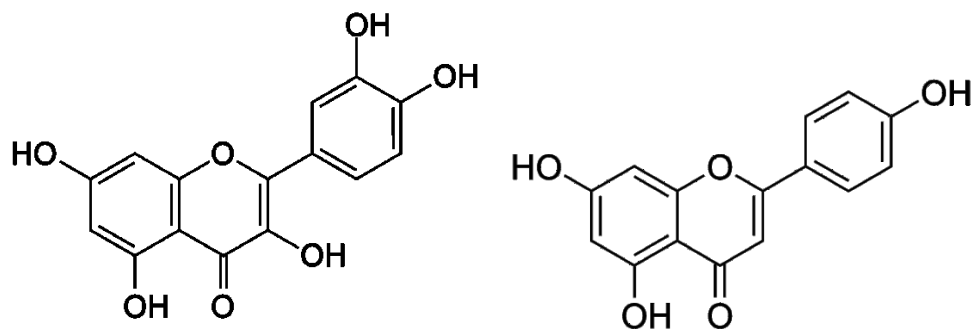
Patří mezi nejvýznamnější sekundární metabolity rostlin díky všudypřítomnému výskytu a velkému počtu zástupců a strukturních typů. Doposud bylo popsáno více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny.

Flavonoidy jsou deriváty fenylchromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany). Vyskytují se pouze v rostlinné říši, nejčastěji jako flavany, řidčeji pak isoflavany. Neoflavany se vyskytují vzácně a nemají terapeutický význam.



Obr. 2 Struktura flavanu [16], isoflavanu [17] a neoflavanu [18]

Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavany dále dělí do několika stupín (flaveny, flavanony, flavanoly, flavanonoly, flavandioly, flavony a flavonoly). Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin. Nejčastěji jsou studovány flavonoly (př. kvercetin, kempferol) a flavony (př. apigenin, luteolin) a jejich glykosidy.



Obr. 3 Struktura kvercetinu [19] a apigeninu [20]

Aglykony (necukerné části) flavonoidních glykosidů jsou produkty vznikající oběma hlavními cestami vedoucími k syntéze aromatických látek v biologických systémech. Jeden 6-uhlíkový fragment těchto $C_6-C_3-C_6$ sloučenin se odvozuje z acetátového metabolismu a zbývající 9-uhlíková část z kyseliny šikimové. Jednotka C_6-C_3 , patrně ve formě kyseliny skořicové, se spojuje se 3 molekulami acetátu za vytvoření meziprojektu chalkonu, z něhož vzniká následně flavanon. Deriváty se tvoří zavedením nebo odstraněním hydroxylových skupin. Flavanonoly vznikají zavedením hydroxylové skupiny do polohy 3, dehydrogenace poloh 2 a 3 vede ke vzniku flavonolů. Glykosylace nastává v pozdním stádiu tvorby flavonoidu.

Flavonoidy, pro všestranné působení na organismus často nazývané bioflavonoidy, se v rostlinách vyskytují většinou glykosidně vázané, rozpuštěné v buněčné šťávě vakuoly. Methoxylované deriváty jsou lipofilní a vyskytují se v silicích. V živém rostlinném organismu se flavonoidy patrně účastní oxidačně redukčních pochodů. Další funkcí v rostlinách je také vábení opylovačů a ochrana před UV zářením.

Terapeutické využití flavonoidů a flavonoidních drog je velmi široké. Některé mají schopnost normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemoragicky a antiedematózně (označováno jako „P-vitaminový“ účinek). 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. Významná je jejich

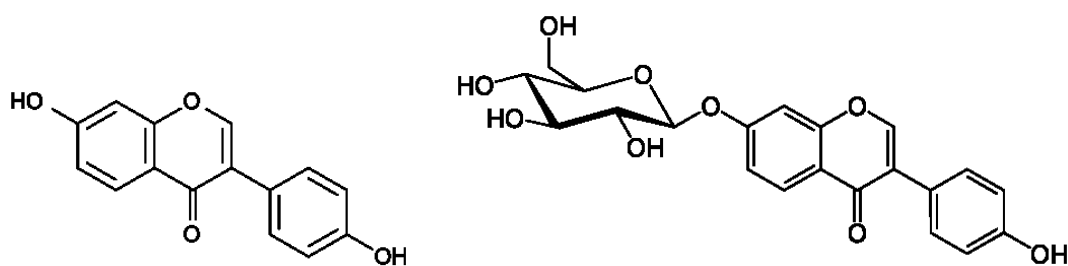
antioxidační aktivita a schopnost eliminovat volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku při jejich nadprodukci v organismu. Inhibují také některé enzymy, které se účastní biochemických pochodů, při nichž vznikají volné radikály, chelatují železo nebo měď. Působí protizánětlivě, brání oxidaci lipidů a důsledkům oxidačního poškození při srdečně cévním onemocnění, nádorovém onemocnění a stárnutí organismu. Jsou inhibitory hyaluronidázy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi. Potencují účinek vitamínu C, používají se proto jako podpůrné prostředky při léčení infekčních nemocí. Některé podporují tvorbu a vylučování žluči, působí také spasmolyticky.

Účinné jsou glykosidy i aglykony. Používají se v čistém stavu (př. rutin, směs diosminu a hesperidinu), častěji však jako drogy nebo jejich extrakty. [12-15]

3.1.6.2 Isoflavonoidy

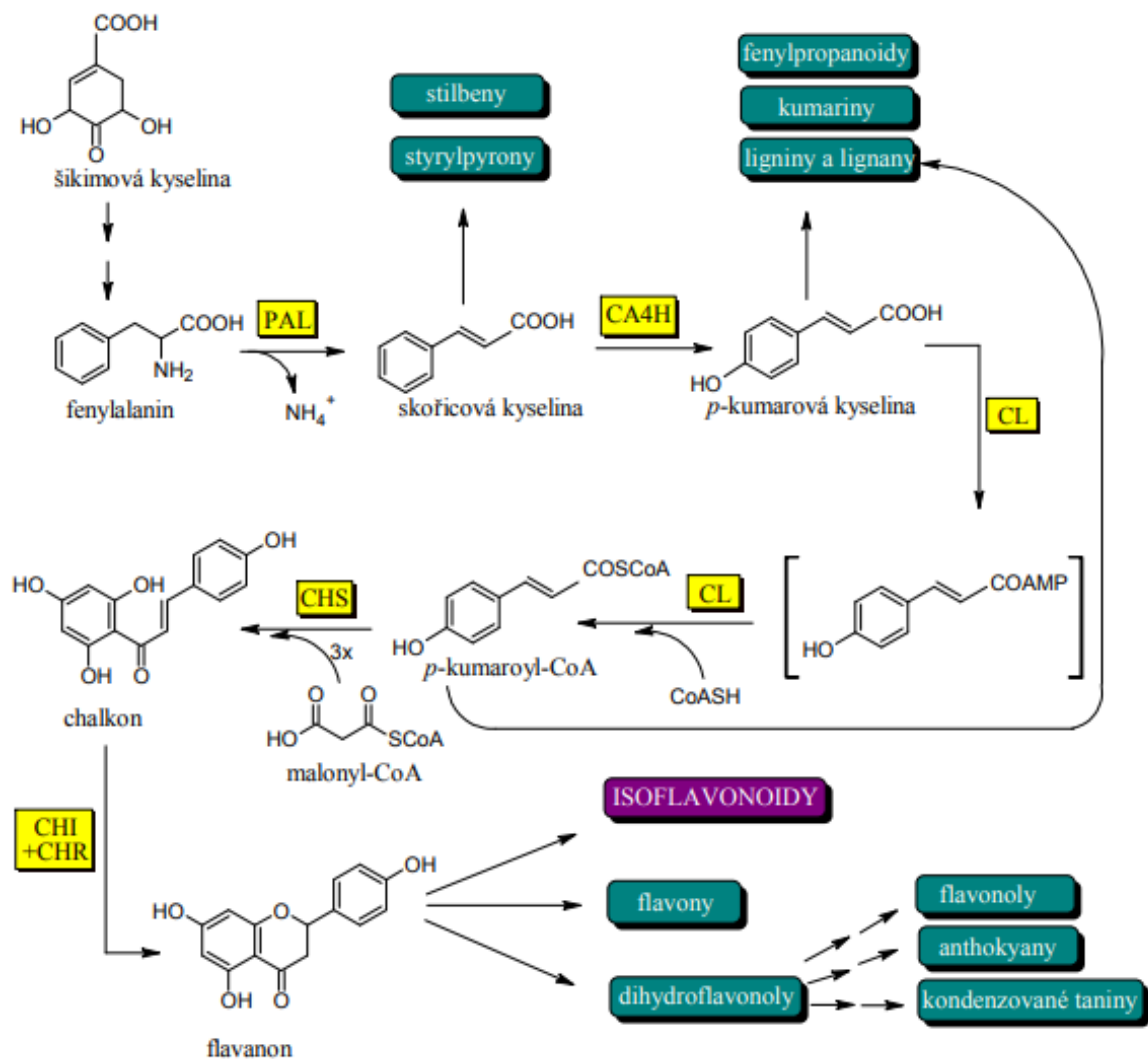
Isoflavonoidy tvoří významnou podskupinu patřící mezi flavonoidy. Existuje asi 700 známých struktur a z toho je popsáno okolo 370 aglykonů. Tyto sloučeniny se odlišují strukturně od dalších tříd flavonoidů vazbou benzenového kruhu v pozici 3 heterocyklického systému. Jejich struktura je založena na 3-fenylchromen-4-onu a liší se v míře hydroxylace, methylace a glykosylace.

Isoflavony jsou polohové izomery častěji se vyskytujících flavonů. V rostlinné říši jsou zastoupeny v menší míře než další flavonoidy. Tato skutečnost je potvrzena faktem, že isoflavony jsou zastoupeny převážně v omezeném počtu čeledí, například v čeledi *Fabaceae*. V menší míře se vyskytují i v řadě dalších čeledí jako jsou *Iridaceae*, *Myristicaceae* nebo *Rosaceae*. Mezi nejznámější isoflavony patří aglykony daidzein, genistein, formononetin a biochanin A, jakož i jejich glykosidy daidzin, genistin, ononin a sissostein. [21]



Obr. 4 Struktura daidzeinu [22] a daidzinu [23]

Isoflavonoidy vznikají v rostlinách stejně jako flavonoidy kondenzací polyacetátu a aromatických kyselin získaných biosyntetickou cestou kyseliny šikimové. Ze vzniklých meziproduktů flavanonu jsou následně syntetizovány migrací arylu, tato reakce je katalyzována enzymem 2-hydroxyisoflavanonsyntázou. [25]



Schematické znázornění hlavních větví fenylpropanoidové dráhy. Enzymy a jejich kofaktory: PAL, fenylalaninamoniaklyasa; CA4H, 4-hydroxylasa kyseliny skořicové (O₂, cytochrom P 450, NADPH); CL, kumaroyl-CoA ligasa (CoASH, ATP); CHS, chalkonsynthasa; CHI, chalkonisomerasa; CHR, chalkonreduktasa. (Nakresleno v programu ACD/ChemSketch podle Buchanan *et al.*, 2002, Winkel-Shirley, 2001)

Obr. 5 Schématické znázornění hlavních větví fenylpropanoidové dráhy [26]

V rostlinném organismu plní isoflavonoidy funkci ochrannou a obrannou. Posilují imunitu rostliny a chrání ji před patogeny. Mají vlastnosti antioxidační, antiparazitární, antivirové, antibakteriální a fungistatické. [24]

Isoflavony patří k nejlépe probádaným fytoestrogenům, což jsou látky nesteroidní povahy, jimž je vlastní estrogení účinek. Vykazují různou afinitu a vnitřní aktivitu na estrogenových, progesteronových či androgenních receptorech, což pravděpodobně stojí v pozadí jejich vyšší bezpečnosti v porovnání s klasickými přípravky s obsahem pohlavních hormonů. Přírodní nesteroidní isoflavony tedy přinášejí alternativu v léčbě klimakterických obtíží (návaly, pocení, nespavost, pocit únavy), také přispívají k příznivému ovlivnění a prevenci chorob majících svůj původ v oxidačním poškození biologických struktur (ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění), v prevenci osteoporózy, upravení stavu kůže, sliznic, brání zvýšenému vypadávání vlasů. Epidemiologické studie prokázaly také významné snížení estrogen-dependentních tumorů u populací se zvýšenou konzumací flavonoidů. Účinek isoflavonoidů není dán pouze jejich působením na estrogení receptory, ale jsou také inhibitory tyrozinkinázy, regulátory genové transkripce, modulátory transkripčních faktorů, antioxidantů, stejně jako způsobují změny některých enzymových aktivit. [24, 27, 28]

3.2 Explantátové kultury rostlin

Řada rostlinných látek je pro člověka nenahraditelná jako farmaka a požadavky na tyto látky rychle stoupají. Proto jsou kromě zemědělské produkce středem zájmu i jiné, alternativní zdroje, mezi něž patří také využití explantátových kultur rostlin. [29]

3.2.1 Obecná charakteristika

Explantátové kultury rostlin (kultury rostlinných explantátů) znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek. [30]

Výhodou explantátových kultur je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk, a z každé lze vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. Umožňují též konzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin.

