

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L.

Lucie Sosvorová

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

Vedoucí diplomové práce: Pharm.Dr. Marie Kašparová, PhD.

Oponent:

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

Úvodem své diplomové práce bych chtěla poděkovat Pharm.Dr. Marii Kašparové, PhD. za metodické vedení, cenné rady, připomínky a ochotu v celém průběhu jejího zpracování.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	2
3. TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1. Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L., Fabaceae)	3
3.1.1. Botanický popis rostliny.....	3
3.1.2. Výskyt.....	5
3.1.3. Odrůdy.....	5
3.1.4. Sběr a použití drogy.....	5
3.1.5. Obsahové látky.....	6
3.1.5.1. Flavonoidy.....	6
3.1.5.2. Isoflavonoidy.....	9
3.1.6. Fytoestrogeny v léčbě menopauzálního syndromu.....	13
3.2. Explantátové kultury rostlin	15
3.2.1. Úvod.....	15
3.2.2. Charakteristika.....	15
3.2.3. Základní termíny.....	16
3.2.4. Základní principy.....	16
3.2.5. Kultivace rostlinných kultur in vitro.....	17
3.2.5.1. Odvození a udržování kultury.....	18
3.2.5.2. Buněčné suspenzní kultury.....	18
3.2.5.3. Růst a pasážování suspenzních kultur.....	19
3.2.5.4. Fyzikální podmínky kultivace.....	21
3.2.5.5. Kultivační médium.....	22
3.2.5.6. Růstové regulátory.....	24
3.2.6. Biotechnologické využití explantátových kultur.....	26
3.2.6.1. Tvorba sekundárních metabolitů.....	26
3.2.6.2. Rozmnožování a šlechtění rostlin.....	28
3.3. Elicitace	30
3.3.1. Elicitory.....	30
3.3.1.1. Klasifikace elicitorů.....	30
3.3.1.2. Mechanismus účinku elicitorů.....	32
3.3.2. Faktory ovlivňující elicitaci.....	33

3.4. Těžké kovy	35
3.4.1. Rtuť	36
3.5. Kyselina jasmínová	37
3.6. HPLC	38
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1. Použitý materiál, přístroje, pomůcky	40
4.1.1. Rostlinný materiál	40
4.1.2. Stanovení ztráty sušením	40
4.1.3. Chemikálie	40
4.1.4. Přístroje a pomůcky	41
4.2. Kultivace explantátové kultury	42
4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje	42
4.2.2. Příprava živného média	42
4.2.3. Podmínky pasážování a kultivace	43
4.3. Elicitace	44
4.3.1. Příprava roztoků elicitoru	44
4.3.2. Elicitace a odběr kultur	44
4.4. Stanovení obsahu flavonoidů	45
4.4.1. Princip stanovení	45
4.4.2. Postup stanovení	45
4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů	47
4.5.1. Princip stanovení	47
4.5.2. Postup stanovení	47
4.6. Statistické vyhodnocení	48
5. VÝSLEDKY	50
5.1. Tabulky	50
5.2. Grafy	53
6. DISKUZE	55
7. ZÁVĚR	58
8. SEZNAM LITERATURY	59
9. SOUHRN	63

1. ÚVOD

Rostliny jsou již od nejstarších dob pro člověka důležitým zdrojem potravy, ale zároveň také slouží k terapii rozličných nemocí. Způsob použití léčivých rostlin se postupem času velmi změnil. Zatímco dříve převládalo přímé použití drog nebo z nich zhotovených přípravků, používají se dnes velmi často izolované čisté látky. (14) Řada přírodních účinných látek se stala předlohou pro synteticky vyráběná léčiva, která se používají jako taková, nebo dochází k obměnám jejich struktury za účelem dosažení výhodnějších terapeutických vlastností. V důsledku velkého množství přírodních struktur, komplikované syntézy a časové i ekonomické náročnosti, není průmyslová výroba u velkého množství přírodních látek možná. V těchto případech zůstávají léčivé rostliny jediným využitelným zdrojem terapeuticky účinných látek.

Rostlinný materiál se pro další zpracování získává sběrem intaktních rostlin či z polních monokultur. Tyto metody mají ovšem řadu nedostatků, jako je možnost výskytu škůdců, chorob, sezónní sklizeň, závislost produkce na podnebí, počasí, teplotě, světle, půdních a vodních podmínkách atd. V závislosti na těchto faktorech může dojít ke změnám množství a poměrného zastoupení jednotlivých rostlinných metabolitů. (25)

Tyto obtíže vedou k hledání alternativních způsobů získávání rostlinných metabolitů. Jednou z možností je využití biotechnologických metod založených na kultivaci rostlinných buněk a tkání. Jde o kultivaci *in vitro* rostlinných explantátů, kdy metabolity mohou být produkovány a kontrolovány za daných podmínek. Kultivace probíhá bez závislosti na přírodních podmínkách, produkovaná biomasa je sterilní a vysoce homogenní. (20)

Množství účinných látek (sekundárních metabolitů) získaných z explantátové kultury bývá bohužel oproti intaktní rostlině nižší. Jedním z efektivních způsobů zvýšení produkce sekundárních metabolitů je metoda elicitace. Využívá se zde vlastnosti rostlin a *in vitro* kultur reagovat na různé stresové podněty kaskádou obranných reakcí s následným zvýšením produkce sekundárních metabolitů. (53,62,63)

V současnosti dochází díky širokému spektru biologických účinků ke vzrůstu zájmu o produkci flavonoidů a isoflavonoidů explantátovými kulturami. Vhodným zdrojem těchto látek se jeví jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*)

Problematikou elicitace explantátové kultury *Trifolium pratense* L. kyselinou jasmínovou a chloridem rtuťnatým se zabývá i tato diplomová práce.

2. CÍL PRÁCE

1. Seznámení se s metodikou kultivace a elicitace rostlinných tkáňových kultur *in vitro*
2. Sledování vlivu působení různých koncentrací elicitorů kyseliny jasmínové a chloridu rtuťnatého v různých časových intervalech 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*

Jetel luční je vytrvalá (u některých forem jen dvou až tříletá) bylina dosahující výšky 15–100 cm. Druh je ve vzrůstu mimořádně proměnlivý. Další četné variability nacházíme také ve velikosti i v odění lodyh a palistů podpůrných listů.

Kořen této byliny je dlouhý křovitě rozvětvený, mnohohlavý a sahá hluboko do půdy (až 50 cm). Tři až pětičlankové lodyhy vyrůstající z přízemní listové růžice jsou většinou mírně hranaté, četné, přímé, vystoupavé až poléhavé, jednoduché či chudě větvené. Povrch lodyhy je bělavě chlupatý, v některých případech jsou lodyhy olysalé až téměř lysé, často načervenalé. Všechny listy jsou trojčetné, spodní dlouze řapíkaté, střední a horní s řapíky kratšími, až téměř přisedlé. Listy jsou složeny z lístků maximálně 15 × 30 mm velikých, obvejčitých až téměř okrouhlých, skoro celokrajných, na lici lysých a s příčnou bělavou nebo červenohnědou skvrnou ve tvaru půlměsíce. Lístky jsou nezřetelně řapíkaté, mají jen málo vyniklé žilky, vespod jsou místy přitiskle chlupaté a na okraji brvitě.



Květy se uspořádávají do hlávek, které vyrůstají zdánlivě na vrcholu lodyhy. Mají kulatý nebo vejčitý tvar a jsou většinou přisedlé, podepřené palisty nejhořejších listů. Průměrná velikost hlávek je 2-3 cm. Každá hlávka je složena z 30-60 květů průměrně 16-18 mm dlouhých. Květy jsou přímé a přisedlé, pětičetné, vždy bez listenů, složené z desetižilného kalichu, který je vně krátce chlupatý a má dolní zub delší, zbarvený karmínově až červeně (zřídka bělozeleně). Koruny jsou na bázi srostlé.



Plodem jsou jednosemenné lusky vejcovitého tvaru. Semena jsou nesouměrně srdcovitá, poněkud zploštělá, 1,5-2,0 mm dlouhá, 1,2-1,5 mm široká, žlutá až pískově hnědá. *Trifolium pratense* L. kvete od května do října. (1,2,3,4,5)



3.1.2 Výskyt

Trifolium pratense L. je rozšířen téměř po celé Evropě, dále pak v západní Asii až po Altaj, Bajkal a severní Indii. Zavlečený, zdomácnělý a pěstovaný je ovšem také ve východní Asii, v jižní Africe a v Austrálii. Jetel luční můžeme najít i v Severní a Jižní Americe a na Novém Zélandu, kde ovšem roste jen planě. Tato bylina je pěstována na polích jako píce, roste také často na lukách, pastvinách, stráních, v příkopech a okrajích cest a lesů. Je to rostlina poměrně přizpůsobivá, výborně se jí daří v nížinách, stejně jako ve vyšších nadmořských výškách. (1,6,7)

3.1.3. Odrůdy

V České republice rozeznáváme 3 poddruhy *Trifolium pratense* L. Tyto poddruhy bývají někdy hodnoceny jako odrůdy.

- *Trifolium pratense subsp. pratense* (Jetel luční pravý) - vyznačuje se hustě přitiskle chlupatými lodyhami a lístky. Tato odrůda se používá převážně jako léčivka a roste pouze v nižších nadmořských výškách.
- *Trifolium pratense subsp. sativum* (Jetel luční setý) – tato odrůda se od ostatních odlišuje především příčnou skvrnou na lístcích a velkým květenstvím. Jetel luční setý má velký význam hospodářský, představuje jednu z nejvýznamnějších pícnin.
- *Trifolium pratense subsp. americanum* (Jetel luční americký) – odlišuje se drsně odstále rezavě chlupatými lodyhami. Tento poddruh byl do ČR přivezen ze Severní Ameriky v 80. letech 19. století, ale později se od jeho pěstování upustilo. (1)

3.1.4. Sběr a použití drogy

Jako droga se používají sušené nerozpadlé květní hlávky - *Trifolium pratense flos*. Červeně či karmínově zbarvené květní hlávky otrháváme od května do srpna. Hlávky musí být čerstvě vykvétlé, překvetlé jsou bezcenné, při sušení hnědnou a rozpadávají se. Květy můžeme jeden den vystavit v jednoduché vrstvě přímému slunci a pak dosušit ve stínu a v průvanu. Sušíme-li hlávky uměle, teplota by neměla překročit 35°C. Poměr seschnutí je u

jetele 6:1. Hlavní podmínkou sušení je, aby hlávky zůstaly v celku a nebyly uvnitř suché. Častým přehrabáváním se totiž hlávky snadno rozpadají a dávají bezcennou drť. Správně usušená droga si zachovává původní barvu, či trochu ztmavne, droga nesmí být ovšem rezavá. Droga podléhá poměrně rychle zkáze, proto ji při uchovávání chráníme před světlem a vlhkem. (2,3)

V lidovém léčitelství je jetel luční nejčastěji užíván ve formě nálevu (2 čajové lžičky drogy na šálek vody) jako antidiarhoikum. Tradičně se také používá při kašlích a bronchitidách. Bylo zjištěno, že snižuje svalový spasmus a působí jako dekongescens a expektorans. Droga byla také často užívána k čištění krve. Zevně má nálev užití jako kožní desinficiens na ekzémy a hnisavé rány, používá se také do obkladů při průušnicích.

V současnosti se droga upotřebuje jako chuťové a vonné korigens do čajových směsí. Nemalý význam má dnes *Trifolium pratense* L. v nehormonální substituční terapii žen v menopauze. Jeho estrogení aktivita je dnes velmi často využívána a přípravky s obsahem této drogy mají u pacientek vesměs velmi pozitivní účinky a ohlasy. V poslední době byl také objeven pozitivní účinek jetele lučního při léčbě rakoviny prsu. (2,3,8,33)

3.1.5. Obsahové látky

V *Trifolium pratense* L. najdeme poměrně rozsáhlé spektrum obsahových látek. Patří sem flavonoidy, isoflavonoidy, glykosidy (tricholin), třísloviny, kumariny, saponiny, organické kyseliny (salicylová, šťavelová, kumarová, hroznová aj.), fenolické látky, silice, pryskyřice, tanin, bílkoviny, aminokyseliny (asparagin v listech), vitaminy, minerální látky (Co a Cu), antokyany a flavonová barviva. Z hlediska moderního terapeutického použití se jako nejvýraznější skupina látek jeví isoflavonoidy. Mezi ně řadíme biochanin A a formononetin, které se vyskytují ve větší míře, dále pak genistein, genistin, daidzein, kumestrol, ononin a trifoliol. (2,5,9,10,39)

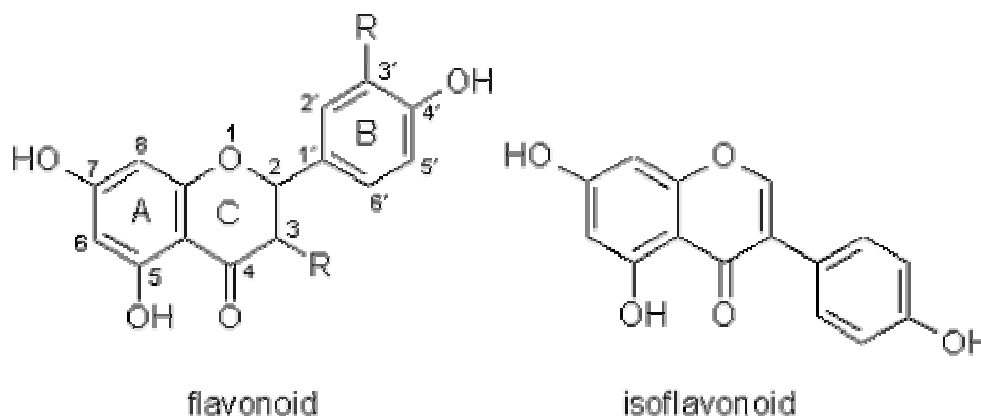
3.1.5.1. Flavonoidy

Flavonoidy neboli flavonoidní látky patří mezi rostlinné sekundární metabolity. Je to velice rozsáhlá skupina rostlinných fenolů, v současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny. Tyto látky jsou v rostlinné říši velmi rozšířeny, jedná se o ve vodě rozpustná barviva (především červená, modrá a

purpurová) zodpovědná za barvu květů, plodů a někdy i listů. (31) 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 epidermis listu nebo současně do epidermis i mezofylu listu. Oba typy tkání mohou pak kumulovat odlišné typy flavonoidů. Aglykony se nejčastěji nachází v kutikule listů. Důvodem je vyšší lipofilita (hydroxylové skupiny ve struktuře sloučeniny jsou částečně nebo úplně methylované) a tím pádem lepší rozpustnost ve voskové vrstvě na povrchu listu. V květech jsou flavonoidy uloženy v buňkách epidermis. Flavonoidy můžeme najít také v oplodí plodů, semenech a pylových zrnech. Flavonoidní látky najdeme také v silicích. Zde se vyskytují nejčastěji ve své methoxylované a methylované formě, či flavonoidy chudé na kyslík (mají vyšší lipofilitu). (11,12,14)

Chemická struktura:

Flavonoidy jsou deriváty kyslíkaté heterocyklické sloučeniny fenylchromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (u isoflavonoidů v poloze 3, neoflavonoidů v poloze 4)



Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami. Jednotlivé deriváty se pak navzájem liší pouze počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin. Dle stupně oxidace pyranového kruhu rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů :

flavany, flaveny, flavanony, flavanoly, flavanonoly, flavandioly, chalkony, katechiny, leukoanthokyanidiny a anthokyanidiny. (13,12,11,31)

Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů. Glykosidy jsou látky obsahující ve své molekule cukernou a necukernou složku (aglykon neboli genin). Cukry se ve glykosidech vyskytují v cyklické formě. Většinou se aglykon kondenzuje svou OH- skupinou s OH- skupinou cukru, vzniká pak spojení přes – O – (tzv. O-glykosidy). Flavonoidní látky se mohou také vyskytovat ve formě aglykonů, ale to pouze velmi zřídka. Tento jev může nastat např. při technologickém zpracování při vyšších teplotách a v kyselém prostředí, kdy často dochází k hydrolýze glykosidů a vzrůstu koncentrace aglykonů. (12,13)

Biosyntéza:

Aglykony flavonoidních glykosidů vznikají oběma hlavními cestami vedoucími k syntéze aromatických látek v biologických systémech. Jeden šestiuhlíkový fragment se odvozuje z acetátového metabolismu a zbývající devítiuhlíková část od kyseliny šikmové. Meziproduktem biosyntézy je patnáctiuhlíkatý chalkon vznikající z kyseliny skořicové a tří molekul acetátu. Tento meziprodukt je později přetvářen na flavon a dává tak základ všem ostatním flavonoidům.

