

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Abiotická elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L.

Mgr. Jitka Vaňková

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

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

Oponent: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Poděkování

Ráda bych poděkovala PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení při zpracování rigorózní práce, za poskytnutí mnoha odborných rad a literárních zdrojů.

Obsah

1 ÚVOD	5
2 CÍL PRÁCE	7
3 TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1 JETEL LUČNÍ (TRIFOLIUM PRATENSE L., FABACEAE)	8
3.1.1 Botanický popis rostliny	8
3.1.2 Výskyt	9
3.1.3 Poddruhy	10
3.1.4 Sběr a použití drogy	10
3.1.5 Obsahové látky	11
3.2 FLAVONOIDY	12
3.3 ISOFLAVONOIDY	15
3.4 ROSTLINNÉ KULTURY IN VITRO	17
3.5 ELICITACE	19
3.5.1 Fytoalexiny	19
3.5.2 Elicitory	19
3.5.2.1 Mechanismus účinku elicitorů	21
3.5.2.2 Podmínky elicitace	22
3.6 SOLI KOVŮ	23
3.6.1 Minerální výživa	23
3.6.2 Adaptace rostlin	23
3.6.3 Hliník	24
3.6.4 Vápník	26
3.6.5 Verapamil (blokátor vápníkových kanálů)	28
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY, POUŽITÝ MATERIÁL	30
4.1.1 Chemikálie	30
4.1.2 Rostlinný materiál	31
4.1.3 Stanovení ztráty sušením	31
4.2 KULTIVACE EXPLANTÁTOVÉ KULTURY	32
4.2.1 Kultivační nádoby a nástroje	32
4.2.2 Příprava živného média	32
4.2.3 Podmínky pasážování a kultivace	33
4.2.4 Odvození suspenzní kultury	33
4.3 ELICITACE	34
4.4 STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ	35
4.4.1 Princip stanovení	35

4.4.2	<i>Postup stanovení</i>	35
4.5	STANOVENÍ OBSAHU ISOFLAVONOIDŮ	37
4.5.1	<i>Princip stanovení</i>	37
4.5.2	<i>Příprava vzorku</i>	37
4.5.3	<i>Parametry HPLC analýzy</i>	38
4.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	40
5	VÝSLEDKY	42
5.1	TABULKY.....	42
5.2	GRAFY.....	47
6	DISKUSE	51
7	ZÁVĚR	57
8	SEZNAM LITERATURY	59
9	ABSTRAKT	62

1 Úvod

„Devět desetin našeho štěstí spočívá vlastně pouze ve zdraví.“

Arthur Schopenhauer

Zdraví si přeje každý člověk. A pokud jej ztratil, snaží se ho rychle obnovit. Chemické preparáty z tohoto důvodu byly v popředí, protože docházelo k rychlému zmírnění potíží. Ale darují nám vždy tyto preparáty zdraví? Ne vždy můžeme říci jednoznačné ano.

A proto se lidé stále častěji přiklánějí k přírodním preparátům – k léčivým bylinám, které lidstvo téměř dvě generace poslalo do „vyhnanství“. Léčivé byliny se opět stávají pomocníkem k udržení nebo obnovení našeho zdraví, bez vedlejších nežádoucích účinků na naše tělo (23).

21. století znamená mnoho změn v lidském životě. Sběr bylin není už v rukou jednotlivců, ale zhodnocování a úprava bylin leží v rukou výrobců léků a lékárníků. K léčbě využíváme kromě samotných drog i účinné látky, které dále zpracováváme a modifikujeme.

Sběr bylin je pouze sezónní, ovlivněn mnoha činiteli, a proto začínáme využívat možnost buněčných kultur *in vitro*. Jejich výhodou je, že produkce metabolitů probíhá za námi stanovených podmínek, není ovlivněna počasím, kvalitou půdy nebo fungicidy. Získaný materiál je sterilní a homogenní (7,24).

Problémem u kultur *in vitro* je, že ztrátou diferenciací pletiv dochází ke snížení nebo zablokování metabolismu. Obsah sekundárních přírodních látek v kultuře je tak nižší než u původní rostliny. Byly vyzkoušeny postupy, kterými lze dosáhnout zvýšené produkce a akumulace sekundárních metabolitů v buněčných kulturách *in vitro*. Jde např. o biotransformaci, imobilizaci, elicitaci a jejich vzájemné kombinování. Elicitace je metoda založená na elicitorem indukované expresi genů, čímž se může zvýšit množství aktivních enzymů a poté zesílit syntéza sekundárních metabolitů (7,24,25).

V současné době stoupá zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů. Vhodným zdrojem se jeví jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*). Kultury *in vitro* ovšem obsahují méně flavonoidů a isoflavonoidů než intaktní rostlina, a proto je snaha zvýšit jejich produkci elicitací (22,26).

2 Cíl práce

- Kultivace explantátové kultury – čtyřleté a nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* L., varieta Sprint
- Sledování vlivu abiotického elicitoru chloridu hlinitého v kombinaci s vápenatými ionty a blokátorem vápníkových kanálů na produkci flavonoidů a iso flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L.

3 Teoretická část

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

3.1.1 Botanický popis rostliny

Jetel luční (*Trifolium pratense* L.) patří společně s asi 300 druhy do čeledi *Fabaceae* (52).

Ve své anatomické stavbě se jedná o velmi proměnlivý druh. Tato vytrvalá bylina dosahuje výšky 20 – 50 cm. Má kulovité kořeny, rychle zeslabující a pronikající hluboko do půdy, více větvené jsou v orniční vrstvě.

Z trsnatého oddenku bez výběžků vyrůstá přizemní růžice listů a přímé nebo vystoupavé, jednoduché nebo spoře rozvětvené, 20 až 50 cm vysoké, chlupaté a většinou trochu hranaté lodyhy o 3 až 5 článcích. Rostlina vytváří mohutnou přizemní růžici listů. Listy jsou trojčetné, dolní dlouze řapíkaté a horní krátce řapíkaté až přisedlé, s palisty vejčité kopinatými, s řapíkem listu vysoko srostlými, ostře špičatými. Listy jsou složeny z lístků 7 až 15 × 15 až 30 mm velikých, skoro celokrajných, na lici lysých a s příčnou bělavou nebo červenohnědou skvrnou, vespod přitiskle chlupatých a na okraji brvitých (8,9,10).

Drobné květy jsou zbarvené červeně, růžově, bíle nebo žlutě, skládají se do hlávkovitých květenství měřících 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. Plod je jednosemenný nepukavý lusk s lehce oddělitelným váčkem. Semena jsou drobná, srdcovitá až kulatá, uzavřena v kalichu. Často je spodní část žlutá a horní fialová (20).

Obr. 1 *Trifolium pratense* L., *Fabaceae* (55)



3.1.2 Výskyt

Trifolium pratense L. roste na lukách, okrajích lesů, na hranicích polí a cest. Pěstován je na polích v různých vyšlechtěných odrůdách. Je to rostlina značně proměnlivá a kosmopolitní, která roste z rovin až do hor v celé Evropě a západní Asii, v severní Africe i v Austrálii. Nejlépe snáší mírně vlhké prostředí (52,58).

Některé druhy poskytují velice kvalitní píci, proto jsou také často pěstovány na zemědělských plochách. Díky účinné mykorrhize dokážou efektivně vázat dusík, proto jsou vhodné i pro zkvalitnění půdy (52).

3.1.3 Poddruhy

V České republice lze nalézt tři poddruhy *Trifolium pratense* L.

Řadíme sem:

Trifolium pratense subsp. pratense (jetel luční pravý) – vytrvalá bylina s významem léčivé rostliny

Trifolium pratense subsp. sativum (jetel luční setý) – jde o 2 – 3 letou bylinu, považovanou za hospodářskou plodinu

Trifolium pratense subsp. americanum (jetel luční americký) – vytrvalá bylina přivezena v 80. letech 19. století, vyznačovala se výškou až 80 cm (10).

3.1.4 Sběr a použití drogy

Jetel luční kvete od května do října. Sběr se provádí hned v počátku května, protože odkvétající droga je méně hodnotná. Jako droga se sbírají nerozpadlé hlávky označované *Trifolium pratense flos*. Hlávky se totiž při sušení rozpadají a hnědnou. Proto je nutné sušit drogu rychle a v tenkých vrstvách. Drogu je možné vystavit přímému slunci pouze na jeden den a pak досуšit ve stinném a vzdušném místě. Při sušení umělým teplem se musí teplota držet do 35 °C. Během skladování je třeba drogu chránit před světlem a vlhkostí, aby nedošlo ke změně kvality. Kvalitní droga si zachovává původní barvu, maximálně mírně ztmavne (8,59,60,61).

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

Poddruhy *pratense* (jetel luční pravý) a *sativum* (jetel luční setý) jsou využívány jako léčivé rostliny, nejlépe květenství červená, případně bílá (58). Vnitřní použití je ve formě čajů jako expektorans, při bakteriálních infekcích, dýchacích obtížích či na čištění krve. Jako součást doplňků stravy se používá pro zmírnění projevů menopauzálních potíží. Zevně pak ve formě koupelí jako kožní dezinfekce ekzémů, lupenky a hnisavých ran (52,58).

U dobytka pasoucího se převážně na červeném jeteli byly hlášeny estrogení poruchy, zřejmě kvůli činnosti isoflavonoidů - formononetin, biochanin, a do určité míry daidzein a genistein (21).

3.1.5 Obsahové látky

Spektrum obsahových látek *Trifolium pratense* L. je rozsáhlé. Zahrnuje flavonoidy, isoflavonoidy, kyanogenní a fenolické glykosidy, saponiny, třísloviny, kumariny, organické kyseliny, minerální kyseliny, barviva, sílice, salicyláty, β -sitosterol, cholin, lecitin, vitaminy (vitamin A, C, B-komplex), vápník, hořčík, železo. *Trifolium pratense* L. obsahuje řadu fenolických sloučenin: daidzein, genistein, isotrifolin, isorhamnetin, pratol, pratensol, trifolin, a protiplísňovou sloučeninu trifolirhizin. Dále obsahuje kyselinu kumarovou, hentriacontan, heptacosan nebo myricyl alkohol (21).