Využívají se jak při šlechtění rostlin, tak při produkci rostlinných metabolitů. [29]

3.2.2 Základní pojmy

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

1. Kultura orgánová – orgánové systémy, orgány resp. jejich základy či části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a v celku zachovává jejich stavbu a funkci.
 2. Kultura tkáňová – do různého stupně soudržné, morfologicky desorganizované 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, suspendované v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.
 4. Kultura buněčná – volné jednotlivé a identifikované buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotekuté půdě nebo na nosiči nasyceném půdou.
 5. Kultura protoplastů – kultura buněk zbavených buněčných stěn, kde buněčný obsah není obalen pevnou buněčnou stěnou, ale jen pružnou, elastickou plasmolemou.
- **Primární explantát** – rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny.
 - **Primární kultura** – kultura primárních explantátů.
 - **Subkultivace, pasážování** – přenos celé kultury nebo její části do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat či zesílit růst kultury po další subkultivační interval.
 - **Subkultivační interval** – období mezi dvěma po sobě následujícími subkultivacemi kultury.
 - **Subkultivační číslo** – číslo, udávající, kolikrát byla kultura pasážována od svého založení z primárního explantátu či již existující kultury.
 - **Rozpadavost kultur** – schopnost tkáňových či suspenzních kultur spontánně se rozpadat na buněčné shluky a volné buňky, schopné dalšího růstu, resp. pomnožování.
 - **Kalus resp. 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.
- **Diferenciace** – chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech, jimiž se odlišily od tzv. eumeristemického stavu a získaly jinou specializaci. Opačný proces se nazývá dediferenciace. [31]

3.2.3 Vlastnosti kultur rostlinných explantátů

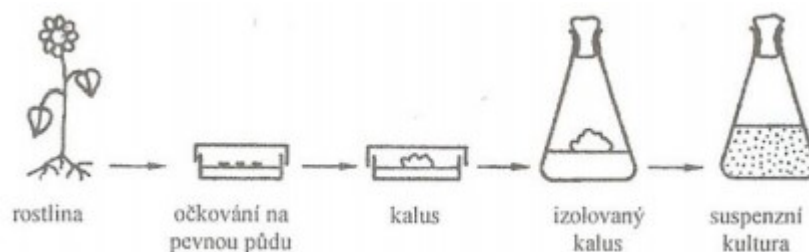
- Rostlinné kultury lze odvodit z buňky či komplexu buněk pletiva kteréhokoliv orgánu rostlinného těla (s výjimkou některých velmi specializovaných buněk, např. sítkovice, tracheidy, sklereidy).
- Kulturu lze pěstovat *in vitro* za vhodných kultivačních podmínek neomezeně dlouho.
- Tkáňová resp. suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje, ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter, není však homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciace.
- Suspenzní kultury jsou tvořeny jak volnými buňkami, tak buněčnými shluky různé velikosti a jejich poměr se v průběhu kultivace může měnit. Rozpadavost kultury je zřejmě geneticky podmíněna a lze ji ovlivnit složením media a kultivačními podmínkami.
- Buňky tkáňových ani buněčných kultur nejsou schopny tvořit jednovrstevnou kulturu (monolayer), neuchycují se na tuhé ani polotuhé podklady.
- Řada rostlinných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách, často velmi jednoduchých.
- Explantátové orgány, resp. orgánové základny v kultuře *in vitro* mohou dorůstat.
- Orgánové, tkáňové ani buněčné kultury nejsou schopny bez poškození podstoupit konzervaci mrazem.
- Vhodnou kombinací růstově aktivních látek a ostatních složek kultivačního média lze v kulturách indukovat histogenezi nebo organogenezi. Takto lze odvodit z jediné somatické buňky životaschopnou rostlinu. [31]

3.2.4 Odvození a udržování kultury

Pro úspěšné odvození sterilní kultury je důležitý výběr vhodné matečné rostliny i části rostlinného těla. Výchozí rostlina by měla být zdravá, pěstovaná v optimálních podmínkách a pokud možno s vysokou produkcí požadovaného sekundárního metabolitu. Úspěch odvození sterilní kultury a růst explantátů je ovlivňován obdobím roku, kdy je explantát odebírán – nejlepších výsledků je dosahováno, je-li explantát odebrán z rostliny v aktivní fázi růstu nebo ze zásobních orgánů. Pokud rostlina nebyla pěstována v aseptických podmínkách, je nutné ji před vlastní explantací opláchnout vodou a povrchově dezinfikovat. Poté se odebere fragment, který se umístí do kultivační nádoby s vhodným médiem a inkubuje se při teplotě 23-28°C. Po několika týdnech se objeví primární kalus, který je schopný neomezeně proliferovat na vhodném mediu po odstranění zbytku výchozího orgánu při pasážování.

U prvních pasáží se mohou objevit morfologické (pigmentace) a morfogenetické (regenerace) změny. Teprve po větším počtu pasáží je získán stabilní a homogenní rostlinný materiál, ovšem pouze za předpokladu přísného dodržování konstantních podmínek kultivace, jako je složení a zpracování živné půdy, teplota, osvětlení, prostředí a pravidelnost pasáží.

Z kalusové kultury lze získat kulturu suspenzní dvěma způsoby. Enzymovým rozvolněním, např. pomocí pektináz, nebo mechanickou cestou, např. za použití pomaloběžného rolleru nebo třepačky. Jak kalusové, tak suspenzní kultury se udržují zatím výhradně pomocí pravidelných pasáží. Průměrná kultivace trvá 7-15 dní. [30, 31]



Obr. 6 Odvození explantátové kultury z rostliny [29]

3.2.5 Buněčné suspenzní kultury

Buněčné suspenzní kultury představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu. Použití tekutých médií umožňuje buňkám suspenze přímý kontakt s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou jim rychle přístupné.

Pohybem tekutého živného média se dosahuje jeho aerace, zajišťuje se lepší přístup živin k jednotlivým buňkám a napomáhá se rozpadu buněčných shluků, které vznikají při dělení buněk. Pohyb je zajišťován umístěním kultivačních nádob na roller (v šikmé rovině se otáčející plocha) nebo na třepačku (pohyb baněk je v horizontální rovině).

Pro kontinuální kultivace buněčných suspenzí se používají různé typy bioreaktorů, kde je pohyb média zajišťován buď míchadlem anebo probubláváním sterilního vzduchu.

Buněčné kultury se hojně využívají jako modelový systém při studiu procesů sekundárního metabolismu, indukci enzymů, genové exprese, jako výchozí materiál pro přípravu enzymů, pro mutační šlechtění rostlin a k produkci somatických embryí. [30]

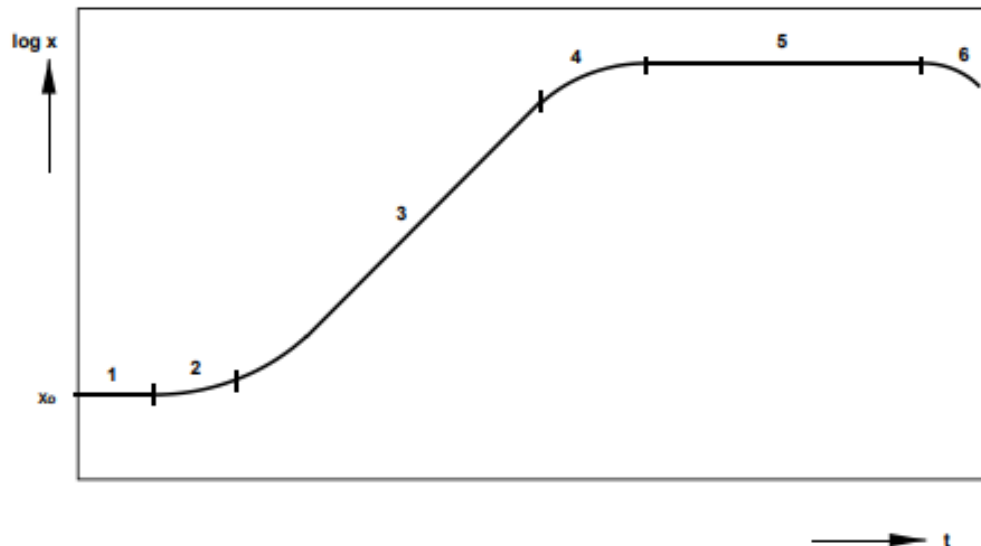
3.2.6 Fáze růstu kultury

Růst buněčné suspenze v uzavřeném systému probíhá v několika fázích. Tyto fáze jsou charakterizovány tzv. růstovou křivkou, kterou získáme grafickým znázorněním závislosti některé z růstových charakteristik suspenze (čerstvá hmotnost, počet buněk, sušina, atd.) na čase. [30]

1. **Lag fáze** – období, během kterého se naočkované buňky přizpůsobují novému prostředí. Po přenesení buněk do živné půdy zůstává jejich koncentrace po určitou dobu konstantní, může však také dočasně poklesnout.
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. Buňka se z hlediska chemického složení nemění, replikace všech jejích součástí musí

probíhat stejnou rychlostí. Fáze trvá tak dlouho, dokud mají buňky dostatečné množství živin a pokud není růst kultury inhibován produkty vlastního metabolismu.

4. **Fáze zpomalení (deklinační fáze)** – s postupným vyčerpáváním živin a hromaděním toxických metabolických produktů dochází s poklesu růstové rychlosti. Tvar růstové křivky se může v této fázi velmi lišit, závisí i na typu rostlinné kultury.
5. **Stacionární fáze** – populace buněk dosahuje maximální a po určitou dobu konstantní velikosti. Stejně jako u předchozí fáze závisí její délka na způsobu měření koncentrace buněk. Maximální dosaženou koncentraci buněk určuje řada faktorů: počáteční koncentrace energetického zdroje, zdroje dusíku i stopových prvků, koncentrace kyslíku, někdy i způsob úpravy pH během kultivace.
6. **Fáze odumírání** – pro průběh této fáze neexistuje žádné pravidlo, odumírání může být rychlé nebo pomalé, spojené nebo nespojené s autolýzou buněk. [31]



Obr. 7 Růstová křivka: x – koncentrace biomasy; jednotlivé fáze – 1) lag, 2) akcelerační, 3) exponenciální, 4) deklinační, 5) stacionární, 6) odumírání

3.2.7 Kultivační podmínky

Kultivace rostlinných explantátů *in vitro* probíhá za přesně stanovených podmínek fyzikálních (teplota, spektrum světla), nutričních (sacharidy, organický dusík) a hormonálních (vitamíny, regulátory růstu). [32]

3.2.7.1 Živná média

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách je složení kultivačního média.

Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo další zdroj organického dusíku, sacharidy, další nedefinované organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory. Existuje celá řada médií používaných pro různé druhy rostlin a pro různé účely kultivace. [30]

- **Makroelementy** – jsou nutné pro kultivaci intaktních rostlin. Do kultivačních médií je dodáváno šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra. Přidávají se ve formě solí a jejich zastoupení v médiu je větší než 30 mg/l.
- **Mikroelementy** – mezi esenciální mikroelementy patří: železo, bor, mangan, jod, molybden, měď a zinek. Význam niklu, kobaltu a hliníku pro růst kultivovaných rostlinných tkání je zatím sporný.
- **Zdroje organického uhlíku** – kultivované rostlinné tkáně jsou schopny využívat uhlík jako základní stavební jednotku pro nově vznikající tkáň z cukrů, alkoholů a organických kyselin. Nejčastějším zdrojem uhlíku a energie je sacharóza, jejíž koncentrace v kultivačním médiu je 2-3%. V některých případech je možné ji nahradit glukózou či fruktózou. Z alkoholů lze použít jako zdroj uhlíku glycerin, z organických kyselin např. kyselinu jablečnou.
- **Vitamíny** – jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Exogenní zdroje vitamínů hrají v růstu kultury významnou úlohu, neboť množství vitamínů tvořené samotnými explantátovými kulturami je často nedostačující. Mezi nejčastěji používané vitamíny v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. Pro růst

tkáňových kultur je nepostradatelný hlavně thiamin, který se používá obvykle v koncentraci 0,1-10,0 mg/l. Někdy se používají také další vitamíny jako biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin a jiné. Jejich přítomnost však v médiích není většinou nezbytná.

- **Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku** – dodávají se do živných médií především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Dusík se v organické formě dodává nejčastěji ve směsi aminokyselin, např. kasein hydrolyzát v obvyklé koncentraci 0,05-0,1%. Dále se používá také L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin.
- **Nedefinované organické složky médií** – růst explantátové kultury je možné často stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Použití těchto nedefinovaných směsí je však lépe vynechat právě z důvodu jejich nedefinovaného složení.
- **Látky používané pro zpevnění média** – pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar, který má oproti jiným látkám řadu výhod. Agarový gel je stabilní při teplotách používaných při kultivaci, nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Jeho tuhost je možné regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. Vedle agaru je možné používat ke zpevnění média také agarózu, Phytigel a Gerlite. 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** – růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokiny, gibereliny a kyselina abscisová. O charakteru růstu explantátové kultury nerozhoduje pouze koncentrace jednotlivých hormonů, ale také jejich vzájemný poměr.
 1. **auxiny** – v kultivačním médiu jsou používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtlů a zejména kořenů. Patří zde především kyselina indolyloctová (IAA), ze syntetických látek pak kyselina indolylmásečná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) nebo kyselina naftyloctová (NAA).

2. cytokiny – používají se v kultivačních médiích za účelem stimulace buněčného dělení a tvorby axilárních prýtů. Nejdůležitějšími zástupci jsou 6-dimethylaminopurin (IPA) a zeatin jako nativní cytokiny, benzylaminopurin (BAP) a furfurylaminopurin (kinetin) jako syntetické cytokiny.
3. gibereliny – do média se přidávají většinou za účelem stimulace růstu buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, ke stimulaci růstu kalusu a zakrslých rostlin. Jedná se především o kyselinu giberelovou (GA_3) a giberelin (GA_7).
4. kyselina abscisová – dodává se za účelem stimulace i inhibice růstu kalusu (v závislosti na rostlinném druhu, ke stimulaci proliferace prýtů a k inhibici pozdějších fází embryogeneze). [30, 31]

3.2.7.2 Fyzikální podmínky

Jedním z předpokladů praktického využití rostlinných buněk je jejich adaptabilita na podmínky kultivace dané kultury. Z fyzikálních faktorů sem lze zařadit teplotu, světlo, pH živného média, aj.

- **Světlo** – působením světla dochází často v intaktních rostlinách i tkáňových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a akumulaci sekundárních metabolitů. Světlo může být také indukčním faktorem některých biosyntetických pochodů, např. syntézy flavonoidů či anthokyanidů. Pozitivní vliv světla byl také prokázán u kultur produkujících digitoxin a diosgenin. Je znám i vliv světla o různých vlnových délkách na produkci sekundárních metabolitů. Může rovněž ovlivňovat orgánovou diferenciaci.
- **Teplota** – kultivační teplota je jedním z faktorů, které ovlivňují průběh kultivace tkáňových kultur. Většinou je zvolena empiricky v těsném rozmezí kolem 25 °C. Její hodnota má vliv na rychlost růstu kultury a její zvýšení může indukovat organogenezi.
- **Acidita živného média** – u rostlinných tkáňových kultur není bezpodmínečně nutná přesná hodnota pH živného média. Optimální hodnota pH živného média je závislá na typu kultury. Většinou je pH média v rozmezí od 5,5 do 6,0. Na

tyto hodnoty se v případě potřeby upravují půdy přísadou hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové. [31]

3.2.8 Biotechnologické využití rostlinných explantátů

Využití rostlinných explantátových kultur *in vitro* lze rozdělit na dvě oblasti, ve kterých je prováděn výzkum, který má i své praktické uplatnění. Jde o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami a o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin. [33]

3.2.8.1 Produkce sekundárních metabolitů

Vyšší rostliny jsou důležitými zdroji léčivých látek. Jednou z možností, jak se vyhnout obtížím se zajištěním těchto látek, je kultivace rostlinných tkání a buněk v podmínkách *in vitro*.

Hlavní výhody buněčné kultivace oproti kultivaci celé rostliny jsou následující:

1. Využívané složky mohou být produkovány za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických změnách nebo půdních podmínkách.
2. Pěstované buňky mohou být zbaveny mikrobů a hmyzu.
3. Buňky jakékoliv rostliny, bez ohledu na její geografický původ, mohou být snadno pěstovány k získání jejich specifických metabolitů.
4. Automatická kontrola buněčného růstu a racionální regulace metabolických procesů může přispět ke snížení pracovních nákladů a zvýšení produktivity.

Rostliny i tkáňové kultury syntetizují sekundární metabolity většinou jen v určité ontogenetické fázi, v určitém období růstového cyklu. Často se stává, že převedením do kultury *in vitro* a ztrátou diference pletiva dochází ke změně či přerušení metabolických drah, jejichž důsledkem je kvalitativní změna spektra produkovanych látek. V buňkách jsou následně akumulovány vedlejší produkty metabolických drah, modifikované látky výchozích rostlin a látky dosud neznámé.

V posledních letech nastal významný pokrok ve vývoji nových technik, kterými je možné dosáhnout zvýšení produkce a akumulace sekundárních přírodních

látek v buněčných kulturách *in vitro*. Jde například o působení elicitorů, biotransformaci nebo imobilizaci.

Úspěšných výsledků ve využívání rostlinných buněčných kultur pro tvorbu sekundárních přírodních látek bylo také dosaženo zejména postupy založenými na manipulacích se složením živného média (např. s růstovými regulátory), dále díky rozvoji metod klonování.

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

Přes dosažené úspěchy zůstává stále nevyřešena celá řada problémů stojících v cestě využití tkáňových kultur pro produkci sekundárních metabolitů. Patrně nejvýznamnějším je nízký obsah žádaných látek, kombinovaný s často se vyskytující nestabilitou produkce. [33, 34]

3.3 Elicitace

Elicitace je jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšené produkce a akumulace sekundárních přírodních látek v buněčných kulturách *in vitro*.

Principem elicítace je mechanismus chemických obranných reakcí rostlin, při kterých dochází mimo jiné ke změně transkripce genů kódujících enzymy ovlivňující biosyntézu sekundárních metabolitů. [2, 33, 34]

3.3.1 Obranné reakce rostlin

Rostliny jsou v průběhu života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu jsou označeny jako stresové faktory (stresory). Mezi nejdůležitější stresové faktory, se kterými se rostliny setkávají v přírodě, patří:

- **Abiotické faktory**
 1. fyzikální
 - mechanické účinky větru
 - nadměrné záření (UV, viditelné)
 - extrémní teploty (horko, chlad, mráz)
 2. 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
- **Biotické faktory**
 - herbivorní živočichové (spásání, poranění)
 - patogenní mikroorganismy (viry, mikrobi, houby)
 - vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus)

Tyto stresové faktory mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů nestejně snadno, a to především v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur.

Způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter. Kromě speciálních anatomických ochranných struktur (např. tlustá kutikula na listech, ostré trny či trichomy, výrazná impregnace buněčných stěn nebo rezervoár vody a snadno rozložitelných organických látek tlumící jejich nedostatek) se rostliny chrání také syntézou více či méně toxických látek (např. kyanovodík, lignin a tanin).

Jestliže stresor pronikne k plazmatické membráně buněk a do symplastu, je jeho negativní dopad omezen spuštěním mechanismů aktivní odolnosti. V takovém případě dojde k řetězci změn, který bývá označován jako stresová reakce. Průběh stresové reakce a její konečný výsledek závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru, tak i na geneticky vázaných předpokladech odpovědi. [36]

3.3.2 Phytoalexiny

Phytoalexiny jsou specifické nízkomolekulární obranné látky, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začnou se vytvářet až po napadení patogenem.

V současné době je známo více než 300 phytoalexinů, které po chemické stránce patří mezi velmi různorodé typy sloučenin. U systematicky příbuzných druhů se obvykle vyskytují také podobné druhy phytoalexinů. Např. u rostlin čeledi *Fabaceae* převažují isoflavonoidy, u jiných čeledí to mohou být seskviterpeny (*Solanaceae*), diterpeny (*Poaceae*), furanokumariny (*Apiaceae*) či stilbeny (*Vitaceae*). U téže rostliny se někdy mohou tvořit dva i více různých phytoalexinů.

Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanismům toxického působení phytoalexinů. [36]

Phytoalexiny mají bakteriostatické, fungistatické a cytostatické účinky. [30]

3.3.3 Elicitory

Elicitor stojí na počátku všech obranných reakcí jako spouštěcí faktor. Může být definován jako látka, která při zavádění v malých koncentracích do systému živých buněk iniciuje nebo zlepšuje biosyntézu specifických sloučenin. [2, 37]

Elicitory mohou být klasifikovány jako endogenní (sloučeniny produkované rostlinami po působení patogenu) a exogenní (látky patogenního původu) nebo také jako biotické a abiotické.