Funkce v rostlinném organismu:

Flavonoidy často zapříčiňují barevnost rostlin a působí tak jako hmyzí atraktanty, které pomáhají lákat opylovače. Tyto látky nemusí být vždy barevné, ale mohou přispívat ke zbarvení pouze jako kopigmenty. V některých případech absorbují záření blízké UV a výsledná barva je vnímána pouze hmyzem. Flavonoidy jsou přítomny také v kutikule listů a epidermálních buňkách, kde působí jako antioxidanty a chrání tak pletiva před ničivým účinkem UV záření. Význam pro rostliny má zřejmě také jejich účast na oxidoredukčních pochodech a pravděpodobně i při pohlavním rozmnožování rostlin. (11,14,15) Některé

flavonoidy mají schopnost působit jako inhibitory jiných rostlinných enzymů (tyrosinázy, glykosidázy, diacylglycerol acetyltransferázy aj.) (16,17,18,28) Bylo objeveno, že flavonoidy některých rostlin působí v rostlinném organismu jako fytoalexiny. Tyto látky s nízkou molekulovou hmotností mají antimikrobiální aktivitu a rostlina je schopna jejich syntézy po napadení mikroorganismy. (11,19)

Biologická aktivita:

Pro své všestranné působení na organismus bývají flavonoidy často označovány jako bioflavonoidy. Jejich terapeutické užití se zakládá na schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemorhagicky a antiedematózně (účinek P-vitamínu). Jsou inhibitory hyaluronidázy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi a jsou proto podpůrnými prostředky při léčení infekčních nemocí. Některé flavonoidy působí diureticky, rozšiřují cévy a snižují krevní tlak. Vázáním iontů vápníku tvoří komplexní soli. Brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C a mají též vlastnosti choleretické, cholagogní a spasmolytické. (13,14,26) U některých flavonoidů, zvláště u licoflavonu C, byla v poslední době objevena také výrazná estrogenní aktivita porovnatelná s účinností isoflavonoidu genisteinu. (30)

3.1.5.2. Isoflavonoidy

Isoflavonoidy patří stejně jako flavonoidy do rozsáhlé skupiny sekundárních rostlinných metabolitů. Všechny známé isoflavonoidy jsou látky zodpovědné za barvu květů a plodů. Isoflavonoidy se také podílejí na růstu klíčků, výhonů a pupenů, ve kterých se vyskytují v hojné míře. Bylo objeveno, že tyto látky se jistým způsobem mohou také podílet na obraně rostlinného organismu (antimikrobiální aktivita). (32,36)

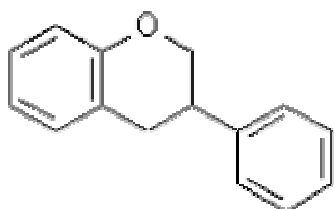
Přírodně se vyskytující isoflavonoidy jsou rostlinné metabolity s estrogenní aktivitou a společně s kumestany a lignany tak představují hlavní řadu aktuálně pozorovaných u fytoestrogenů. Estrogenní účinky isoflavonoidů byly poprvé pozorovány roku 1940 u australských ovcí, které trpěly tzv. "jetelovou nemocí". Ovce které spásaly převážně jetelové pastviny trpěly poruchami reprodukce, abnormální laktací, změnami pohlavních orgánů, permanentní neplodností, prolapsy uteru a velmi těžkými porody. Problémy této nemoci analyzoval a příčinu určil veterinář Henry Bennets již roku 1946. (33,34,35)

Isoflavony byly prvně objeveny u čeledi *Fabaceae* (*Glycine max*, *Trifolium pratense*, *Arachis hypogaea*). Vyskytují se také v čeledích *Iridaceae*, *Euphorbiaceae* a *Asteraceae* (*Helianthus spp.*). V rostlinách je najdeme nejčastěji ve formě glykosidů, některé však také ve formě aglykonů. Nejrozšířenějšími přírodně se vyskytujícími aglykony jsou daidzein, genistein, biochanin A a formononetin. Nejúčinnějšími glykosidy zastoupenými hlavně v čeledi *Fabaceae* jsou daidzin a genistin. Během zpracování, izolace a analýzy jsou tyto látky chemicky či enzymaticky degradovány na aglykony. Po perorálním užití se daidzein a genistein metabolizují v gastrointestinálním traktu, biochanin A a formononetin se mohou vzájemně během metabolismu přeměňovat na genistein a daidzein. (33)

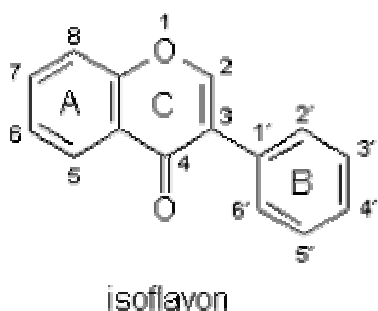
Typickým izoflavonoidem jetele je formononetin. Ten je sice sám o sobě neúčinný, ale působením střevní mikroflóry se postupně mění na daidzein, dihydrodaidzein a equol. Až poslední jmenovaná látka je účinným fytoestrogenem, jako taková se v jeteli tedy nevyskytuje. (35)

Chemická struktura:

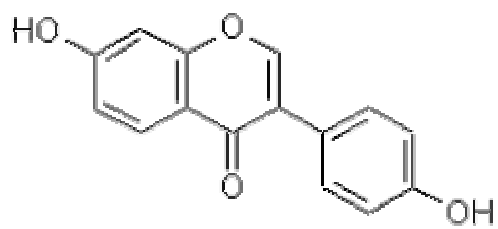
Chemicky jsou isoflavonoidy deriváty **3-fenylchromanu**.



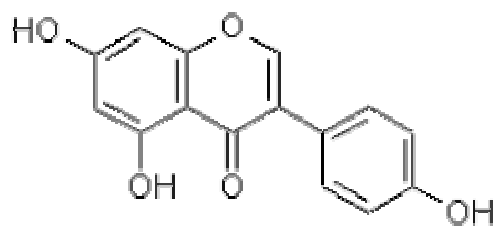
Jsou strukturně více rozmanité než ostatní skupiny flavonoidů a tvoří několik skupin, které se liší stupněm oxidace pyranového kruhu. Rozlišujeme tedy isoflavonoidy odvozené od 3-fenylchromanu, 3-fenylchromonu, 3-fenylchromenu, 2-arylbenzofuranu a flavonoidy s otevřeným pyranovým cyklem. Nejrozsáhlejší skupinou isoflavonoidů jsou isoflavony, které tvoří nejvíce redukovanou formu isoflavonoidů.



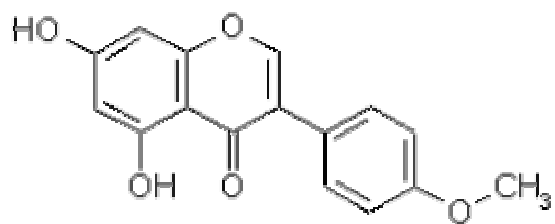
Daidzein



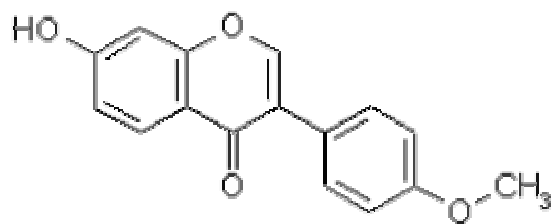
Genistein



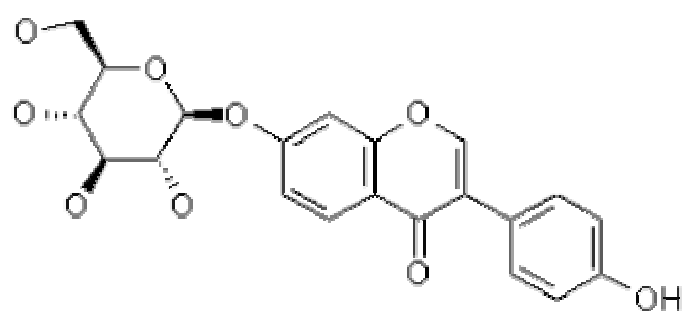
Biochanin A



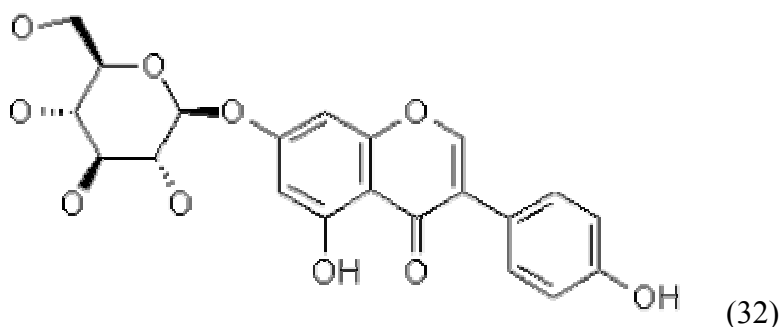
Formononetin



Daidzin



Genistin



Biosyntéza:

Isoflavonoidy v rostlinách vznikají v základu na stejném principu jako flavonoidy, tedy kondenzací polyacetátu a aromatických aminokyselin, které jsou syntetizovány biosyntetickou cestou kyseliny šikimové. Z běžných flavanonových meziproductů jsou syntetizovány migrací arylu katalyzovanou enzymem 2-hydroxyisoflavanonsyntázou. (36)

Biologická aktivita:

Isoflavonoidy jsou, jak již bylo zmíněno, jedním z hlavních fytoestrogenů. Fytoestrogeny jsou látky přírodního původu, které strukturně a funkčně napodobují savčí estrogen. Tyto látky se hojně používají k nehormonální substituční terapii žen v menopauze. Snižují výskyt menopauzálních syndromů, mají pozitivní a preventivní účinek na osteoporózu, snižují riziko výskytu kardiovaskulárních nemocí (aktivita antiatherogenní, hypocholesteromická a antioxidační) a výrazně redukuje riziko vzniku rakoviny prsu. Byl také zjištěn pozitivní vliv isoflavonoidů v prevenci rakoviny prostaty. (33)

3.1.6. Fytoestrogeny v léčbě menopauzálního syndromu

V období přechodu číhá na ženy dvojí riziko, jež souvisí s estrogény. Funkce vaječnicků vyhasíná a produkce estrogenů prudce klesá. Tento jev má dopad na řadu tkání. Projeví se úbytek kostní hmoty (osteoporóza), ztenčí se kůže i sliznice a změní se kvalita cév. Nepříznivé změny se týkají i mozku a to zejména kognitivních funkcí. U třetiny žen vedou tyto změny k častým zlomeninám, cévním komplikacím a infarktům. Ani pro zbylé dvě třetiny žen však není přechod nijak příjemným obdobím a jeho průběh se dá těžko dopředu odhadnout. Úbytku estrogenů v menopauze je možné předcházet tím, že se chybějící hormony tělu dodají jako léky. Hormonální substituční terapie byla zavedena už před půl stoletím a postupně se rozšířila na značnou část populace žen příslušného věku.

Stárnutí přináší také riziko častějšího výskytu karcinomu prsu a dělohy. Pro tyto nádory jsou estrogény růstovým faktorem podobně jako pro tkáně, od nichž jsou odvozeny. Statistiky hodnotící zdravotní význam hormonální terapie v dnešní době často poukazují na značné riziko vzniku nádorového bujení (nádory prsu a dělohy). (35)

V důsledku zjištění závažných vedlejších nežádoucích účinků klasické hormonální substituční terapie (HRT), v současnosti stále více stoupá význam alternativní léčby menopauzálních syndromů. Do popředí se v poslední době dostávají přípravky s obsahem fytoestrogenů. Pozitivní účinek těchto látek na klimakterické obtíže byl poprvé pozorován u asijských žen, které konzumovaly velké množství isoflavonů (sója). Tyto ženy měly daleko nižší incidenci menopauzálních syndromů, kardiovaskulárních nemocí, osteoporózy a hormon-dependentních nádorů. Účinky těchto látek byly během posledních let postupně ověřeny a v současnosti již pomáhají velkému množství žen po celém světě. (72)

Fytoestrogeny jsou látky rostlinného původu, které strukturně nebo funkčně napodobují účinky estrogenů a hrají tak důležitou roli v prevenci klimakterických obtíží, rakoviny, srdečního selhání a osteoporózy. Rozličná biologická aktivita fytoestrogenů je dána jejich schopností působit jak estrogeně jako agonisté estrogenu, tak antiestrogeně jako jeho antagonisté. Jako agonisté napodobují účinky endogenního estrogenu a jako antagonisté mohou blokovat, nebo alterovat jeho receptory. Fytoestrogeny jsou díky svému agonistickému a antagonistickému působení klasifikovány jako selektivní modulátory

receptorů pro estrogen. Tyto látky také díky své nízké molekulové hmotnosti mohou procházet buněčnými membránami.