Z hlediska využití *Trifolium pratense* L. v terapii se jeví jako nejzajímavější skupina isoflavonoidů zahrnující biochanin A a formononetin, které se vyskytují v největší míře. Dále jsou zde zastoupeny daidzein, genistein, genistin, koumestrol, ononin a trifoliol.

3.2 Flavonoidy

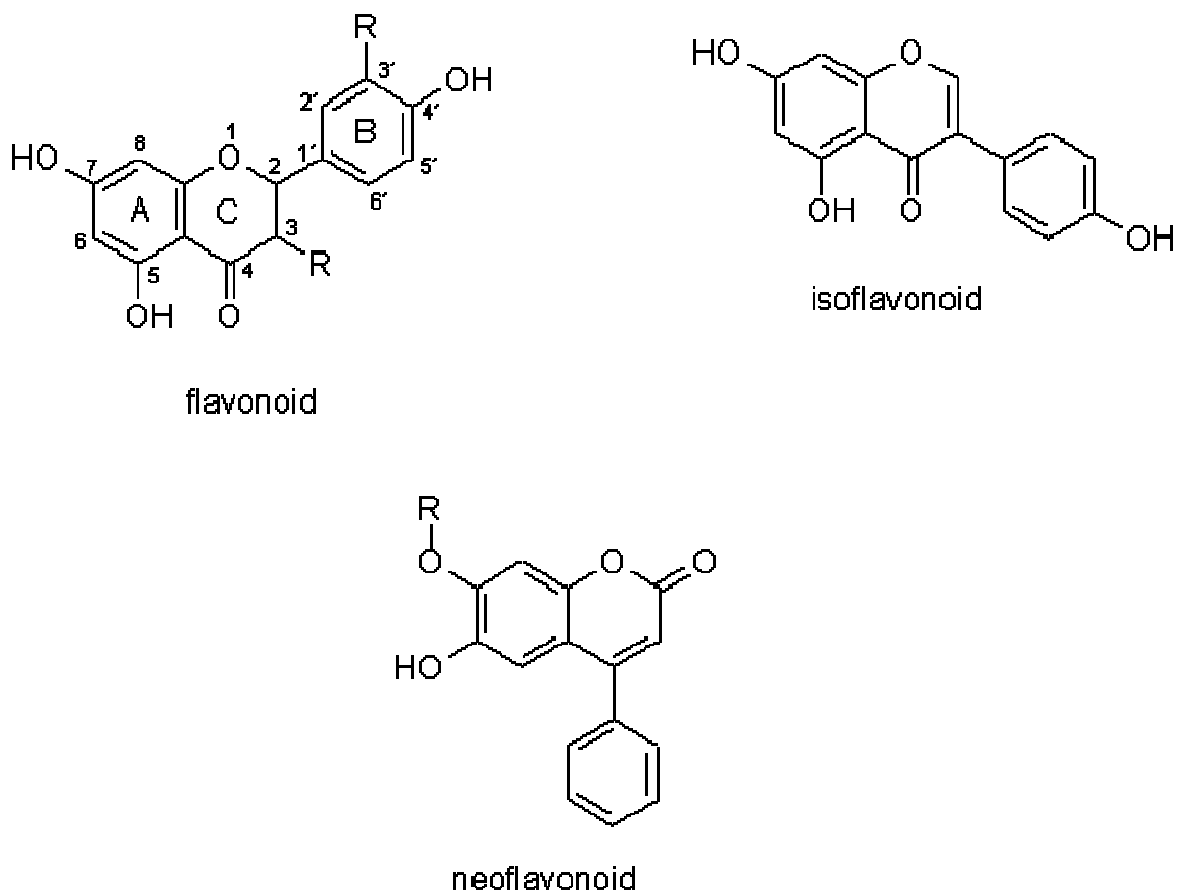
Rozsáhlá skupina rostlinných fenolů – flavonoidů - se stále rozšiřuje o další sloučeniny. Jedná se o ve vodě rozpustná barviva, zodpovědná za barvu květů, plodů a někdy i listů. Nejčastěji jsou uloženy ve vakuolách. V listech mohou být ukládány do buněk epidermu nebo do epidermu a zároveň mezofylu. V obou typech tkání se mohou kumulovat odlišné typy flavonoidů. Aglykony nejčastěji nacházíme v kutikule listů, protože jsou lipofilnější (hydroxylové skupiny ve struktuře sloučeniny jsou částečně nebo úplně methylované), a proto lépe rozpustné ve voskové vrstvě na povrchu listu. Flavonoidy nalezneme v epidermálních buňkách květů, v oplodí plodů, semenech a dokonce v pylových zrnech. Methoxylované deriváty jsou lipofilnější a vyskytují se v silicích.

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

Podle oxidace pyranového kruhu rozeznáváme základní struktury flavonoidů: flaveny, flavany, katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavononoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny (38).

Všechny flavonoidy mají společnou základní strukturu odvozenou od chromanu s fenylem připojeným v poloze 2. V poloze 3 jde o isoflavonoidy a v poloze 4 neoflavonoidy. Jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace pyranového cyklu (kruh C).

Obr. 2 Základní struktury flavonoidních látek



Funkce v rostlinném organismu

Flavonoidy přispívají k zbarvení rostlin. Vyskytují se jako kopigmenty - např. jako flavonové a flavonolové - chránící anthokyany, které pomáhají lákat opylovače. V některých případech flavonoidy absorbují záření blízké UV a vzniklá barva je vnímána pouze hmyzem. Dále chrání pletiva před ničivým účinkem UV záření svou přítomností v kutikule listů a epidermálních buňkách.

Jsou důležitou součástí antioxidačního systému. Zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (železo, měď). Optimální vlastnosti byly nalezeny u o-dihydroxy struktury v kruhu B, 2,3 dvojnou vazbu a 4-oxo funkční skupiny v kruhu C a 3 a 5 -OH skupiny na kruzích A a C. Tato struktura se vyskytuje např. u kempferolu nebo kvercetinu.

Flavonoidy v rostlinách vznikají kondenzací polyacetátu a aromatických aminokyselin (fenylalanin a tyrosin), které vznikají v biosyntetické cestě kyseliny šikimové. Meziproduktem biosyntézy je chalkon (patnácti-uhlíkatý) vznikající z kyseliny skořicové a tří molekul acetátu, který je přetvářen na flavanon a tvoří tak základ i dalších struktur flavonoidů (6,39).

Flavonoidy ve své molekule obsahují cukernou a necukernou složku (aglykon). Biologicky účinné jsou glykosidy i aglykony. V organismech se zapojují do oxidačně-redukčních procesů. Vykazují účinky spasmolytické, antihepatotoxické, normalizují permeabilitu kapilár a odstraňují jejich lomivost, pravděpodobně díky svému působení na metabolismus arachidonové kyseliny vykazují protizánětlivou a antialergickou aktivitu. Mnoho rostlin obsahujících flavonoidy působí jako diuretika (38).

Flavonoidy jsou také inhibitory enzymů např. elastázu a kolagenázu, hyaluronidázu, angiotenzin konvertujícího enzymu nebo Ca^{2+} -dependentní ATP-ázu.

Ukazuje se, že vhodný způsob stravování a příjem potravin s vyšším obsahem flavonoidů by mohl pomoci při léčbě a předcházení aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob. Tím by se zvýšil příjem flavonoidů, což by zřejmě bylo vhodnější než podávání samotných antioxidačních preparátů jako vitamín C a E (38).

3.3 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou sekundární metabolity odvozené od 3-fenylchromanu, jeví podobné účinky jako flavonoidy, které jsou deriváty 2-fenylchromanu. Na rozdíl od flavonoidů jsou v rostlinách mnohem méně zastoupeny. To je způsobeno nutnou přítomností specifického enzymu zodpovědného za přeměnu 2-fenylchromanového cyklu na 3-fenylchroman (62).

Nejčastěji se vyskytující skupinou těchto sekundárních látek jsou isoflavany. V rostlině se vyskytují převážně ve volné formě méně glykosidicky vázané. Z přibližně 360 známých zástupců jsou nejvýznamnějšími biochanin A, daidzein, formononetin a genistein (obr.3). Jako další skupiny isoflavonoidů rozlišujeme lignany (matairesinol, secoisolariciresinol-diglucosid) a kumestany.

Isoflavonoidy jsou látky, které se vyskytují ve většině rostlinných tkání. O přesném významu se příliš neví, ale je pravděpodobné, že vznikají jako odpověď na infekci patologickým agens (fytoalexiny). Mohou tak představovat jeden z obranných mechanismů. Lze je izolovat z klíčků, pupenů a mladých výhonků. Což napovídá, že zasahují do regulace fyziologických procesů důležitých pro růst rostlin (64,65).

Nejvýznamnějším zdrojem isoflavonoidů je sója a sojové produkty. Ostatní luštěniny obsahují tyto látky jen omezeně. V našich podmínkách jsou zdrojem jetel luční nebo vojtěška. Dále např. ploštičník, červená vinná réva, rýže, ale i jahody, rybíz nebo datle (62).

Isoflavonoidy jsou řazeny k nejvýznamnějším fytoestrogenům (22). Váží se na estrogení receptory. Ty rozlišujeme na dva subtypy:

ER- α – nachází se v děloze, mléčných žlázách a hypofýze

ER- β – v mozku, kostech, močovém měchýři a thymu.

