

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOSIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Explantátová kultura *Trifolium
pratense* L.**

Lenka Šustrová

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

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

Oponent:

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

Úvodem své diplomové práce bych ráda poděkovala PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení v průběhu zpracování diplomové práce. Současně děkuji za poskytnutí literárních podkladů a také mnohých cenných rad a připomínek.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. CÍL PRÁCE.....	2
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	3
3.1. Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L., <i>Fabaceae</i>).....	3
3.1.1. Botanický popis rostliny, výskyt.....	3
3.1.2. Odrůdy.....	5
3.1.3. Sběr a úprava drogy.....	5
3.1.4. Použití.....	5
3.1.5. Obsahové látky.....	6
3.1.5.1. Flavonoidy.....	6
3.1.5.2. Isoflavonoidy.....	8
3.2. Rostlinné explantáty.....	10
3.2.1. Obecná charakteristika.....	10
3.2.2. Vlastnosti rostlinných kultur.....	12
3.2.3. Odvození a udržování kultury.....	13
3.2.4. Kultivační podmínky.....	14
3.2.4.1. Živná média.....	14
3.2.4.2. Fyzikální podmínky kultivace.....	16
3.2.5. Fáze růstu kultury.....	16
3.2.6. Biotechnologické využití rostlinných explantátových kultur.....	18
3.2.6.1. Produkce sekundárních metabolitů.....	18
3.3. Elicitace.....	20
3.3.1. Obranné reakce rostlin.....	20
3.3.2. Phytoalexiny.....	21
3.3.3. Elicitory.....	21
3.3.3.1. Biotické elicitory.....	21
3.3.3.2. Abiotické elicitory.....	22
3.3.4. Mechanismus účinku elicitoru.....	22
3.3.5. Podmínky elicitace.....	24
3.4. Rtuť.....	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29

4.1. Přístroje a pomůcky	29
4.2. Chemikálie	29
4.3. Rostlinný materiál	30
4.4. Stanovení ztráty sušením	30
4.5. Kultivace explantátové kultury	31
4.5.1. Kultivační nádoby a nástroje	31
4.5.2. Příprava živného média	31
4.6. Odvození kalusové kultury, pasážování a kultivace	32
4.7. Elicitace	33
4.7.1. Příprava roztoků elicitoru	33
4.7.2. Elicitace a odběr kultur	34
4.8. Stanovení obsahu flavonoidů	34
4.8.1. Princip stanovení	34
4.8.2. Postup stanovení	34
4.9. Stanovení obsahu isoflavonoidů	36
4.9.1. Příprava vzorku	36
4.9.2. Parametry HPLC analýzy	36
4.10. Statistické zpracování výsledků	38
5. VÝSLEDKY	40
5.1. Tabulky	40
5.2. Grafy	43
6. DISKUSE	44
7. ZÁVĚR	46
8. SOUHRN	47
9. SEZNAM LITERATURY	49

1. ÚVOD

Vyšší rostliny jsou důležitými zdroji léčivých látek. Rostlinné části (drogy) se používají buď přímo jako léčivé přípravky nebo slouží nepřímo k získávání účinných látek. Materiál se získává z polních monokultur nebo z planě rostoucích rostlin. V posledních letech se však stále více projevují obtíže při zajišťování přírodních surovin. Jejich ceny vzrůstají a současně stoupají nároky farmaceutického průmyslu. Sběr i polní pěstování léčivých rostlin je navíc sezónní záležitost, jejíž výtěžek je závislý na mnoha činitelích a nelze jej příliš dále zvyšovat.[19,22]

Vzrůstající obtíže při zajišťování přírodních surovin vedou k hledání alternativních způsobů získávání rostlinných metabolitů. Jednou z možností by mohlo být využití buněčných kultur, jejíž hlavní výhody spočívají v tom, že produkce je nezávislá na podnebí, na výkyvech počasí, kvalitě půdního fondu a ekonomické situaci. Takto získaný materiál dosahuje stupně homogenity, který je u nativních rostlin nedosažitelný, biomasa je sterilní a neobsahuje insekticidy, fungicidy ani herbicidy.[19]

Často se stává, že převedením do kultury *in vitro* a ztrátou diferenciací pletiva dochází ke změně či přerušení metabolických drah. Množství vyprodukovaných sekundárních metabolitů bývá oproti intaktní rostlině nižší.[22]

Jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšení produkce a akumulace sekundárních přírodních látek v kulturách *in vitro* je elicitace buněčných kultur. Jedná se o metodu založenou na signálem (elicitem) indukované expresi genů, což vede k nárůstu hladiny metabolicky aktivních enzymů a následně i k zesílení syntézy sekundárních metabolitů.[24]

Zřejmý je stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s bohatým spektrem jejich biologických účinků.

Vhodný zdroj těchto sekundárních metabolitů představuje jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*).[24]

Problematikou elicitace explantátových kultur *Trifolium pratense* L. abiotickým elicitem chloridem rtuťnatým se zabývá i tato diplomová práce.

2. CÍL PRÁCE

1. Seznámení s metodikou kultivace a elicitace rostlinných explantátových kultur *in vitro*.
2. Sledování vlivu čtyř různých koncentrací abiotického elicitoru chloridu rtuťnatého na produkci sekundárních metabolitů kalusovou a suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. v závislosti na délce jeho působení.

3. TEORETICKÁ ČÁST

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

3.1.1. Botanický popis rostliny, výskyt

Trifolium pratense je ve své anatomické stavbě velmi proměnlivý druh. Odlišnosti nacházíme ve vzrůstu, velikosti i v odění lodyh a palistů podpůrných listů. V České republice se na celém území vyskytuje velmi hojně, od nížin po horské oblasti. Rozšířen je téměř po celé Evropě. Zavlečený, zdomácnělý a pěstovaný je ve východní Asii, v Severní i Jižní Americe, v Austrálii, na Novém Zélandu a v jižní Africe. V některých pohořích Evropy a na mořských pobřežích tvoří morfologicky diferencované rasy, obvykle označované jako subspecie nebo variety.[1,2,3]

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

a má dolní zub delší. Koruna má horní plátek (pavéza) delší než oba postranní plátky (křídla) a ty jsou delší než dva spodní srostlé v tupý člunek. Plodem je drobný, nepukavý, vejčitý, tence blanitý, jednosemenný lusk otevírající se víčkem. Semena jsou nesouměrně srdcovitá, poněkud zploštělá, hladká, lesklá, žlutá až pískově hnědá, dlouhá 1,5-2,0 mm a široká 1,2-1,5 mm. Mají zřetelně vyznačenou rýhu.[1,2,4,5,6]

Jetel luční roste ve světlých lesích, na okrajích lesů a na loukách, kde indikuje mírně vlhké půdy, protože těžko snáší sucho i větší vlhko. Je rovněž pěstován na polích v různých šlechtěných odrůdách. Tento druh je dobrá pícnina bohatá na bílkoviny a zároveň důležitá medonosná rostlina. Kvůli dosti hluboko uloženým medníkům mohou jetel luční opylovat jen čmeláci nebo motýli.[3,4,7]



3.1.2. Odrůdy

V České republice nacházíme tři poddruhy, které bývají někdy hodnoceny jako odrůdy. Jedná se o *Trifolium pratense subsp. pratense*, vytrvalá bylina s významem léčivé rostliny; *subsp. sativum*, obvykle 2-3letá bylina představující jednu z nejvýznamnějších pícnin a *subsp. americanum*. Posledně zmiňovaný vytrvalý poddruh k nám byl dovezen v 80. letech 19. století, ale od jeho pěstování bylo později upuštěno.[1]

3.1.3. Sběr a úprava drogy

Jako droga se používají nerozpadlé hlávky – *Trifolii pratensis flos*. (Droga není oficiální v ČL 2005 ani v jeho Doplnčích.) Rostlina kvete od května do října. Při sběru je nutno odstranit z květních hlávek palisty podpůrných listů. Překvetlé hlávky při sušení hnědnou, proto jsou bezcenné. Květy je možno vystavit jeden den v jednoduché vrstvě přímému slunci a pak dosušit ve stínu a v průvanu. Přehrabáváním se hlávky snadno rozpadají a dávají bezcennou drť. Správně usušená droga zachová původní barvu nebo trochu ztmavne, ale nesmí být rezavá. Hlavní podmínkou je, aby hlávky zůstaly v celku a nebyly uvnitř suché. Suší-li se uměle, teplota nesmí překročit 35°C. Drogu je při skladování nutno chránit před světlem a vlhkem, rychle podléhá zkáze.[4]

3.1.4. Použití

Jetel luční se vnitřně užívá ve formě nálevu (2 čajové lžičky drogy na šálek vody). Lidové léčitelství drogu využívá při příušnicích, dále je užívána k úpravě stolice při průjmeh, při bronchitidách, při cukrovce a revmatismu. Zevně je užívána jako kožní dezinficiens na ekzémy a hnisavé rány ve formě koupelí. Je součástí mnohých potravních doplňků na zmírnění projevů menopauzálních potíží. Dnes se používá hlavně jako korigens chuti a vůně do čajových směsí. Mladé listy jsou připravovány jako zelenina podobně jako špenát. V Irsku a Skotsku se vyrábí ze sušených květů pečovaný chléb zvaný „thambrak“.[2,4,6,7]

3.1.5. Obsahové látky

Spektrum obsahových látek *Trifolium pratense* zahrnuje flavonoidy, isoflavonoidy, třísloviny, saponiny, kumariny, kyanogenní glykosidy, fenolické glykosidy, organické kyseliny (salicylová, oxalová, kumarová, hroznová), minerální kyseliny, barviva, silice, salicyláty, β -sitosterol, cholin, lecitin, vitaminy (vitamin A, C, B-komplex), vápník, hořčík, železo.

Z hlediska potenciálního využití v terapii se jeví jako nejzajímavější skupina isoflavonoidů zahrnující formononetin a biochanin A, které jsou v rostlině zastoupeny nejvíce a dále daidzein, genistein, genistin, kumestrol, ononin, trifoliol.[8,9]

3.1.5.1. Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou látky náležící mezi rostlinné sekundární metabolity. V současnosti je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny tohoto typu.

Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany). Nejčastěji se vyskytují flavany, méně často isoflavany. Neoflavany se vyskytují vzácně a nemají terapeutický význam. Všechny tři kruhy bývají hydroxylovány a methoxylovány, jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavonoidy dělí do několika skupin (flaveny, flavany, flavanoly, flavanony, flavanonoly, flavandioly, flavony, flavonoly). Flavonoly jsou nejhojnější skupinou flavonoidů zastoupených v ovoci a zelenině, nejběžnějšími zástupci jsou potom kvercetin a kemferol.

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

Flavonoidy se v rostlinách vyskytují rozpuštěné v buněčné šťávě vakuoly. Methoxylované deriváty jsou lipofilní a nacházejí se v silicích. V živém rostlinném

organismu se flavonoidy patrně účastní oxidačně redukčních pochodů. Další funkcí flavonoidů je vábení opylovačů a ochrana rostlin před UV zářením.

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

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemorhagicky a antiedematosně (P-vitaminový účinek). Jsou inhibitory hyaluronidasy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi, jsou proto podpurnými prostředky při léčení infekčních nemocí. Vykazují též antimikrobiální a antivirovou aktivitu. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S vápenatými ionty tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C. Mají též vlastnosti choleretické, cholagogní a spasmolytické. Účinné jsou glykosidy i aglykony. Používají se v čistém stavu, častěji však jako drogy nebo jejich extrakty.

Flavonoidy jsou významnou součástí antioxidačního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (železo, měď). Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace. Optimální radikálově likvidační vlastnosti byly nalezeny pro o-dihydroxy strukturu v kruhu B, 2,3 dvojnou vazbu a 4-oxo funkční skupinu v kruhu C a 3 a 5-hydroxyskupiny na kruzích A a C. Tuto strukturu mají právě flavonoly. Ukazuje se, že přírodní flavonoidy s popsánými vlastnostmi mohou významným způsobem působit při prevenci chorob majících svůj původ v oxidačním poškození biologických struktur (ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění). Vhodný způsob stravování a příjem potravin s vyšším obsahem flavonoidů by mohl pomoci při léčbě těchto chorob a předcházení jim.[9,10,11]

3.1.5.2. Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou odvozené od 3-fenylchromanu, jeví tedy podobnost s flavonoidy (deriváty 2-fenylchromanu), k nimž jsou také řazeny jako zvláštní skupina. Na rozdíl od flavonoidů jsou však u rostlin mnohem méně zastoupeny. To je dáno přítomností specifického enzymu zodpovědného za přeměnu 2-fenylchromanového cyklu na 3-fenylchroman. Isoflavonoidy jsou tak téměř specifickými obsahovými látkami čeledi *Fabaceae*. Vzácně je lze nalézt i v některých dalších čeledích, jako například *Iridaceae*, *Myristicaceae*, *Rosaceae*. [12,13]

Nejčastěji se vyskytující skupinou těchto sekundárních metabolitů rostlin jsou isoflavony, které se v rostlině nacházejí častěji ve volné formě a méně často glykosidicky vázané. Nejvýznamnějšími zástupci z více než 360 zatím popsáných isoflavonů jsou biochanin A, formononetin, daidzein a genistein. [13]

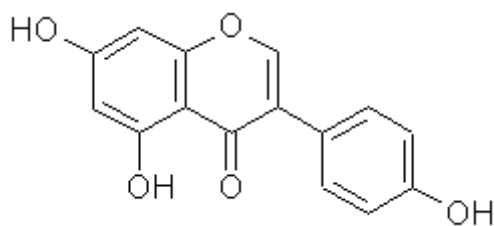
O významu isoflavonoidů v rostlině se zatím příliš neví. Pravděpodobně jsou produkovány jako odpověď na infekci patologickým agens (fytoalexiny) a mohou tak představovat jeden z obranných mechanismů rostliny. [12] Isoflavonoidy lze izolovat z většiny rostlinných tkání, přičemž v pupenech, mladých výhoncích a klíčcích se vyskytují více. Z toho se usuzuje, že by mohly zasahovat do regulace fyziologických procesů důležitých pro růst rostlin. [14,15]

Nejvýznamnějším zdrojem isoflavonoidů je sója a sojové produkty. Ostatní luštěniny (fazole, hrách) tyto látky obsahují také, v kvantitativním vyjádření je jich tady však mnohem méně. [13] Dále byly nalezeny v olejnatých semenech, obilninách, zelenině, ovoci, čaji nebo kávě. Obsah isoflavonoidů byl v malé míře zjištěn i v takových výrobcích z rostlin, jakými je bourbon či pivo. [9,16]

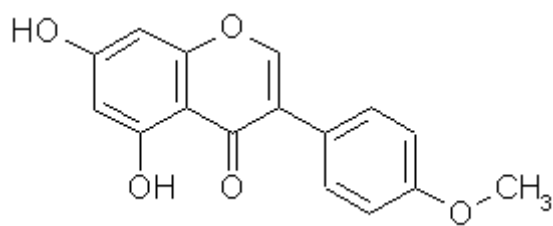
Isoflavonoidy se váží na estrogenní receptory a působí tak jako slabé estrogény (hormone like effect), ovšem zároveň mohou narušovat funkci endogenních estrogenů v lidském organismu. Princip antiestrogenního působení je založen také na stimulaci biosyntézy SHBG (sexuální hormony vázající globulin) v játrech. Vyšší hladiny SHBG jsou protektivním faktorem proti nadměrnému působení estrogenů i androgenů v cílové tkáni. Ani u maximálních koncentrací dosažitelných příjmem potravy není estrogenní a antiestrogenní účinek příliš dramatický. Isoflavonoidy mohou též ovlivňovat různé enzymy, syntézu proteinů,

transport vápníku, oxidaci lipidů, diferenciaci buněk nebo účinek růstových faktorů. Vykazují tedy široké spektrum biologické aktivity, z něhož je možné jmenovat například aktivitu antioxidační, antiosteoporotickou, antikarcinogenní, antiatherogenní, hypocholesterolemickou, antivirovou, antibakteriální, insekticidní, antifungální a imunosupresivní. Působí také jako antidotum proti některým hadím a pavoučím jedům.[9]

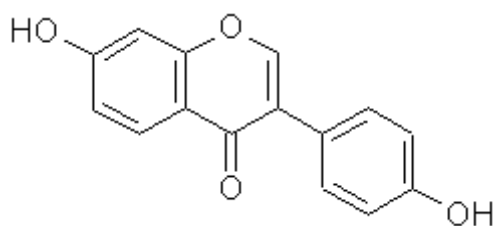
Struktury nejvýznamnějších isoflavonoidů



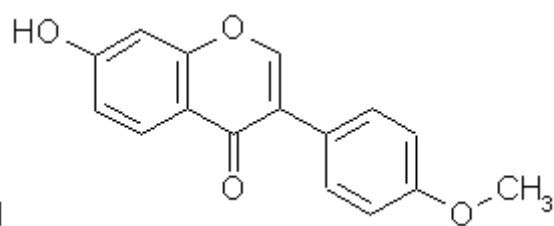
genistein



biochanin A



daidzein



formononetin

3.2. Rostlinné explantáty

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

V 50. letech 20. století došlo k vývoji aparatur. Byly používány různé druhy třepaček (Muir, 1954), White (1953) vyvinul roler, Nickell a Tulecke (1960) pracovali se suspenzemi rostlinných buněk ve fermentačních aparaturách.[17]

V současné době lze využití kultur *in vitro* rozdělit na dvě oblasti, v nichž je prováděn výzkum, jenž má své praktické uplatnění. Jde o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin a o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami, kterou lze ovlivnit například využitím prekurzorů požadovaných metabolitů, biotransformací nebo procesem elicítace kultur.[18]

3.2.1. Obecná charakteristika

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

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

Intaktní rostlina – původní rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách.

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

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

Primární explantát – rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny.

Primární kultura – kultura primárních explantátů.

Subkultivace, pasážování – přenos celé kultury nebo její části (inokula) do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat nebo zesílit růst kultury po další subkultivační interval.

Subkultivační interval – doba mezi dvěma pasážováními.

Subkultivační číslo – udává, kolikrát byla kultura pasážována.

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

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

Kalusová kultura – kultura kalusu *in vitro*.

Totipotence – schopnost rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* obnovit v průběhu diferenciačních procesů specializované funkce a postupně regenerovat ve fertilní rostlinu; umožňuje realizace genetických změn vyvolaných v jednotlivých buňkách na úrovni celého organismu.

Diferenciace – chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech spočívající v aktivaci či inaktivaci určitých genů, jimiž se odlišily od tzv. eumeristemického stavu a získaly jinou specializaci. Opačný proces je nazýván dediferenciace.[17,19]

3.2.2. Vlastnosti rostlinných kultur

- Rostlinné kultury je možno odvodit z buňky či komplexu buněk pletiva kteréhokoliv orgánu rostlinného těla (s výjimkou některých velmi specializovaných buněk, např. sítkovice, sklereidy).
- Kulturu lze za vhodných kultivačních podmínek pěstovat *in vitro* neomezeně dlouhou dobu.
- Tkáňová a suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje, ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter, není však homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciace.
- Suspenzní kultury, které lze z tkáně pěstované na pevné půdě získat buď enzymovým rozvolněním (např. pomocí pektináz) nebo mechanickou cestou, jsou tvořeny jednotlivými buněčnými shluky různé velikosti, jejichž tvorbu se dosud nepodařilo vyloučit. Rozpadavost kultury je zřejmě geneticky podmíněna a lze ji ovlivnit složením média a kultivačními podmínkami.