- **Biotické elicitory** – jsou látky biologického původu. Exogenní biotické elicitory zahrnují sloučeniny uvolňované mikroorganismy a jinými patogeny nebo tvořené působením rostlinných enzymů na mikrobiální buněčné stěny. Patří zde například mikrobiální enzymy, houbové a bakteriální lyzáty, kvasinkové extrakty a polysacharidy z buněčných stěn mikroorganismů (př. chitin, glukany). Mezi látky endogenního původu patří polysacharidy (př. galakturonid, chitosan), které vznikají při patogenní degradaci rostlinné buněčné stěny, intracelulárních proteinů a malých molekul syntetizovaných rostlinnými buňkami v reakci na různé typy stresu, a také rostlinné hormony (př. kyselina salicylová, methyl jasmonát).
- **Abiotické elicitory** – jsou látky nebiologického původu. Patří zde zejména soli těžkých kovů (př. CuCl_2 , HgCl_2 , MnSO_4 , PbNO_3) a fyzikální faktory (př. změny pH, UV záření). [37-39]

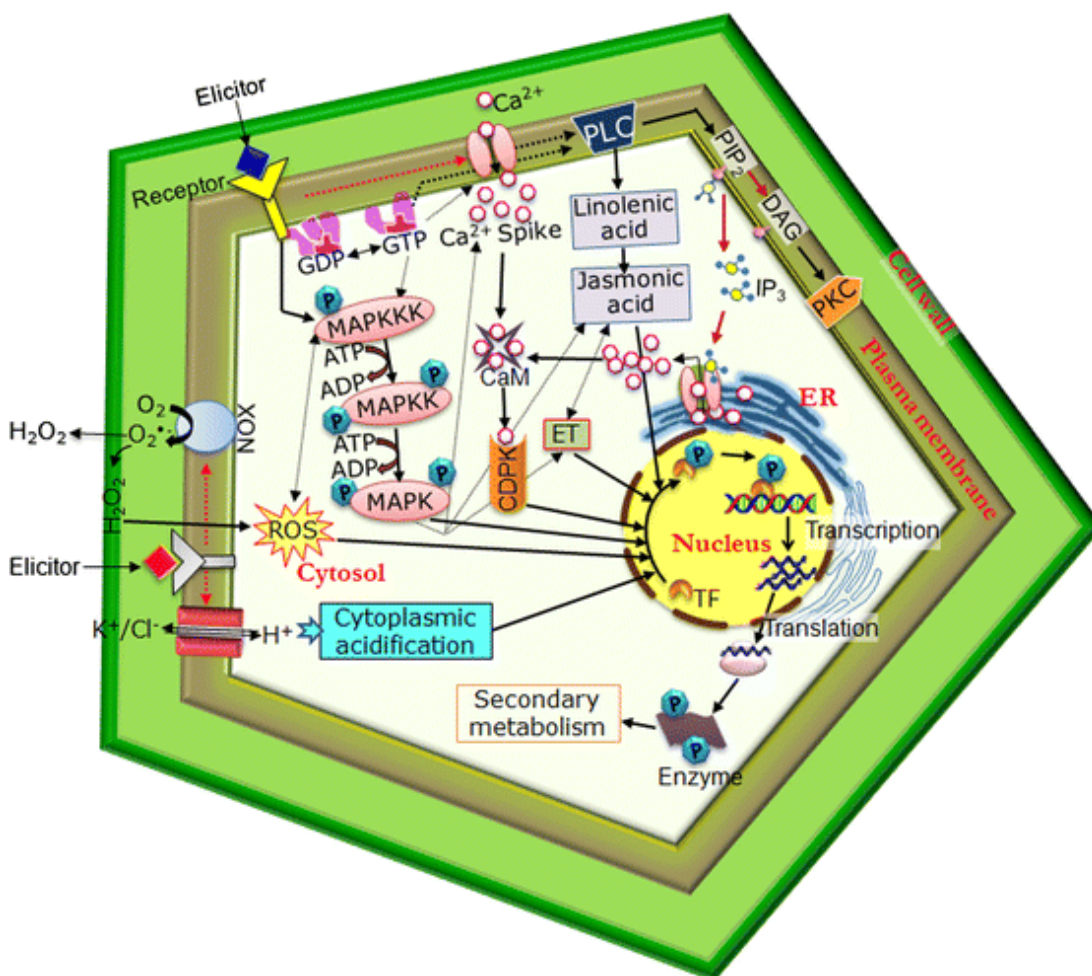
3.3.4 Mechanismus účinku elicitoru

Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (označovaných také jako druzí poslové, angl. *second messengers*). Rozeznáváme dva základní systémy druhých poslů: systém cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a systém fosfoinozimidový.

Oba tyto systémy jsou spuštěny vazbou elicitoru na receptor v membráně. Změna struktury receptoru je pomocí guanozin trifosfát-vážečného proteinu (G-proteinu) přenesena na klíčový enzym, kterým je v případě systému cAMP adenylátcykláza. Adenylátcykláza přeměňuje adenosin trifosfát na cAMP, zatímco v případě fosfoinozimidového systému fosfolipáza c štěpí membránový lipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2) na dvě signální molekuly: diacylglycerol (DAG), který jako

lipofilní molekula zůstává v membráně, a inozitol-1,4,5-trisfosfát (IP₃), který přechází do cytoplazmy. Všichni tři druží poslové působí nakonec změnu fosforylace proteinů: cAMP a DAG přímo aktivací proteinkináz, IP₃ nepřímo, po vazbě na receptor v endoplazmatickém retikulu a uvolnění iontů vápníku. Ionty vápníku jsou vlastně dalším nosičem signálu; vážou se na specifickou bílkovinu kalmodulin, čímž vzniká aktivní komplex schopný aktivovat proteinkinázy a následně i expresi genů.

Velmi častým a rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku vyvolaných elicitory. Zvýšené množství peroxidu vodíku je možné zjistit po 5 až 10 minutách působení elicitoru. Kromě možného přímého účinku peroxidu vodíku na expresi genů existuje ještě nepřímá cesta, při které nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmonová a methyljasmonát a ty teprve pak ovlivňují transkripci genů. [36]



Obr. 8 Schématické znázornění signální dráhy vedoucí k produkci sekundárních metabolitů rostlin [38]

Dráha sekundárních metabolitů je velmi specifická pro typ elicitoru, kterému jsou buňky vystaveny, a existuje variabilita mechanismu účinku, který zahrnuje širokou škálu metabolických reakcí na stresové situace v rostlinách. V důsledku toho je elicitací efekt na produkci sekundárních metabolitů v rostlinných buňkách velmi empirický. [38]

3.3.5 Podmínky elicitace

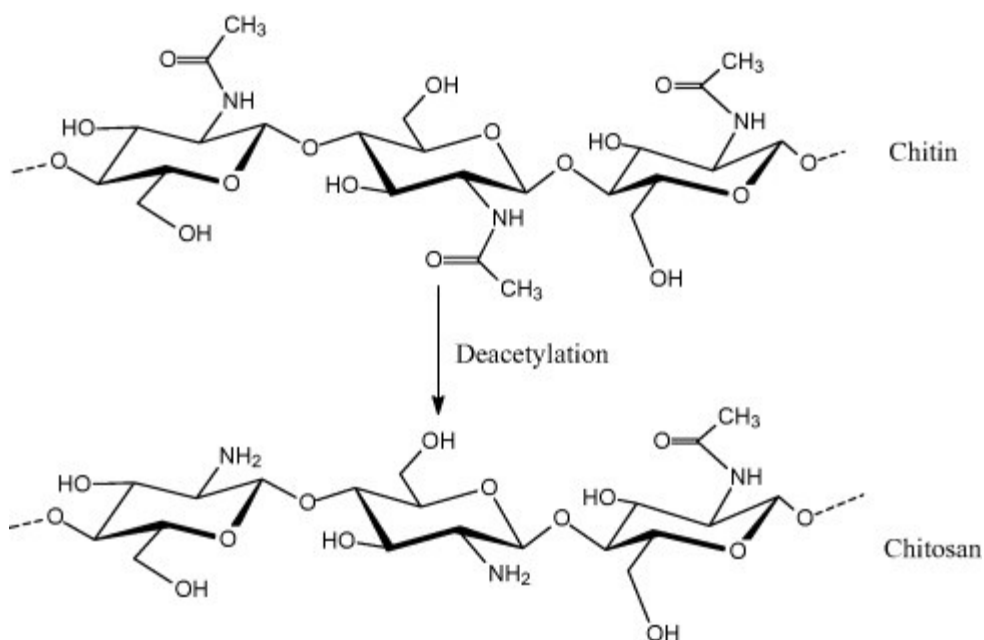
Základním předpokladem úspěšné elicitace je nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby jeho působení na rostlinnou kulturu *in vitro*. Důležitá je také volba vhodné explantátové kultury, stáří kultury, složení kultivačního média nebo čas přidání elicitoru během určité fáze buněčného růstu. [2, 37]

Poznatky o procesu elicitace, který podmiňuje tvorbu a akumulaci sekundárních přírodních látek v rostlinných buněčných kulturách, lze shrnout následovně:

- Tvorba sekundárních přírodních látek po působení elicitoru se vyskytuje především v buňkách, které se nacházejí na konci růstové fáze.
- Nastává v průběhu několika hodin po působení elicitoru (6-168 hodin).
- Probíhá v buňkách suspendovaných v růstovém médiu, tak v kalusu.
- Sekundární přírodní látky jsou přítomny v buňkách i v médiu.
- Elicitaci můžeme opakovat, aniž nastává poškození buňky. [33]

3.3.6 Chitosan

Chitosan (poly-D-glukosamin) patří mezi přírodní polymery typu polysacharidů. Je odvozený od přírodního chitinu, druhého nejrozšířenějšího polysacharidu po celulóze. Získává se alkalickou deacetylací chitinu, několikahodinovým varem s 50% hydroxidem sodným nebo enzymaticky působením *N*-deacetylázy. V důsledku různého stupně deacetylace, molekulové hmotnosti, stupně polymerace či viskozity se jedná o heterogenní látku. Tato heterogenita může výrazně ovlivnit fyzikální vlastnosti, a tak řídit jeho biologické aplikace. V přírodě se vyskytuje jako hlavní složka exoskeletu členovců a pouze v malém množství u několika typů hub rodu *Aspergillus* a *Mucor*. [40, 44]



Obr. 9 Deacetylace chitinu [41]

Chitosan je důležitou strukturní složkou buněčné stěny několika patogenních hub. Co se týče rostlin, může být aplikován *in vivo* jako antimikrobiální činidlo proti houbám, bakteriím a virům, *in vitro* může být použit jako elicitor obranných mechanismů. Jeho elicitální aktivita je silně ovlivněna stupněm polymerace a acetylace. Zdá se, že chitosan je zvláště účinný při zvyšování obsahu širokého spektra rostlinných polyfenolů, jako jsou stilbeny (např. resveratrol) a flavonoidy (např. anthokyany), což jsou velmi důležité antioxidanty pro rostliny, zvířata a lidi. [45]

Přestože přesný mechanismus účinku chitosanu v rostlinách je stále neznámý, byly navrženy různé hypotézy. Stimulační účinek různých enzymových aktivit na detoxikaci reaktivních druhů kyslíku naznačuje zapojení peroxidu vodíku a oxidu dusnatého v signální dráze chitosanu. Pro indukci obranných reakcí u rostlin může chitosan přímo ovlivňovat genovou expresi interakcí s chromatinem anebo se může vázat na specifické receptory. Aby bylo možné plně porozumět komplexním reakcím zprostředkovaným chitosanem, jsou v budoucnu zapotřebí další studie. [44, 45]

Chitosan má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní. Pro své výjimečné vlastnosti se používá v různých oborech zahrnujících především biomedicínu, kosmetiku, agrochemii, fyzikální chemii, konzervaci potravin, čištění vody a impregnaci textilií. Používá se také jako potravní doplněk pro snížení hladiny cholesterolu a redukci hmotnosti. Váže na sebe tuky a cholesterol a odvádí je ze zažívacího traktu dříve, než jsou zpracovány. Jako vláknina

zlepšuje činnost tlustého střeva a snižuje pocit hladu, proto se používá k hubnutí. Někdy se mu přičítá přílišný redukční účinek, který však nebyl vědecky prokázán. [40, 42, 43]

Nedávné inovativní využití chitosanu zahrnuje syntézu nanočástic chitosanu jako cenného transportního systému pro hnojiva, herbicidy, pesticidy a mikroživiny pro podporu růstu plodin vyváženou a trvalou výživou. Navíc chitosanové částice mohou bezpečně dodat genetický materiál pro transformaci rostlin. [44]

Tato diplomová práce se zabývá chitosanem jako potenciálním biotickým elicitorem pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál, přístroje, pomůcky

4.1.1 Rostlinný materiál

K pokusům uvedeným v této práci byla použita explantátová kultura, odvozená ze sterilní klíčící rostliny jetele lučního *Trifolium pratense* L., *Fabaceae* (varieta Sprint, Tempus a DO-8). Elicitace chitosanem byla prováděna u pětileté suspenzní kultury.