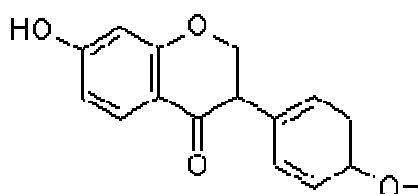
V současnosti se věnuje pozornost fytoestrogenům, protože by mohly být alternativou v léčbě klimakterického syndromu. Užívání hormonální substituční terapie má mnoho nežádoucích účinků.

Mohly by také pomáhat při léčbě nemocí kardiovaskulárního systému, osteoporózy, nepravidelné krvácení, ale i proti zhoubným nádorům (novější publikace dokládají ochranný účinek pravidelného užívání isoflavonů na karcinom ovaria (62).

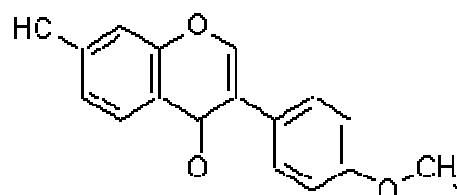
Isoflavonoidy ovšem vykazují i antiestrogenní účinek, narušováním funkce endogenních receptorů v lidském organismu. Princip antiestrogenního působení je založen na stimulaci biosyntézy sexuální hormonu vázající globulin (SHBG) v játrech.

Isoflavonoidy vykazují široké spektrum účinků. Např. aktivitu antioxidační, antiosteoporotickou, antikarcinogenní, hypocholesteremickou, antivirová, antibakteriální, antifungální, larvicidní a insekticidní. Lze je použít jako antidotum proti některým pavoučím a hadím jedům (*Bothrops atrox*).

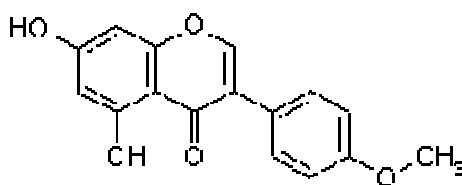
Obr. 3 Struktury nejvýznamnějších isoflavonoidů (40)



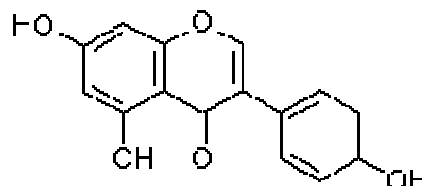
Daidzein



Formononetin



Biochanin A



Genistein

3.4 Rostlinné kultury *in vitro*

Hovoříme-li o explantátové či tkáňové kultuře, jedná se o pěstování (kultivaci), případně o vegetativní množení (mikropropagaci) rostlinného materiálu za specifických umělých podmínek. Rostliny jsou pěstovány ve zcela sterilním prostředí, nepůsobí na ně tak svojí činností žádné jiné organizmy (především mikroorganismy). Člověk může libovolně nastavit téměř všechny podmínky kultivačního prostředí a ty, které nemůže, má možnost alespoň monitorovat. Celým světem se tak pro rostlinu stává malá, často skleněná baňka (nejčastěji Erlenmeyerova baňka). Z tohoto důvodu se historicky vžil pro celý proces název kultivace rostlin v prostředí *in vitro*, tedy ve skle.

Pěstitel určuje volbou složení kultivačního média dostupnost a formu živin, vitamínů, vody a růstových regulátorů přístupných pro rostlinu. Dále také reguluje teplotu kultivačního prostředí, délku a kvantitu i kvalitu záření během dne. Právě tato definovatelnost kultivačního prostředí umožňuje studium mnohých základních fyziologických procesů v rostlině. Lze tak například studovat odpovědi rostlinných kultur na působení různých stresorů, regulaci kvetení, vývoj embryí apod. V podmínkách *in vitro* lze kultivovat jak celistvé rostliny, tak jejich části – orgány (stonek, kořen, pupen), jejich části (pletiva) nebo jen samostatné buňky.

První pokusy zabývající se problematikou rostlinných kultur *in vitro* provedl Haberlandt (1902). On ovšem pracoval s diferencovanými buňkami, což vedlo k negativním výsledkům. Byly vyzkoušeny různé modifikace média a podmínek kultivace. Až volba meristemických buněk vedla ke kladným výsledkům. Hannig (1904), Dietrich (1924) a po něm Thukey (1933) úspěšně kultivovali rostlinná embrya. První neomezeně rostoucí kalusové kultury nezávisle na sobě odvodili z kambia Nobecourt (1937) a Gautheret (1938). Základní podmínkou pro úspěšnou kultivaci rostlinných kultur je jejich pravidelné pasážování do nového živného prostředí (31).

50. léta vedla k vývoji nových aparatur. Používaly se různé druhy třepaček (např. Muir - 1954), White (1953) vyvinul roler, Nickell a Tulecke (1960) pracovali se suspenzemi rostlinných buněk ve fermentačních aparaturách (30).

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

Problematice rostlinných kultur *in vitro* se věnovala také má diplomová práce vypracovaná na katedře farmakognozie (38), kde jsou definovány všechny základní termíny charakterizující rostlinné kultury *in vitro*. Podrobně jsou zde uvedeny také vlastnosti rostlinných explantátů, způsoby a podmínky jejich kultivace, charakteristika růstových fází buněčných kultur a biotechnologické využití rostlinných kultur *in vitro*.

3.5 Elicitace

Elicitace je proces, založený na signálem indukované expresi genů, při kterém je využívána schopnost rostlin a rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na rozličné stresové podněty řadou obranných reakcí. Aktivují se enzymy, které vedou ke zvýšené akumulaci sekundárních metabolitů.

3.5.1 Fytoalexiny

Jedná se o specifické nízkomolekulární látky s antimikrobiální aktivitou, které jsou syntetizovány po napadení mikroorganismy. Jakákoliv odchylka životního prostředí od fyziologického standardu může aktivovat obranné mechanismy rostlin. Tím je zahájena syntéza fytoalexinů. Díky svému lipofilnímu charakteru mohou přestupovat přes plazmatickou membránu patogenů. U nestresované rostliny se nacházejí ve velmi nízkých koncentracích nebo vůbec. K fytoalexinům řadíme např.: flavonoidy, terpeny, steroidy (35,36).

U jedné rostliny se tvoří více druhů fytoalexinů. U systematicky příbuzných rostlin se vyskytují podobné druhy. U zástupců čeledi *Fabaceae* jsou typickými sekundárními metabolity isoflavonoidy. Další čeledi obsahují např. furanokumariny (*Apiacea*, *Rutaceae*), seskviterpeny (*Solanaceae*) nebo diterpeny (*Poaceae*).

3.5.2 Elicitory

Elicitory jsou signální látky, ovlivňující expresi genů, potřebných k syntéze fytoalexinů. V buňkách infikovaných pletiv intaktních rostlin i buněčných kultur probíhají reakce, při kterých se krátkodobě aktivují enzymy, které katalyzují tvorbu fytoalexinů (25).

Elicitory se dělí na dvě skupiny:

1. Biotické elicitory

Jde o organické sloučeniny nebo organismy, které spouštějí tvorbu fytoalexinů už při nepatrných koncentracích.

Zástupci:

- bakterie, kvasinky, mykoplasmata, viry – části nebo celé intaktní patogenní i nepatogenní organismy
- oligosacharidy, polypeptidy, glykoproteiny – organické molekuly parazitických mikroorganismů
- chitosan, oligogalakturonidy, kyselina salicylová - organické molekuly pocházející z buněk napadené rostliny (endogenní konstitutivní elicitory) (25)

2. Abiotické elicitory

Jsou to chemické a fyzikální vlivy, které rostlinu stresují a vyvolávají tak tvorbu fytoalexinů. Výhodou abiotických elicitorů je schopnost chemické identifikace. Lze je tedy aplikovat v přesně určených množstvích. Většinou se také jedná o cenově dostupné látky (25,34).

Zástupci:

- soli těžkých kovů
- kyselina trichloroctová, 2,4-dinitrofenol - inhibitory látkové výměny
- detergenty
- nedostatek živin
- pesticidy - rostlinné ochranné prostředky
- změny fyzikálních vlivů (pH, UV záření, γ -záření, osmotického tlaku)

3.5.2.1 Mechanismus účinku elicitorů

Předpokládá se, že elicitory v rostlinných kulturách *in vitro* indukují produkci a akumulaci stresových metabolitů stejným mechanismem jako v intaktní rostlině (25). Expresi genů, potřebných k obranné reakci není ovlivněna přímo, ale přes druhé posly (G-proteiny, proteinkinasy, Ca^{2+} -proteiny). Signál je přenášen přes transdukční signální cesty, což vede k expresi genů a biochemickým změnám.

Na základě dosavadních znalostí se předpokládá se, že molekuly biotického elicitoru jsou rozpoznány specifickými receptory v plazmatické membráně. Po obsazení receptoru dojde k aktivaci G-proteinů, otevření Ca^{2+} -kanálů a rychlému influxu vápenatých iontů do buňky. Tím je přinesena informace o poranění buňky.

Zdrojem Ca^{2+} iontů jsou intracelulární organely (mitochondrie, endoplazmatické retikulum). Přejít přes plazmatickou membránu je umožněno změnou membránového potenciálu přes napětově závislý Ca^{2+} -permeabilní kanál, který zvyšuje koncentraci cytosolových Ca^{2+} iontů. Ve chvíli kdy koncentrace Ca^{2+} iontů v intracelulárním prostoru dosáhne $1\mu\text{M}$, naváže se kalcium na bílkovinu kalmodulin. Ta přes 4 vazebná místa pro Ca^{2+} ionty tvoří komplex, ovlivňující aktivitu některých proteinkináz (34).

Další způsob přenosu signálu je zprostředkován pomocí fosfoinositolovému systému. Dochází k hydrolýze lipidů plazmatické membrány a jsou generovány dvě signální molekuly – inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol. Tyto látky vedou k aktivaci proteinkináz a expresi genů (34).

Jiným způsobem přenosu signálu je tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku (hydroxylové radikály, hydrogen peroxidy). Kyslíkové deriváty způsobují peroxidaci membránových lipidů, což vede ke zvýšení syntézy stresových fytohormonů (kyseliny jasmínové). Expresi genů je tak ovlivněna nepřímo (34).