- Buňky tkáňových ani buněčných kultur nejsou schopny tvořit jednovrstevnou kulturu (monolayer), neuchycují se na tuhé ani na polotuhé podklady.
- Řada rostlinných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách.
- Orgánové, tkáňové ani buněčné kultury nejsou schopny bez poškození podstoupit konzervaci mrazem.
- Vhodnou kombinací růstově aktivních látek a ostatních složek kultivačního média lze v kulturách indukovat histogenezi nebo organogenezi, takto je možné odvodit z jediné somatické buňky životaschopnou rostlinu.[19]

3.2.3. Odvození a udržování kultury

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

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

Z kalusové kultury lze enzymatickým nebo mechanickým způsobem odvodit kulturu suspenzní. V prvním případě se používají vhodné pektinázy, ve druhém pomaloběžné rolery a třepačky. Získané kultury lze udržovat za podmínek *in vitro* neomezeně dlouho. Kultura musí být pravidelně pasážována za aseptických podmínek, aby se zabránilo nežádoucí kontaminaci rostlinného explantátu.[19]

3.2.4. Kultivační podmínky

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

3.2.4.1. Živná média

Živné médium tvoří prostředí, které obsahuje všechny látky důležité pro růst kultury. Může být tekuté nebo tuhé (s přísadou agaru). Jednotlivé zastoupení komponent, jak kvantitativní tak kvalitativní, má rozhodující význam nejen pro růst explantátů, ale například i pro rozpadavost kalusu při převádění do suspenzní kultury.

Složky živných půd se podle množství v půdě resp. svého charakteru nebo fyziologických účinků rozdělují do následujících skupin:

- ❖ **Destilovaná voda** – s minimálním obsahem anorganických látek, prostá pyrogenů, plynů a organických nečistot.
- ❖ **Makroelementy** – dusík, síra, fosfor, hořčík, vápník a draslík jsou nutné pro kultivaci intaktních rostlin. Přidávají se do živné půdy ve formě solí, jejich koncentrace v médiu je vyšší než 30 mg.l^{-1} .
- ❖ **Mikroelementy** – železo, mangan, měď, zinek, bor, jod, molybden jsou nepostradatelné pro správný vývoj. Jsou přítomny v malých množstvích ve formě solí.
- ❖ **Zdroje organického uhlíku** – kultivované rostlinné tkáně jsou schopny využít uhlík jako základní stavební jednotku z cukrů, alkoholů a organických kyselin. Nejlepším zdrojem jsou však sacharidy (nejčastěji sacharóza v koncentraci 2-5 %, kterou je možné nahradit glukózou, laktózou či škrobem).
- ❖ **Vitamíny** – explantátové kultury nejsou schopny produkovat dostatečné množství vitamínů pro svůj růst a vývoj. Nejčastěji se dodává pyridoxin, thiamin, kyselina nikotinová a myoinositol. V kultivačních médiích se někdy používají další vitamíny jako biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin a další. Jejich přítomnost však většinou není nezbytná.

- ❖ **Nedefinované směsi přírodních látek** – často se používá hydrolyzát kaseinu, kokosové mléko a extrakty z pšenice, kukuřice a kvasnic.[19,20]
- ❖ **Látky používané pro zpevnění média** – pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar, jenž má oproti jiným látkám řadu výhod. Agarové gely jsou při kultivačních teplotách stabilní, agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhost svarového gelu je možno regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. Není-li použito pevné médium, je možné explantáty fixovat na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě nebo perforovaném celofánu.[17]
- ❖ **Prostředky pro odpěňování živných pūd** – tyto prostředky jsou důležité zejména ve výrobě. Jedná se o rostlinné oleje (sójový, řepkový, kokosový, slunečnicový, hořčičný), živočišné tuky (lůj, dezodorizovaný rybí tuk, tekutá frakce vepřového sádla) a silikonové oleje (jako vodná emulze s obsahem 10 % silikonu).
- ❖ **Aminokyseliny** – slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Jejich přirozené směsi působí příznivě na růst a vývoj explantátu, podporují též organogenezi. Dodávají se do živných médií především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů.[19]
- ❖ **Růstové regulátory (fytohormony)** – rostlinné buňky jsou při pěstování *in vitro* většinou závislé na přítomnosti růstových regulátorů, protože syntéza endogenních fytohormonů není pro zajištění růstu dostatečná. Pro účely kultivace je lze rozdělit do tří základních skupin:
 - **Auxiny:** v tkáňových kulturách rostlin se používá především kyselina β -indolyloctová (IAA), kyselina β -indolyl-4-máselná (IBA), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina α -naftyloctová (α -NAA). V kultivačním médiu jsou používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtu a zejména kořenů.
 - **Cytokininy:** nejdůležitějšími přírodními cytokininy jsou zeatin a 6-izopentenylaminopurin a syntetickými 6-furfurylaminopurin (kinetin) a 6-benzylaminopurin (BA). Používají se ke stimulaci buněčného dělení a k indukci tvorby axilárních prýtů.

- **Gibereliny:** hlavními zástupci jsou kyselina giberelová (GBA) a giberelin. Přidávají se do média většinou za účelem stimulace růstu buněčných kultur, kalusů a zakrslých rostlin.[17,19]

3.2.4.2. Fyzikální podmínky kultivace

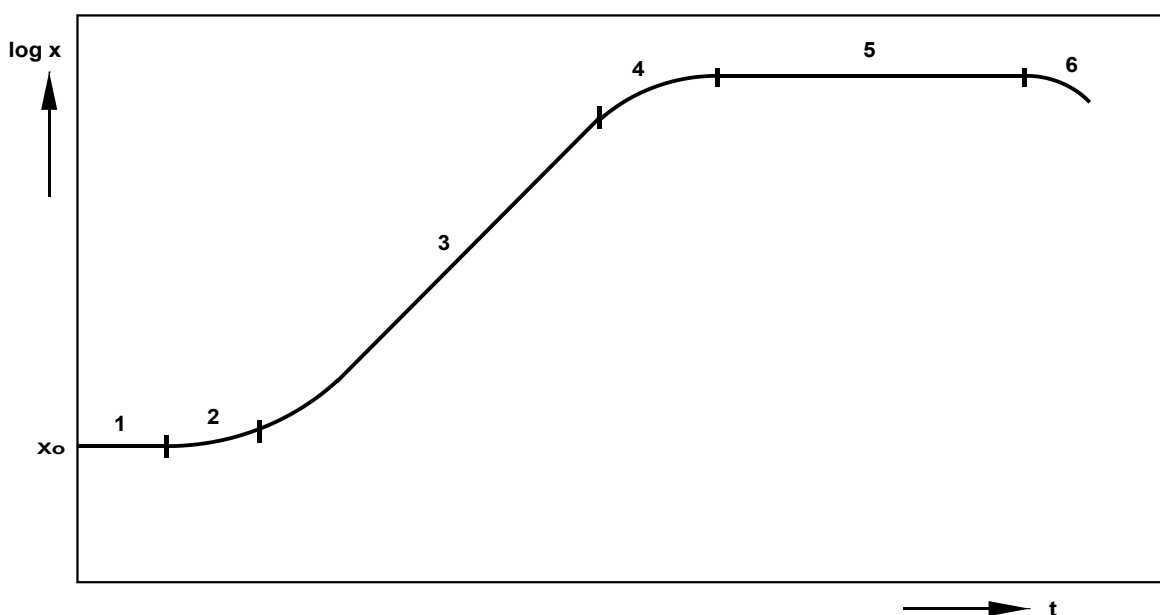
- ❖ **Světlo** – v závislosti na světle dochází často v intaktních rostlinách i tkáňových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů. Důležitá je intenzita a kvalita světla, jakož i případná fotoperioda. Doba a způsob osvětlení se liší dle objektu a typu kultivace. Nejběžnější je při nepřetržitém osvětlení 500-1000 luxů a při fotoperiodě (8-16 hodin) osvětlení nad 2000 luxů.
- ❖ **Teplota** – je jeden z důležitých faktorů ovlivňující rychlost metabolismu, růst a dělení buněk a tím i průběh kultivace tkáňových kultur. Jako nejvhodnější se jeví kultivace v teplotním rozmezí 23-28°C. Je-li teplota příliš nízká, rychlost metabolismu se zpomalí až zastaví, pokud je teplota vysoká, dojde k poškození buněk.
- ❖ **Acidita živného média** – u rostlinných tkání není bezpodmínečně nutná přesná hodnota pH živného média. Optimální hodnota pH závisí na typu kultury. Pro většinu kultur *in vitro* se doporučuje hodnota pH od 5,5 do 6,0. Na tyto hodnoty se v případě potřeby upravují půdy přísadou kyseliny chlorovodíkové nebo hydroxidu sodného.
- ❖ **Vlhkost vzduchu** – podle požadavků dané kultury bývá nastavena na hodnoty v rozmezí 20-98 %.[19,21]

3.2.5. Fáze růstu kultury

Rostlinná kultura prochází během růstu několika fázemi, které jsou charakterizovány růstovou křivkou vyjadřující závislost koncentrace biomasy na čase. Délka fáze závisí na složení živného média, fyzikálních faktorech a na typu a stáří buněk, jejich množství a genetickém vybavení.[17,19]

1. **lag fáze** – období přizpůsobení se naočkovaných buněk novému prostředí. Po umístění buněk do živného média je jejich koncentrace po určitou dobu konstantní nebo může přechodně klesnout.
2. **fáze zrychlení (akcelerační)** – všechny důležité enzymové reakce postupně dosahují maximálních konstantních rychlostí a přecházejí do ustáleného stavu.
3. **exponenciální fáze** – buňky rostou stále stejnou maximální rychlostí, buňka se z hlediska chemického složení nemění. Fáze trvá tak dlouho, pokud mají buňky dostatečné množství živin a pokud není růst kultury inhibován produkty vlastního metabolismu.
4. **fáze zpomalení (deklinační)** – v důsledku postupného vyčerpání živin a hromadění metabolických produktů dochází k poklesu růstové rychlosti. Tvar růstové křivky se v této fázi může velmi lišit, což záleží také na typu rostlinné kultury.
5. **stacionární fáze** – populace buněk dosahuje maximální a po určitou dobu konstantní velikosti, doba této fáze závisí stejně jako u předchozí fáze na způsobu měření koncentrace buněk. Maximální dosaženou koncentraci buněk určuje řada faktorů, např. počáteční koncentrace energetického zdroje, zdroje dusíku a stopových prvků, koncentrace kyslíku, způsob úpravy pH během kultivace.
6. **fáze odumírání** – pro průběh fáze neexistuje žádné pravidlo, odumírání může být pomalé či rychlé, spojené či nespojené s autolýzou buněk.[19]

Růstová křivka



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

3.2.6. Biotechnologické využití rostlinných explantátových kultur

Využití kultur *in vitro* lze rozdělit na dvě oblasti, v nichž je prováděn výzkum, který má své praktické uplatnění. Jde o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin a o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami.[18]

3.2.6.1. Produkce sekundárních metabolitů

Vyšší rostliny jsou bohatými zdroji léčivých látek. Jednou z možností, jak se vyhnout obtížím se zajištěním těchto látek, by mohlo být zavedení systému buněčných kultur pro jejich produkci. Hlavní výhody buněčné kultivace oproti kultivaci celé rostliny jsou následující:

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

V posledních letech nastal významný pokrok ve vývoji nových technik, kterými lze dosáhnout zvýšení produkce a akumulace sekundárních přírodních látek v buněčných kulturách *in vitro*. Jde například o elicitaci, biotransformaci a imobilizaci.