4.1.2 Chemikálie

- 6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno
- Dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno
- Dusičnan draselný p. a., Lachema, Brno
- Dusičnan amonný p. a., Lachema, Brno
- Ethanol 96%, Lachema, Brno
- Glycin č., Lachema, Brno
- Chitosan (low molecular weight, from shrimp shells, $\geq 75\%$ deacetylated, C3646), Sigma-Aldrich, USA
- Chloramin B, Lachema, Brno
- Chlorid kobaltnatý p. a., Lachema, Brno
- Chlorid olovnatý 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-dichlorfenoxycetová č., Lachema, Brno
- Kyselina boritá p. a., Lachema, Brno
- Kyselina chlorovodíková p. a., Lachema, Brno
- Kyselina mravenčí bezvodá p. a., Lachema, Brno

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

4.1.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen
- Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
- Horkovzdušný sterilizátor HS 31A, Chirana, Brno
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, Žilina
- Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
- Vodní lázeň KL-1, Laboratorní přístroje, Praha

4.2 Kultivace explantátové kultury

4.2.1 Kultivační nádoby a nástroje

Kultivace suspenzní kultury probíhala ve 250 ml varných baňkách z varného skla značky SIAL, které bylo použito pro své vhodné vlastnosti (odolnost vůči vodě, chemikáliím a rozdílům teplot).

Při elicitaci byly použity pipety, jež byly sterilizovány v autoklávu obalené hliníkovou folií po dobu 15 minut při teplotě 121°C a tlaku páry 0,1 MPa. Kovové nástroje byly nejprve opláchnuty 96% ethanolem, poté zabaleny do hliníkové folie a sterilizovány 2 hodiny v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200°C.

4.2.2 Příprava živného média

Pro kultivaci tkáňových kultur bylo použito živné médium podle Gamborga, které má následující složení [46]:

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

Pro přípravu živného média byly použity substance a zásobní roztoky. Substance byly zváženy na analytických vahách a nízké koncentrace byly pipetovány z předem připravených zásobních roztoků. Jednotlivé složky byly rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce o objemu 1000 ml a vše bylo doplněno destilovanou vodou po značku.

Jako stimulant růstu byla použita kombinace 2 mg.l⁻¹ 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 2 mg.l⁻¹ 6-benzylaminopurinu. [47]

Předem připravená půda pro kultivaci byla rozlita po 25 ml do varných baněk připravených pro suspenzní kultury. Baňky byly uzavřeny hliníkovou folií a sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa.

4.2.3 Pasážování a kultivace

Pasážování bylo prováděno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen nejméně 1 hodinu germicidní zářivkou. Při práci bylo použito sterilní sklo a nástroje, také musely být zachovány přísné aseptické podmínky.

Suspenzní kultura byla kultivována při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma na pomaloběžném roleru. Pasážování bylo prováděno vždy po 14 dnech subkultivace přenesením 2 ml narostlé suspenze do baněk s čerstvým médiem. [47]

4.3 Elicitace

4.3.1 Příprava roztoků elicitoru

K elicitaci byly použity 4 koncentrace roztoku chitosanu v 1% kyselině octové (naředěním z nejsilnější koncentrace):

- I. 1 mg/100 ml
- II. 10 mg/100 ml
- III. 100 mg/100 ml
- IV. 1000 mg/100 ml

4.3.2 Elicitace a odběr kultur

Ve 14. dni kultivace byla provedena za aseptických podmínek elicítace suspenzní kultury 4 koncentracemi roztoku chitosanu.

K experimentu bylo použito 72 kultivačních baněk s explantátovou kulturou. Soubor 8 neelicitovaných baněk sloužil jako kultura kontrolní. Ke kontrolním kulturám byl přidáván 1,0 ml 1% roztoku kyseliny octové. Do ostatních 64 baněk s kulturou byl napipetován vždy 1,00 ml elicitoru o příslušné koncentraci. Potom byly elicítované kultury dále kultivovány za již uvedených podmínek. Po 6, 24, 48 a 168 hodinách aplikace elicitoru byly elicítované kultury odebrány. Odběry kontrolních kultur byly provedeny po 6 a 168 hodinách. Buňky suspenzní kultury byly odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a sušeny za laboratorní teploty.

U každého vzorku bylo provedeno stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2017.

4.4 Stanovení obsahu flavonoidů

4.4.1 Princip stanovení

Po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé byl stanoven obsah flavonoidů pomocí spektrofotometrie. [48]

4.4.2 Postup stanovení

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

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

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

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

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

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

v němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm;

m – hmotnost zkoušené kultury v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

4.5 Statistické zpracování výsledků

Experimentem získané výsledky obsahu flavonoidů v kulturách *Trifolium pratense* L. byly vyhodnoceny statisticky na základě **T-testu**. Jedná se o test významnosti rozdílu dvou průměrů pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$.

- **Aritmetický průměr**

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

- **Směrodatná odchylka**

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

n - rozsah souboru

x_i - naměřené hodnoty

\bar{x} - aritmetický průměr

s - směrodatná odchylka

- **T-test**

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

t - testovací kritérium

\bar{x}_1 - aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x}_2 - aritmetický soubor pokusného souboru

n_1 - počet členů kontrolního souboru

n_2 - počet členů pokusného souboru

s_1 - směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 - směrodatná odchylka pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t rozdělení se stupněm volnosti (v), počítáno podle vzorce: $v = n_1 + n_2 - 2$.

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

Pro vypočtený počet stupňů volnosti $v = 2$ a pro $p(0,05)$ je kritická hodnota $t(v)_p = 3,182$. [49]

5 VÝSLEDKY

5.1 Tabulky

Tabulka č. 1: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) elicitované roztokem chitosanu.

Koncentrace elicitoru mg/100 ml	Doba aplikace elicitoru (h)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
I 1	6	0,175	0,015	0,157	0,003	1,177
	24	0,165	0,010	0,157	0,003	0,766
	48	0,253	0,007	0,157	0,003	12,605
	168	0,245	0,004	0,101	0,018	7,809
II 10	6	0,168	0,002	0,157	0,003	3,051
	24	0,164	0,024	0,157	0,003	0,289
	48	0,226	0,016	0,157	0,003	4,239
	168	0,154	0,005	0,101	0,018	2,837
III 100	6	0,120	0,007	0,157	0,003	4,858
	24	0,164	0,019	0,157	0,003	0,364
	48	0,119	0,004	0,157	0,003	7,600
	168	0,150	0,018	0,101	0,018	1,925
IV 1000	6	0,182	0,019	0,157	0,003	1,300
	24	0,228	0,021	0,157	0,003	3,347
	48	0,207	0,016	0,157	0,003	3,071
	168	0,192	0,022	0,101	0,018	3,201

Zeleně zvýrazněná hodnota označuje nejvyšší stanovený obsah flavonoidů. Jedná se o statisticky významné zvýšení oproti kontrole; $p = 0,05$.

Tabulka č. 2: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varietá Tempus) elicitované roztokem chitosanu.

Koncentrace elicitoru mg/100 ml	Doba aplikace elicitoru (h)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
I 1	6	0,231	0,000	0,137	0,006	15,667
	24	0,269	0,023	0,137	0,006	5,553
	48	0,280	0,019	0,137	0,006	7,177
	168	0,175	0,015	0,145	0,009	1,715
II 10	6	0,259	0,028	0,137	0,006	4,260
	24	0,254	0,013	0,137	0,006	8,172
	48	0,248	0,008	0,137	0,006	11,100
	168	0,136	0,003	0,145	0,009	0,949
III 100	6	0,196	0,016	0,137	0,006	3,453
	24	0,142	0,005	0,137	0,006	0,640
	48	0,184	0,001	0,137	0,006	7,727
	168	0,170	0,008	0,145	0,009	2,076
IV 1000	6	0,182	0,000	0,137	0,006	7,500
	24	0,153	0,004	0,137	0,006	2,219
	48	0,164	0,009	0,137	0,006	2,496
	168	0,170	0,001	0,145	0,009	2,761

Zeleně zvýrazněná hodnota označuje nejvyšší stanovený obsah flavonoidů. Jedná se o statisticky významné zvýšení oproti kontrole; $p = 0,05$.

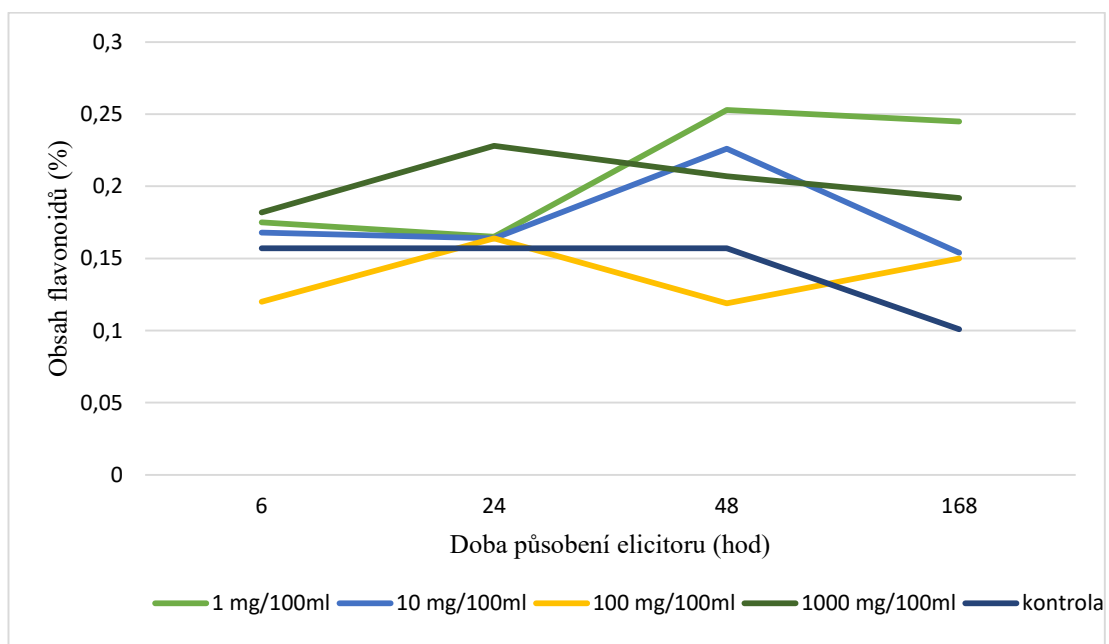
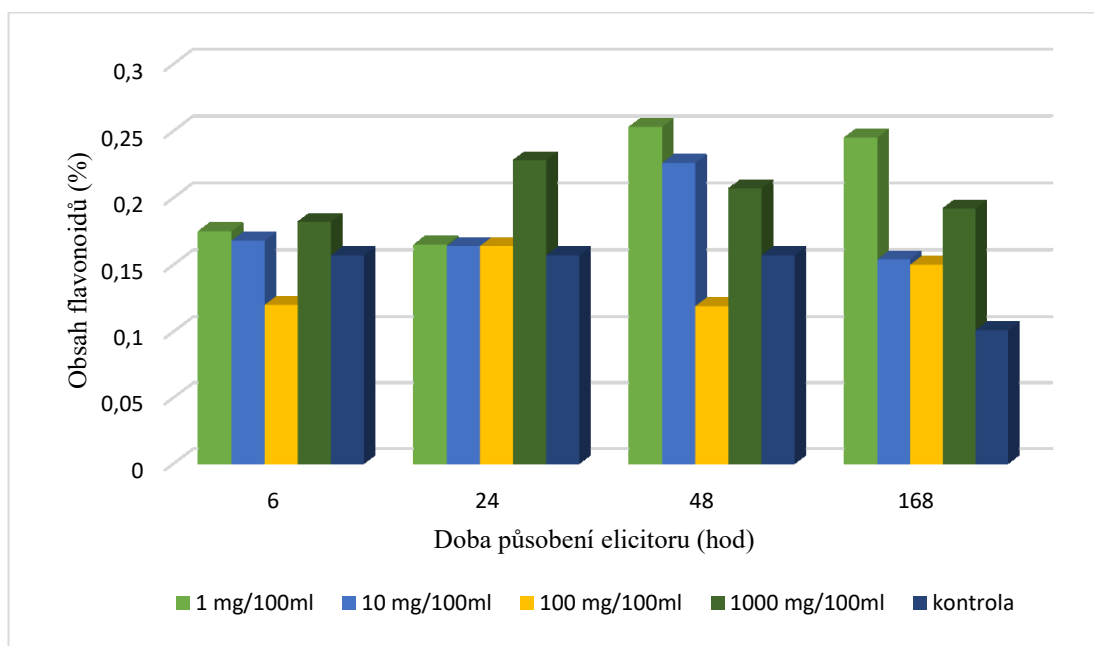
Tabulka č. 3: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varietá DO-8) elicitované roztokem chitosanu.