Abiotické elicitory se neváží na specifické receptory, jejich působení je např. ve spouštění peroxidace lipidů u těžkých kovů. Zvýší se propustnost plazmatické membrány pro Ca^{2+} ionty a nárůstu koncentrace signálně účinných stresových fytohormonů. Ionty těžkých kovů aktivují transkripci genů tvorbu fytochelatinů, malých

peptidů syntetizovaných z glutathionu, které váží kovy a vznikají tak inaktivní komplexy. Tento proces je buňkou využíván také při detoxikaci (37).

3.5.2.2 Podmínky elicitace

Pro úspěšnou elicitaci je nejdůležitější podmínkou výběr vhodného elicitoru. Volbou nevhodného elicitoru může naopak dojít ke snížení nebo i k zastavení produkce žádaných látek.

Další důležité podmínky pro indukci sekundárních metabolitů jsou vhodné vzájemné interakce elicitoru a buněčné kultury:

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

O podmínkách tvorby a akumulace sekundárních látek v rostlinných buněčných kulturách můžeme říci, tvorba sekundárních metabolitů probíhá pod vlivem elicitoru zejména v buňkách, které jsou na konci růstové fáze. Elicitace je opakovatelný proces, probíhající jak v suspenzních kulturách, tak v kalusu. Začíná v průběhu několika hodin po působení elicitoru (6-48 hodin). Sekundární metabolity se nalézají v buňkách i v médiu (24).

3.6 *Soli kovů*

3.6.1 Minerální výživa

Minerální výživa je pro rostlinu důležitá. Asimilované ionty (jejich přeměna ve struktury a účast v procesech rostliny) jsou nezbytné ve vývojových procesech, kdy působí jako kofaktory enzymů, osmotika, poslové k přenosu signálů a substráty v biochemických reakcích.

Kvalitativně odpovídá obsah prvků v rostlině složení kořenového substrátu. Nepřítomnost prvků v rostlině je způsobena nepřítomností v půdě nebo v atmosféře. Důležité je ovšem množství a poměr jednotlivých prvků v rostlině, které se od množství a poměru prvků v půdě nebo živném médiu mohou lišit (32,34,47).

3.6.2 Adaptace rostlin

Ionty těžkých kovů představují problematickou zátěž životního prostředí. Akumulují se v potravních řetězcích. Uvolňují se do půdního roztoku, přes kořeny jsou přijímány do rostlin, kde vytlačují základní kovové ionty z biomolekul. Autooxidují a produkují tak reaktivní formy kyslíku. Blokují esenciální funkční skupiny v biomolekulách.

Rostliny se dokážou adaptovat na zvýšený výskyt těžkých kovů. A to následujícími způsoby:

tolerance – ionty těžkých kovů hromadící se v tkáňových buňkách jsou inaktivovány vazbou na nízkomolekulární bílkoviny s vysokým podílem cysteinu (*fytochelatiny* nebo *metalotioneiny*).

rezistence – rostlina se chrání omezením vstupu iontů do buněk, hromaděním iontů ve vakuolách nebo omezením transportu do nadzemní části rostliny.

Rostliny se vyznačují rozdílným stupněm tolerance a rezistence na působení iontů těžkých kovů. Vystavení rostlin neredoxně reagujícím těžkým kovům má za následek oxidační stres.

3.6.3 Hliník

Hliník společně s borem, galiem a thaliem patří do III. A skupiny Mendělejevovy periodické tabulky prvků. Je to velmi lehký kov bělavě šedé barvy, velmi dobrý vodič elektrického proudu, široce používaný v elektrotechnice a ve formě slitin v leteckém průmyslu a mnoha dalších odvětvích (48).

V přírodě je hliník třetím nejvíce zastoupeným prvkem. Ve sloučeninách se vyskytuje pouze v mocenství Al^{+3} . V kyselém prostředí jako hlinitý kation, v alkalickém prostředí jako hlinitanový anion $[AlO_2]^-$. Hliník je v čistém stavu velmi reaktivní, na vzduchu se rychle pokryje tenkou vrstvičkou oxidu Al_2O_3 , která chrání kov před další oxidací. Hliník je velmi dobře rozpustný ve zředěných kyselinách, koncentrovaná kyselina dusičná jej však stejně jako vzdušný kyslík pokryje ochrannou vrstvou oxidu Al_2O_3 . Také hydroxidy alkalických kovů snadno rozpouštějí kovový hliník za vzniku hlinitanů $[AlO_2]^-$ (48,50,51).

V rostlinné buňce se hliník váže na nukleové kyseliny ve formě fosfátů, čímž ovlivňuje při buněčném dělení průběh replikace. Interferuje s enzymy podílejícími se na fosforylaci cukrů a na ukládání polysacharidů v buněčných stěnách, a tím ovlivňuje permeabilitu membrán (spolu s interakcí s membránovými proteiny, fosfolipidy a lipoproteiny). Hliník se váže na pektiny stěn kořenových buněk, což zamezuje prodlužovacímu růstu kořenů (41).

Rostliny disponují relativně účinnými obrannými mechanismy vůči toxickému působení hliníku.

Jedná se např. o:

- snižování inhibičního vlivu na kalmodulin-dependentní enzymy tvorbou polypeptidů (kyselina polyasparagová, kyselina polyglutamová) schopných vázat hliníkové ionty
- tvorba citrátu a malátu, které převádějí hliník do pevných organických komplexů
- zvýšení pH v okolí kořenů (42).

V rostlinných buňkách plní hlinité ionty dvojí roli. Chovají se jako induktory nebo inhibitory influxu Ca^{2+} v závislosti na koncentraci. Tyto účinky byly sledovány na buňkách BY-2 produkujících aequorin u rostliny *Nicotiana tabacum* a na TPC1 Ca^{2+} kanálech rostliny *Arabidopsis thaliana*. Hliník v buňkách indukoval produkci superoxidu, čímž byl sekundárně navozen vstup Ca^{2+} do buňky. Vyšší koncentrace Al^{3+} iontů vedla k potlačení původní stimulace. Došlo k blokování Ca^{2+} kanálů reagujících na reaktivní formy kyslíku (18).

Jiná studie zkoumala vliv hliníku jako inhibitoru na influx Ca^{2+} iontů transgenními BY-2 buňkami tabáku způsobený kyselinou salicylovou a chladem monitorováním světélkujícího proteinu aequorinu. TPC1 kanál byl vyhodnocen jako citlivý na hliník a na reaktivní formy kyslíku. Je zřejmé, že hlinité ionty vedou u rostlin k rozvoji obranných mechanismů (53).

Další studie se zabývala vlivem chloridu hlinitého na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L.. Bylo sledována šest rozdílných koncentrací AlCl_3 jako potenciálního elicitoru. Obsah kumarinů vzrůstal s rostoucí koncentrací Al^{3+} iontů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s koncentrací AlCl_3 1000 μM (14).

Vystavení rostlin neredoxně reagujícím těžkým kovům mělo za následek oxidační stres (43).

Trojmocné ionty Al, La a Gd jsou fyto toxické. Provedené studie ukázaly, že po přidání LaCl_3 nebo GdCl_3 k buňkám *Nicotiana tabacum* (*Solanaceae*) se spustila produkce superoxidu. AlCl_3 vyvolala mnohem vyšší produkci superoxidu při fyziologickém pH 5,8. Ukázalo se, že na tvorbě superoxidu se podílí NADPH oxidázy. Množství vytvořeného superoxidu je závislé na dávce elicitoru. Rostoucí koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu byla změřena luminiscencí proteinu aequorinu. Hliníkem indukovaný superoxid stimuluje příliv Ca^{2+} iontů. Vysoká koncentrace Al^{3+} iontů inhibovala H_2O_2 -navozený influx Ca^{2+} iontů. To vysvětlilo neúčinnost vysokých koncentrací hliníku. Je pozoruhodné, že hlinité ionty do koncentrace 10 mM nevykazují inhibiční vliv na hypoosmolární influx Ca^{2+} iontů. Vyplývá z toho, že hliník může být selektivní inhibitor redox-reagujících Ca^{2+} kanálů (19).

3.6.4 Vápník

Vápník je přijímán rostlinami jako kationt Ca^{2+} z půdního roztoku, kde je většinou převažujícím kationtem. Vlastní příjem Ca^{2+} se uskutečňuje hlavně pasivně kořenovými špičkami, kde ještě nejsou vyvinuty diferencované struktury kořenů (33,54).

Vápník je prakticky nepohyblivý floémem, dochází zde snadno k jeho imobilizaci, a proto je obsah vápníku v zásobních orgánech nízký. Ve starších buňkách a pletivech se hromadí ve vakuole ve formě šťavelanu nebo jiných těžko rozpustných solí. Proto je nutný jeho pravidelný přísun z vnějšího prostředí v průběhu celého vegetačního období (54).

Při nedostatku vápníku je snížena tvorba kořenového vlášení, kořeny postupně slizovají, kořenové buňky se rozkládají a pletivo se přeměňuje v nestrukturní hmotu. Další příznaky se projevují na mladých částech rostlin (např. na mladých listech lze pozorovat chlorotické skvrny, popř. dochází k hákovitému zakřivení nerozvinutých čepelí) (33,54).

V buňce se pro vápenaté ionty a inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) používá označení „druhý posel“. Mají mimořádný význam v přenosu a v amplifikaci signálu. Po vyvolání reakce se molekula druhého posla opět uvolňuje a rychle aktivuje mnohonásobek molekul příjemce. Druhým poslem u rostlin také může být cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), který je schopen reagovat s G-proteinem (33,34).