Existují různé třídy fytoestrogenů: isoflavony, kumestany, ligniny, antrachinony, chalkony, flavony, prenylflavonoidy a saponiny. V přírodě se také vyskytují rostlinné steroidy jako například estron nalezený v palmě *Elaeis guineensis*, nebo β -sitosterol, nalezený ve velmi nízkých množstvích ve většině rostlin. Fytoestrogeny jsou rozříděny na základě chemické struktury, která se podobá struktuře estrogenů. Pro efektivní vazbu na receptor je důležitý aromatický kruh a hydroxylová skupina. Důležitým rysem jsou také sterické a hydrofobní vlastnosti, stejně jako vodíková vazba mezi fenolickou hydroxylovou skupinou a vazebným místem receptoru. Biologická aktivita jednotlivých fytoestrogenů se liší a je často uváděna jako nižší než nativní či syntetický estrogen. Rozdílnosti aktivity jednotlivých látek mohou být dány právě odlišnostmi v chemické struktuře. V některých případech se aktivními fytoestrogeny stanou látky až po metabolizaci v živočišném organismu. (33)

Předmětem hlavního zájmu se v současnosti stala skupina isoflavonů. Tyto látky jsou rozšířeny u bobovitých rostlin, zvláště pak sóji (*Glycine max*), jetele lučního (*Trifolium pratense*) a podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*).

Trifolium pratense L.

Jetel luční začal být ve farmacii používán začátkem dvacátého století na léčbu žilních onemocnění. Estrogenní aktivita byla objevena až roku 1950 a jako estrogenní látky byly identifikovány isoflavony formononetin, biochanin A, daidzein a genistein. Extrakty jetele lučního byly testovány na obsah a účinnost isoflavonů a bylo potvrzeno, že tyto látky mají schopnost vázat se na estrogenové receptory v lidském těle. Jako hormonálně neaktivnější látka jetele lučního byl shledán genistein. Na základě mnoha humáních studií a klinických testů byly extrakty jetele lučního doporučeny jako prevence rakoviny prsu, kardiovaskulárních chorob a všech ostatních klimakterických obtíží. Bylo také zjištěno, že tyto extrakty významně snižují hladinu LDL cholesterolu v séru. (33)

Jetel luční a jeho isoflavonoidy jsou v současnosti předmětem velkého zájmu mnoha vědců, ústavů a firem. Na trhu již můžeme nalézt celou škálu úspěšně používaných přípravků s obsahem výtažků jetele lučního. V budoucnu bude ale zapotřebí ještě mnoho studií, které by ozřejmily všechny léčebné účinky této rostliny jako významného zdroje fytoestrogenů.

3.2. Explantátové kultury rostlin

3.2.1. Úvod

Řada rostlinných látek používaných jako farmaka je pro člověka stále nenahraditelná a požadavky na tyto látky stále rychle stoupají. Proto jsou kromě zemědělské produkce nyní ve středu zájmu jiné alternativní zdroje. Jedním z velmi seriózních zdrojů je právě v dnešní době již vysoce vyvinutá technika explantátových kultur rostlin. (20)

První pokusy zabývající se touto problematikou provedl Haberlandt (1902). Všechny jeho pokusy byly prováděny s vysoce diferencovanými buňkami a tak se i přes zásadní změny medií a podmínek kultivace nepodařilo jemu, ani jeho následovníkům, dojít k úspěchu. Pozitivní výsledky byly dosaženy až při výměně buněk diferencovaných za meristemické. První Hännign (1904) a až dlouho po něm další (Ditrich 1924, Tukey 1933, La Rue 1936) úspěšně kultivovali rostlinná embrya. Dalším mezníkem bylo dosažení neomezeně rostoucích kalusových kultur, kterého docílili nezávisle na sobě Nobécourt (1937) a Gautheret (1938). Během poměrně dlouhé doby byly poté realizovány explantátové kultury nejrozmanitějších rostlinných druhů a pletiv. K dalším objevům již z pozdější doby patří pak získávání haploidů cestou kultivace prašníků *in vitro* a získávání rostlinných protoplastů cestou enzymatického rozrušení buněčné stěny. (21)

Tato metoda má nezastupitelné místo ve šlechtitelství a v současné době se také uplatňuje k produkci sekundárních metabolitů rostlin.

3.2.2. Charakteristika

Pojem kultura rostlinných explantátů *in vitro* (explantátová kultura) znamená aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin (část živého pletiva, soubor více orgánů či samotný orgán, nebo jeho část a dokonce i jedinou buňku) za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostoru a kultivovat za více či méně definovaných podmínek.

Hlavní výhodou explantátových kultur je možnost dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk a z každé z nich lze vypěstovat plnohodnotnou

rostlinu. Díky této metodě lze také konzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin. (20,24)

3.2.3. *Základní termíny*

- 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*
- Kultivace in vitro – pěstování v podmínkách co nejúplněji definovatelných po stránce chemické i fyzikální, zabraňujících nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organismy a buňkami
- Intaktní rostlina – původní rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách
- 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 po další subkultivační interval
- Subkultivační interval – období mezi dvěma po sobě následujícími subkultivacemi kultury
- Kalus – v původním slova smyslu neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny, v přeneseném slova smyslu pletivo proliferující na povrchu nenádorových primárních explantátů, které je schopné subkultivace (20)

3.2.4. *Základní principy*

Základem rostlinného organismu vznikajícího pohlavním rozmnožováním je jedna buňka – zygota (vzniká oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou). Zygota obsahuje v jádře kompletní genetickou informaci a mitoticky se dělí. Zygota je totipotentní. Totipotence je schopnost rostlinných buněk obnovit v průběhu diferenciaci specializované funkce. Procesem mitotického dělení vznikají dceřiné buňky, které se dále diferencují a stávají se stavebními jednotkami specializovaných pletiv. Možnost vegetativního množení však ukazuje, že rostlinné buňky touto diferenciací nijak nedegenerují, naopak jsou

schopny dediferenciace a opětného dělení. Proces dediferenciace je založen na tzv. diferenční genové aktivitě, kdy se specializace buňky vytváří na základě aktivace či inaktivace určitých genů příslušného rostlinného druhu. Dediferenciaci a neorganizovaný růst je možné navodit změnou podmínek, ve kterých se daná buňka nachází. V rostlinném organismu je tedy totipotentní jak zygota, tak meristemická i jakákoliv jiná buňka. Teoreticky je tedy jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem, vhodné pro odvození explantátové kultury. (22)

Pěstujeme-li rostlinný explantát po určitou dobu v podmínkách *in vitro*, získáváme tedy kulturu rostlinných explantátů.

Dle morfologického hlediska dělíme tyto kultury do pěti kategorií:

- *kultury orgánové* – orgánové systémy, orgány nebo jejich základy či části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a vcelku zachovává jejich stavbu a funkci
- *kultury tkáňové (pletivové)* – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy pletiva, pomnožované na pevných či polotuhých nosičích nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě
- *kultury suspenzní* – volné buňky a malé buněčné shluky rozptýlené v promíchané a provzdušňované tekuté živné půdě
- *kultury buněčné* – volné jednotlivé buňky pomnožované v tekuté či polotuhé živné půdě nebo na pevném nosiči nasyceném živnou půdou
- *kultury protoplastů* – buňky zbavené pevných buněčných stěn, obalené pružnou, elastickou plazmalemou (20,24)

3.2.5. Kultivace rostlinných kultur *in vitro*

Z parenchymatických pletiv rozličných rostlinných částí je možno odvodit kalusové explantáty reprezentované nediferencovanou hmotou buněk rostoucích na polotuhém médiu a z nich potom explantáty suspenzní a buněčné, které rostou v půdách tekutých. Na udržování explantátů jsou potřebné živiny (K, Ca, Mg, zdroje dusíku, fosforu, síry, glukóza, stopové prvky). Nevyhnutelný je také přídavek vitaminů, fytohormonů a růstových hormonů, pravidelné pasážování do nového živného prostředí, v případě

buněčných kultur také provzdušňování a zachování sterility živného media. Růst a vývoj rostlinných kultur také významně ovlivňují fyzikální podmínky kultivace.

Nediferencované buňky obsahují také genetické informace podněcující tvorbu sekundárních metabolitů. Pro maximální tvorbu sekundárních metabolitů je vždy nutné nalézt optimální chemické i fyzikální podmínky kultivace. (26,27)

3.2.5.1. Odvození a udržování kultury

Pro úspěšné odvození explantátové kultury je důležitý výběr matečné rostliny a části rostlinného těla. U většiny dvouděložných bylin je možné odvodit kalus z různých explantátů (segmentu listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, vzrostných vrcholů, embryí atd.) U rostlin jednoděložných je výběr vhodných pletiv menší. Danou rostlinu či rostlinné semeno je nejprve nutno povrchově sterilizovat a dále pěstovat v aseptických podmínkách. Následuje odebrání vhodného fragmentu, přenesení na živnou půdu a inkubace za optimálních podmínek (23–28 °C a vhodná perioda světlo/tma). Po několika týdnech získáme soubor parenchymatických nediferencovaných buněk – kalusů. Růst kalusů je ve většině případů indukován umístěním explantátu na medium s vysokou koncentrací auxinu (1-10 mg/l) v přítomnosti nižší koncentrace cytokininu. K získání stabilního a homogenního materiálu je ovšem zapotřebí provést větší počet pasáží a dodržet konstantní podmínky kultivace.

Z kalusové kultury lze odvodit kulturu suspenzní a to buď enzymatickým či mechanickým způsobem. Pro odvození se nejčastěji používá kalusová kultura rozpadavá, kalus kompaktní je nevhodný. Při prvním způsobu se jako rozvolňovací činidlo používají pektinázy, v druhém případě jsou kousky kalusu kultivovány na tekutém mediu na třepačce nebo rolleru. K získání jednobuněčné suspenze se musí rostoucí suspenzní kultura pravidelně filtrovat přes sítko o známé velikosti pórů. Velmi důležité je následující pravidelné pasážování a zabránění nežádoucí kontaminace vzorků přísným dodržováním aseptických podmínek. (20,22,26,27)

3.2.5.2. Buněčné suspenzní kultury

Buněčné suspenzní kultury představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujiícím se tekutém živném

médiu. Použití tekutých médií umožňuje buňkám suspenze přímý kontakt s živným médiem. Jednotlivé složky živného roztoku jsou tedy buňkám velice snadno a rychle přístupné. Tento jev spolu s dobrou výměnou dýchacích plynů v pohybujícím se médiu umožňuje velmi rychlý růst buněčné suspenze.

Ke kultivaci buněčných suspenzí se používají různé kultivační systémy, které mají společné používání pohybujících se tekutých živných medií. Pohyb média zajišťuje aeraci, usnadňuje přístup živin k buňkám a napomáhá rozpadu buněčných shluků, které vznikají při dělení buněk. Kultivační nádoby (nejčastěji 100-500 ml Erlenmeyerovy baňky) se umísťují na roller (v šikmé rovině se otáčející plocha) nebo na třepačku (pohyb baněk v horizontální rovině). Počet otáček rolleru je v závislosti na zařízení 1-10 otáček za minutu, u třepačky je to 30-150 otáček/min. při amplitudě výkyvu 2-5 cm. Při používání rolleru se mechanické separaci buněk napomáhá speciální úpravou kultivačních baněk (mají různé výstupky). Při užití rolleru i třepačky se kultivační nádoby naplňují médiem pouze do jedné pětiny až jedné čtvrtiny.

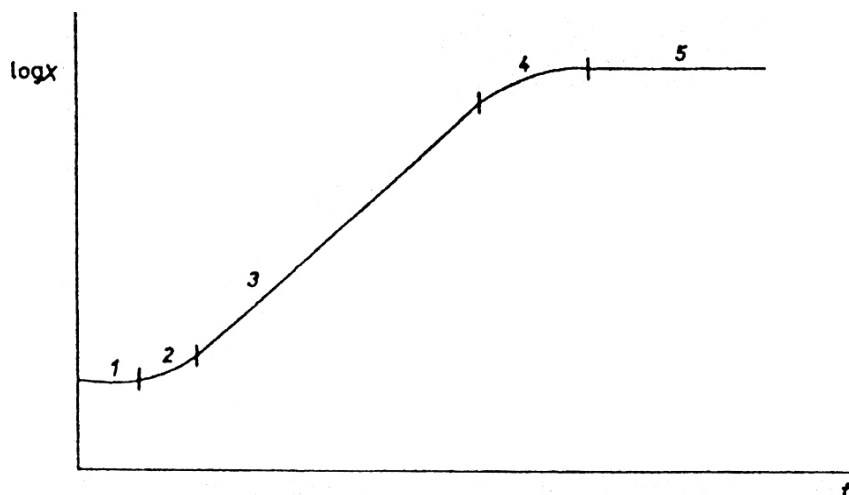
Pro kontinuální kultivace buněčných suspenzí se používají různé typy bioreaktorů. Pohyb média je zde zajišťován buď míchadlem nebo probubláváním sterilního vzduchu. Moderní bioreaktory jsou již plně automatizované a schopné zajišťovat stálé složení živného roztoku, stálou hustotu buněčné suspenze, regulaci pH, stálou koncentraci plynů i monitorování růstu buněčné kultury. (22)

3.2.5.3. Růst a pasážování suspenzních kultur

Roste-li buněčná suspenze v uzavřeném systému, dochází v průběhu času ke zvyšování její hustoty a ke změně složení média. Růst suspenzní kultury je díky snadnějšímu přístupu k živinám mnohem rychlejší než růst kultury kalusové. Rychlý růst buněk způsobuje rychlé odčerpávání živin z kultivačního media a k zajištění stálého růstu je proto nutné buněčné suspenze poměrně často pasážovat na čerstvé médium. Nejvhodnější doba pro pasážování kultury je na konci exponenciální fáze růstu (jedna z fází růstové křivky), která je charakteristická aktivním dělením a růstem buněk, přičemž růst není limitován exogenními faktory.

Růst buněčné suspenze můžeme tedy charakterizovat růstovou křivkou. Tato křivka vyjadřuje závislost množství buněk v suspenzní kultuře na době kultivace.