Koncentrace elicitoru mg/100 ml	Doba aplikace elicitoru (h)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
I 1	6	0,177	0,008	0,178	0,005	0,106
	24	0,255	0,011	0,178	0,005	6,373
	48	0,381	0,006	0,178	0,005	25,991
	168	0,324	0,009	0,186	0,009	10,842
II 10	6	0,179	0,010	0,178	0,005	0,089
	24	0,261	0,007	0,178	0,005	9,649
	48	0,368	0,013	0,178	0,005	13,641
	168	0,277	0,008	0,186	0,009	7,557
III 100	6	0,236	0,015	0,178	0,005	3,668
	24	0,274	0,020	0,178	0,005	4,657
	48	0,294	0,006	0,178	0,005	14,852
	168	0,270	0,009	0,186	0,009	6,600
IV 1000	6	0,282	0,005	0,178	0,005	14,708
	24	0,293	0,012	0,178	0,005	8,846
	48	0,285	0,020	0,178	0,005	5,190
	168	0,253	0,007	0,186	0,009	5,876

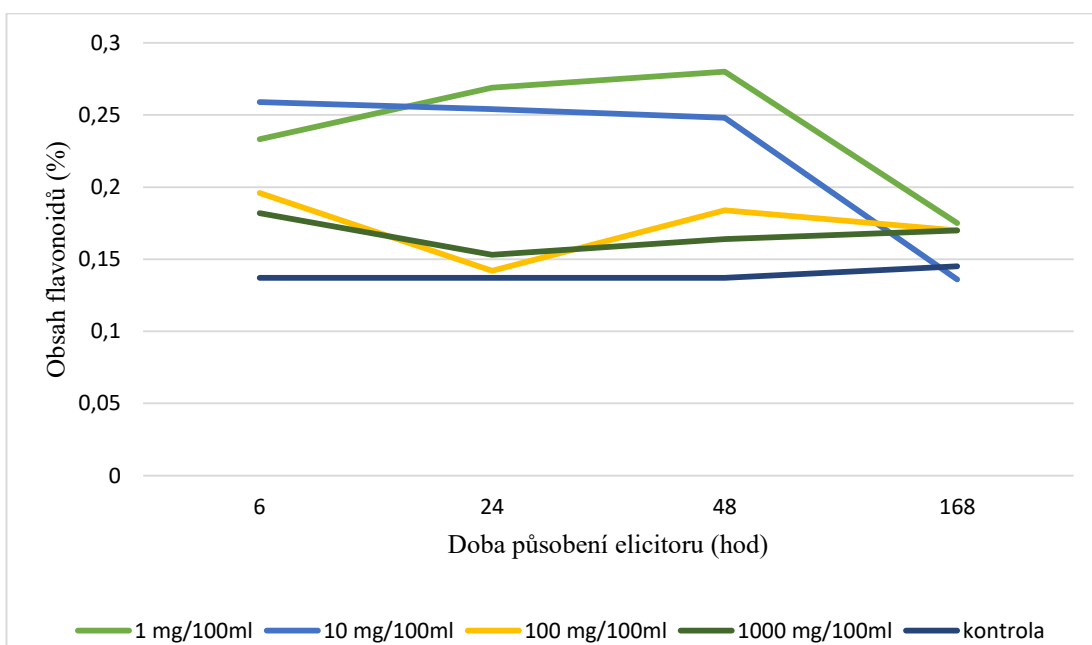
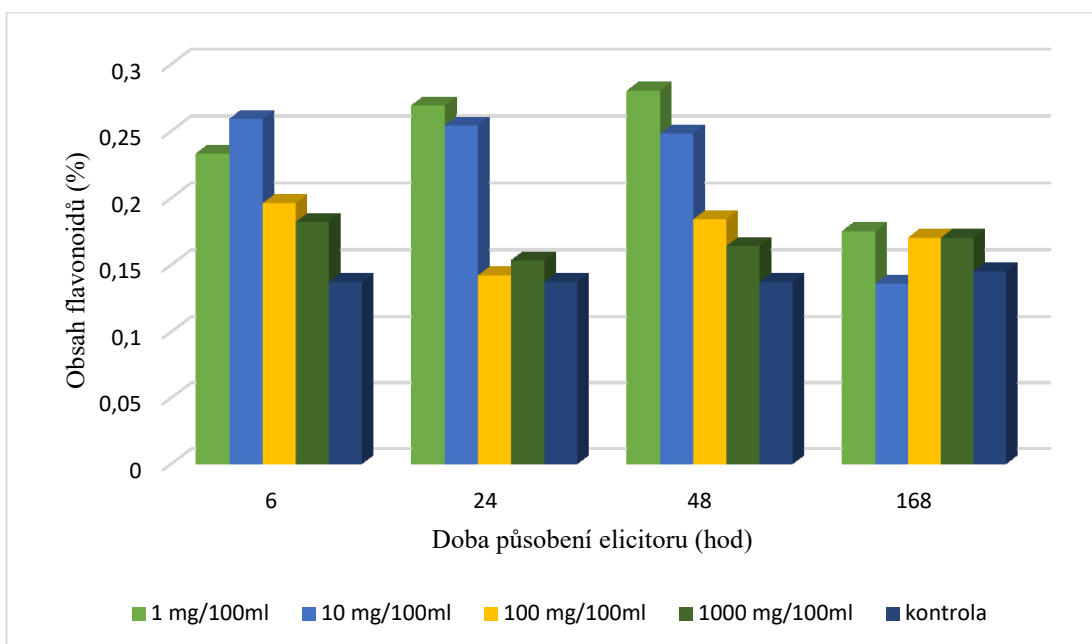
Zeleně zvýrazněná hodnota označuje nejvyšší stanovený obsah flavonoidů. Jedná se o statisticky významné zvýšení oproti kontrole; $p = 0,05$.

5.2 Grafy

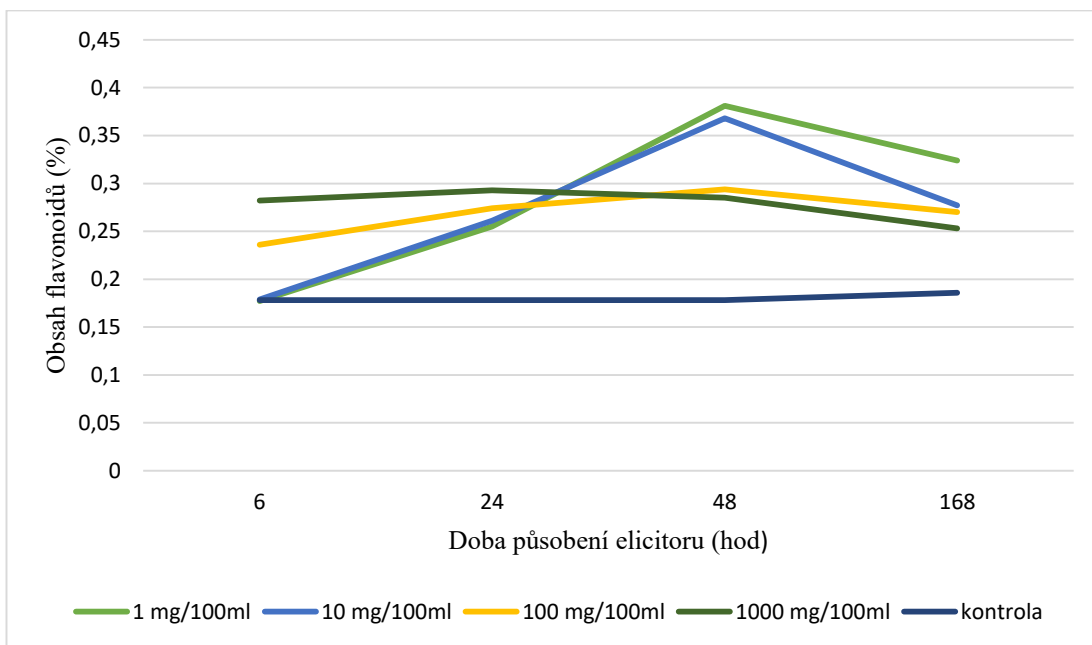
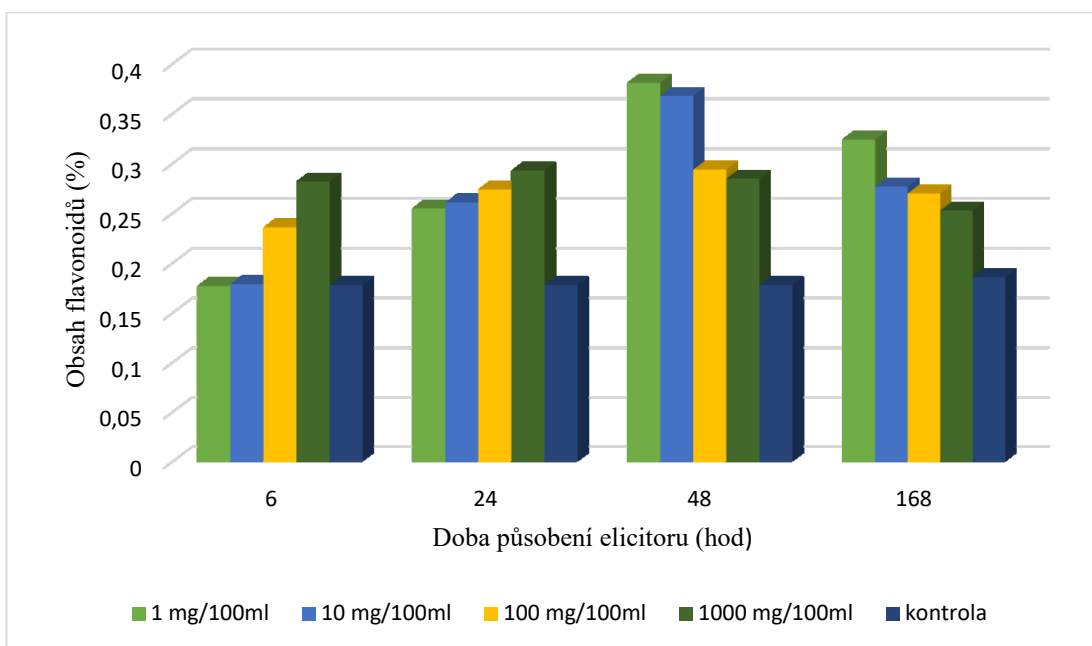
Graf č. 1: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) elicitované roztokem chitosanu.



Graf č. 2: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) elicítované roztokem chitosanu.



Graf č. 3: Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) elicitované roztokem chitosanu.



6 DISKUZE

Vyšší rostliny jsou nejen důležitým zdrojem potravin, dřeva, vlákniny, olejů, ale také poskytují nejbohatší výběr přírodních látek, z nichž je řada využívána v medicíně a farmacii. Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky únosnou organickou syntézou a jejich výroba pomocí genového inženýrství v mikrobiálních systémech není zatím řešitelná, protože vznikají mnohostupňovými syntézami. Jednou z možností, jak získat požadované rostlinné látky, je i využití rostlinných explantátových kultur. [2]

Sekundární metabolity rostlin hrají významnou roli při adaptaci rostlin na podmínky prostředí a zároveň představují důležitý zdroj léčiv. Problémem *in vitro* kultur je velmi nízká nebo nulová koncentrace požadovaných metabolitů. Nízké výtěžky souvisí se snížením nebo zablokováním enzymové aktivity a následně i metabolismu. Jedním z efektivních způsobů, jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních, je využití metody elicítace.