Funkce vápníku lze rozdělit (33,54):

- ovlivňuje semipermeabilitu buněčných membrán a stěn buněk - je vázán na negativní náboje (hlavně pektiny). Stabilizuje strukturu, prostorové uspořádání, a tím i permeabilitu membrán. Jde o funkci specifickou pro vápník, nenahraditelnou žádnými dvojmocnými kationty (Mn ani Sn).
- je stavební látkou - zpevňuje buněčné stěny. Podílí se na růstu buněk, které netvoří typickou celulózní stěnu (kořenové vlásky a pylové láčky), které bez Ca^{2+} vůbec nerostou.

- neutralizuje a váže některé organické kyseliny (zvláště kyselinu šťavelovou), což může mít detoxikační efekt.
- významně ovlivňuje stabilitu a integritu pletiv, což má vliv na skladovatelnost plodů (jablka - pihovitost, rajčata, papriky)
- ovlivňuje aktivitu enzymů v rostlinách (invertázy, katalázy, nitrátoreduktázy aj.).

Rostlina vnímá signály ze svého okolí (jsou to např. zemská tíže, světlo, fotoperioda, teplota, složení vzduchu, voda a minerální živiny, mechanické překážky, patogeny apod.). Buňky v rostlině reagují na vnitřní signály, které přijímají ze sousedních buněk. Jsou to fytohormony, cukry a dusíkaté látky, peptidy, proteiny, voda, minerální látky a další.

Signály (nejen) hormonální jsou přijímány receptory, tj. specifickými proteiny s vazebnými místy pro určitý signál. Dochází ke změně transportu iontů mezi kompartmenty, regulaci metabolických cest a distribuci metabolitů, regulaci exprese genů, změny v cytoskeletu, v hormonální regulaci a nakonec změny růstových parametrů (34).

Jsou aktivovány fosfolipázy, které štěpí v membráně fosfolipidy a jejich produkty se podílejí na regulaci buněčných procesů. Mimo jiné vznikají produkty inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). Do cytoplazmy uvolněný IP3 se váže na proteiny kanálů pro Ca^{2+} ve vnitrobuněčných membránách, umožňuje otvírání těchto kanálů a uvolňování Ca^{2+} z vnitrobuněčných kompartmentů (endoplazmatické retikulum, vakuoly) do cytosolu, což aktivuje Ca-dependentní enzymy v buňce (např. kalmodulin). Teprve poté je zahájena řetězová reakce fosforylací v cytoplazmě. Změny koncentrace Ca^{2+} v cytosolu jsou také způsobeny mechanickým pohybem, zasolením, kyselinou gibberelovou, auxiny nebo cytokininy. Ionty jsou uvolňovány z buněčných stěn, intracelulárního prostoru nebo kombinací obou míst. Jelikož jsou Ca^{2+} ionty vázány na Ca-dependentní bílkoviny, objevují se také v chloroplastech, jádrech a mitochondriích. Předpokládá se, že i zde plní úlohu posla zprostředkovávajícího regulaci genové exprese, oxidační fosforylace a fotosyntetické fixace CO_2 (34).

3.6.5 Verapamil (blokátor vápníkových kanálů)

Verapamil patří do skupiny blokátorů vápníkových kanálů. Jedná se o heterogenní skupinu látek. Dle chemické struktury je můžeme rozdělit do třech hlavních skupin:

- dihydropyridiny (nifedipin)
- benzothiazepiny (diltiazem)
- fenylalkylaminy (verapamil)

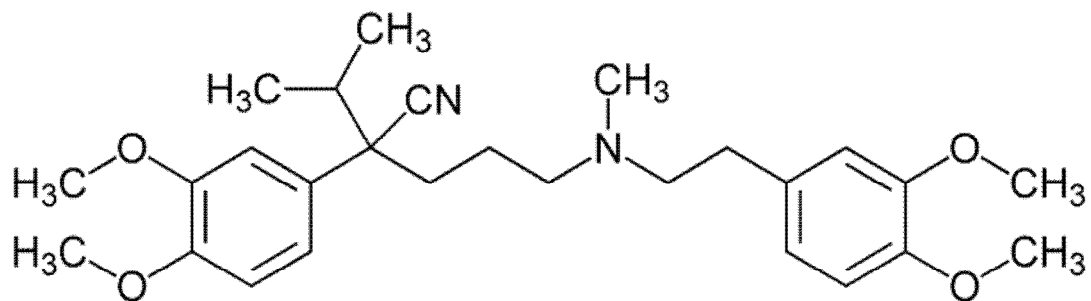
Účinek blokátorů vápníkových kanálů je ve specifické inhibici průniku iontů Ca^{2+} napětově řízenými kalciovými kanály do buněk hladkých svalů cévní stěny a kontraktálních a vodivých buněk myokardu. Nepůsobí na příčně pruhované svaly, kde nedochází k pravidelným změnám elektrického napětí membrány.

Po podání blokátorů vápníkových kanálů klesá intracelulární koncentrace vápníku a tím dojde ke snížení kontraktility a dráždivosti myokardu, které se u anginy pectoris projevuje snížením tonu věnčitých tepen v místě excentrické stenózy a v oblasti rezistenčních arteriol (15). Blokátory kalciového kanálu nevedou k poklesu krevního tlaku u normotoniců a neovlivňují hladiny reninu. Vedou k významné regresi hypertrofie levé srdeční komory. Nevyvolávají ortostatickou hypotenzi, nevedou k bronchokonstrikci a jsou metabolicky neutrální (56).

Nejvýznamnějším zástupcem první skupiny blokátorů vápníkového kanálu je verapamilu. Jeho hlavní účinek spočívá v účinku na myokard. Zpomaluje sinusový rytmus a snižuje rychlost vedení v převodním systému. Významný je i jeho negativně inotropní účinek, který je větší než u nifedipinu a diltiazemu. Vazodilatační účinek verapamilu se uplatňuje až u dávek nad 240 mg denně (15,27,56).

Obr. 4 Chemická struktura verapamilu

(±)-[3-[[2-(3,4-dimethoxyfenyl)ethyl]methylamino]propyl]-3,4-dimethoxy- α -(1-methylethyl)benzenacetonitril(56)



4 Experimentální část

4.1 *Přístroje a pomůcky, použitý materiál*

Analytické váhy A 200 S, Sartorius, Göttingen

Autokláv PS 20 A, Chirana, Brno

Box s laminárním prouděním Fatran LF, výrobné družstvo Pokrok, Žilina

Horkovzdušný sterilizátor HS 31 AM, Chirana, Brno

Chromatografická sestava Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), Merck, Darmstadt

Kolona LiChrosper RP-18 250x4 (5 μ m) s předkolonkou, Merck, Darmstadt

Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha

Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge

Třepačka Unimax, 2010, Heidolph

Vodní lázeň KL-1, Laboratorní přístroje, Praha

4.1.1 Chemikálie

6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno

dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema, Brno

dusičnan draselný p.a., Lachema, Brno

edetán disodný č., Lachema, Brno

ethanol 96 %, Lachema, Brno

chlorid hlinitý p.a., 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 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
sacharosa 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
verapamil p. a. Sigma-Aldrich, Steinheim

4.1.2 Rostlinný materiál

K pokusům v této práci byla použita explantátová kultura, odvozená ze sterilní klíčící rostliny jetele lučního *Trifolium pratense* L., (*Fabaceae*) varieta Sprint. Semena byla získána ze Šlechtitelské stanice Domoradice. Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepačce. Elicitace byla provedena u čtyřleté a nově odvozené (7. a 8. pasáž) suspenzní kultury.

4.1.3 Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do váženky, předem vysušené 2 hodiny při 105 °C, byly odváženy asi 2,000 g explantátové kultury. Váženka s obsahem byla zvážena a sušila se 2 hodiny v sušárně při 105 °C. Po vysušení se váženka s navázkou nechala vychladnout v exsikátoru a

zvážila se. Ztráta sušením byla vztažena na navážku explantátové kultury a vyjádřena v procentech. Výsledné hodnoty ztráty sušením 5,41 % a 5,38 % jsou aritmetickým průměrem ze tří stanovení (1).

4.2 *Kultivace explantátové kultury*

4.2.1 Kultivační nádoby a nástroje

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

4.2.2 Příprava živného média

Pro kultivaci tkáňových kultur bylo použito živné médium **podle Gamborga (B5)** s následujícím složením (4):

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 růstový stimulant byla použita kombinace kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové (2 mg.l⁻¹) s 6-benzylaminopurinem (2 mg.l⁻¹) (5).

Jednotlivé látky byly naváženy na analytických vahách nebo v případě nízkých koncentrací pipetované ze zásobních roztoků a dále rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněné po značku destilovanou vodou. Poté byly přidány růstové stimulanty. Nakonec se živné médium rozdělilo po 25 ml do varných baněk. Ty byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

4.2.3 Podmínky pasážování a kultivace

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. Během celého průběhu práce byly zachovány přísně aseptické podmínky, bylo používáno sterilní sklo a nástroje.

4.2.4 Odvození suspenzní kultury

Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepačce a následně kultivována na pomaloběžném roleru o rychlosti 8 ot min⁻¹ při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma.

Pasážování na B5 médiu proběhlo vždy v subkultivačním intervalu 14 dní, kdy byla přenesena část narostlé suspenze do baňky s čerstvým médiem a růstovými stimulanty - kyselinou 2,4-dichlorfenoxyoctovou (2 mg.l⁻¹) a 6-benzylaminopurinem (2 mg.l⁻¹).

4.3 Elicitace

K pokusům byly připraveny tři koncentrace vodného roztoku chloridu hlinitého (1 μmol , 10 μmol , a 100 μmol), chloridu vápenatého (0,1 mmol, 1 mmol a 10 mmol) a verapamilu (1 μmol , 10 μmol , a 100 μmol).

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

Při elicitaci suspenzí kultury, která byla provedena za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu ve 21. dni kultivace, byl použit chlorid hlinitý samostatně a v kombinaci s chloridem vápenatým a verapamilem. Ke kulturám byl vždy napipetován 1,00 ml elicitoru (resp. vápenatých iontů, verapamilu) o příslušné koncentraci. Ke kontrolním kulturám byl přidáván 1,0 ml destilované vody.