Obr. Růstová křivka



x.....množství buněk

t.....doba kultivace

Křivka je určena šesti základními fázemi:

1. lag fáze – pomalý růst buněčné suspenze těsně po naočkování, je dán přizpůsobováním se buněk novému prostředí
2. akcelerační fáze (fáze zrychlení) – buňky se množí stále stoupající rychlostí, mají dostatečný přísun živin a kyslíku, všechny důležité enzymové reakce postupně dosahují maximálních konstantních rychlostí a přecházejí do ustáleného stavu.
3. exponenciální fáze – velmi intenzivní nárůst buněčné suspenze, buňky rostou stále stejnou, maximální rychlostí, trvá tak dlouho, dokud mají buňky dostatečný přísun živin a růst není inhibován odpadními produkty buněk
4. deklinační fáze (fáze zpomalení) – rychlost množení se následkem poklesu množství živin a zvyšování počtu toxických metabolických produktů snižuje
5. stacionární fáze – populace buněk dosahuje maximální a po určitou dobu konstantní velikost, dochází k poklesu či úplnému zastavení růstu buněk, počet nových buněk se rovná množství buněk uhynulých, růst je inhibován

snižujícím se množstvím živin a stoupajícím množstvím odpadních látek v médiu

6. fáze odumírání – živiny jsou již prakticky vyčerpány, dochází k různě rychlému odumírání buněk, pro průběh této fáze neexistuje žádné obecné pravidlo, je závislá na dané kultuře (20,22)

Délka doby mezi založením nové kultury a stacionární fází záleží na několika faktorech: počáteční hustotě suspenze, době trvání lag fáze a délce buněčného cyklu dané kultury. Každá buňka inokula se během kultivace 4-6 krát dělí, čemuž pak odpovídá nárůst buněčné masy. Průměrná inkubační doba je 18-25 dní, při velmi aktivním dělení 6-9 dní. Při použití velmi nízké počáteční hustoty buněk dochází k prodloužení lag fáze a exponenciální fáze. Růst buněčné suspenze je ovšem možné stimulovat jejím kontaktem s kulturou o vysoké hustotě buněk, resp. s metabolity, které intenzivně se dělící buňky uvolňují do okolního média. Intenzivně se dělící buňky totiž produkují substance, které stimuluje růst okolních buněk.

Pasážování buněčné suspenze lze provádět centrifugací ve zkumavce při 200-1000xg po dobu 5 minut. Supernatant se odpipetuje a sedimentované buňky se resuspendují v čerstvém živném roztoku. Nová suspenze se přefiltruje přes sterilní filtr o velikosti pórů 250 µm. Tím se odstraní velké buněčné agregáty a poté se stanoví počet buněk v 1 ml suspenze. Suspenze se potom rozpipetuje v určitém objemu (podle počtu buněk v inokulu) do baněk s kultivačním médiem. (22)

3.2.5.4. Fyzikální podmínky kultivace

Pro správný růst explantátové kultury je třeba nalézt vhodné okolní prostředí. Z fyzikálních faktorů, které mají přímý vliv na tkáňovou kulturu sem lze zařadit teplotu, osvětlení, pH živného média a vlhkost vzduchu.

- **Teplota** – teplota kultivace je většinou zvolena empiricky kolem 25°C. Příliš nízká nebo naopak příliš vysoká teplota by mohla inhibovat růst a sekundární metabolismus kultury. Její hodnota má vliv na dobu zdvojení počtu buněk a její zvýšení může indukovat organogenezi kultur.

- **Osvětlení** – v závislosti na světle dochází často ve tkáňových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů. Je proto důležité zvolit u dané rostliny vhodnou periodu světlo/tma. Pozitivní vliv světla byl prokázán např. u kultur produkujících digoxin a diosgenin.
- **pH živného média** – na rozdíl od kultivace mikroorganismů nebo živočišných tkání není u rostlinných tkáňových kultur bezpodmínečně nutná přesná hodnota pH živného media. Používané roztoky bývají obvykle slabě kyselé. Optimální hodnota pH je závislá na typu kultury, většinou se pohybuje mezi pH 5,5 – 6,0.
- **vlhkost vzduchu** – vlhkost vzduchu v kultivačních místnostech bývá nastavena na hodnotu v rozmezí 20 – 98% podle požadavků dané kultury. Je-li vlhkost příliš nízká, mohlo by dojít ke zorkovatění povrchu tkání či jejich úhynu. Při příliš vysoké vlhkosti páry na povrchu média kondenzují a tím inhibují růst kultury. (20,22)

3.2.5.5. Kultivační médium

Složení kultivačního média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi tkáňových kultur. Médium dodává buňkám živiny potřebné pro růst, vývoj, množení a uskutečňování všech biochemických procesů.

Kultivační médium se standartně skládá z následujících složek: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny či další zdroje organického dusíku, sacharidy, zdroje organického uhlíku, další nedefinované organické složky, zpevňující látka a růstové regulátory.

Vhodných médií existuje celá řada. Různá jsou používána pro rozličné druhy rostlin a odlišné účely kultivace. Mezi nejčastěji používaná média patří média, která popsali: White (1963), Murashige a Skoog (MS, 1962), Gamborg et al. (B5, 1968), Gautheret (1942), Shenk and Hildebrandt (SH 1968), Nitech and Nitsch (1969), Lloyd and McCown (1981). Média MS, SH a B5 jsou na rozdíl od ostatních charakteristická vysokým obsahem makroelementů.

- **Makroelementy** – patří sem šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra. Optimální koncentrace každého prvku je značně závislá na rostlinném druhu, většinou bývá větší než 30 mg/l. Jelikož pro zajištění růstu některých druhů explantátových kultur rostlin je nutná redukováná forma dusíku, musí být anorganický dusík do média dodáván ve formě nitrátů či amonných solí.
- **Mikroelementy** – jsou látky nezbytné pro růst tkáňových kultur. Řadíme k nim: železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Do médií se také někdy dodává kobalt, jód, sodík a chlór. Tyto látky ovšem nejsou pro růst explantátové kultury nezbytné.
- **Zdroje organického uhlíku** – jako nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána sacharóza, v některých případech je možné ji nahradit glukózou či fruktózou. Obvykle používaná koncentrace sacharózy v živném médiu je 2-5%. Méně často jsou jako zdroje uhlíku používány alkoholy. Z nich se jako nejvhodnější zdroj jeví glycerin. Dalším alternativním zdrojem mohou být organické kyseliny, nejsou ovšem zdrojem ideálním.
- **Zdroje organického dusíku** – přestože kultivované rostlinné buňky si jsou schopny všechny aminokyseliny syntetizovat z anorganického dusíku, přidávají se do média poměrně často některé aminokyseliny. Jejich přítomnost v rostlinném explantátu stimuluje jeho růst, slouží jako bezprostřední zdroj dusíku a mohou být přímo využívány k syntéze proteinů.
- **Destilovaná voda** – voda pro přípravu živných roztoků může obsahovat jen minimální množství anorganických látek, musí být prostá pyrogenů a organických nečistot
- **Vitamíny** – explantátové kultury si na rozdíl od rostlin nejsou schopny sami v dostatečném množství syntetizovat vitamíny nezbytné k růstu a vývoji. Do médií se tedy nejčastěji přidává thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. V některých živných půdách nalezneme také biotin, kyselinu listovou, kyselinu askorbovou, kyselinu pantotenovou a riboflavin. Přítomnost těchto vitamínů není však většinou nezbytně nutná.
- **Nedefinované organické složky** – růst kultury je často možné stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např.: hydrolyzát kaseinu, kokosové mléko, extrakty z kukuřice, pšenice, sladu, vlašského ořechu, koňského kaštanu a kvasnic. Někdy se přidává aktivní uhlí, které má za úkol absorpci látek inhibujících růst či

naopak absorpci růstových mediátorů. Zapřičiňuje tak jak stimulaci, tak inhibici růstu rostlinných kultur.

- **Látky používané pro zpevnění média** – nejčastěji se pro přípravu tuhých medií používá agar. Agarové gely jsou stabilní při kultivačních teplotách, nereagují s ostatními složkami média a nejsou rozkládány rostlinnými enzymy. Tuhost média lze regulovat použitím různých koncentrací agaru.
- **Růstové regulátory** – jsou látky stimulující růst rostlinných buněk. V podmínkách *in vitro* je buňky nejsou schopny v dostatečné míře samy syntetizovat, musí být tedy do živného média dodávány. (20,22)

3.2.5.6. Růstové regulátory

Růstové regulátory jsou specifické látky stimulující či inhibující růst rostlin. Každá rostlina má schopnost si tyto látky sama do určité míry syntetizovat. Růstové regulátory jsou spolu s podmínkami prostředí nutné k dosažení harmonického růstu rostlinného organismu, můžeme jim tedy přisoudit funkci absolutního organizátora a regulátora růstu rostlin. (20)

Důkaz existence růstových látek provedl Went (1926) na koleopatii trav (koleopatie je soubor stejných buněk schopných intenzivního růstu, ve kterých neprobíhá buněčné dělení). Z pokusu vyplynul závěr, že na vrcholu koleoptie existuje látka podporující růst buněk. (27)

Za stimulátora růstu se považuje látka, která podněcuje rostlinu, případně tkáň k větší životnosti. Rostliny jsou pak schopny intenzivněji a lépe využívat živiny a jejich asimilační pochody probíhají mnohem intenzivněji než u rostlin nestimulovaných. Naopak růstovými inhibitory označujeme látky, které ve fyziologických koncentracích růst zpomalují. Zdůraznění fyziologické koncentrace je podstatné, jelikož stimulatory růstu mohou ve vyšších koncentracích růst kultury inhibovat a naopak, inhibitory růstu v nižších koncentracích mohou růst stimulovat. (22)

Růstové regulátory se dělí jednak dle účinku, na stimulatory a inhibitory růstu, a dále pak dle původu, na regulátory přirozené a syntetické.

Mezi nejdůležitější růstové regulátory patří:

- **Auxiny** – jsou v kultivačním médiu používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtlů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu prýtlů. Jsou odvozeny od kyseliny indolyloctové (IAA), která představuje nativní auxin. Ostatní látky, jako kyselina indolylmásečná (IBA), dichlorfenoxyoctová (2, 4-D) a naftyloctová (NAA), jsou látky syntetické. Různé druhy auxinů mají různou fyziologickou aktivitu, pohybují se různou rychlostí pletivy, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jsou jiným způsobem metabolizovány. (22)
- **Cytokininy** – v kultivačních médiích se používají za účelem stimulace buněčného dělení a stimulace tvorby axilárních prýtlů. Mezi běžně používané cytokininy patří především benzylaminopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (IPA), furfurylaminopurin (kinetin) a zeatin. Zeatin a IPA jsou považovány za nativní cytokininy, zatímco kinetin a BAP představují skupinu syntetickou. Další nativně vyskytující se látkou s podobnou chemickou strukturou jako cytokininy, je adenin. V některých případech byla i u adeninu pozorována cytokininová aktivita.
- **Gibereliny** – stimulují růst buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, urychlují růst kalusu a růst zakrslých rostlin. Mezi nejdůležitější zástupce této skupiny patří kyselina giberelová (GBA 3) a giberelin. GBA 3 v nižší koncentraci podporuje rovnoměrný růst, v koncentraci vyšší vyvolává převahu prodlužovacího růstu nad tloušťnutím. Tato kyselina také podporuje syntézu IAA.
- **Kyselina abscisová** – v závislosti na rostlinném druhu může tato látka stimulovat i inhibovat růst kalusu, stimulovat proliferaci prýtlů a inhibovat pozdější fáze embryogeneze. Chemicky se jedná o seskviterpenickou kyselinu. (22,27)

Růst explantátových kultur ovlivňují hlavně auxiny a cytokininy. O charakteru růstu kultury nerozhoduje pouze koncentrace jednotlivých hormonů, ale často jejich vzájemný poměr. Složení a koncentraci regulátorů růstu je tedy vždy třeba citlivě přizpůsobit nárokům každé kultury. (20,22)

3.2.6. Biotechnologické využití explantátových kultur

Využití explantátových kultur lze rozdělit na dvě oblasti. Jde o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami a problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin. V obou skupinách je velmi intenzivně prováděn výzkum, který má dnes i své praktické uplatnění.

Během 90. let 20. století byla v Evropě založena řada středisek biotechnologického výzkumu, které se věnují jednak výzkumu a také komerčnímu využívání rostlinných kultur *in vitro*. (37)

3.2.6.1. Tvorba sekundárních metabolitů

Tkáňové kultury rostlin se mohou v průmyslové produkci sekundárních metabolitů uplatnit na několika úrovních. Předně je možné využít explantátových kultur k vlastnímu množení rostlin významných z hlediska produkce sekundárních metabolitů, dále k získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách a získávání nových či většího množství známých látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk. (20,22)

Hlavní výhody buněčné kultivace oproti kultivaci celé rostliny jsou následující:

- Produkce sekundárních metabolitů probíhá za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických změnách či půdních podmínkách
- V kultuře jsou vyloučeny negativní biologické vlivy jako jsou mikrobi a hmyz, kteří v přírodě mění produkci sekundárních metabolitů
- Buňky kterékoliv rostliny, bez ohledu na geografický původ, mohou být snadno pěstovány k získání jejich specifických metabolitů
- Kultivace probíhá za sterilních podmínek, nehrozí žádné bakteriální nebo houbové onemocnění
- Automatizace řízení buněčného růstu a racionální regulace metabolických procesů může přispět ke snížení pracovních nákladů a zvýšit produktivitu (22,37)

Syntézu a akumulaci sekundárních metabolitů je možné považovat za aspekt diferenciací, jev, který je charakterizován biochemicky, histochemicky a morfologicky. Bylo demonstrováno, že v rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se

akumuluje jen malé množství sekundárních metabolitů. Oproti tomu v procesech cytodiferenciace, buněné agregace a morfologické organizace dochází ke zpomalení růstu, což přímo koreluje se vzestupem syntézy sekundárních metabolitů, především cestou omezení primárního metabolismu. Stimulačně na produkci sekundárních metabolitů může působit i vliv určitého stresu, jako např.: snížení koncentrace živin v živném roztoku, vynechání růstového regulátoru, vliv záření, nebo aplikace elicitorů. Elicitory jsou agens biologického původu, které působí jako aktivátory enzymů v pletivech rostlin a vyvolávají obrannou odpověď buněk založenou na produkci sekundárních metabolitů. Produkce může být vedle biotických elicitorů stimulována také elicitory abiotickými (UV záření, chlad, vysoká teplota, soli těžkých kovů, změny pH atd.) (22,37)

Rostliny i tkáňové kultury syntetizují většinou sekundární metabolity jen v určité ontogenetické fázi, v určitém období růstového cyklu. Často se stává, že převedením do kultury *in vitro* a ztrátou diferenciace pletiva dochází ke změně či přerušení metabolických drah, čímž se kvalitativně změní spektrum produkovaných látek. Objevují se vedlejší produkty metabolických drah, modifikované látky výchozích rostlin, či látky nové, které se dají využít k různým farmaceutickým účelům. (37)