Elicítace je metoda založena na faktu, že akumulace většiny sekundárních látek v rostlinách je součástí obranných mechanismů vyvolaných buď patogeny, nebo vlivy prostředí. Dosavadní poznatky naznačují, že se jedná o ekonomicky výhodný způsob získávání přírodních látek, který nabývá na významu. [50, 51]

Cílem této práce bylo sledovat vliv biotického elicitoru chitosanu na produkci flavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint, Tempus a DO-8).

Explantátové kultury byly kultivovány na živném médiu podle Gamborga s přídavkem 2 mg/l 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 2 mg/l 6-benzylaminopurinu, při teplotě 25°C a za střídání světelného režimu (16 hodin světlo/8 hodin tma).

Všechny tři variety suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. byly vystaveny působení roztoku chitosanu o čtyřech různých koncentracích, a to 1 mg/100ml, 10 mg/100ml, 100 mg/100ml a 1000 mg/100ml. Vzorky se odebíraly po 6, 24, 48 a 168 hodinách. Kontrolní vzorky byly odebírány po 6 a 168 hodinách, neboť jejich produkce se v takto krátkých časových intervalech významně nemění. [52]

Z výsledků elicítace explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint) biotickým elicitem chitosanem (tabulka č. 1, graf č. 1) je zřejmé, že nejlepších elicitačních účinků bylo dosaženo při aplikaci nejnižší koncentrace elicitoru. Maximální produkce flavonoidů (0,253 %) byla zjištěna při působení elicitoru o koncentraci 1 mg/100ml po 48 hodinách, kdy došlo ke statisticky významnému

zvýšení obsahu flavonoidů o 61 % oproti kontrolní kultuře. K největšímu zvýšení obsahu flavonoidů (o 143 %) oproti kontrole ale došlo při použití nejslabší koncentrace elicitoru po 168 hodinách jeho působení. Samotný obsah flavonoidů ve vzorku byl ale nižší než v prvním případě (0,245 %).

Při elicitaci explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) roztokem chitosanu o čtyřech koncentracích (tabulka č. 2, graf č. 2) byly zjištěny nejlepší elicitální účinky při aplikaci nejnižší koncentrace elicitoru, stejně jako u variety Sprint. Maximální obsah flavonoidů (0,280 %) byl vyvolán po 48 hodinách působení elicitoru o koncentraci 1 mg/100ml. Obsah flavonoidů vzrostl oproti kontrole o 104 %, což představuje statisticky významné zvýšení v porovnání s kontrolou. Při aplikaci nejnižší koncentrace elicitoru lze kladně hodnotit také jeho 24 hodinové působení, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů o 96 % oproti kontrolnímu vzorku. Obsah flavonoidů byl 0,269 %.

V případě explantátové kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) elicítované chitosanem (tabulka č. 3, graf č. 3) došlo k maximální produkci flavonoidů (0,381 %) opět při působení nejnižší koncentrace elicitoru 1 mg/100ml po dobu 48 hodin, kdy se produkce flavonoidů zvýšila o 114 % oproti kontrole. Jedná se o statisticky významné zvýšení produkce. Pozitivně lze hodnotit také množství flavonoidů ve vzorku po 48 hodinové aplikaci roztoku chitosanu o koncentraci 10 mg/100ml. U této koncentrace a doby působení elicitoru byl zjištěn obsah flavonoidů 0,368 %, což je o 107 % více ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Porovnáme-li působení biotického elicitoru chitosanu na suspenzní kulturu *Trifolium pratense* L. všech tří variet (Sprint, Tempus a DO-8), je zřejmé, že nejvýraznější pozitivní efekt na produkci flavonoidů má v případě 48 hodinového působení v nejnižší koncentraci 1 mg/100ml, kdy došlo ve varietě Sprint, Tempus i DO-8 ke stanovení maximálního obsahu flavonoidů ve vzorku.

Pozitivní vliv chitosanu jako stimulantu produkce sekundárních metabolitů lze potvrdit také na základě článků publikovaných v odborných periodících.

Příkladem úspěšné elicítace chitosanem je experiment zveřejněný v roce 2016, kdy byla zkoumána indukce aromatických aminokyselin a fenylypropanoidových sloučenin v suspenzní kultuře *Scrophularia striata* Boiss. V pokusu byly použity tři koncentrace chitosanu (10, 50 a 100 mg/l), které byly přidány ke kulturám 7 dní po subkultivaci. Elicítované kultury byly odebrány 5 dní po aplikaci elicitoru. Všechny tři testované koncentrace chitosanu vyvolaly významnou indukci fenylypropanoidových sloučenin, avšak největší nárůst celkového obsahu fenolů,

flavonoidů a flavanolů byl pozorován u koncentrace 100 mg/l. Tato studie ukázala pozitivní vliv elicitoru chitosanu na produkci sekundárních metabolitů v suspenzní kultuře *Scrophularia striata* Boiss. [53]

Další studie se zaměřila na vliv chitosanových a chitinových oligomerů na genovou expresi a produkci lignanů v buněčných kulturách *Linum album*. Buňky byly po dobu pěti dní vystaveny působení oligomerů chitosanu a chitinu o koncentraci 100 mg/l. Výsledky ukázaly, že produkce lignanů byla zvýšena všemi testovanými oligomery obou látek, avšak nejvyšší množství podofylotoxinu (73,5 µg/g sušiny) a larciresinolu (96 µg/g sušiny) bylo dosaženo působením hexameru chitosanu. Množství podofylotoxinu tak bylo třikrát vyšší než u kontrolního vzorku, obsah larciresinolu se v porovnání s kontrolou zdvojnásobil. [54]

Pozitivní elicitální účinek oligomerů chitosanu a chitinu byl prokázán také v jiné práci, která studovala aktivitu fenylalanin amoniak-lyázy (PAL) a tyrosin amoniak-lyázy (TAL), jakožto klíčových enzymů fenylpropanoidové dráhy. Elicitory byly aplikovány na listy sóji (*Glycine max* L.) v koncentraci 100 µmol/l po dobu 12, 24, 36, 48, 60 a 72 hodin. Aplikace chitosanu a chitinu, resp. jejich oligomerů, způsobila zvýšenou aktivitu obou enzymů, PAL i TAL. Ve srovnání s kontrolami bylo maximální aktivity dosaženo po 36 hodinách hexamerem chitinu a pentametrem chitosanu. Celkový obsah fenolických látek v sójových listech po elicitaci oligomery chitosanu a chitinu vzrostl, což poukazuje na pozitivní korelaci mezi enzymovou aktivitou a celkovým fenolickým obsahem. [55]

V dalším experimentu byla zkoušena kombinace elicitace chitosanem a následného přidání Diaion® HP-20 (styren-divinylbenzenové pryskyřice) ke kořenovým kulturám *Plumbago indica* L. s cílem zvýšení produkce plumbaginu. Chitosan byl aplikován v koncentraci 150 mg/l po dobu 72 hodin. Ve srovnání s kontrolním vzorkem se množství plumbaginu zvýšilo 6,6krát. Následné přidání Diaion® HP-20 o koncentraci 10 g/l a její působení po dobu 48 hodin, výrazně zvýšilo obsah stanovované látky. Množství plumbaginu bylo až 10krát vyšší než u neošetřené kořenové kultury. Schopnost chitosanu zvýšit produkci plumbaginu v tak velkém množství by mohla být způsobena napodobením houbové infekce, která vyvolala přirozenou obranyschopnost, nebo zvýšením tvorby enzymů podílejících se na biosyntéze plumbaginu, stejně jako enzymů zahrnutých ve fenylpropanoidové dráze jiných sekundárních metabolitů. [56]

Zvýšením produkce plumbaginu v kořenových kulturách *Plumbago indica* L. se zabývala také další studie stejných autorů jako u předchozí zmíněné publikace, která

posuzovala účinky celkem 12 biotických a abiotických elicitorů, včetně chitosanu. Kromě L-alaninu a 1-naftolu byl mezi nejlepšími elicitory k podpoře produkce plumbaginu také chitosan, který v koncentraci 150 mg/l významně zvýšil jeho obsah v sušině na 10,6 mg/g, což bylo 5,5krát více než u neošetřených kořenových kultur. [57]

Jiný pokus studoval elicitaci chitosanem za účelem zvýšení produkce kurkuminu, a také stimulaci obranné reakce u kurkumy (*Curcuma longa* L.). Chitosan o koncentraci 0,1 % byl sprejem aplikován na rostlinu každých 30 dní (celkem 7krát). Odběr vzorků byl prováděn 5 dní po každém postřiku. Použití chitosanu jako elicitoru vyvolalo zvýšení obsahu kurkuminu v oddencích, stejně jako zvýšení celkové produkce kurkuminu na rostlinu. V porovnání s kontrolami bylo množství kurkuminu v rhizomech o 56 % vyšší a produkce v celkové rostlině byla zdvojnásobena. Studie poukazuje na použití chitosanu jako ekologicky šetrné sloučeniny pro zvýšení produkce kurkuminu rostliny *Curcuma longa* L. [58]

Chitosan zvýšil také produkci xanthonů v *in vitro* kulturách *Hypericum perforatum* za současného snížení produkce flavonoidů. Kromě xanthonů indukoval chitosan také tvorbu 1,7-dihydroxyxanthonu (euxanthonu) a cadensinu G. Tyto látky ovšem nebyly detekovány v kontrolních vzorcích. [59]

Positivní elicitací účinek chitosanu byl uveden také v práci, která popisuje aplikaci chitinu a chitosanu jako potenciálních elicitorů kumarinů a fluorochinolových alkaloidů v *in vitro* kulturách *Ruta graveolens* L. Pokusy byly prováděny za použití dvou koncentrací chitinu i chitosanu (0,1% a 0,01%). Výsledky ukazují, že obě sloučeniny indukovaly významný nárůst koncentrací téměř všech metabolitů. V případě furanokumarinů, 0,1% chitosan zdvojnásobil produkci sekundárních metabolitů ve srovnání s jeho nižší koncentrací (0,01%). Jako příklad lze uvést bergapten, jehož množství v sušině činilo až 904,3 µg/g. [60]

Suspenzní kultura *Taxus chinensis* byla elicitována chitosanem, methyl jasmonátem a stříbrnými ionty. Kromě samostatného působení jednotlivých elicitorů byla testována také jejich kombinace. Největší produkce paklitaxelu bylo dosaženo kombinací chitosanu o koncentraci 50 mg/l, methyl jasmonátu o koncentraci 60 µg/l a Ag⁺ iontů o koncentraci 30 µg/l. Stanovené množství paklitaxelu bylo při tomto složení elicitorů 25 mg/l, což je téměř 40krát více než v případě kontroly a 6krát více než při elicitaci samotným chitosanem. [61]

Jiná práce sledovala elicitací účinek chitosanu a pektinu v suspenzních kulturách *Morinda citrifolia* L. na produkci antrachinonů, fenolů a flavonoidů.

Elicitory byly používány samotné nebo ve vzájemné kombinaci. Optimální koncentrace chitosanu pro zvýšení biosyntézy sekundárních metabolitů byla 0,2 mg/ml. Při této koncentraci elicitoru bylo množství stanovovaných látek v sušině 103,16 mg/g v případě antrachinonů, 48,57 mg/g v případě fenolů a 75,32 mg/g v případě flavonoidů. [62]

Pozitivní vliv chitosanu na produkci sekundárních metabolitů potvrdily také další studie, např. u kultur *Mentha piperita* L. [63], *Cocos nucifera* [64], *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* [65] nebo *Pueraria candollei* [66].