K pokusu bylo použito 88 kultivačních baňek se suspenzí kulturou. Soubor 4 baňek bez elicitoru, vápenatých iontů a verapamilu sloužil jako kultura kontrolní. Do 12 baňek s kulturou byl přidán samotný chlorid hlinitý (jedna koncentrace do 4 baňek). V dalších 36 baňkách byla příslušná koncentrace chloridu hlinitého kombinována s jednou ze tří koncentrací vápenatých iontů (vždy po 4 baňkách). Ve zbývajících 36 baňkách byly ke třem sledovaným koncentracím chloridu hlinitého přidávány jednotlivé koncentrace verapamilu. Všechny baňky byly pečlivě uzavřeny hliníkovou folií a dále kultivovány za již uvedených podmínek. Vznikly tak čtyři soubory baňek – kontrolní kultura, kultura elicítovaná chloridem hlinitým, elicítovaná kultura v kombinaci s vápenatými ionty a elicítovaná kultura v kombinaci s verapamilem.

Všechny elicítované a kontrolní suspenzní kultury byly sklizeny vždy po 24 hodinách. Buňky byly odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a sušeny při laboratorní teplotě.

U každého vzorku bylo provedeno stanovení flavonoidů dle ČL 2009 a v případě nově odvozené suspenzní kultury také stanovení isoflavonoidů pomocí HPLC.

4.4 Stanovení obsahu flavonoidů

4.4.1 Princip stanovení

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé (1).

4.4.2 Postup stanovení

Základní roztok

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

Zkoušený roztok

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

Kontrolní roztok

5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R (10+100)* a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem

se promyje 3 ml směsí objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10+100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

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

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

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

v němž značí:

A - absorbanci roztoku v maximu při 410 nm,

M - hmotnost zkoušené kultury v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 405.

4.5 Stanovení obsahu isoflavonoidů

Methanolové extrakty suspenzních kultur *Trifolium pratense* L. byly zkoušeny na přítomnost isoflavonoidů. Stanovení daidzeinu, genistinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí (2).

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 interakcí (7).

4.5.2 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.

4.5.3 Parametry HPLC analýzy

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

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

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

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

Standardy: genistin, genistein, daidzein, formononetin

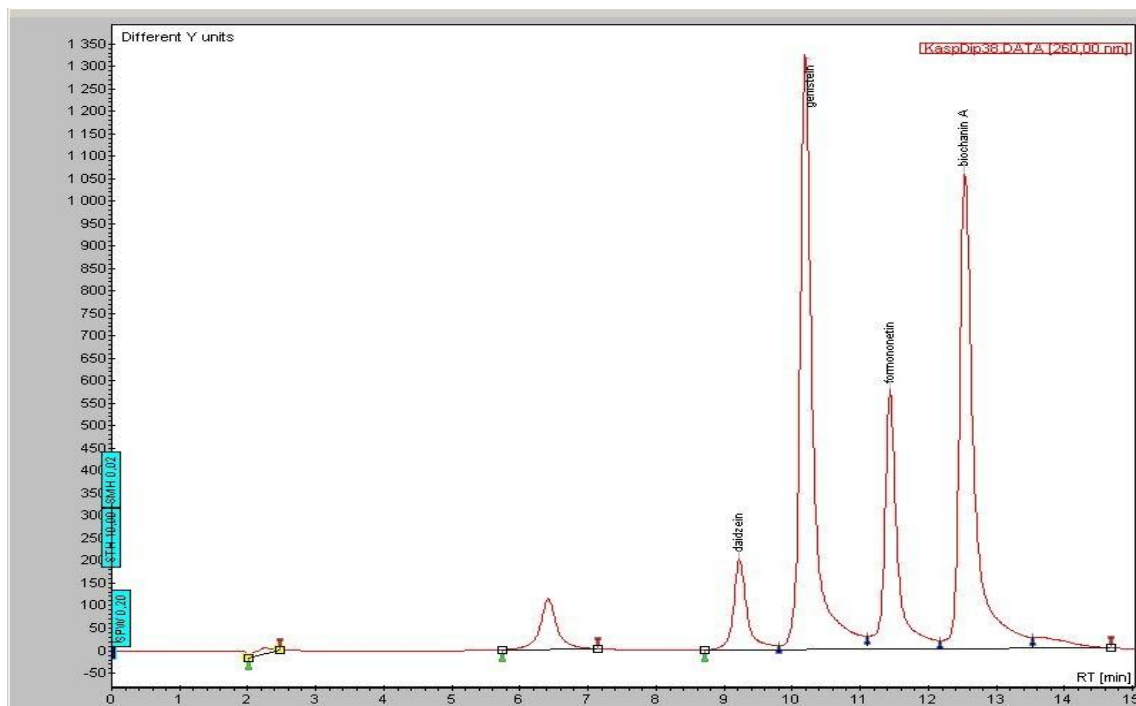
Průtok: 1,1 ml/min

Objem nástřiku: 20 μl

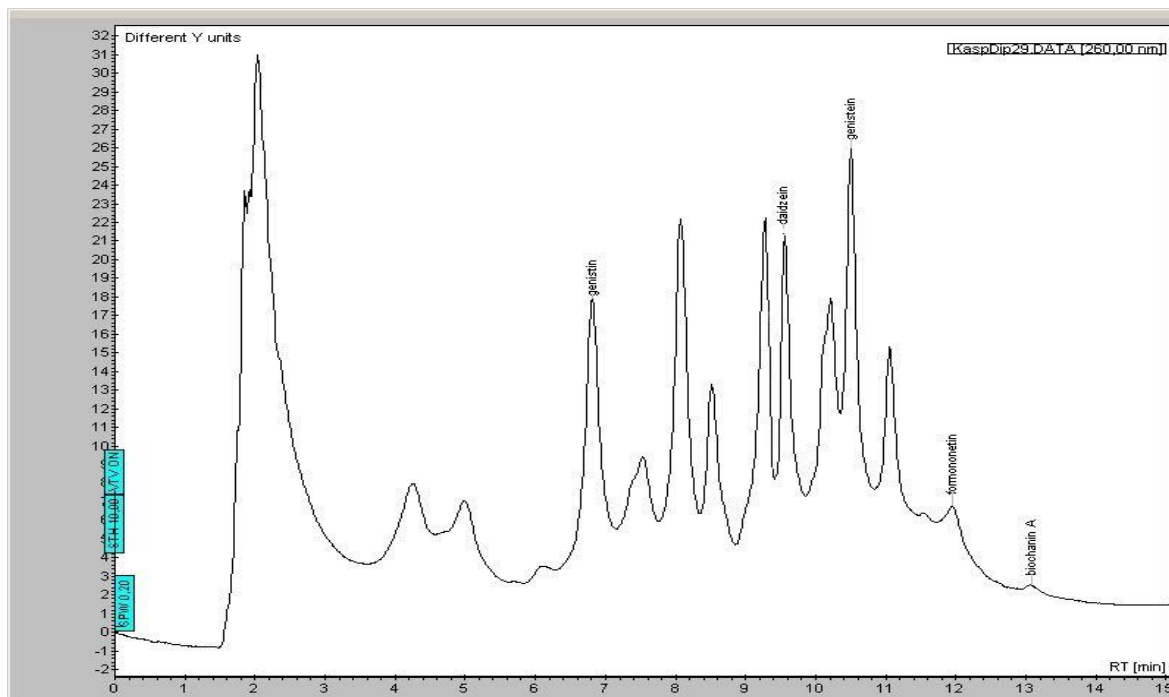
Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově. V čase $t = 0$ bylo složení 30 % methanolu a 70 % vody, v čase $t = 9$ min 80 % methanolu a 20 % vody. Následovala isokratická eluce stejným složením do času $t = 15$ min.

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 – 650 nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 260 nm. Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

Obr. 5 Chromatografický záznam standardů



Obr. 6 Chromatografický záznam elicitovaného vzorku



4.6 Statistické vyhodnocení

Vyhodnocení naměřených hodnot obsahu flavonoidů v kulturách *Trifolium pratense* L. bylo statisticky provedeno na základě T-testu, pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ (3).

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. K výpočtu testovacího kritéria bylo použito vztahu:

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

t.....testovací kritérium

\bar{x}_1aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x}_2aritmetický průměr pokusného souboru

n_1počet členů kontrolního souboru

n_2počet členů pokusného souboru

s_1směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2směrodatná odchylka pokusného souboru

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

Vypočtená hodnota testovacího kritéria (**t**) se porovná s příslušnou kritickou hodnotou $t(v)_p$ pro vypočtený stupeň volnosti (**v**) a zvolenou hladinu významnosti (**p**). Je-li hodnota (**t**) větší než hodnota $t(v)_p$, je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti (**p**) (3).