V následující tabulce jsou uvedeny příklady úspěšných pokusů o vyprodukování sekundárních metabolitů rostlinnými kulturami v množství významně větším než v intaktní rostlině. (38)

Sekundární metabolit	Rostlina	Použití
ginsenosid	<i>Panax ginseng</i>	Potravinový doplněk
antrachinon	<i>Rubia tinctorum, R akane</i>	Pigment, potr. doplněk, farmacie
diosgenin	<i>Dioscera deltoides</i>	Farmacie
vinkristin	<i>Catharanthus roseus</i>	Farmacie
ginkolidy	<i>Gingo biloba</i>	Farmacie
digoxin	<i>Digitalis lanata</i>	Farmacie
kapsaicin	<i>Capsicum frutescens</i>	Ochucovadlo
taxol	<i>Taxus cuspidata</i>	Farmacie
imperatorin	<i>Angelica dahurica</i>	Farmacie
morfin a kodein	<i>Papaver somniferum</i>	Farmacie

Přes velké množství úspěchů dosažených v oblasti rostlinné biotechnologie v produkci užitečných sekundárních metabolitů, získané poznatky stále v dostatečné míře nedosahují komerční aplikace. Z velkého množství užitečných metabolitů získaných použitím tkáňových kultur dosáhlo širokého komerčního použití pouze malé množství látek. Patří sem shikonin z rostlinné kultury *Lithospermum erythrorhizon*, purpurin získaný z explantátové kultury *Rubia akane* a poměrně známý taxol, který se získává z kultury *Taxus cuspidata*. (38)

Budoucnost průmyslového využití buněčných kultur pro produkci přírodních látek v bioreaktorech závisí především na vývoji postupů a technologií zkracujících periodu kultivace a zvyšujících výtěžek. Perspektivní je i přenos rostlinných genů, které kódují enzymy katalyzující reakce biosyntézy sekundární látky do bakteriální buňky či buňky mikroskopických hub. (37)

3.2.6.2. Rozmnožování a šlechtění rostlin

V průběhu 90. let 20. století se objevily nové perspektivy pro šlechtění rostlin. Byl podán přímý důkaz o tom, že systém nediferencované buněčné a pletivové kultury je mimořádně vhodný pro rozšíření genetické proměnlivosti rostlin a že vytváří možnosti selektovat agronomicky významné vlastnosti na úrovni *in vitro*. Došlo tak k propojení genetického studia rostlinné buňky s klasickou mendelistickou hybridologickou analýzou.

V dnešní době mají tedy tkáňové kultury rostlin své nezastupitelné místo nejen ve výzkumu, ale také v průmyslu a zemědělství, kde slouží k množení, šlechtění a ozdravování rostlin. (20,23)

Z různých aplikací jsou nejdůležitější:

- Vegetativní množení – umožňuje rychlé získávání tisíců shodných rostlinných jedinců (orchideje, karafiáty, gerbery)
- Meristémové kultury – umožňují získávání ozdravených bezvirových rostlin. Postup je založen na předpokladu, že viry neinfikují meristemické pletivo a tudíž izolované vrcholy ke kultivaci jsou viruprosté (příčinou je intenzivní dělení buněk meristémů). Většinou tento základní předpoklad splňuje pouze vlastní vzrostný vrchol, který není vaskularizován a tudíž je chráněn před systémově se šířící virovou infekcí.

- Pylové kultury – umožňují získání haploidních rostlin a od nich odvozených čistých linií pro šlechtitelské účely (rýže, tabák, obilí)
- Fúze protoplastů – u téhož či rozdílného rostlinného druhu umožňují tvorbu somatických hybridů (buněk nebo celých rostlin) s vlastnostmi epigenetické povahy z jiného druhu (přenos samčí cytoplasmatické sterility, rezistence aj.)
- Tvorba regenerovaných rostlin – umožňuje využití polymorfismu ve šlechtitelském programu a selekci produkčních klonů na úrovni izolované buňky
- Genové inženýrství – používá se k zavedení nových vlastností do rostlin (20,23)

Další oblastí je využití tkáňových kultur k mikropropagaci rostlin. Jedná se o způsob vegetativního množení rostlin pomocí explantátových kultur, který má ale oproti tradičním způsobům řadu výhod:

- Kultura se odvozuje z velmi malých částí rostlin (explantátů), z nichž regenerují malé rostliny
- Rozmnožování se provádí ve sterilních podmínkách. Po odvození kultury nedochází k úhynu rostlin vlivem onemocnění, rostliny jsou bez houbových a bakteriálních nákaz
- Je možná produkce bezvirových rostlin
- Podmínky množení jsou přesně definovány, je možné zvýšit koeficient množení. Rychlost mikropropagace je mnohem vyšší než u metod klasických.
- Rostliny je možné množit po celý rok bez závislosti na ročním období
- Odpadají nároky na velké skleníkové plochy
- Rostliny *in vitro* mezi pasážemi nevyžadují téměř žádnou péči

Hlavními nevýhodami mikropropagace je relativně drahé laboratorní vybavení a poměrně vysoká pracnost metody neumožňující využití mechanizace.

Metoda mikropropagace nalézá v současné době uplatnění tam, kde není možná jiná metoda vegetativního množení, rychlost množení tradičními metodami je pomalá a v případech, kdy je makropropagace velmi nákladná. Používá se pro získání bezvirového materiálu a ve šlechtitelských programech, kde vyšlechtěných jedinců je velmi omezený počet. (37)

3.3. Elicitace

Jedním z efektivních způsobů jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních je využití metody elicítace. Strategie je založena na faktu, že akumulace většiny sekundárních látek je součástí obranných mechanismů rostlin. Rostliny produkcí sekundárních metabolitů odpovídají na útok patogenů a vlivů prostředí a to jak faktorů fyzikálních (UV záření), tak faktorů chemických. (62,67)

Elicítace je založena na signálem (elicítorem) indukované expresi genů, což vede následně ke zvýšení syntézy sekundárních metabolitů v rostlinách i v kulturách *in vitro*. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu. (63)

3.3.1. Elicitory

Elicitory jsou látky chemického, či jiného původu, které imitují v přírodě se vyskytující stresové faktory. Mohou tak v rostlinném organismu spustit obranné reakce jako například produkci reaktivních forem kyslíku, reakci hypersenzitivity, nebo produkci fytoalexinů (antimikrobiálních sekundárních metabolitů). (68) Elicitory jsou užitečným nástrojem ke zvýšení produkce cenných rostlinných látek.

Běžně se dnes používají u rostlinných systémů, jako např.: sója (*Glycine max*), hrách (*Pisum sativum*) a rajče (*Lycopersion esculentum*). (38,67) Již roku 2001 Tebayashi poprvé testoval vliv elicitoru chloridu měďnatého a chitooligosacharidů na *Trifolium pratense* L. Kořeny sazenic jetele lučního obsahovaly po aplikaci těchto elicitorů zvýšené množství formononetinových aglykonů. Bylo zjištěno, že elicitory mají schopnost ovlivňovat enzymy zapojené do sekundárního metabolismu isoflavonů a stimulovat tak rostlinu ke zvýšené produkci těchto látek. (67)

Elicitory nemají žádnou společnou chemickou strukturu, patří k široké paletě různých tříd sloučenin, zahrnující také oligosacharidy, peptidy, proteiny a lipidy. (70)

3.3.1.1. Klasifikace elicitorů

Elicitory můžeme dělit dle různých hledisek, na fyzikální a chemické, exogenní a endogenní a biotické či abiotické. (68,69)

Biotické elicitory:

Jedná se o látky biologického původu odvozené od patogenních organismů či rostlin samotných. Biologické sloučeniny mohou být definované složení, jestliže je známa molekulární struktura, nebo mohou být komplexní sloučeninou zahrnující různé třídy molekul, které lze pouze obtížně definovat. (38)

K biotickým elicitorům řadíme:

- Látky přímo uvolňované mikroorganismy, které jsou dobře rozpoznávány rostlinou (enzymy, fragmenty buněčných stěn)
- Substance vytvořené činností mikroorganismů v rostlinné buněčné stěně (fragmenty pektinu aj.)
- Látky vytvořené interakcí rostlinných enzymů a mikrobiální buněčné stěny (chitosan, glukany)
- Sloučeniny endogenního původu a látky vyskytující se v přírodě, vytvářené či uvolňované rostlinnými buňkami jako reakce na různé stimuly (proteiny, glykoproteiny, oligosacharidy, rostlinné hormony – kyselina salicylová a kyselina jasmínová) (68)

Abiotické elicitory:

Jsou to látky, které nemají biologický původ. Tyto látky můžeme dále rozdělit na fyzikální faktory a chemické sloučeniny. Biotické elicitory mohou být také klasifikovány na základě interakce rostlina – elicitor na dvě skupiny: obecné elicitory, schopné spustit obrannou reakci v hostitelské i všech jiných rostlinách, a druhově specifické elicitory, které indukují odpověď vedoucí k tvorbě sekundárních metabolitů pouze v specifických hostitelských kultivarech. (38)

Řadíme k nim:

Fyzikální faktory

- UV záření, γ -záření
- Tepelný stres – příliš vysoké či nízké teploty
- Osmotický stres
- Mechanická poranění
- Změny pH

Chemické faktory

- Ionty těžkých kovů
- Látky s vysokou afinitou k DNA
- Detergenty
- Fungicidy
- Herbicidy (68,69)

3.3.1.2. Mechanismus účinku elicitorů

Vzhledem k dosavadním znalostem se předpokládá, že produkce a akumulace fytoalexinů a jiných stresových metabolitů, navozená aplikací elicitorů, je v rostlinných kulturách *in vitro* regulována stejnými mechanismy jako v případě intaktní rostliny. (53)

Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (druhých poslů). Rozeznáváme dva základní systémy druhých poslů: systém cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a systém fosfoinositidový. (54)

Oba tyto systémy jsou spouštěny vazbou elicitoru na receptor v membráně. Změna struktury receptoru je pomocí guanozintrifosfát-vážečného proteinu (G-proteinu) přenesena na klíčový enzym, kterým je v případě systému cAMP adenylátcykláza. Adenylátcykláza pak přeměňuje adenosintrifosfát na cAMP. V případě fosfoinositidového systému dochází ke štěpení membránového lipidu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) fosfolipázou c na dvě signální molekuly: diacylglycerol (DAG) a inozitol-1,4,5-trisfosfát (IP₃). DAG zůstává jako lipofilní molekula v membráně, zatímco IP₃ přechází do cytoplasmy. Všichni tři druží poslové působí nakonec změnu fosforylace proteinů: cAMP a DAG přímo aktivací proteinkináz, na kterou navazuje exprese genů, IP₃ nepřímo, po vazbě na receptor v endoplazmatickém retikulu a uvolnění iontů vápníku. Ionty vápníku jsou vlastně dalším nosičem signálu. Váží se na specifickou bílkovinu kalmodulin, čímž vzniká aktivní komplex schopný aktivovat proteinkinázy a posléze i expresi genů. (54)

Velmi častým a neobyčejně rychlým přenosem signálu a aktivace genové exprese je tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku. 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 cesta nepřímá. Při ní nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmínová a methyljasmonát a ty pak teprve ovlivňují transkripci. Peroxidací lipidů dochází také ke zvýšení propustnosti membrány pro vápenaté ionty, které následně vnikají dovnitř buňky a zprostředkují tak expresi genů. Tímto mechanismem spouští transkripci genů například těžké kovy. (54,55)

3.3.2. Faktory ovlivňující elicitaci

Úspěšnost elicitace jako nástroje pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů závisí na souboru interakcí mezi elicitorem a rostlinnou buňkou. Hlavní faktory ovlivňující tuto interakci a proto i odpověď na působení elicitoru jsou: specifita elicitoru, koncentrace elicitoru a podmínky růstu tkáňové kultury (stádium růstu, složení živného média, osvětlení).

Specifita elicitoru

Je dokázáno, že stejný elicitor může stimulovat sekundární metabolismus různých rostlinných kultur. Elicitace jednotlivých kultur různými elicitory má za následek akumulaci stejných látek, které jsou pro danou rostlinu typické. Obecně tedy platí, že typ sekundárního metabolitu je typický pro danou rostlinnou kulturu, ale není závislý na skupině elicitoru.

Koncentrace a doba působení elicitoru

Koncentrace elicitoru je faktor, který silně ovlivňuje intenzitu odpovědi a efektivní dávku, která se liší dle rostlinného druhu a může být nalezena výhradně empiricky. Například u elicitoru chitosanu dochází při dávce 200 mg/l k maximální produkci antrachinonů v *Rubia tinctorum* a oproti tomu koncentrace 20 mg/l velmi výrazně stimuluje produkci antrachinonů v *R. akane*. Doba působení elicitoru je také závislá na konkrétním rostlinném druhu a odvíjí se od zvýšení aktivity jeho metabolických enzymů. Stejně jako koncentrace, se optimální doba působení elicitoru zjišťuje výhradně empiricky.