Na základě všech uvedených studií a také výsledků této diplomové práce lze potvrdit, že biotický elicitor chitosan je vhodným stimulatorem produkce sekundárních metabolitů v rostlinných explantátových kulturách.

7 ZÁVĚR

Byl sledován vliv chitosanu jako biotického elicitoru na produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint, Tempus a DO-8).

Výsledky této práce mohou být shrnuty následovně:

1. Nejvyšší obsah flavonoidů po elicitaci roztokem chitosanu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. varieta Sprint (0,253 %) byl dosažen po 48 hodinové aplikaci elicitoru o koncentraci 1 mg/100ml, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 61 % oproti kontrolní kultuře.
2. Nejvyšší obsah flavonoidů po elicitaci roztokem chitosanu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. varieta Tempus (0,280 %) byl dosažen po 48 hodinové aplikaci elicitoru o koncentraci 1 mg/100ml, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 104 % oproti kontrolní kultuře.
3. Nejvyšší obsah flavonoidů po elicitaci roztokem chitosanu v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. varieta DO-8 (0,381 %) byl dosažen po 48 hodinové aplikaci elicitoru o koncentraci 1 mg/100ml, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 114 % oproti kontrolní kultuře.
4. Zdá se, že nejvýznamnější z hlediska zvýšení obsahu flavonoidů u všech tří variet suspenzních kultur je 48 hodinová aplikace chitosanu o koncentraci 1 mg/100ml.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Jahodář, L.: Farmakobotanika: semenné rostliny. Praha: Karolinum 2009; s. 9.
- [2] Tůmová, L., Tůma, J.: Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat. Chem. Listy. 2009; 103, 503-510.
- [3] Siatka, T., Sklenářová, H., Kašparová, M. et al.: Vliv chloridu rtuťnatého na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Chem. Listy. 2011; 105, 367-370.
- [4] Kašparová, M.: Fytoestrogeny z jetele lučního. Prakt. lékáren. 2013; 9, 201-203.
- [5] Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. Čes. slov. Farm. 2009; 58, 67-70.
- [6] Pilát, A., Ušák, O.: Atlas rostlin. Praha: SPN 1964; s. 112.
- [7] Slavík, B. et al.: Květena České republiky 4. Praha: Academia 1995; 532 s.
- [8] Gran, J., Jung, R., Münker, B.: Bobulovité, užitkové a léčivé rostliny. Praha: Ikar 1996; s. 102.
- [9] ---: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cleaned-Illustration_Trifolium_pratense.jpg; použito 6.3.2018.
- [10] Korbel, V., Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství. Praha: Avicenum 1990; s. 178.
- [11] Janča, J., Zentrich, J. A.: Herbář léčivých rostlin 2. díl. Praha: Eminent 1995; 290 s.
- [12] Nagy, M., Mučaji, P., Grančai, D.: Farmakognózia. Bratislava: Herba 2015; s. 31.
- [13] Spilková, J. et al.: Farmakognozie. Praha: Karolinum 2016; 346 s.
- [14] Hubík, J. et al.: Obecná farmakognosie II. Praha: SPN 1989; 297 s.
- [15] Tomko, J. et al.: Farmakognózia. Martin: Osveta 1999; 424 s.
- [16] ---: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavan.PNG>; použito 8.4.2018.
- [17] ---: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Isoflavan.PNG>; použito 8.4.2018.
- [18] ---: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neoflavonoid.PNG>; použito 8.4.2018.
- [19] ---: <https://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>; použito 8.4.2018.
- [20] ---: <https://en.wikipedia.org/wiki/Apigenin>; použito 8.4.2018.
- [21] Klejduš, B., Štěrbová, D., Stratil, P. et al.: Identifikace a charakterizace isoflavonů v rostlinných extraktech za použití kombinace HPLC s hmotnostním

detektorem a detektorem s diodovým polem (HPLC-DAD-MS). Chem. Listy. 2003; 97, 530-539.

[22] ---: <https://en.wikipedia.org/wiki/Daidzein>; použito 9.4.2018.

[23] ---: <https://en.wikipedia.org/wiki/Daidzin>; použito 9.4.2018.

[24] Vrzáňová, M., Heresová, J.: Fytoestrogeny.

<https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2004/01/05.pdf>; použito 10.4.2018.

[25] Deavours, B. E., Dixon, R. A.: Metabolic Engineering of Isoflavonoid Biosynthesis in Alfalfa. Plant Physiol. 2005; 138, 2245-2251.

[26] Pičmanová, M.: Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2008; s. 10.

[27] Slíva, J.: Isoflavony v současné medicíně. <http://www.edukafarm.cz/c583>; použito 10.4.2018.

[28] Ren, M. Q., Kuhn, G., Wegner, J. et al.: Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties. Eur. J. Nutr. 2001; 40, 135-146.

[29] Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty. Praha: Karolinum 2001; s. 75.

[30] Kováč, J.: Explantátové kultury rostliny. Olomouc: Univerzita Palackého 1995; 140 s.

[31] Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty. Praha: Karolinum 1992; 153 s.

[32] Kincl, M., Krpeš, V.: Základy fyziologie rostlin. Ostrava: Ostravská univerzita 2006; s. 187.

[33] Dušek, J., Dušková, J., Tůmová, L. et al.: Biotechnologické využití kultur vyšších rostlin *in vitro*. Čes. slov. Farm. 1996; 45, 204-212.

[34] Kašparová, M., Dušek, J.: Vliv biotické elicitace na produkci anthraglykosidů tkáňovou kulturou *Rheum palmatum* L. Čes. slov. Farm. 1999; 48, 132-135.

[35] Vodrážka, Z.: Biotechnologie. Praha: Academia 1992; s. 65.

[36] Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin. Praha: Academia 1998; 484 s.

[37] Namdeo, A. G.: Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. Phcog. Rev. 2007; 1, 69-79.

[38] Narayani, M., Srivastava, S.: Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. Phytochem. Rev. 2017; 16, 1227-1252.

- [39] Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D. et al.: Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*. 2016; 21, 182-205.
- [40] Vavříková, E., Vinšová, J.: Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chem. Listy*. 2009; 103, 56-65.
- [41] Tran, D. L. et al.: Some biomedical applications of chitosan-based hybrid nanomaterial. *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* 2011; 2, 1-6.
- [42] Uraganu, T. (ed.), Tokata, S. (ed.): *Material Science of Chitin and Chitosan*. New York: Springer 2006; 284 s.
- [43] Periyah, M. H., Halim, A. S., Saad, A. Z. M.: Chitosan: A Promising Marine Polysaccharide for Biomedical Research. *Phcog. Rev.* 2016; 10, 39-42.
- [44] Malerba, M., Cerana, R.: Chitosan Effects on Plant Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17, 996.
- [45] Mackay, R. G., Tait, J. M.: *Handbook of Chitosan Research and Applications*. New York: Nova Science Publishers 2012; 492 s.
- [46] Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 1968; 50, 151-158.
- [47] Kašparová M., Siatka T., Spilková J. et al.: Explantátová kultura *Trifolium pratense* L. *Čes. slov. Farm.* 2006; 55, 44-47.
- [48] Kolektiv autorů: *Český lékopis 2017*. Praha: Grada 2017; s. 3998.
- [49] Klemra, P., Klemrová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. 1. vyd. Praha: Karolinum 1999.
- [50] Łuczkiwicz, M., Głód, D.: Callus cultures of *Genista* plants – in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Sci.* 2003; 165, 1101-1108.
- [51] Tůmová, L., Polívková, D.: Vliv AgNO₃ na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. *in vitro*. *Čes. slov. Farm.* 2006; 55, 186-188.
- [52] Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: Biotická elicítace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. *Čes. slov. Farm.* 2008; 57, 107-110.
- [53] Kamalipourazad, M., Sharifi, M., Maivan, H. Z. et al.: Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. *Plant Physiol. Biochem.* 2016; 107, 374-384.

- [54] Bahabadi, S. E., Sharifi, M., Murata, J. et al.: The effect of chitosan and chitin oligomers on gene expression and lignans production in *Linum album* cell cultures. J. Med. Plants. 2014; 14, 46-53.
- [55] Khan, W., Prithiviraj, B., Smith, D. L.: Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosin ammonia-lyase activities in soybean leaves. J. Plant Physiol. 2003; 160, 859-863.
- [56] Panichayupakaranant, P., Jaisi, A.: Chitosan elicitation and sequential Diaion® HP-20 addition a powerful approach for enhanced plumbagin production in *Plumbago indica* root cultures. Process. Biochem. 2017; 53, 210-215.
- [57] Jaisi, A., Panichayupakaranant, P.: Increased production of plumbagin in *Plumbago indica* root cultures by biotic and abiotic elicitors. Biotechnol. Lett. 2016; 38, 351-5.
- [58] Sathiyabama, M., Bernstein, N., Anusuya, S.: Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). Ind. Crops. Prod. 2016; 89, 87-94.
- [59] Tocci, N., Ferrari, F., Santamaria, A. R. et al.: Chitosan enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* cell cultures. Nat. Prod. Res. 2010; 24, 286-93.
- [60] Orlita, A., Sidwa-Gorycka, M., Paszkiewicz, M. et al.: Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and fluoroquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). Biotechnol. Appl. Biochem. 2008; 51, 91-6.
- [61] Zhang, C. H., Mei, X. G., Liu, L. et al.: Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Biotechnol. Lett. 2000; 22, 1561-1564.
- [62] Baque, M. A., Shiragi, M. H. K., Lee, E. J. et al.: Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). AJCS. 2012; 6, 1349–1355.
- [63] Salimgandomi, S., Shabrangy, A.: The effect of Chitosan on antioxidant activity and some secondary metabolites of *Mentha piperita* L. JPHS. 2016; 4, 135-142.
- [64] Chakraborty, M., Karun, A., Mitra, A.: Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. J. Plant Physiol. 2009; 166, 63-71.
- [65] Yin, H., Fretté, X. C., Christensen, L. P. et al.: Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). J. Agric. Food Chem. 2012; 60, 136-43.

[66] Udomsuk, L., Jarukamjorn, K, Tanak, H.: Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnol. Lett.* 2010; 33, 369-374.

9 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Kandidát: Adriana Blahušová

Školitel: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium sekundárních metabolitů v rostlinných explantátových kulturách I

Základním předpokladem úspěšné elicitace, která se využívá ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů, je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby působení elicitoru na rostlinnou kulturu *in vitro*, což bylo předmětem této diplomové práce.

Byl sledován vliv 6, 24, 48 a 168 hodinového působení roztoku chitosanu (ve čtyřech koncentracích) na produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Sprint, Tempus a DO-8).

Kultura byla kultivována na médiu podle Gamborga s přidavkem 2 mg/l 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 2 mg/l 6-benzylaminopurinu, při teplotě 25°C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma.

Nejlepší elicitální účinek chitosanu na produkci flavonoidů byl u všech tří zkoumaných variet po 48 hodinové aplikaci nejnižší koncentrace 1 mg/100ml.

10 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmacognosy

Candidate: Adriana Blahušová

Supervisor: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The study of secondary metabolites in plant tissue cultures I

A principal precondition for successful elicitation used to increase the production of secondary metabolites is, among other, finding a suitable elicitor, its concentration and the optimal period of time of the action of the elicitor on the plant culture *in vitro*, which was the aim of the present diploma thesis.

The effect was examined of a 6, 24, 48 and 168 hour action of the solution of chitosan (in four concentrations) on the production of flavonoids in the suspension culture *Trifolium pratense* L. (variety Sprint, Tempus and DO-8).

The culture was cultivated in Gamborg medium to which 2 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2 mg/l of 6-benzylaminopurine were added, at the temperature of 25°C and 16 hours light/8 hours dark period.

The best elicitation effect of chitosan on the production of flavonoids was the lowest concentration of 1 mg/100ml in all three studied varieties after 48 hours of application.