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

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

Přes dosažené úspěchy zůstává stále nevyřešená celá řada problémů stojících v cestě využití tkáňových kultur pro produkci sekundárních metabolitů. Patrně nejvýznamnějším je nízký obsah žádaných látek, kombinovaný s často se vyskytující nestabilitou produkce.[22]

3.3. Elicitace

Elicitaci lze charakterizovat jako indukční proces, který vede ke zvýšení hladiny enzymů nebo jejich aktivaci, čímž dochází k vyšší produkci sekundárních metabolitů.

3.3.1. Obranné reakce rostlin

Rostliny se stejně jako ostatní organismy musí vyrovnat s nepříznivými vlivy vnějšího prostředí. Nepříznivé vlivy závažně ohrožující rostlinu jsou označovány jako stresové faktory (stresory). Nejdůležitější stresové faktory, s nimiž se rostliny setkávají v přírodě, jsou uvedeny v následujícím přehledu:

❖ ABIOTICKÉ FAKTORY:

- fyzikální - mechanické účinky větru
 - nadměrné záření (UV, viditelné)
 - extrémní teploty (horko, chlad, mráz)
- chemické - nedostatek vody (sucho)
 - nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
 - nedostatek živin v půdě
 - nadbytek iontů solí a vodíku v půdě
 - toxické kovy a organické látky v půdě
 - toxické plyny ve vzduchu

❖ BIOTICKÉ FAKTORY- herbivorní živočichové (spásání, poranění)

- patogenní mikroorganismy (viry, mikrobi, houby)
- vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitizmus)

Aby mohly rostliny přežít, vyvinuly se u nich obranné mechanismy. Pasivní (dlouhodobý) způsob ochrany je založen na zamezení (nebo alespoň výrazném omezení) průniku stresových faktorů do vnitřního prostředí rostlin. K tomuto účelu slouží především speciální anatomické ochranné struktury (trichomy, trny, ostny, tlustá kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn). Jiným rostlinám slouží jako nesespecifická prevence syntéza více či méně toxických látek (kyanogenní glykosidy, taniny). Další mechanismy jsou realizovány pouze v případě napadení škůdcem.[23]

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

3.3.2. Phytoalexiny

Phytoalexiny jsou specifické nízkomolekulární obranné látky sekundárního metabolismu, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začnou se vytvářet až po napadení patogenem. V současné době je známo více než 300 phytoalexinů, které po chemické stránce patří mezi velmi různorodé typy sloučenin. U systematicky příbuzných druhů se obvykle vyskytují také podobné druhy phytoalexinů. Tak např. u rostlin čeledi *Fabaceae* převažují isoflavonoidy, u jiných čeledí to mohou být seskviterpeny (*Solanaceae*), diterpeny (*Poaceae*), furanokumariny (*Apiaceae*) či stilbeny (*Vitaceae*). U téže rostliny se někdy mohou tvořit dva i více různých phytoalexinů. Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje průnik přes plasmatickou membránu patogenů. Postižení membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanismům toxického působení phytoalexinů.[23] Tyto látky mají bakteriostatické, fungistatické a cytostatické účinky.[17]

3.3.3. Elicitory

Elicitory jsou signální látky biologického či nebiologického původu. Mají schopnost dát podnět k aktivaci genů, které jsou nezbytné pro syntézu phytoalexinů. Elicitory aktivují určité enzymy, které katalyzují tvorbu antimikrobiálně působících sekundárních látek (phytoalexinů) i jiných stresových látek s charakterem sekundárních metabolitů.[24]

3.3.3.1. Biotické elicitory

Jedná se o organické látky se signálním účinkem. Mezi ně se řadí:

- celé intaktní patogenní i nepatogenní organismy nebo jejich části: viry, bakterie, kvasinky, houby, mykoplazmata
- organické molekuly parazitických organismů: oligosacharidy, glykoproteiny, mastné kyseliny
- endogenní konstitutivní elicitory: organické molekuly pocházející z buněk napadené rostliny (oligogalakturonidy, chitosan, kyselina jasmínová, kyselina salicylová).[24]

3.3.3.2. Abiotické elicitory

Zahrnují chemické a fyzikální vlivy, které rostlinu stresují a tím spouštějí tvorbu fytoalexinů. Výhoda abiotických elicitorů spočívá v tom, že jsou chemicky zcela definované, lze je přesněji dávkovat a jsou zpravidla finančně dostupné.[24]

Patří sem:

- inhibitory látkové výměny: kyselina trichloroctová, 2,4-dinitrofenol
- fyzikální vlivy: UV záření, gama záření, změny pH a osmotického tlaku, chlad, vysoká teplota
- detergenty
- rostlinné ochranné prostředky: pesticidy
- soli těžkých kovů: CuCl_2 , HgCl_2 , CdCl_2 , CuSO_4 , MnSO_4 , PbNO_3 . [17,23]

3.3.4. Mechanismus účinku elicitoru

Na základě dosavadních znalostí se předpokládá, že elicitory indukovaná produkce a akumulace fytoalexinů a jiných stresových metabolitů rostlinnými kulturami *in vitro* je regulována stejnými mechanismy jako v případě intaktní rostliny.[24]

Předpokládá se, že molekuly elicitoru interagují s membránovými receptory, které mají schopnost přenést extracelulární signál do intracelulárního signálního systému. Byly nalezeny některé komponenty transdukčního signálního řetězce, které pomáhají přenosu signálu přes membránu do buňky. Jedná se o G-proteiny, vápenaté ionty, kalmoduliny, proteinkinázy (proteinová fosforylace má za následek ovlivnění vápníkových kanálů) apod.[25]

Obsazení membránového receptoru molekulou biotického elicitoru může vést k aktivaci G-proteinu, k otevření vápníkových kanálů a k rychlému influxu vápenatých iontů do buňky.[26] G-protein leží na vnitřní straně plasmatické membrány. Po navázání elicitoru na vazebné místo receptoru se mění konformace receptoru a v tomto stavu váže na své intracelulární části G-protein.

Aktivaci G-proteinu je umožněn vstup vápníku do buňky přes vápníkový kanál. Extracelulární vápník je považován za signál přinášející informaci o poranění dovnitř buňky. Další předpokládaný zdroj vápenatých iontů, které pochází z intracelulárních organel (mitochondrie, endoplasmatické retikulum), přenáší informace v buňce. Vápenaté ionty se uvnitř buňky váží na bílkovinu kalmodulin, která má pro vápenaté ionty čtyři vazebná místa, a narůstající komplex kalcium-kalmodulin moduluje mnoho fyziologických procesů. Vzniklý komplex ovlivňuje aktivitu určitých proteinkináz.

Zvýšení koncentrace vápenatých iontů v cytosolu, a tím i aktivace proteinkináz, může být dosaženo i jinými cestami. Přenos signálu může být zprostředkován pomocí fosfoinositolového systému, při němž hydrolýzou lipidů plasmatické membrány jsou generovány dvě signální sloučeniny: inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol, které za účasti iontů vápníku aktivují proteinkinázy a posléze i expresi genů.[23]

Některé pokusy dokazují, že velmi častým a rychlým způsobem přenosu signálu probíhajícího na membránách a aktivace genové exprese je také tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku (hydroxylové radikály, hydrogenperoxydy). Zvýšené množství peroxidu je možné zjistit po 5 až 10 minutách působení elicitoru.[27,28]

U abiotických elicitorů ovšem nedochází k vazbě na specifický receptor, ale např. těžké kovy pravděpodobně spouštějí peroxidaci lipidů membrány, a tak dochází ke zvýšení propustnosti membrány pro vápenaté ionty.[29] U abiotických elicitorů je nutná přítomnost přenašečů signálu. Komplex nebo přenašeč aktivuje geny, které kódují mRNA enzymů katalyzujících biosyntézu fytoalexinů.[30]

Ionty těžkých kovů jako Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} jsou esenciální mikroelementy pro rostlinný metabolismus, ale jsou-li v nadbytečném množství, mohou být vysoce toxické. Mechanismy transportu iontů těžkých kovů musí vyhovovat nejen požadavkům buněčného metabolismu, ale slouží též k ochraně buněk proti toxickým účinkům kovových iontů. Tyto mechanismy nebyly ještě zcela

definovány, ačkoliv počet genů kódujících možné transportní struktury byl již určen.[30]

Těžké kovy v rostlinných buňkách vyvolávají aktivaci transkripce několika genů tvorbu fytochelatinů. Jsou to malé peptidy syntetizované z glutathionu, které inaktivují těžké kovy tvorbou komplexů.[31]