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

5 Výsledky

5.1 Tabulky

Tabulka 1 **Produkce flavonoidů u 4-leté suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým**

koncentrace elicitoru	elicitovaná kultura		kontrolní kultura		T-test
	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
AlCl ₃ (μmol)					
1	0,127	0,000	0,111	0,004	3,714
10	0,129	0,006	0,111	0,004	2,403
100	0,151	0,004	0,111	0,004	6,828

Tabulka 2 **Produkce flavonoidů u 4-leté suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým a chloridem vápenatým**

koncentrace elicitorů		elicitovaná kultura		kontrolní kultura		T-test
AlCl ₃ (μmol)	CaCl ₂ (mmol)	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
1	0,1	0,262	0,002	0,111	0,004	31,133
1	1	0,133	0,003	0,111	0,004	4,185
1	10	0,150	0,005	0,111	0,004	6,052
10	0,1	0,152	0,002	0,111	0,004	8,885
10	1	0,148	0,001	0,111	0,004	8,379
10	10	0,178	0,011	0,111	0,004	5,656
100	0,1	0,165	0,017	0,111	0,004	3,130
100	1	0,169	0,000	0,111	0,004	13,710
100	10	0,157	0,020	0,111	0,004	2,286

Tabulka 3 **Produkce flavonoidů u 4-leté suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým a verapamilem**

koncentrace elicitorů		elicitovaná kultura		kontrolní kultura		T-test
AlCl ₃ (μmol)	verapamil (μmol)	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
1	1	0,141	0,004	0,111	0,004	5,414
1	10	0,123	0,004	0,111	0,004	2,072
1	100	0,114	0,004	0,111	0,004	0,433
10	1	0,146	0,011	0,111	0,004	3,035
10	10	0,151	0,009	0,111	0,004	4,138
10	100	0,145	0,005	0,111	0,004	5,268
100	1	0,117	0,004	0,111	0,004	0,977
100	10	0,148	0,005	0,111	0,004	5,671
100	100	0,125	0,000	0,111	0,004	3,230

Tabulka 4 **Produkce flavonoidů u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým**

koncentrace elicitoru	elicitovaná kultura		kontrolní kultura		T-test
AlCl ₃ (μmol)	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
1	0,178	0,009	0,149	0,001	3,198
10	0,179	0,011	0,149	0,001	2,711
100	0,154	0,006	0,149	0,001	0,810

Tabulka 5 **Produkce flavonoidů u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým a chloridem vápenatým**

koncentrace elicitorů		elicitovaná kultura		kontrolní kultura		T-test
AlCl ₃ (μmol)	CaCl ₂ (mmol)	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
1	0,1	0,220	0,015	0,149	0,001	4,695
1	1	0,176	0,014	0,149	0,001	1,917
1	10	0,190	0,003	0,149	0,001	14,045
10	0,1	0,151	0,005	0,149	0,001	0,403
10	1	0,175	0,008	0,149	0,001	3,107
10	10	0,210	0,013	0,149	0,001	4,862
100	0,1	0,170	0,010	0,149	0,001	2,158
100	1	0,166	0,001	0,149	0,001	17,000
100	10	0,196	0,007	0,149	0,001	6,737

Tabulka 6 **Produkce flavonoidů u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým a verapamilem**

koncentrace elicitorů		elicitovaná kultura		kontrolní kultura		T-test
AlCl ₃ (μmol)	verapamil (μmol)	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	průměrný obsah flavonoidů (%)	směrodatná odchylka	
1	1	0,167	0,010	0,149	0,001	1,668
1	10	0,177	0,008	0,149	0,001	3,271
1	100	0,156	0,013	0,149	0,001	0,499
10	1	0,186	0,015	0,149	0,001	2,537
10	10	0,188	0,006	0,149	0,001	6,678
10	100	0,150	0,010	0,149	0,001	0,116
100	1	0,162	0,023	0,149	0,001	0,570
100	10	0,156	0,000	0,149	0,001	7,842
100	100	0,168	0,007	0,149	0,001	2,903

Tabulka 7 Produkce isoflavonoidů u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým

elicitor	obsah isoflavonoidů (%)					
	AlCl ₃ (μmol)	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A
0		0,06	0,02	0,02	0,05	-
1		0,09	0,03	0,02	0,07	-
10		0,09	0,03	0,02	0,06	-
100		0,08	0,02	0,02	0,06	-

Tabulka 8 Produkce isoflavonoidů u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým a chloridem vápenatým

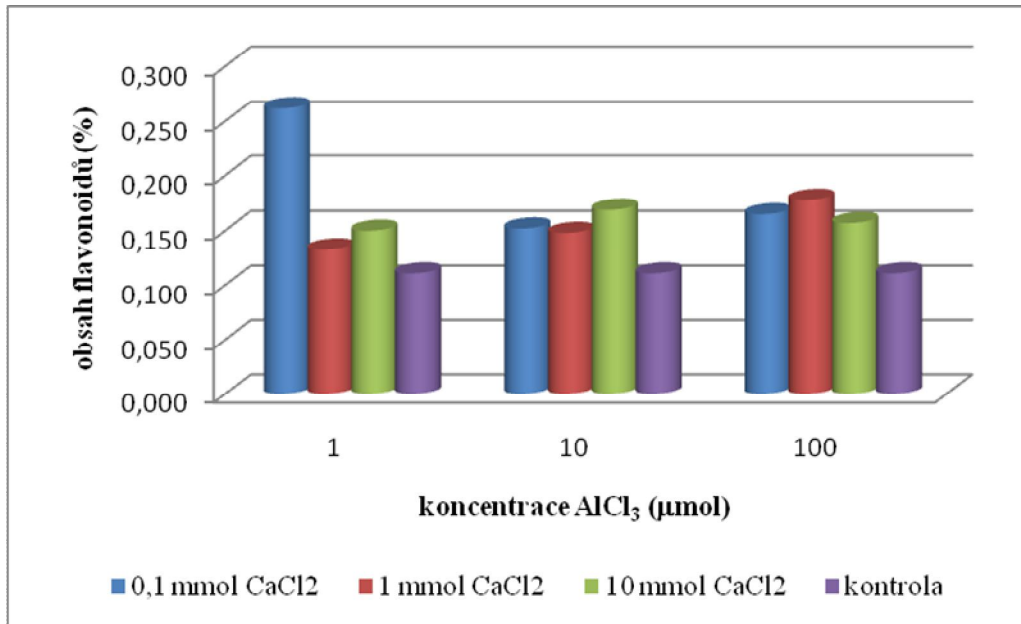
koncentrace elitorů		obsah isoflavonoidů (%)				
AlCl ₃ (μmol)	CaCl ₂ (mmol)	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A
1	0,1	0,09	0,04	0,02	0,07	-
1	1	0,09	0,03	0,03	0,07	-
1	10	0,09	0,03	0,03	0,07	-
10	0,1	0,11	0,03	0,03	0,06	-
10	1	0,14	0,03	0,03	0,07	-
10	10	0,13	0,03	0,03	0,07	0,01
100	0,1	0,09	0,03	0,03	0,06	-
100	1	0,11	0,02	0,03	0,07	-
100	10	0,08	0,02	0,03	0,07	-

Tabulka 9 **Produkce isoflavonoidů u nově odvozené suspenzní kultury**
***Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým a verapamilem**

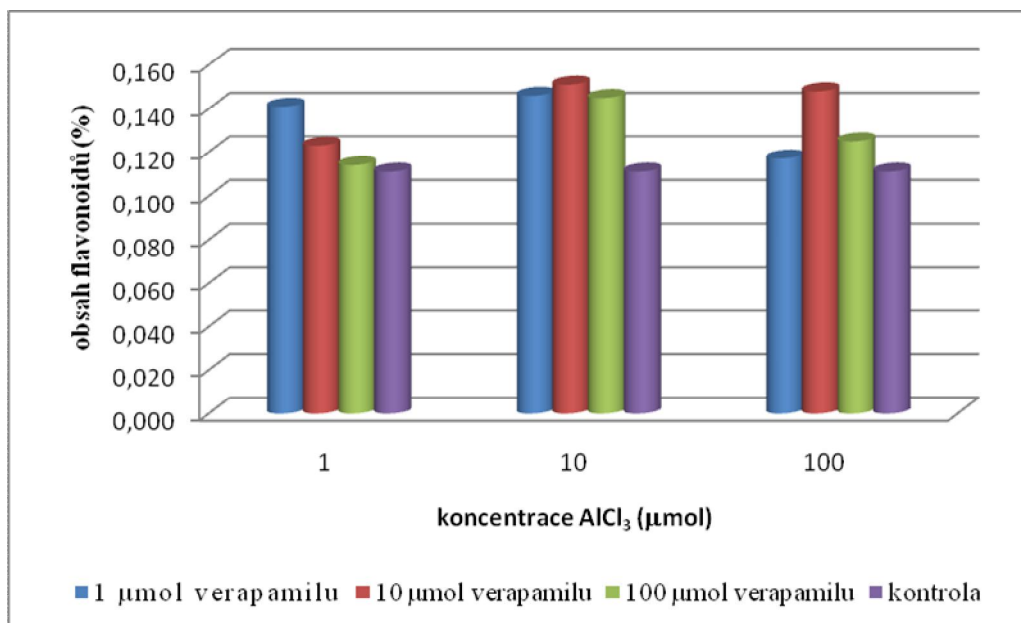
koncentrace elicitorů		obsah isoflavonoidů (%)				
AlCl ₃ (μmol)	verapamil (μmol)	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A
1	1	0,08	0,03	0,02	0,06	-
1	10	0,07	0,02	0,02	0,05	-
1	100	0,07	0,02	0,02	0,05	-
10	1	0,08	0,03	0,02	0,06	-
10	10	0,07	0,02	0,02	0,05	-
10	100	0,07	0,02	0,01	0,05	-
100	1	0,08	0,02	0,02	0,06	-
100	10	0,07	0,01	0,02	0,05	-
100	100	0,05	0,01	0,01	0,05	-