Podmínky pěstování kultury:

Mezi tyto faktory zahrnujeme stádium růstu, složení živného média a osvětlení. Ve většině případů literatura uvádí, že nejvhodnější doba k aplikaci elicitoru je během

exponenciální fáze růstu, kdy většina enzymatických pochodů je dostatečně aktivní, aby odpověděla na přítomnost elicitoru. Dalším důležitým faktorem je přítomnost růstového regulátoru v médiu, který může znatelně ovlivnit elicitaci sekundárních metabolitů. Například explantátové kultury mrkve bez auxinu v médiu neodpovídají na elicitaci, kdežto kultury s přídavkem auxinu ano. Také světelné podmínky kultury mohou hrát podstatnou roli. U *Hypericum perforatum* dochází ke zvýšené tvorbě hypericinu, jestliže jsou inkubovány za tmy. (38)

Z důvodu různorodosti odpovědí rostlin a rostlinných kultur na elicitaci je vždy důležitým aspektem této metody optimalizace složení média a všech ostatních podmínek pěstování rostlinné kultury. (38)

3.4. Těžké kovy

V důsledku znečišťování životního prostředí se jak do ovzduší, tak do půdního roztoku stále častěji uvolňují ionty těžkých kovů. Těžké kovy jsou definovány jako kovy s hustotou vyšší než 5g/cm^3 . 53 z 90 přirozeně se vyskytujících prvků jsou těžké kovy, ale ne všechny mají biologický význam. Na základě jejich rozpustnosti ve fyziologických podmínkách může být dostupných pro žijící buňky 17 těžkých kovů, které mohou mít také význam pro organismus a ekosystém. Mezi těmito kovy se nachází důležité mikroživiny, jako např. Fe, Mo a Mn. Další skupinou jsou toxické látky více či méně využívané jako stopové prvky. Patří sem Zn, Ni, Cu, V, Co, W a Cr. Třetí skupinou jsou prvky As, Hg, Ag, Sb, Cd, Pb, a U. Tyto prvky nemají žádnou známou funkci jako živiny a v rostlinách působí víceméně toxicky. (54,56)

Mechanismy toxicity těžkých kovů můžeme rozdělit do tří skupin:

1. Produkce reaktivních forem kyslíku autooxidací – Vnik těžkých kovů do buňky způsobí postupnou redukci molekulárního kyslíku z vody na reaktivní formy kyslíku ($\text{O}_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} a H_2O_2). Tyto reaktivní formy mohou vést k nespecifické oxidaci proteinů a membránových lipidů, nebo mohou způsobit poškození DNA. Tento mechanismus je typický pro přechodné kovy jako například železo a měď
2. Blokování esenciálních funkčních skupin v biomolekulách – Kadmium a některé další kovy, které se nezapojují do oxidačně-redukčních dějů (rtuť) způsobují přechodnou ztrátu glutathionu (GSH) a inhibici antioxidantních enzymů, zvláště glutathion-reduktázy. Dostupná data ukazují, že jestliže není kadmium dostatečně rychle detoxifikováno, může spustit sekvenci reakcí vedoucích k inhibici růstu, stimulaci sekundárního metabolismu a nakonec k buněčné smrti.
3. Vytlačení základních kovových iontů z biomolekul – mnoho enzymů obsahuje kov v pozici důležité pro jejich aktivitu. Nahrazení jednoho kovu jiným obvykle vede k inhibici, či ztrátě enzymové aktivity. Bivalentní kationy jako Co^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} nahrazují Mg^{2+} v ribulóze-1,5 bifosfát-karboxyláze/oxygenáze, což vede ke ztrátě její aktivity. Záměna Ca^{2+} za Cd^{2+} v proteinu kalmodulinu, důležité části buněčné signalizace, vede k inhibici

kalmodulin-závislé fosfodiesterázové aktivity v ředkvičce. Tento mechanismus se vyskytuje u různých druhů těžkých kovů. (56)

3.4.1. Rtuť

Rtuť patří společně se zinkem a kadmiiem do kovů 12. skupiny periodické tabulky prvků. Vyskytuje se v oxidačních číslech I a II. Za běžné teploty je to kapalný stříbrolesklý kov. Páry rtuti jsou jedovaté. V přírodě se vyskytuje nejčastěji vázaná ve sloučeninách. Mezi rudy rtuti se řadí coloradoit HgTe , kalomel Hg_2Cl_2 a cinabarit neboli rumělka HgS , která je nejvýznamnější.

Výroba rtuti je založena na pražení sulfidu rtuťnatého v proudu vzduchu. Uvolňuje se při tom oxid siřičitý a páry rtuti, které ochlazením kondenzují. Rtuť se také může vyrábět pražením sulfidické rudy se železným odpadem nebo s oxidem vápenatým. (60,61)

Vlivem znečišťování prostředí se jak do půdy, tak do atmosféry dostávají určitá množství rtuťnatých iontů, které mají následně schopnost pronikat do rostlinných organismů. V rostlinném těle má rtuť získaná z půdního roztoku tendenci akumulovat v kořenech, což ukazuje, že kořeny slouží jako bariéra příjmu rtuti. Koncentrace rtuti v rostlině je vždy závislá jednak na míře znečištění prostředí, a také na povaze vazby rtuti. Hladiny rtuti v rostlině jsou vždy vyšší, jestliže je kov přiveden v organické formě. Rtuť je rostlinou také vstřebávána z atmosféry a to převážně listy. Opadávající listy mohou být tak následně zdrojem kontaminace humusu. Nahromadění, toxická odpověď a distribuce rtuti se vždy liší u rostlin vystavených kontaminaci půdní, či atmosferické. Možné mechanismy toxicity rtuti jsou: změna permeability buněčné membrány, reakce -SH skupin s kationy, afinita pro reakci s fosfátovými skupinami a aktivními skupinami ADP či ATP a vytlačení základních kovových iontů z biomolekul.

Rtuť v rostlině ovlivňuje jak světelnou, tak temnostní fázi fotosyntézy. Náhrada centrálního atomu chlorofylu, Mg^{2+} , rtuťnatým iontem vede ke kolapsu fotosyntézy. U rostlin obsahujících akvaporiny hrozí nebezpečí narušení systému příjmu vody, jelikož akvaporiny jsou ke rtuti vnímavé. Expozice rtuti může také vést ke zvýšené frekvenci chromozomových aberací. (59)

3.5. Kyselina jasmínová

Kyselina jasmínová dostala své jméno po prvním zdroji z vyšších rostlin, ze kterého byla izolována – z esenciálních olejů *Jasminum grandiflorum*. Dnes je známo, že kyselina jasmínová (JA) a její methylester (MeJA) jsou obsaženy ve všech orgánech mnoha rostlinných druhů, a to v relativně vysokých množstvích. Kyselina jasmínová je chemicky 3-oxo-2-(2' cis-pentenyl)cyklopentan-1-octová kyselina a vyskytuje se ve formě 4 izomerů, z nichž je nejaktivnější (-)-jasmonát. Aktivnější než JA bývá její methylester, patrně díky své těkavosti a neschopnosti disociovat. (54)

Biosyntéza kyseliny jasmínové vychází z kyseliny α -linolenové, která je oxygenována lipoxygenázou a přes několik meziproductů vzniká JA. O degradaci JA je známo málo, přednostně se zabudovává do konjugátů s glukózou a některými aminokyselinami. Nejdéle známým fyziologickým účinkem JA je její urychlující účinek na stárnutí listových segmentů a dále má také růstově inhibiční vlastnosti. Nejvýznamnější úlohou JA je její funkce endogenní signální látky, která se podílí na změnách v genové expresi. (54)

Elicitace JA či MeJA ovlivňuje sekundární metabolismus rostlin. Gundlach popsal indukci vzniku sekundárních metabolitů po elicitaci MeJA v buněčných suspenzních kulturách 36 druhů jednoděložných a dvouděložných rostlin. JA silně indukuje produkci rýžových fytoalexinů a sakuranetinu v listech a buněčných kulturách této rostliny. (44)

Pozitivní elicitální účinek JA byl pozorován také v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum*. Zde kyselina jasmínová indukovala zvýšenou produkci hypericinu a zvýšený růst buněk kultury. Tento efekt se projevil u elicitace probíhající za tmy. (57)

Elicitace MeJA vyvolal také zvýšenou akumulaci antrachinonů v kalusové kultuře *Rubia cordifolia* a to i u genově upravené kultury. (58)

Elicitální účinek kyseliny jasmínové na sekundární metabolismus byl také sledován u pětidenních sazenic *Trifolium pratense* L. Byla zaznamenána indukce vzniku čtyř sloučenin, které byly nalezeny v kořenech rostliny po elicitaci JA. Jednalo se o clovamid, caffeoyltyrosin, *p*-kumaroyl DOPA a *p*-kumaroyltyrosin, z nichž clovamid množstevně značně převažoval. (44)

3.6. HPLC

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je v současné době jedna z nejprogresivnějších metod analytické chemie. Patří mezi chromatografické metody, které jsou dnes velmi široce využívány v analýze léčiv jak syntetického, tak přírodního původu. HPLC a chromatografie vůbec patří mezi metody separační, umožňující analýzu směsí s možností kvalitativního a často též kvantitativního hodnocení separovaných složek směsi.

Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární – nepohyblivá a druhá je mobilní – pohyblivá. V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. V případě HPLC je stacionární fáze upevněna v koloně a mobilní fáze (kapalina) pak unáší separované látky. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. K separaci tedy dochází na základě různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi.

HPLC je v dnešní době široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích. Hlavní přednosti této metody:

- Umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi
- Analýza je oproti jiným metodám velice rychlá, citlivá
- Pro analýzu postačuje jen minimální množství vzorku
- Možnost automatizace – modernější HPLC chromatografy, vybavené automatickými dávkovači, mohou po naprogramování provádět analýzy bez obsluhy

HPLC chromatografické kolony pro analytické účely jsou nejčastěji 10 – 25 cm dlouhé o vnitřním průměru 3 – 5 mm. Kolony jsou zpravidla zhotoveny z nerezové oceli nebo skla a jejich náplň tvoří vhodné sorbety. Jako sorbety se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze. Jedná se o zrnka silikagelu na jejichž hydroxylové skupiny jsou vhodným způsobem navázány různé radikály (nejčastěji uhlovodíkové řetězce, či krátké řetězce s funkční skupinou). Jako HPLC sorbety se rovněž používají silikagel a oxid hlinitý, i když v daleko menší míře než chemicky vázané fáze.

HPLC analýzu lze realizovat za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, tzv. isokratická eluce. Je-li v průběhu analýzy programově měněno složení mobilní fáze, jedná se o tzv. gradientovou eluci. Předpokladem úspěšné HPLC analýzy je optimalizace chromatografických podmínek tak, aby jednotlivé separované složky směsi poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky.

Citlivost a selektivita chromatografické analýzy závisí vždy na použitém detektoru.

- Spektrofotometrické detektory – proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky. Jsou nejčastěji používané, vyznačují se značnou citlivostí a lze je používat i při gradientové eluci.
- Fluorimetrické detektory – jsou výborně použitelné v případech, kdy analyzované léčivo, rozkladný produkt či metabolit vykazuje fluorescenci. Tyto detektory jsou sice méně universální, ale daleko citlivější a selektivnější než detektory spektrofotometrické. Při gradientové eluci je lze použít také.
- Elektrochemické detektory – uplatňují se při hodnocení léčiv, u nichž lze využít dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí, která probíhá na rozhraní elektroda – eluent. Jsou značně citlivé, ale většina z nich je nepoužitelná při gradientové eluci.
- Refraktometrické detektory – měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem, který vytéká z kolony a obsahuje analyzovanou látku. Jsou univerzální, ale pro malou citlivost se používají jen ojediněle.
- Spojení HPLC a hmotnostního spektrometru (HPLC – MS) – u této metody je nutno nejprve z eluentu odstranit mobilní fázi a molekuly léčiva jsou pak analyzovány v hmotnostním spektrometru dle hmotnosti. Tato metoda je vysoce selektivní, vysoce citlivá a poskytuje mnoho údajů potřebných pro identifikaci léčiv. Nevýhodou tohoto způsobu detekce je velmi vysoká finanční náročnost.

Nejdůležitější oblasti využití:

- Stanovení obsahu a čistoty léčiv
- Identifikace léčiv
- Stabilita léčiv, stabilitní studie
- Analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu
- Problematika monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách (71)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál, přístroje, pomůcky

4.1.1. Rostlinný materiál

K veškerým experimentům v této práci byla použita explantátová kultura, odvozená ze sterilní klíčící rostliny jetele lučního *Trifolium pratense* L., (*Fabaceae*) varieta Tempus. Semena byla získána ze šlechtitelské stanice Domoradice. Pokusy byly prováděny na suspenzní kultuře, která byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepačce. Elicitace byly provedena u tříleté suspenzní kultury.

4.1.2. Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do předem vysušené váženky byly odváženy asi 2,000 g explantátové kultury. Váženka s obsahem byla zvážena a sušena 2 hodiny v sušárně při 105°C. Po vysušení a vychladnutí v exsikátoru byla zvážena. Ztráta sušením byla vztažena na navážku explantátové kultury a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením 5,53% je aritmetickým průměrem ze tří stanovení. (40)

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 manganatý p.a., Lachema, Brno
síran měďnatý p.a., Lachema, Brno
síran zinečnatý p.a., Lachema, Brno
síran železnatý p.a., Lachema, Brno

4.1.4. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy A 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
Třepačka Unimax, 2010, Heidolph
Vodní lázeň KL – 1, Laboratorní přístroje, Praha
Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
Kapalinový chromatograf Unican Crystal, Cambridge
Kolona LiChrosper RP – 18 s předkolonkou, Merk, 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 (materiál odolný vůči vodě, chemikáliím a rozdílům teplot), které vyhovuje požadavkům pro kultivaci tkáňových kultur. Kalusové kultury byly kultivovány na můstcích z filtračního papíru ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách. Suspenzní kultury byly kultivovány ve 250 ml varných baňkách ze skla SIAL. Kovové pinzety, používané pro tento pokus, byly opláchnuty 96% ethanolem a po zabalení do hliníkové folie sterilizovány 2 hodiny při 200°C v horkovzdušném sterilizátoru.

4.2.2. Příprava živného média

Pro kultivaci tkáňových kultur *Trifolium pratense* L. bylo použito živné medium podle Gamborga (B5) následujícího složení: (41)

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) (39)

Jednotlivé substance byly naváženy na analytických vahách, v případě nízkých koncentrací pipetované ze zásobních roztoků. Všechny látky byly rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněné destilovanou vodou po značku. Až poté byly přidány růstové stimulatory. Živné medium bylo rozděleno po 25 ml do varných baněk. Baňky byly uzavřeny hliníkovou folií a sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

4.2.3. Podmínky pasážování a kultivace

Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kultury kalusové mechanickým rozvolněním na třepače. Následně byla kultivována ve varných baňkách na médiu podle Gamborga na pomaloběžném roleru při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Subkultivační interval byl 14 dní. (39) Pasážování kultur bylo provedeno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen minimálně 1 hodinu germicidní zářivkou. Po celou dobu pasážování byly zachovány přísně aseptické podmínky, bylo používáno sterilní sklo a nástroje.

4.3. Elicitace

4.3.1. Příprava roztoků elicitoru

K pokusům byly použity dva druhy elicitorů – kyselina jasmínová a chlorid rtuťnatý.

U elicitoru chloridu rtuťnatého byly připraveny čtyři vodné roztoky o následujících koncentracích:

Koncentrace I	0,1 μmol
Koncentrace II	1 μmol
Koncentrace III	10 μmol
Koncentrace IV	100 μmol

V druhém případě byly k elicitaci použity čtyři roztoky kyseliny jasmínové v 96% ethanolu o následujících koncentracích:

Koncentrace I	5 μmol
Koncentrace II	50 μmol
Koncentrace III	500 μmol
Koncentrace IV	5000 μmol

Z nejsilnější koncentrace daného elicitoru byly naředěním připraveny roztoky o nižší koncentraci. Vodné roztoky chloridu rtuťnatého 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 suspenzní kultury byla prováděna rozdílnými koncentracemi kyseliny jasmínové a chloridu rtuťnatého ve 21. dni kultivace. (39) Všechny práce byly uskutečněny za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu.

Postup elicítace byl následovný:

Do 64 baněk s kulturami byl vždy napipetován 1,00 ml elicítoru o příslušné koncentraci. Osm baněk bylo vyhrazeno pro vzorky kontrolní, do nich nebyl napipetován žádný elicítor. Všechny 72 baněk bylo řádně označeno a pečlivě uzavřeno hliníkovou folií. Následovala kultivace za již uvedených podmínek.