Chlorid rtuťnatý způsobuje v buněčné kultuře *Zea mays* L. změny v transkripci genů podobných těm, které byly pozorovány jako odpověď na infekci patogenem (geny chitináz, 1,3- β -glukonáz a další). Po působení chloridu rtuťnatého se aktivovaly proteiny bohaté na glycin, proteiny tepelného šoku a membránových kanálů. Snahou studie bylo zjistit, zda pozorované změny mohou být považovány za specifickou odpověď na stres těžkými kovy, nebo zda se jedná o všeobecnou odpověď na abiotický stres. Za tímto účelem byl sledován účinek chloridu sodného, chladu, tepla, UV záření a zranění na expresi genů, které jsou indukovány právě chloridem rtuťnatým. Bylo zjištěno, že proteiny syntetizované jako odpověď na chlorid rtuťnatý nejsou specifické pro stres těžkými kovy, ale že se zřejmě jedná o obecnou reakci na abiotické elicitory.[32]

3.3.5. Podmínky elicítace

Základním předpokladem úspěšné elicítace je nutné splnění určitých podmínek:

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

Volba vhodného elicitoru pro elicítaci určité kultury je nejdůležitější podmínkou úspěšné elicítace.[29]

Poznatky o procesu elicítace, který podmiňuje tvorbu a akumulaci sekundárních metabolitů v rostlinných buněčných kulturách, lze shrnout následovně:

- tvorba sekundárních přírodních látek po působení elicitoru se vyskytuje především v buňkách, které se nacházejí na konci růstové fáze
- nastává v průběhu několika hodin po působení elicitoru (12-48 hodin)
- probíhá jak v buňkách suspendovaných v růstovém médiu, tak i v kalusu
- sekundární přírodní látky jsou přítomny v buňkách i v médiu
- elicítaci můžeme opakovat, aniž nastává poškození buňky.[22]

3.4. Rtuť

Chemická značka rtuti je Hg (Hydrargyrum). Jedná se o prvek zařazený do II. vedlejší podskupiny Mendělejevovy periodické soustavy prvků s protonovým číslem 80 a relativní atomovou hmotností 200,59.

Rtuť je známa už od nejstarších dob. Jedinou významnou rudou rtuti je rumělka (cinabarit) HgS, k níž bývá v nepatrných množstvích přimíšena i rtuť ryzí. Technicky bezvýznamnými nerosty rtuti jsou tiemannit HgSe, coloradoit HgTe, kalomel Hg₂Cl₂, coccinit Hg₂I₂. [33]

Rtuť se vyrábí tak, že se rumělka pražením převede na oxid, který se kolem 500°C rozkládá a rtuť se vydestiluje. [34] Rudy bohaté rtutí se zahřívají se železným odpadem nebo páleným vápnem a rtuť se vydestiluje. [33]

Rtuť je při obyčejné teplotě kapalný stříbrobílý, silně lesklý kov. Za atmosférického tlaku vře při 356,95°C a tuhne při -38,84°C. Rtuť je vodivá a těkává. Páry rtuti jsou velmi jedovaté. Při trvalém působení mohou vyvolat těžké poruchy i ve zcela nepatrných množstvích. Charakteristické příznaky při otravě rtutí jsou: slinění, význačné červenání dásní, uvolňování zubů, těžké nervové poruchy, bolesti hlavy, zažívací potíže, třes rukou a hlavy. Avšak běžné nervové poruchy jako otupělost, únava, rozmrzelost, nespavost, oslabení paměti apod. se mohou objevit ještě před typickými symptomy chronické otravy rtutí. [35]

Na vzduchu je rtuť stálá, za vyšší teploty se oxiduje na HgO. Ochotně se slučuje s halogeny a sírou již za chladu. Rozpouští se v kyselině dusičné, za horka i v kyselině sírové. S mnohými kovy poskytuje tekuté či tuhé slitiny – amalgamy. Ve sloučeninách vystupuje rtuť v oxidačním stavu I a II. Koordinační sloučeniny tvoří většinou Hg (II) s nejčastějšími koordinačními čísly 2, 4 (tetraedrické uspořádání) a 6. [33]

Rtuť v kovové podobě se využívá v měřicí a vakuové technice. Velká množství rtuti se spotřebují na výrobu umělé rumělky. Dále slouží k léčebným účelům, příkladem může být šedá mast používaná při kožních onemocněních. Důležité jsou také katalytické účinky některých solí rtuti, zejména při reakcích sloučenin uhlíku. Amalgamy se používají v zubním lékařství. Důležitá je také amalgamace zinkových desek pro galvanické články. Sodíkový amalgam má časté použití v laboratoři jako redukční činidlo. [35]

U rostlin je možné rozlišovat tři různé molekulární mechanismy toxicity těžkých kovů založené na jejich chemických a fyzikálních vlastnostech:

- Produkování reaktivní formy kyslíku autooxidací a Fentonovou reakcí. Tato reakce je typická pro přechodné kovy jako je železo nebo měď.
- Blokování základních funkčních skupin v biomolekulách je typické hlavně pro neredoxně reagující těžké kovy, jako je kadmium a rtuť.
- Odstranění základních kovových iontů z biomolekul. Tato reakce se vyskytuje u jiných druhů těžkých kovů.[36]

Při vychytávání rtuti z půdy slouží rostlinné kořeny jako bariéra. Koncentrace rtuti v nadzemních částech rostlin se zdá být závislá hlavně na vychytávání rtuti vytěkané z půdy listy. Bylo zjištěno, že vychytávání rtuti je specifické pro mechorosty, lišejníky, bahenní rostliny, zemědělské rostliny a dřeviny. Možnými kauzálními mechanismy toxicity rtuti jsou změny permeability buněčné membrány, reakce thiolových (-SH) skupin s kationty, afinita k reakcím s fosfátovými skupinami a aktivními skupinami ADP nebo ATP a nahrazování esenciálních iontů, hlavně větších kationů. Předpokládá se, že rostlinám jsou obecně dostupnější anorganické formy rtuti než organické.

Rtuť ovlivňuje jak světelnou tak i temnostní fázi fotosyntézy. Příčinou poruchy fotosyntézy je náhrada centrálního atomu chlorofylu, hořčíku, rtuť. Rostlinné buňky obsahují v tonoplastu a plasmatické membráně aquaporiny, což jsou proteiny usnadňující transport vody. Hodně aquaporinů je citlivých na rtuť.[37] Toxicita rtuti se tedy může projevit dehydratací buněk.[38] V nízkých koncentracích má rtuť toxický účinek na degradační schopnosti mikroorganismů. Sloučeniny rtuti mají účinek na indukci c-mitózy prostřednictvím porušení růstové aktivity. Následkem je tvorba polyploidních a aneuploidních buněk a c-tumorů. Organické sloučeniny rtuti jsou dvěstěkrát účinnější než anorganická rtuť. Vystavení účinkům anorganické rtuti snižuje mitotický index v buňkách kořenové špičky a frekvence chromozomálních aberací vzrůstá přímo úměrně k použitým koncentracím a trvání expozice. Vyšší rostliny reagují na stres těžkými kovy způsobený rtuť syntézou fytochelatinů. Fytochelatiny působí jako chelatační látky a stejně jako glutathion váží rtuťnaté ionty.[37]

Při měření specifické aktivity některých enzymů v hlízách a přilehlých kořenových tkáních v sóji (*Glycine max* L.) bylo zjištěno, že enzym chitináza je citlivý na rtuť.[39]

Vystavení rostlin neredoxně reagujícím těžkým kovům mělo za následek oxidační stres.[36] Na sazenicích a buněčných kulturách *Sesbania drummondii* byly sledovány účinky rtuti na jejich růst a odpověď antioxidantních systémů. *Sesbania* odpověděla na oxidační stres vyvolaný rtutí upravením neenzymatických antioxidantů (glutathion, neproteinové thioly) a enzymatických antioxidantů (superoxid dismutáza, askorbát peroxidáza, glutathion reductáza). Obsah neenzymatických antioxidantů stejně jako aktivity antioxidantních enzymů nejprve vzrůstaly a po přesažení určité koncentrace rtuti začaly klesat. Rostliny *Sesbania* tedy byly schopné tolerovat stres vyvolaný rtutí za použití účinných antioxidantních obranných mechanismů.[40,41]

Při sledování účinků těžkých kovů na růst sekundárních kalusových kultur *Ruta graveolens* L. bylo zjištěno, že jejich účinek je funkcí koncentrace. V případě rtuti se koncentrace pohybovaly v rozmezí 10^{-5} až 10^{-7} mol. Jakákoliv aplikovaná koncentrace inhibovala vzrůst hmotnosti živého kalusu. V opačném poměru k této inhibici vzrůstala hmotnost sušiny, což je zaviněno výše zmíněnou dehydratací buněk.[38]

Při studiu účinků některých těžkých kovů, včetně rtuti, na růstový cyklus agregátů buněk *Arachis hypogaea* L. kultivovaných v suspenzním médiu bylo zjištěno, že tyto kovy mohou v nízkých koncentracích umožnit nepřetržitý růst agregátů. Při vysokých koncentracích (1 mmol) zapříčiňují ustrnutí růstu.[42]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Přístroje a pomůcky

- ❖ Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen
- ❖ Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
- ❖ Horkovzdušný sterilizátor HS 31A, Chirana, Brno
- ❖ Box s laminárním prouděním Fatran LF, Žilina
- ❖ Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- ❖ Třepačka Unimax 2010, Heidolph
- ❖ Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
- ❖ Chromatografická sestava Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), Tokyo
- ❖ Kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5µm) s předkolonkou, Merck, Darmstadt

4.2. Chemikálie

- ❖ 6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno
- ❖ Dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno
- ❖ Dusičnan draselný *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Dusičnan amonný *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Ethanol 96%, Lachema, Brno
- ❖ Glycin č., Lachema, Brno
- ❖ Chloramin B, Lachema, Brno
- ❖ Chlorid kobaltnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ Chlorid pyridoxinia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- ❖ Chlorid rtuťnatý *p.a.*, Lachema, Brno
- ❖ 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 a-naftyloctová č., Lachema, Brno

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

4.3. Rostlinný materiál

K pokusům uvedeným v této práci byla použita explantátová kultura odvozená ze sterilní klíčící rostliny jetele lučního *Trifolium pratense* L., *Fabaceae* (varieta DO-9). Semena byla získána ze Šlechtitelské stanice Domoradice. Elicitace byla provedena u tříleté kalusové a suspenzní kultury.

4.4. Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do váženky, předem vysušené 2 hodiny při 105°C, byly odváženy asi 2,000 g přesně 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.[43]

4.5. Kultivace explantátové kultury

4.5.1. Kultivační nádoby a nástroje

Ke kultivaci explantátových kultur bylo použito nádobí z varného skla značky SIAL, které je dostatečně odolné vůči vodě, chemikáliím a rozdílům teplot. Kalusové kultury byly kultivovány na můstcích z filtračního papíru vložených do 100ml Erlenmeyerových baněk. Suspenzní kultury byly kultivovány ve 250ml varných baňkách z téhož skla.

Kovové nástroje (pinzety, skalpely) byly opláchnuty 96% ethanolem a po zabalení do hliníkové fólie sterilizovány 2 hodiny v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200°C. Pipety s kouskem vaty vloženým do jejich horního konce byly také sterilizovány v hliníkové fólii 15 minut při teplotě 121°C v autoklávu.

4.5.2. Příprava živného média

Explantátová kultura *Trifolium pretense* L. byla odvozena a kultivována podle Gamborga (B5) na živném médiu následujícího složení:[44]

KNO ₃	2 500,00	mg.l ⁻¹
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	150,00	mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	250,00	mg.l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00	mg.l ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150,00	mg.l ⁻¹
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,84	mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,34	mg.l ⁻¹
KI	0,75	mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	3,00	mg.l ⁻¹
MnSO ₄ . H ₂ O	10,00	mg.l ⁻¹

ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,00	mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	mg.l ⁻¹
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	mg.l ⁻¹
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	mg.l ⁻¹
myoinositol	100,00	mg.l ⁻¹
kyselina nikotinová	1,00	mg.l ⁻¹
pyridoxin	1,00	mg.l ⁻¹
thiamin	10,00	mg.l ⁻¹
sacharosa	30 000,00	mg.l ⁻¹

Jednotlivé substance byly odváženy na analytických vahách (nízké koncentrace byly pipetovány z připravených zásobních roztoků). Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněno destilovanou vodou po značku.

Jako stimulatory růstu byly použity 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina v koncentraci 2 mg.l⁻¹ a 6-benzylaminopurin také v koncentraci 2 mg.l⁻¹ živného média.[45]

Půda připravená pro kultivaci byla rozlita po 30 ml do Erlenmeyerových baněk s papírovými můstky pro kultivaci kalusových kultur a po 25 ml do varných baněk připravených pro kultury suspenzí. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121°C a tlaku páry 0,1 MPa.

4.6. Odvození kalusové kultury, pasážování a kultivace

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

s 30 ml živného média podle Gamborga. Po týdnu kultivace při teplotě 25°C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma byly získány sterilní klíčící rostliny.

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

Kalusová kultura *Trifolium pratense* L. byla odvozena ze sterilní klíčící rostliny na živném médiu podle Gamborga, při teplotě 25°C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. K živnému médiu byly přidány růstové stimulatory 2 mg.l⁻¹ kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 2 mg.l⁻¹ 6-benzylaminopurinu. Subkultivační interval byl 21 dní.

Suspenní kultura byla odvozena z rozpávané kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepače a následně kultivována na pomaloběžném roleru za stejných podmínek jako kultura kalusová. Pasážování bylo prováděno vždy po 14 dnech subkultivace přenesením části narostlé suspenze do baněk s čerstvým médiem.[45]

4.7. Elicitace

4.7.1. Příprava roztoků elicitoru

Byly připraveny 4 vodné roztoky chloridu rtuťnatého o koncentraci:

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

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

4.7.2. Elicitace a odběr kultur

Ve 21. dni kultivace byla provedena za aseptických podmínek elicítace kalusové a suspenzní kultury chloridem rtuťnatým.

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

U každého vzorku bylo provedeno stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2005 a stanovení isoflavonoidů pomocí HPLC.

4.8. Stanovení obsahu flavonoidů

4.8.1. Princip stanovení

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé.[43]

4.8.2. Postup stanovení

Základní roztok: 0,200 g usušené práškové kultury se ve 250ml baňce smíchá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni při 60°C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy ve 250ml baňce, přidá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni při 60°C, za častého

protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky. 250ml baňka i filtr se promyjí *lihem R 60% (V/V)* a promývací tekutina se přidá do odměrné baňky. Spojené roztoky se zředí *lihem R 60% (V/V)* na 100,0 ml a roztok se zfiltruje.

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

Kontrolní roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R (10 + 100)* a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R (10 + 100)* a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml. Po 30 minutách se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

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

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

m

v němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm;

m – hmotnost zkoušené kultury v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

4.9. Stanovení obsahu isoflavonoidů

Stanovení daidzeinu, genistinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.[46]

4.9.1. Příprava vzorku

Asi 0,400 g upráškované kultury se ve 100ml baňce smíchá s 15 ml methanolu 80% a extrahuje se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes malý chomáček vaty do 25ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku kultury ve 100ml baňce, přidá se 15 ml methanolu 80% a extrahuje se ještě jednou 20 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky a spojené extrakty se zředí methanolem 80% na 25,0 ml. Roztok se převede přes mikrofiltr do vialek a analyzuje se metodou HPLC. Identifikace obsahových látek se provede porovnáním retenčních časů a spekter příslušných píků vzorků se standardy.

4.9.2. Parametry HPLC analýzy

Chromatograf: Jasco (čerpadlo PU-2089 Plus, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavený předkolonovým filtrem.

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

Objem nástřiku: 20 μl .

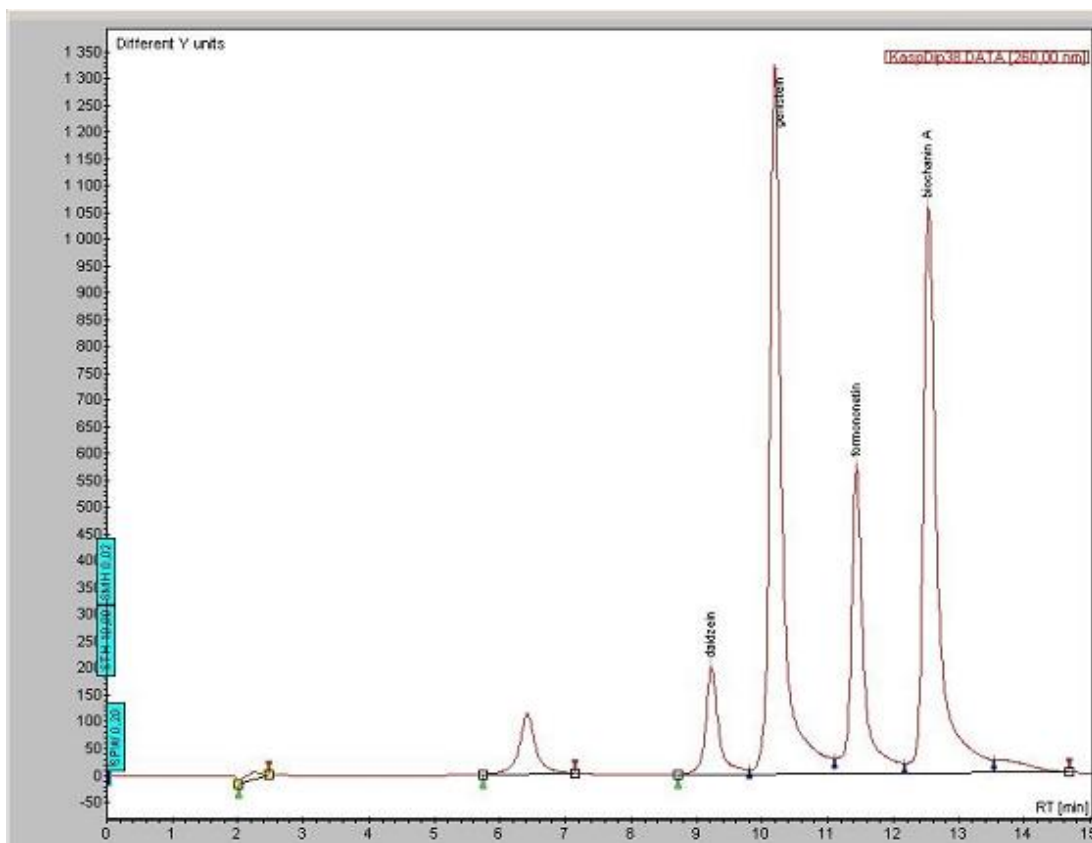
Eluce: eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově. V čase $t = 0$ bylo složení 30 % methanolu a 70 % vody, v čase $t = 9$ minut 80 % methanolu a 20 % vody. Následovala isokratická eluce stejným složením do času $t = 15$ minut.

Standardy: genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A.

Průtok: 1,1 ml/min, mobilní fáze obsahovala jako pufr 0,15 % kyseliny fosforečné.

Detekce: DAD Jasco MD-2015, vyhodnoceno při vlnové délce 260 nm.