Po 6, 24, 48 a 168 hodinách působení elicítoru byly elicítované kultury odebrány. Odběry kontrolních vzorků byly provedeny po 6 a 168 hodinách. Buňky suspenzních kultur byly odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a sušeny při laboratorní teplotě.

U každého vzorku byla provedena dvě paralelní stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2005 a statistické vyhodnocení výsledků. V případě chloridu rtuťnatého jako elicítoru, bylo provedeno také stanovení obsahu isoflavonoidů dle ČL 2005.

4.4. Stanovení obsahu flavonoidů

4.4.1. Princip stanovení

Obsah flavonoidů se stanoví spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé. (40)

4.4.2. Postup stanovení

Základní roztok:

0,200 g – 0,400 g práškové kultury se ve 250 ml baňce smíchá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 minut na 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 minut na vodní lázni při 60°C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes vatu 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 šřavelovou 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:

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

V němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm;

M – hmotnost zkoušené kultury v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů

Methanolové extrakty suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. varieta Tempus byly zkoušeny na přítomnost isoflavonoidů. Stanovení daidzeinu, genisteinu, genistinu, formononetinu a biochaninu A bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. (42)

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. (40)

4.5.2. Postup stanovení

Příprava vzorku:

Asi 0,2000 g – 0,4000 g upráškované kultury se ve 100ml baňce smíchá s 15 ml *methanolu 80%* a extrahuje se 30 minut na vodní lázni při 80°C 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 LiChrosper R-18 (250 x 4 mm, velikost částic 5 µm) s ochrannou předkolonkou

Objem nástřiku: 20 μ l

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

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

Eluce mobilní fáze probíhá 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 $t = 15$ minut.

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

Získané výsledky obsahu flavonoidů ve sledovaných kulturách *Trifolium pratense* L. byly statisticky vyhodnoceny na základě T-testu, pro zvolenou hladinou 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-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}_1 aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x}_2 aritmetický průměr 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**), vypočítáno 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**). (43)

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 kyselinou jasmínovou

koncentrace elicitoru (μmol)	čas odběru (hod)	elicitovaná kultura		kontrola		T-test
		průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
5	6	0,1326	0,0616	0,1057	0,0434	0,505
	24	0,2221	0,0633	0,1057	0,0434	2,151
	48	0,1826	0,0606	0,1057	0,0434	1,459
	168	0,2446	0,0608	0,1760	0,0025	1,594
50	6	0,0970	0,0532	0,1057	0,0434	0,231
	24	0,1672	0,0542	0,1057	0,0434	1,603
	48	0,1974	0,0537	0,1057	0,0434	1,864
	168	0,0771	0,0491	0,1760	0,0025	2,845
500	6	0,1591	0,0471	0,1057	0,0434	1,179
	24	0,1091	0,0462	0,1057	0,0434	0,076
	48	0,1405	0,0489	0,1057	0,0434	0,579
	168	0,0805	0,0498	0,1760	0,0025	2,709
5000	6	0,0866	0,0534	0,1057	0,0434	0,393
	24	0,0571	0,0580	0,1057	0,0434	0,949
	48	0,1362	0,0596	0,1057	0,0434	0,585
	168	0,1200	0,0561	0,1760	0,0025	1,410

Tabulka 2

Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicitované chloridem rtuťnatým

koncentrace elicitoru (μmol)	čas odběru (hod)	elicitovaná kultura		kontrola		T-test
		průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
0,1	6	0,1217	0,0517	0,1436	0,0270	0,529
	24	0,2116	0,0508	0,1436	0,0270	1,674
	48	0,1473	0,0515	0,1436	0,0270	0,092
	168	0,1833	0,0518	0,1976	0,0010	0,390
1	6	0,1839	0,0534	0,1436	0,0270	0,952
	24	0,1844	0,0549	0,1436	0,0270	0,943
	48	0,1810	0,0262	0,1436	0,0270	1,406
	168	0,2356	0,0583	0,1976	0,0010	0,926
10	6	0,1343	0,0591	0,1436	0,0270	0,202
	24	0,1051	0,0590	0,1436	0,0270	0,839
	48	0,2151	0,0531	0,1436	0,0270	1,697
	168	0,2529	0,0548	0,1976	0,0010	1,280
100	6	0,1664	0,0538	0,1436	0,0270	0,536
	24	0,1439	0,0568	0,1436	0,0270	0,007
	48	0,2158	0,0552	0,1436	0,0270	1,662
	168	0,2964	0,0634	0,1976	0,0010	2,204

Tabulka 3

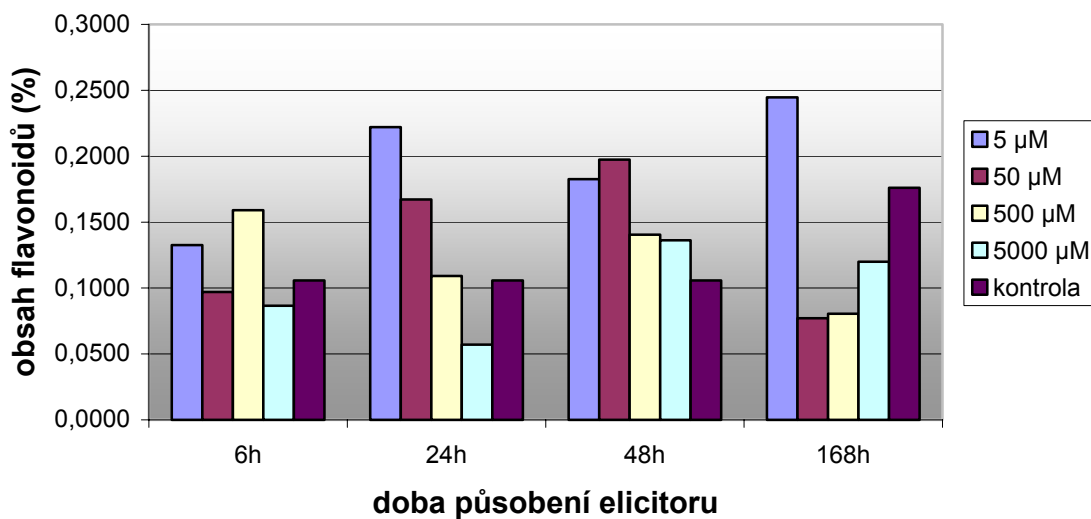
Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicitované chloridem rtuťnatým

Koncentrace elicitoru (μmol)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)			
		genistin	daidzein	genistein	formononetin
kontrola	6	0,26	0,01	0,01	-
	24	0,26	0,01	0,01	-
	48	0,26	0,01	0,01	-
	168	0,19	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	0,2	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	0,23	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	0,39	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

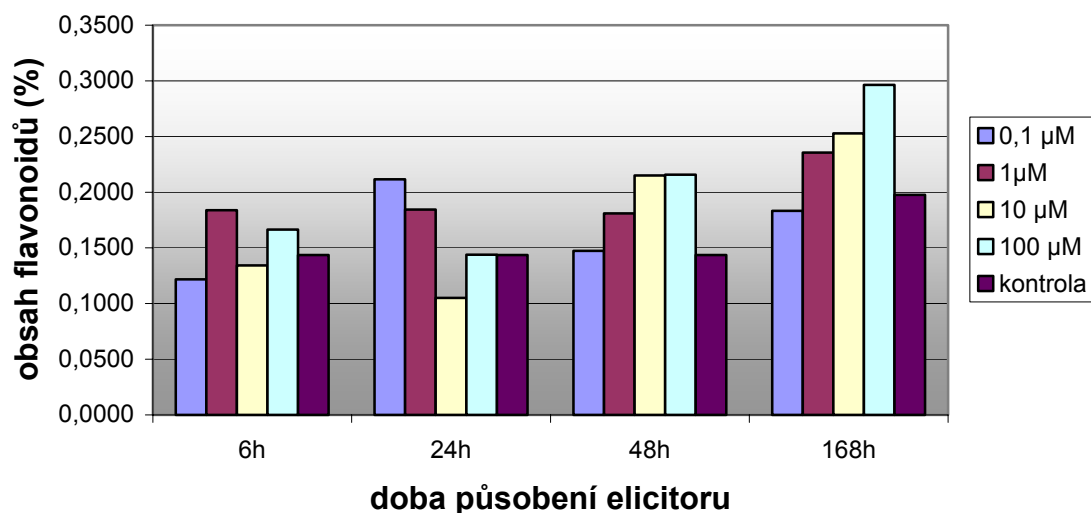
Graf 1

Elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. kyselinou jasmínovou



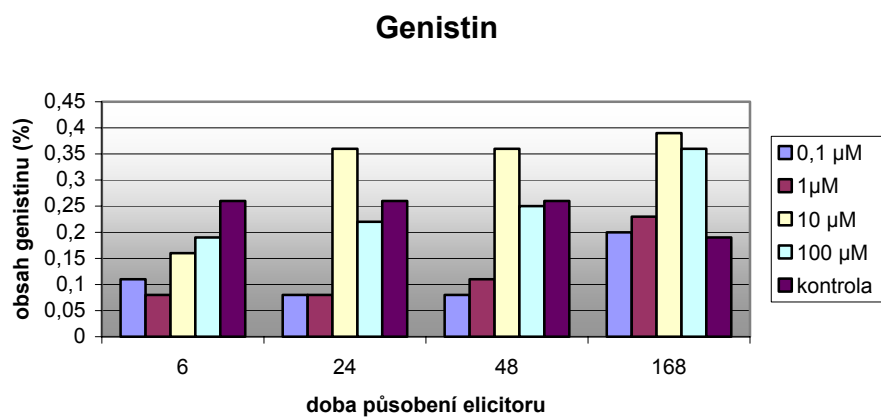
Graf 2

Elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. chloridem rtuťnatým

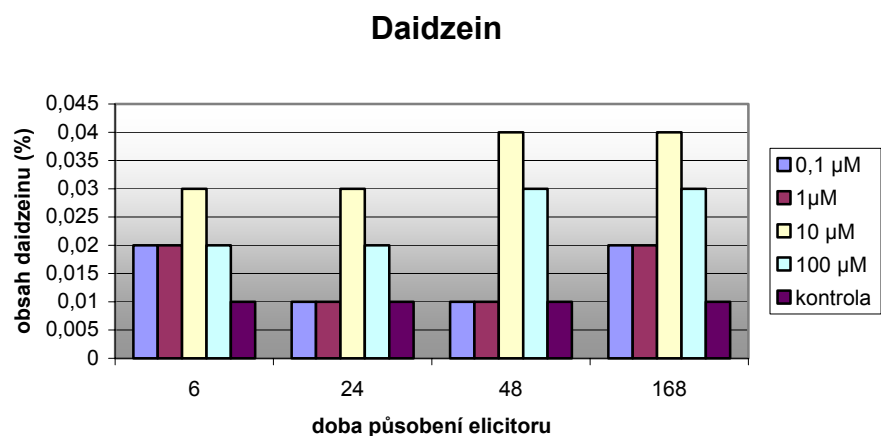


Grafy produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicované chloridem rtuťnatým

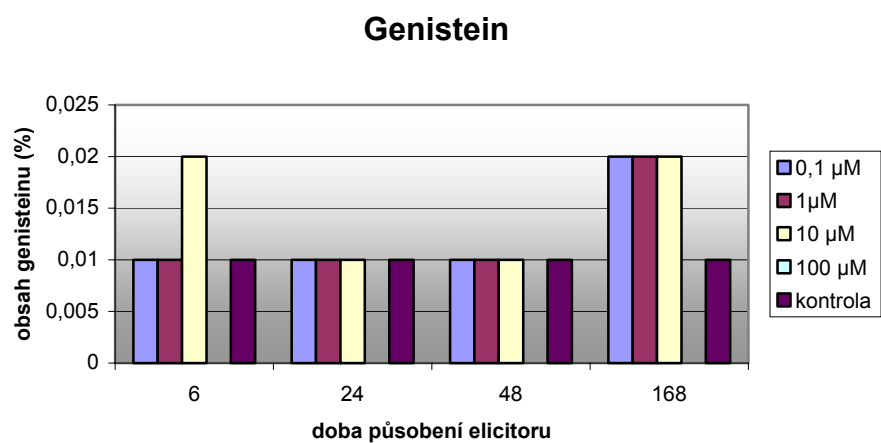
Graf 3



Graf 4



Graf 5



6. DISKUZE

V posledních letech je věnována stále větší pozornost kultivaci rostlinných tkání a buněk v podmínkách *in vitro*. Problémem těchto kultur je často velmi nízká koncentrace požadovaných metabolitů. Jedním z efektivních způsobů jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních je využití metody elicitace. Strategie je založena na faktu, že akumulace většiny sekundárních látek v rostlinách je součástí obranných mechanismů vyvolaných buď patogeny, nebo vlivy prostředí. Řada těchto mechanismů není dosud přesně objasněna. Ví se však, že většina obranných reakcí rostlin i kultur *in vitro* závisí na aktivaci vhodných genů, přičemž elicitory neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu. (39,62,63)

Kyselina jasmínová, vyskytující se v mnoha rostlinných druzích, se kromě jiných účinků projevuje v rostlině jako endogenní signální látka. (54) Pozitivní účinky elicitace kyselinou jasmínovou na sekundární metabolismus rostlin byly ověřeny v mnoha experimentech, např.: u explantátových kultur *Hypericum perforatum*, *Rubia cordifolia*, *Catharanthus roseus* a *Rubia tinctorum* (44,57,58,65,66)

Experimenty provedené v minulých letech prokázaly, že po elicitaci solemi těžkých kovů dochází ke zvýšení produkce sekundárních látek v rostlinných tkáních. Například u kultury *Ononis arvensis in vitro* bylo pozorováno zvýšení produkce flavonoidů po aplikaci NiCl_2 , CoCl_2 , CrCl_3 , CuSO_4 , CdCl_2 a HgCl_2 . (62) Pozitivní elicitální účinek rtuťnatých iontů byl také pozorován u kořenů *Medicago sativa*. (64)

Cílem této práce bylo sledovat vliv dvou různých elicitorů – kyseliny jasmínové a chloridu rtuťnatého ve čtyřech různých koncentracích na produkci flavonoidů explantátovou suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. U elicitoru chloridu rtuťnatého byl sledován také vliv na produkci isoflavonoidů (genistinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu). Sledované doby působení elicitoru (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z publikovaných údajů, které uvádějí zvýšení produkce flavonoidů v rozmezí několika hodin až dní po elicitaci kultur těžkými kovy. (44,45,46,56,64) Vzorky kontrolní kultury byly odebrány po 6 a 168 hodinách, jelikož produkce sekundárních metabolitů se v tak krátkých časových intervalech významně nemění. (44,45,47,48)

Z výsledků elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) kyselinou jasmínovou (tab.1, graf 1) je patrné, že nejvyššího elicitálního účinku bylo dosaženo u koncentrace elicitoru 5 μmol . Účinek se s časem postupně zvyšoval (s výjimkou aplikace 48 hodin) až do 168 hodin, kdy bylo dosaženo maximální produkce flavonoidů (0,245%). Nejvyšší zvýšení produkce způsobila však 24 hodinová aplikace této koncentrace, což představuje statisticky významné zvýšení produkce flavonoidů o 110 % v porovnání s kontrolou. U koncentrace elicitoru 50 μmol se účinek taktéž s časem zvyšoval, po 168 hodinách, došlo ovšem k inhibici produkce flavonoidů. Koncentrace 500 μmol měla nejvyšší elicitální účinek při době působení 6 hodin, poté se elicitální účinek mírně snižoval. Nejsilnější koncentrace elicitoru produkci flavonoidů, s výjimkou 48hodinové aplikace, spíše inhibovala.