Obr. 1. Chromatografický záznam standardů



4.10. Statistické zpracování výsledků

Získané výsledky obsahu flavonoidů ve sledovaných kulturách byly statisticky zhodnoceny pomocí F testu (test významnosti rozdílu mezi dvěma rozptyly) a t-testem (test významnosti rozdílu dvou průměrů). F testem bylo zjištěno, že nelze zamítnout nulovou hypotézu $s_1^2 = s_2^2$ a soubory mohou být použity pro statistické zpracování t-testem za podmínky $x_1 = x_2$. K výpočtu testovacího kritéria bylo použito vztahu:

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

n_1 počet členů kontrolního souboru

n_2 počet členů pokusného souboru

\bar{x}_1 aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x}_2 aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 směrodatná odchylka pokusného souboru

t testovací kritérium

K výpočtu směrodatné odchylky bylo použito vztahu:

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

K výpočtu aritmetického průměru bylo použito vztahu:

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

n rozsah souboru

x_i naměřené hodnoty

Testovacímu kritériu přísluší t rozdělení se stupněm volnosti (v) vypočítaného podle vztahu: $v = n_1 + n_2 - 2$

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

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

V případě provedení dvou stanovení obsahu byl vypočtený počet stupňů volnosti $v = 3$ a kritická hodnota $t(v)_p$ pro $p(0,05) = 3,182$. [47]

5. VÝSLEDKY

5.1. Tabulky

Tabulka 1. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicitované chloridem rtuťnatým

Koncentrace elicitoru (μmol)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Elicitace		Kontrola		t-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
HgCl ₂ I 100	6	0,333	0,0047	0,320	0,0272	0,4710
	24	0,335	0,0175	0,320	0,0272	0,4638
	48	0,192	0,0085	0,320	0,0272	4,4917
	168	0,454*	0,0032	0,315	0,0070	18,0596
HgCl ₂ II 10	6	0,425	0,0449	0,320	0,0272	2,0001
	24	0,290	0,0225	0,320	0,0272	0,8499
	48	0,264	0,0114	0,320	0,0272	1,8988
	168	0,492*	0,0027	0,315	0,0070	23,5916
HgCl ₂ III 1	6	0,322	0,0128	0,320	0,0272	0,0665
	24	0,328	0,0098	0,320	0,0272	0,2767
	48	0,262	0,0031	0,320	0,0272	2,1186
	168	0,389*	0,0015	0,315	0,0070	10,3368
HgCl ₂ IV 0,1	6	0,295	0,0042	0,320	0,0272	0,9084
	24	0,310	0,0061	0,320	0,0272	0,3587
	48	0,339	0,0010	0,320	0,0272	0,6981
	168	0,427	0,0689	0,315	0,0070	1,6172

Poznámka: hodnoty průměrného obsahu flavonoidů označené symbolem * jsou statisticky významně zvýšené oproti hodnotám kontroly, p = 0,05.

Tabulka 2. Produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicitované chloridem rtuťnatým

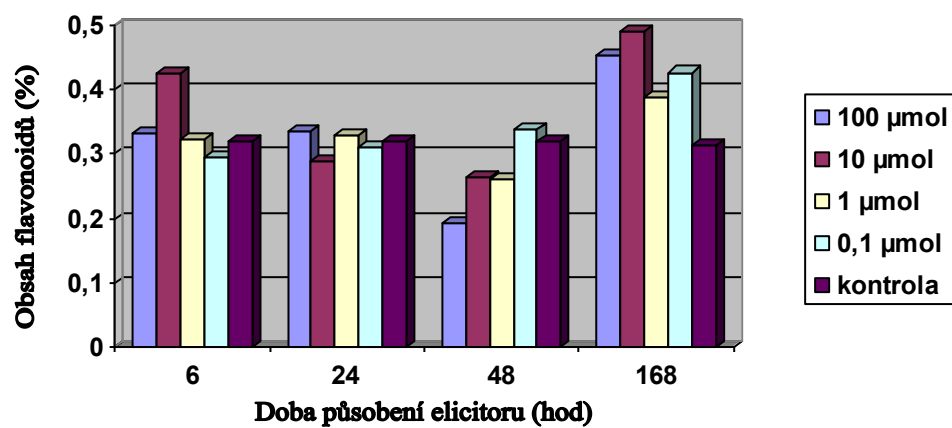
Koncentrace elicitoru (μmol)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Elicitace	Kontrola
		Obsah flavonoidů (%)	Obsah flavonoidů (%)
HgCl ₂ I 100	6	0,636	0,326
	24	0,226	0,326
	48	0,216	0,326
	168	0,000	0,562
HgCl ₂ II 10	6	0,000	0,326
	24	0,000	0,326
	48	0,000	0,326
	168	0,000	0,562
HgCl ₂ III 1	6	0,170	0,326
	24	0,081	0,326
	48	0,010	0,326
	168	0,292	0,562
HgCl ₂ IV 0,1	6	0,144	0,326
	24	0,055	0,326
	48	0,035	0,326
	168	0,000	0,562

Tabulka 3. Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L.
(varieta DO-9) elicitované chloridem rtuťnatým

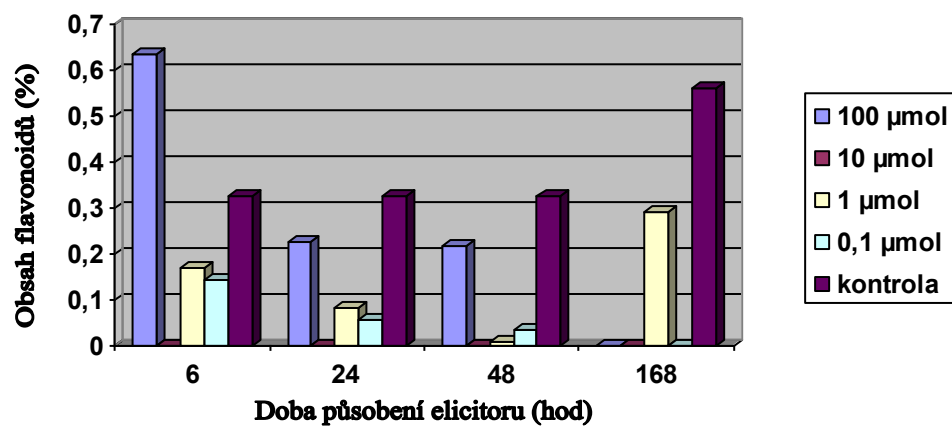
Koncentrace elicitoru (μmol)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)			
		genistin	daidzein	genistein	formononetin
kontrola	6	0,30	0,01	-	-
	24	0,30	0,01	-	-
	48	0,30	0,01	-	-
	168	0,28	0,01	-	-
HgCl ₂ I 100	6	0,32	0,01	-	-
	24	0,32	0,01	-	-
	48	0,44	0,02	-	-
	168	0,49	0,03	-	-
HgCl ₂ II 10	6	0,46	-	-	-
	24	0,47	0,02	-	-
	48	0,28	-	-	-
	168	0,59	-	-	-
HgCl ₂ III 1	6	0,41	-	-	-
	24	0,39	-	-	-
	48	0,35	-	-	-
	168	0,44	-	0,01	-
HgCl ₂ IV 0,1	6	0,32	-	-	-
	24	0,41	-	-	-
	48	0,42	-	-	-
	168	0,38	-	0,01	-

5.2. Grafy

Graf 1. Elicitace suspenzní kultury chloridem rtuťnatým



Graf 2. Elicitace kalusové kultury chloridem rtuťnatým



6. DISKUSE

Problematika zvýšení produkce terapeuticky významných sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro* je jednou z intenzivně sledovaných oblastí v oboru farmaceutické biotechnologie. A konkrétně metoda elicitace explantátových kultur je metodou velmi nadějnou.

Úspěšná elicitace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor a pro každou explantátovou kulturu. Jedná se například o koncentraci a dobu působení elicitoru. Z těchto důvodů byly zkoušeny čtyři koncentrace vodného roztoku chloridu rtuťnatého (100 μmol , 10 μmol , 1 μmol a 0,1 μmol), které byly zvoleny v rozmezí koncentrací obvykle používaných u tohoto typu elicitoru.[48,49,50,51]

Sledované doby působení elicitoru (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z poznatků již provedených pokusů [52,53,54] a z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po přidání elicitoru.[48,49,51,55,56] Kontrolní kultury byly odebírány po 6 a 168 hodinách, neboť jejich produkce se v takto krátkých časových intervalech významně nemění.

Dalším faktorem, který může ovlivnit úspěšnost elicitace, je fyziologický stav kultury, respektive její růstová fáze. Z dřívějších pokusů vyplývá,[45] že pro elicitaci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. je optimální 21. den subkultivace, a proto elicitace kultury byla provedena v tomto dni kultivace.

Z výsledků elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) chloridem rtuťnatým (tabulka 1, graf 1) je zřejmé, že sledovaný elicitor měl jednoznačně pozitivní elicitální účinek pouze u nejdelší doby svého působení (168 hodin), u ostatních tří není jeho účinek jednoznačný. Kladně lze hodnotit zejména 168hodinovou aplikaci koncentrace 10 μmol , která způsobila statisticky významné zvýšení produkce v porovnání s kontrolou o 56 % a kdy byl zjištěn maximální obsah flavonoidů v elicítované suspenzní kultuře (0,492 %). Také koncentrace 100 μmol po této nejdelší aplikaci zvýšila produkci o 44 % oproti kontrole. Statisticky významné zvýšení o 23 % způsobila též 168hodinová aplikace elicitoru o koncentraci 1 μmol .

V suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicítované chloridem rtuťnatým byla metodou HPLC sledována také produkce isoflavonoidů.

U kontrolní kultury byly z isoflavonoidů zjištěny pouze genistin a daidzein (tabulka 3). Pozitivní elicitální účinek byl v případě genistinu zaznamenán u všech použitých koncentrací elicitoru. Kladně lze hodnotit, jako v případě flavonoidů, zejména 168hodinovou aplikaci koncentrace 10 μmol , která způsobila nárůst produkce genistinu o 111 % oproti kontrole. V případě isoflavonoidu daidzeinu došlo k pozitivnímu ovlivnění produkce pouze po 48 a 168hodinové aplikaci elicitoru o koncentraci 100 μmol a po 24hodinové aplikaci elicitoru o koncentraci 10 μmol . Po 168hodinové aplikaci koncentrace 1 μmol a 0,1 μmol bylo metodou HPLC detekováno 0,01 % isoflavonoidu genisteinu.