Při elitaci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) chloridem rtuťnatým (tab.2, graf 2) byla produkce flavonoidů s rostoucí koncentrací elicitoru naopak stimulována. Nejvyššího elicitálního účinku bylo dosaženo při použití elicitoru o koncentraci 100 μmol . Elicitální účinek se s dobou působení elicitoru také zvyšoval. Maximální produkce flavonoidů (0,2964%) byla zjištěna při působení chloridu rtuťnatého 100 μmol po dobu 168 hodin, kdy došlo ke zvýšení produkce o 50 % oproti kontrole. U koncentrace elicitoru 10 μmol bylo pozitivního účinku dosaženo po 48 hodinách působení, poté se účinek mírně snižoval. Koncentrace 1 μmol stimulovala produkci ve všech sledovaných dobách působení. Chlorid rtuťnatý 0,1 μmol měl pozitivní účinek pouze při době aplikace 24 hodin, jinak produkci flavonoidů spíše inhiboval.

Porovnáme –li působení obou elicatorů na suspenzní kulturu *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus), jako výhodnější elicator se jeví kyselina jasmínová. Oproti chloridu rtuťnatému zde došlo k statisticky významnému zvýšení obsahu flavonoidů o 110 % v porovnání s kontrolou a o již při nízké koncentraci kyseliny jasmínové (5 μmol) a krátké době působení (24 hodin).

U suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) elicitované chloridem rtuťnatým byla metodou HPLC sledována také produkce isoflavonoidů. U kontrolní kultury byly zjištěny isoflavonoidy genistein, genistin a daidzein (tab. 3, graf 3, 4, 5).

Nejsilnější elicitální účinek měla koncentrace 10 μmol a to zejména při době aplikace 168 hodin. Obecně se elicitální účinek u všech koncentrací s dobou působení

zvyšoval. Maximální obsah genistinu (0,39 %) byl zjištěn při elicitaci chloridem rtuťnatým 10 μ mol a době působení elicitoru 168 hodin, kdy došlo ke zvýšení o 205 % oproti kontrole. Velmi nízký obsah daidzeinu a genisteinu v kontrolní kultuře zvýšila elicitace o 300 % a 100 %. U formononetinu došlo v případě některých koncentrací i k indukci tvorby, u kontrolní kultury totiž zjištěn nebyl.

Na základě výsledků je zřejmé, že produkce sekundárních metabolitů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varietá Tempus) je poměrně nízká. Pravděpodobně je tento jev zapříčiněn tím, že se jedná o mladou, rychle rostoucí suspenzní kulturu, která většinou produkuje jen malé množství metabolitů. Produkce sekundárních metabolitů však může být zvýšena určitým druhem stresu, což se nám v případě aplikace elicitorů kyseliny jasmínové i chloridu rtuťnatého podařilo potvrdit. I další studie svědčí o tom, že zejména kyselina jasmínová patří k významným signálním látkám rostlinných obranných reakcí, které vedou ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů. (49,50,51,52,65,66)

Elicitace se tedy projevila jako jeden z efektivních způsobů zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních. Jde o účinný a ekonomicky výhodný způsob, jehož význam dále stoupá.

7. ZÁVĚR

Výsledky dosažené v této práci lze shrnout do následujících bodů:

1. Maximální produkci flavonoidů (0,222%) vykazovala suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) při působení biotického elicitoru kyseliny jasmínové 5 μmol po dobu 24 hodin. V porovnání s kontrolou došlo k velmi významnému zvýšení produkce flavonoidů o 110 %.
2. Při použití abiotického elicitoru chloridu měďnatého bylo u suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) dosaženo nejvyšší produkce flavonoidů (0,296 %) za 168 hodin působení elicitoru o koncentraci 100 μmol . V porovnání s kontrolní kulturou zde došlo ke zvýšení produkce o 50 %.
3. Z výsledků je patrné, že jako výhodnější z obou elicitorů se jeví kyselina jasmínová. Oproti chloridu rtuťnatému zde došlo k statisticky významnému zvýšení produkce sekundárních metabolitů při použití nejslabší koncentrace elicitoru (5 μmol) a krátké době působení (24 hodin).
4. U abiotického elicitoru chloridu rtuťnatého byla sledována také produkce isoflavonoidů. Nejvyšší zvýšení produkce bylo v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus) zjištěno u genistinu. Po 168hodinové elicitaci 10 μmol chloridem rtuťnatým byl zjištěn maximální obsah genistinu 0,39 %, což představuje zvýšení produkce o 205 % oproti kontrolní suspenzi.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Slavík, B. et al.: Květena České republiky, Praha, Academia, 1995, s. 474.
2. Kresánek, J., Krejča, J.: Atlas léčivých rostlin a lesných plodov, Osveta, 1982, s. 192, 193.
3. Korbelář, J., Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství, Praha, Avicenum, 1981, s. 178.
4. <http://botanika.borec.cz>, 5. 1. 2008
5. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K69.php>, 5. 1. 2008
6. <http://rostliny.prirodou.cz>, 6. 1. 2008
7. <http://botany.cz>, 6. 1. 2008
8. Parvu, E.: Homeopathy, 2004; 93, 45.
9. <http://faf.vfu.cz/html/docs/plants/trifolium/ol.html>, 7. 1. 2008
10. http://faf.vfu.cz/vet_bot/docs/rostlina/trifpra.php, 7. 1. 2008
11. <http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html>, 7. 1. 2008
12. <http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/texty/flavon.htm>, 7. 1. 2008
13. Hubík, J., Dušek, J., Řezáčová, A., Štarhová, H.: Obecná farmakognosie II, Praha, SPN, 1989, s. 31-34.
14. Minařík, J., Farmakognosie, Avicenum, Praha, 1979, s. 140.
15. Volkan, Y. et al.: Food Chem., 2007; 108, 31.
16. Hyun, S. K. et al.: Biol. Pharm. Bull., 2008; 31, 154.
17. Kim, J. H. et al.: Biol. Pharm. Bull., 2006; 29, 302.
18. Chung, M. Y. et al.: Planta Med., 2004; 70, 258.
19. Soledade, M. et al.: Phytochemistry, 2008; 69, 894.
20. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 1992, s. 2, 9, 37, 84-88, 94.

21. Landa, Z. et al.: Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění, Praha, SPN, 1980, s. 7-45.
22. Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin, Olomouc, Vydavatelství Univerzity Palackého, 1995, s. 1, 13-21, 33, 50-54, 79-82.
23. Novák, F. J.: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin, Praha, Academia, 1990, s. 5-57.
24. Kováčik, A.: Genetika rostlin, Praha, SZN, 1983, s. 425.
25. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: Farmakognosie I, Praha, SPN, 1989, s. 11.
26. Tomko, J. et al.: Farmakognózia, Bratislava, Osveta/Avicenum, 1989, s. 181, 182.
27. Jahodář, L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 2000, s. 35-40.
28. Lee, H. S. et al.: *Planta Med.*, 1997; 63, 266.
29. Adlercreutz, H., Mazur, W.: *Ann. Med.*, 1997; 29, 95.
30. Garritano, S. et al.: *Phytomedicine*, 2005; 12, 143, 145.
31. Winkel-Shirley, B.: *Plant physiol.*, 2001; 126, 485.
32. <http://faf.vfu.cz/html/txts/isoflav.html>, 14. 1. 2008.
33. Ososki, A. L., Kennelly, E. J.: *Phytoter. Res.*, 2003; 17, 845.
34. Wu, Q., Wang, M., Simon, J. E.: *J. Chrom.*, 2003; 1016, 195.
35. Lapčík, O., Stárka, L.: *Vesmír*, 2004; 83, 531.
36. Deavours, B. E., Dixon, R. A.: *Plant physiol.*, 2005; 138, 2245.
37. Dušek, J. et al.: *Čes. Slov. Farm.*, 1996; 45, 204.
38. Vasconsuelo, A., Boland, R.: *Plant Sci.*, 2007; 172, 861.
39. Kašparová, M. et al.: *Čes. Slov. Farm.*, 2006; 55, 44.
40. Kolektiv autorů: *Český lékopis 2005*, Praha, Grada, 2005, s. 161, 162, 1368.
41. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: *Exp. Cell Res.*, 1968; 50, 151.

42. Rijke, E. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 2002; 468, 3.
43. Klemera, P., Klemmerová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*, Praha, Karolinum, 1993, s. 30, 80.
44. Tebayashi, S. et al.: *Phytochemistry*, 2000; 54, 387.
45. Wei, W. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006; 70, 298.
46. Pomahačová, B. et al.: *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 2006; 34, 29.
47. Chiny, T. et al.: *Process Biochem.*, 2005; 40, 3397.
48. Kartoseutono, S. et al.: *Biotechnol. Zett.*, 2002; 24, 687.
49. Satdive, R. K. et al.: *J. Biotechnik.*, 2007; 128, 281.
50. Filella, J., Penuelas, J., Llusia, J.: *New Phytologist*, 2006; 169, 135.
51. Gadzovska, S. et al.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2007; 89, 1.
52. Kuzovkina, J. U. et al.: *Rus. J. Plant Physiol.*, 2005; 52, 77.
53. Reichling, J., Biederbeck, K.: *Biologie*, 1989; 3, 188.
54. Procházka, S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Praha, Academia, 1998, s. 242, 424, 425.
55. Kneer, R., Zenk, M. H.: *Phytochemistry*, 1997; 44, 69.
56. Schützendübel, A., Polle, A.: *J. Exp. Bot.*, 2002; 53, 1351.
57. Walker, T. S., Pal Bais, H., Vivanco, J. M.: *Phytochemistry*, 2002; 60, 289.
58. Bulgakov, V. P. et al.: *J. Biotechnol.*, 2002; 97, 213.
59. Parta, M., Sharma, A.: *Bot. Rev.*, 2000; 66, 379.
60. Honza, J., Mareček, A.: *Chemie pro čtyřletá gymnázia 2. díl*, Olomouc, Nakladatelství Olomouc, 1998, s. 101.
61. Kolektiv autorů: *Encyklopedický slovník*, Praha, Odeon, 1993, s. 941.
62. Tůmová, L., Polívková, D.: *Čes. Slov. Farm.*, 2006; 55, 186.
63. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. Slov. Farm.*, 2003; 52, 248.
64. Zhao, S. et al.: *J. Inorgan. Biochem.*, 2007; 101, 1.

65. Rijhwani, S. K., Shanks, J. V.: *Biotechnol. Prog.*, 1998; 14, 442.
66. Mantova, O. L. et al.: *Russ. J. Plant Physiol.*, 1999; 49, 248.
67. Sivesind, E., Seguin, P.: *J. Agronom. Crop Sci.*, 2006; 192, 50.
68. Angelova, Z., Georgie, S., Roos, W.: *Biotechnol. Biotechnik. Eq.*, 2006; 20, 2.
69. Nymfeo, A. G.: *Pharmacognosy rev.*, 2007; 1, 69.
70. Montesano, M., Brader, G., Palva, E. T.: *Mol. Plant Patol.*, 2003; 4, 73.
71. Klimeš, J. et al.: *Kontrola léčiv I*, Praha, Karolinum, 2002, s. 22, 23, 29-33.
72. Coon, J. T., Pittler, M. H., Ernst, E.: *Phytomedicine*, 2007; 14, 153

9. SOUHRN

Explantátová kultura *Trifolium pratense* L.

Souhrn

Cílem práce bylo sledovat vliv elicitorů kyseliny jasmínové a chloridu rtuťnatého na produkci flavonoidů u suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta Tempus). U elicitoru chloridu rtuťnatého byl sledován jeho vliv také na produkci isoflavonoidů výše zmíněnou suspenzní kulturou.

Kultury byly kultivovány na živném mediu podle Gamborga s přidavkem 2 mg.l^{-1} 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2 mg.l^{-1} 6-benzylaminopurinu při teplotě 25°C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. U elicitovaných a kontrolních vzorků bylo provedeno fotometrické stanovení flavonoidů dle Českého lékopisu 2005 a stanovení isoflavonoidů metodou HPLC.

Z výsledků elicítace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. oběma elicitory je patrné, že jako výhodnější z obou elicitorů se jeví kyselina jasmínová. Oproti chloridu rtuťnatému zde došlo k statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů při použití koncentrace elicitoru $5 \mu\text{mol}$ a době působení 24 hodin. Metodou HPLC byly zjištěny isoflavonoidy genistin, genistein a daidzein. Pozitivně lze hodnotit zvláště 168 hodinovou aplikaci $10 \mu\text{mol}$ chloridu rtuťnatého, která stimulovala produkci všech těchto flavonoidů.

Explant culture of *Trifolium pratense* L.

Summary

The objective of this work was to observe the effect of the elicitors of jasmonic acid and mercuric chloride on the production of flavonoids by the *Trifolium pratense* L. suspension culture (variety Tempus). By the elicitor of mercuric chloride was observed also its effect to the production of isoflavonoids in the same culture.

The cultures were cultivated in Gamborg nutrient media with the addition of 2 mg.l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2 mg.l⁻¹ 6-benzylaminopurine, at the temperature of 25°C and 16-hours light/8-hours dark period. The elicited and control samples underwent the photometric determination of flavonoids in accordance with the Czech Pharmacopoeia 2005 and the determination of isoflavonoids via the HPLC method.

From the results of the elicitation of *Trifolium pratense* L. by both elicitors we can see, that more profitable of these is jasmonic acid. Compared to the mercuric chloride there was found a significant increase of flavonoid production while using a concentration of 5 µmol and operating time 24 hours. Via the HPLC method were found out the isoflavonoids genistin, genistein and daidzein. We can positively evaluate mainly 168-hours application of 10 µmol mercuric chloride, which stimulated the production of all these flavonoids.