Kalusová kultura *Trifolium pratense* L. (tabulka 2, graf 2) na rozdíl od suspenzní kultury rostla pomalu, proto byl získán pouze omezený počet vzorků ke stanovení obsahu flavonoidů. Nedostatek vzorků neumožnil statistické vyhodnocení elicitace. U kalusové kultury měl sledovaný elicitor pozitivní elicitální účinek pouze po 6hodinové aplikaci nejsilnější koncentrace 100 μmol , kde došlo k navýšení produkce flavonoidů o 95 % oproti kontrole. Všechny doby působení koncentrace 10 μmol a 168hodinová aplikace koncentrace 100 μmol a 0,1 μmol zcela potlačily produkci flavonoidů kalusovou kulturou.

Výsledky práce tedy neprokázaly jednoznačně pozitivní působení abiotického elicitoru chloridu rtuťnatého na produkci sledovaných sekundárních metabolitů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L.

Elicitace je z biologického hlediska složitým procesem, na jehož počátku stojí rozpoznání elicitoru plasmatickou membránou rostlinné buňky a na jeho konci transkripční aktivace specifických genů, následovaná mimo jiné akumulací fytoalexinů. Jsou známy některé dílčí kroky zúčastněné v tomto procesu, jeho celkový průběh a mechanismus zůstává však zatím nerozřešen.

7. ZÁVĚR

Výsledky práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Maximální obsah flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (0,636 %) vyvolala 6hodinová elicitace roztokem chloridu rtuťnatého o koncentraci 100 μmol , kdy došlo ke zvýšení produkce o 95 % v porovnání s kontrolní kulturou.
2. Nejvyšší obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (0,492 %) vyvolala 168hodinová elicitace roztokem chloridu rtuťnatého o koncentraci 10 μmol , kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 56 % oproti kontrolní kultuře.
3. U suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. byl navíc sledován vliv elicitace roztokem chloridu rtuťnatého na obsah isoflavonoidů. K nejvýraznějšímu zvýšení produkce v porovnání s kontrolou došlo vlivem 168hodinové elicitace roztokem o koncentraci 100 μmol u daidzeinu (nárůst o 200 %) a vlivem 168hodinové elicitace roztokem o koncentraci 10 μmol u genistinu (nárůst o 111 %).

8. SOUHRN

Explantátová kultura *Trifolium pratense* L.

Základním předpokladem úspěšné elicitace, která se využívá ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů, je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby působení elicitoru na rostlinnou kulturu *in vitro*, což bylo předmětem této diplomové práce. Byl sledován vliv 6, 24, 48 a 168hodinového působení roztoku chloridu rtuťnatého (ve čtyřech koncentracích) na produkci flavonoidů a isoflavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L., která byla kultivována na médiu 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.

Maximální obsah flavonoidů, zjištěný fotometrickým stanovením podle Českého lékopisu 2005, byl prokázán u kalusové kultury (0,636 %) po 6hodinovém působení elicitoru o koncentraci $100 \mu\text{mol}$ a u suspenzní kultury (0,492 %) po 168hodinovém působení elicitoru o koncentraci $10 \mu\text{mol}$. Maximální obsah isoflavonoidů, zjištěný metodou HPLC, byl prokázán u suspenzní kultury po 168hodinovém působení elicitoru o koncentraci $100 \mu\text{mol}$ (0,03 % daidzeinu) a po 168hodinovém působení elicitoru o koncentraci $10 \mu\text{mol}$ (0,59 % genistinu).

SUMMARY

Explant Culture of *Trifolium pratense* L.

A principal precondition for successful elicitation used to increase the production of secondary metabolites is, among other, finding a suitable elicitor, its concentration and the optimal period of time of the action of the elicitor on the plant culture *in vitro*, which was the aim of the present thesis. The effect was examined of a 6, 24, 48 and 168 hour action of the solution of mercury dichloride (in four concentrations) on the production of flavonoids and isoflavonoids in the callus and suspension culture of *Trifolium pratense* L. cultivated on a Gamborg medium with an addition of 2 mg.l⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2 mg.l⁻¹ of 6-benzylaminopurine, at the temperature of 25°C and 16 hour light/8 hour dark period.

The maximal content of flavonoids found by a photometric determination according to Pharmacopoeia Bohemica 2005 was demonstrated in the callus culture (0,636 %) after 6 hour action of the elicitor of the 100 µmol concentration and in the suspension culture (0,492 %) after 168 hour action of the elicitor of the 10 µmol concentration. The maximal content of isoflavonoids found by a HPLC method was demonstrated in the suspension culture after 168 hour action of the elicitor of the 100 µmol concentration (0,03 % of daidzein) and after 168 hour action of the elicitor of the 10 µmol concentration (0,59 % of genistin).

9. SEZNAM LITERATURY

1. Slavík, B. et al.: Květena České republiky 4, Praha, Academia, 1995, s. 474-476
2. Pilát, A., Ušák, O.: Atlas rostlin, Praha, SPN, 1964, s. 108
3. <http://rostliny.prirodou.cz>, 11. 10. 2007
4. Korbelář, J., Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství, Praha, Avicenum, 1981, s. 178
5. Hron, F., Zejbrlík, O.: Rostliny polí a zahrad, Praha, SPN, 1974, s. 192-193
6. Gran, J., Jung, R., Münker, B.: Bobulovité, užitkové a léčivé rostliny, Praha, Ikar, 1996, s. 102
7. Kresánek, J.: Atlas léčivých rostlin a lesných plodov, Martin, Osveta, 1982, s. 192-193
8. Wu, Q. et al.: J. Chromatogr., 2003; 1016, 195
9. <http://faf.vfu.cz/html/index2.html>, 16. 10. 2007
10. <http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/texty/flavon.htm>, 16. 10. 2007
11. Hubík, J. et al.: Obecná farmakognosie II., Sekundární látky, Praha, SPN, 1989, s. 31-36
12. Bruneton, J.: Pharmacognosy, Paris, Lavoisier Publ., 1999, s. 172
13. Mazur, W., Adlelercreutz, H.: Pure Appl. Chem., 1998; 70, 1759
14. Kaufman, P. B. et al.: J. Altern. Complem. Med., 1997; 3, 7
15. Adlelercreutz, H., Mazur, W.: Ann. Med., 1997; 29, 95
16. Kroyer, G. T.: Innovat. Food Sci. Emerging Technol., 2004; 5, 101
17. Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin, Olomouc, Vydavatelství Univerzity Palackého, 1995, s. 13-21, 50-54, 79-82
18. Kašparová, M., Dušek, J.: Čes. slov. Farm., 1999; 48, 132
19. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 1992, s. 9, 10, 34, 38, 41, 84-97
20. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 2001, s. 75-83
21. http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%BDivn%C3%A1_p%C5%AFda, 16. 10. 2007

22. Dušek, J., Dušková, J., Tůmová, L., Spilková, J.: *Čes. slov. Farm.*, 1996; 45, 204
23. Procházka, S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Praha, Academia, 1998, s. 412-430
24. Beiderbeck, R., Reichling, J.: *Biologie*, 1989; 3, 188
25. Nürberger, T., Scheel, D.: *Trends Plant Sci.*, 2001; 6, 372
26. Gelti, A., Higgins, V. J.: *Plant. Physiol.*, 1997; 113, 269
27. Chasan, R.: *Plant Cell Rep.*, 1995; 7, 495
28. Wojtaszek, P.: *Biochem. J.*, 1997; 332, 681
29. Reichling, J., Beiderbeck, R.: *Biologie*, 1989; 5, 453
30. Williams, L. E., Pittman, J. K., Hall, J. L.: *Int. J. Biochem. Biophys.*, 2000; 1465, 104
31. Kneer, R., Zenk, M. H.: *Phytochemistry*, 1997; 44, 69
32. Didierjean, L. et al.: *Planta*, 1996; 199, 1
33. Kašpárek, F., Pastorek, R., Šindelář, Z., Březina, F.: *Anorganická chemie*, Olomouc, Vydavatelství Univerzity Palackého, 2001, s. 387
34. Kůtek, F.: *Anorganická chemie III – Kovy*, Praha, SNTL, 1982, s. 130
35. Remy, H.: *Anorganická chemie II. díl*, Praha, SNTL, 1972, s. 465-470
36. Schutzendubel, A., Polle, A.: *J. Exp. Bot.*, 2002; 53, 1351
37. Patra, M., Sharma, A.: *Bot. Rev.*, 2000; 66, 379
38. Maroti, M., Bognar, J.: *Acta Bot. Hung.*, 1989; 35, 185
39. Mohammadi, M., Karr, A. L.: *J. Plant Physiol.*, 2002; 159, 245
40. Israr, M., Sahi, S.: *Plant Physiol. Biochem.*, 2006; 44, 590
41. Israr, M., Sahi, S., Datta, R., Sarkar, D.: *Chemosphere*, 2006; 65, 591
42. Xu, Y. J., Vanhuystee, R. B.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1993; 32, 319
43. Kolektiv autorů: *Český lékopis 2005*, Praha, Grada, 2005, s. 162, 1368
44. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojiman, K.: *Exp. Cell Res.*, 1968; 50, 151
45. Kašparová, M. et al.: *Čes. slov. Farm.*, 2006; 55, 44
46. De Rijke, E. et al.: *Anal. Chem. Acta*, 2002; 468, 3
47. Reisenauer, R.: *Metody matematické statistiky a jejich aplikace*, Praha, SNTL, 1970, s. 82, 207
48. Zhou, Z. S. et al.: *J. Inorg. Biochem.*, 2007; 101, 1
49. Tebayashi, S., Ishihara, A., Iwamura, H.: *J. Exp. Bot.*, 2001; 52, 681
50. Kartosentono, S. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 2002; 24, 687
51. Tůmová, L., Blažková, R.: *Čes. slov. Farm.*, 2002; 51, 44

52. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: Čes. slov. Farm., 2003; 52, 248
53. Kašparová, M., Siatka, T.: Čes. slov. Farm., 2004; 53, 252
54. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: Čes. slov. Farm., 2003; 52, 148
55. Olmos, E. et al.: J. Exp. Bot., 2003; 54, 291
56. Metwally, A. et al.: Plant Physiol., 2003; 132, 272