5.2 Grafy

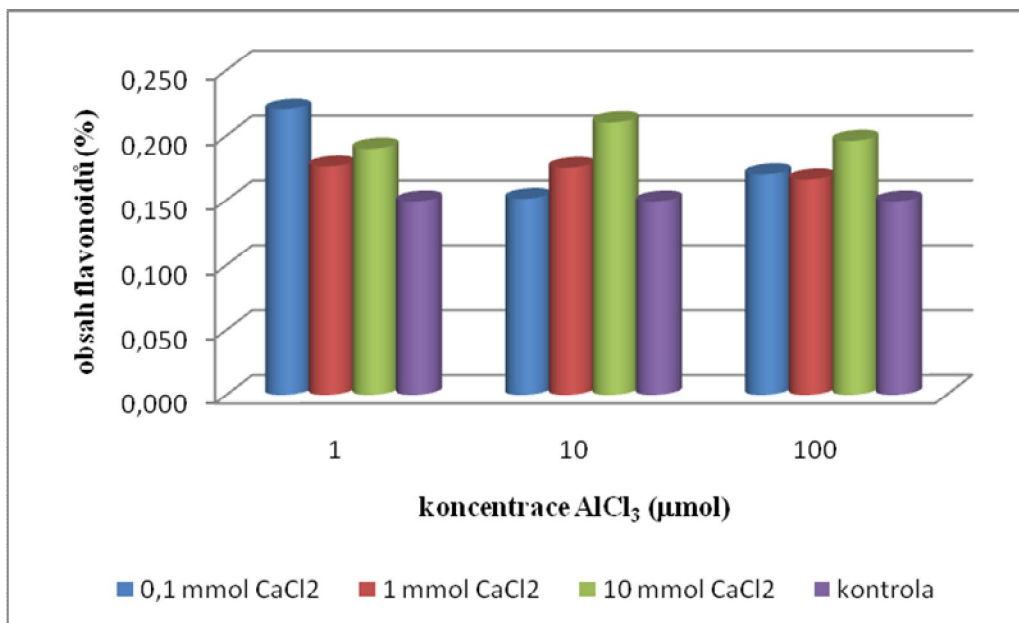
Graf 1 **Produkce flavonoidů u 4-leté suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hliníovým a chloridem vápenatým**



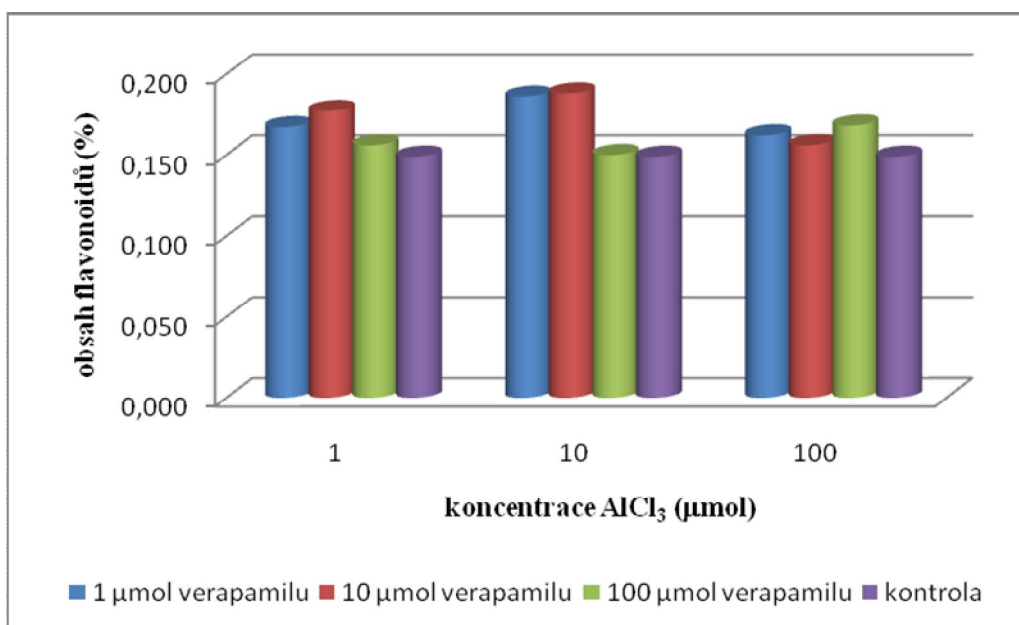
Graf 2 **Produkce flavonoidů u 4-leté suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hliníovým a verapamilem**



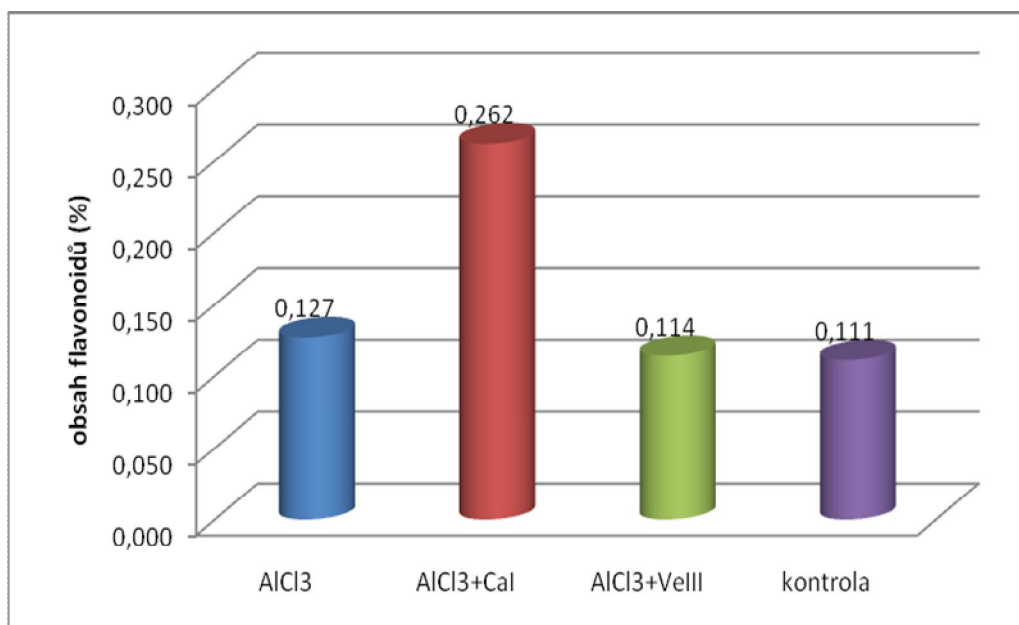
Graf 3 Produkce flavonoidů u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým a chloridem vápenatým



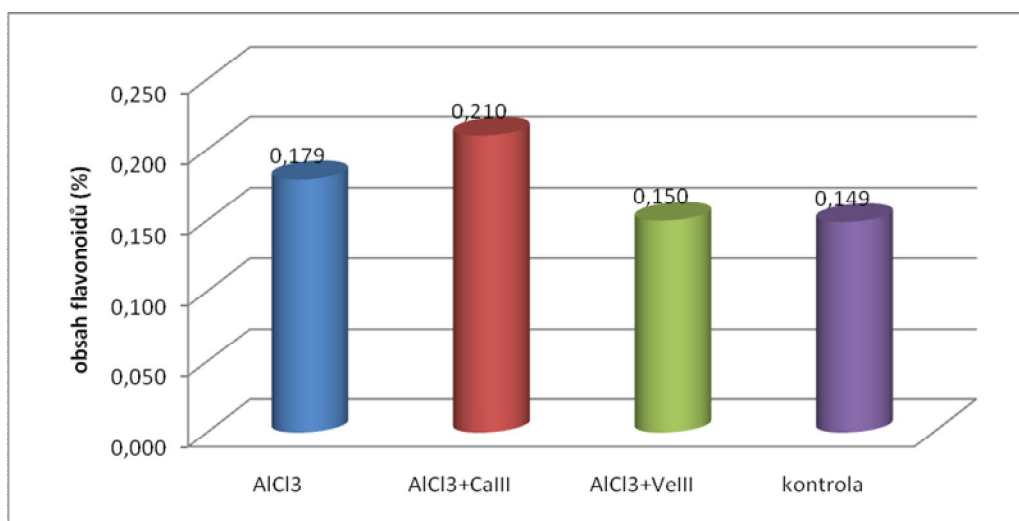
Graf 4 Produkce flavonoidů u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým a verapamilem



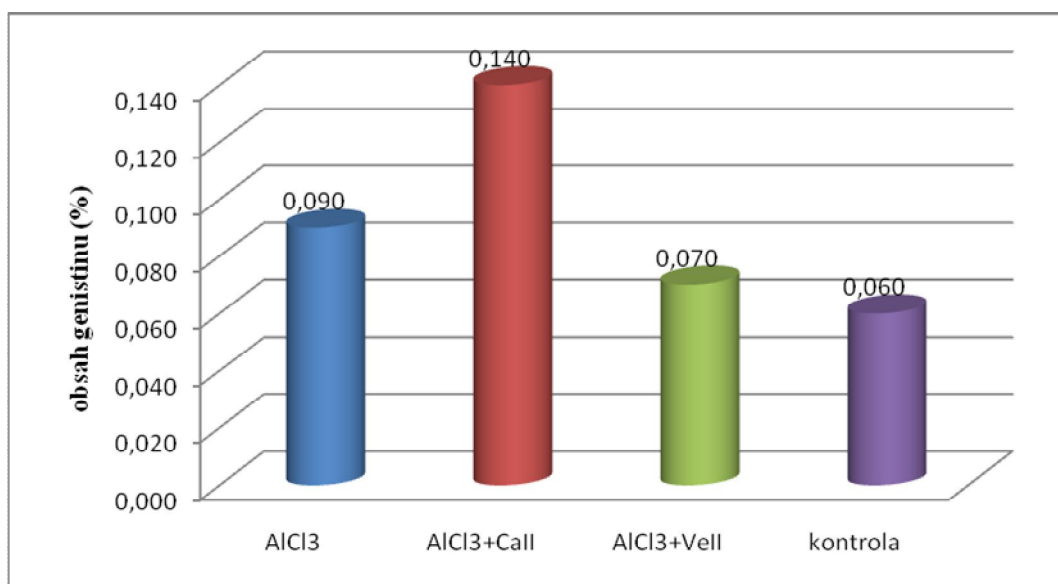
Graf 5 Porovnání produkce flavonoidů u 4-leté suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým (1 μmol), kombinací chloridu hlinitého (1 μmol) a chloridu vápenatého (0,1 mmol) a kombinací chloridu hlinitého (1 μmol) a verapamilu (100 μmol)



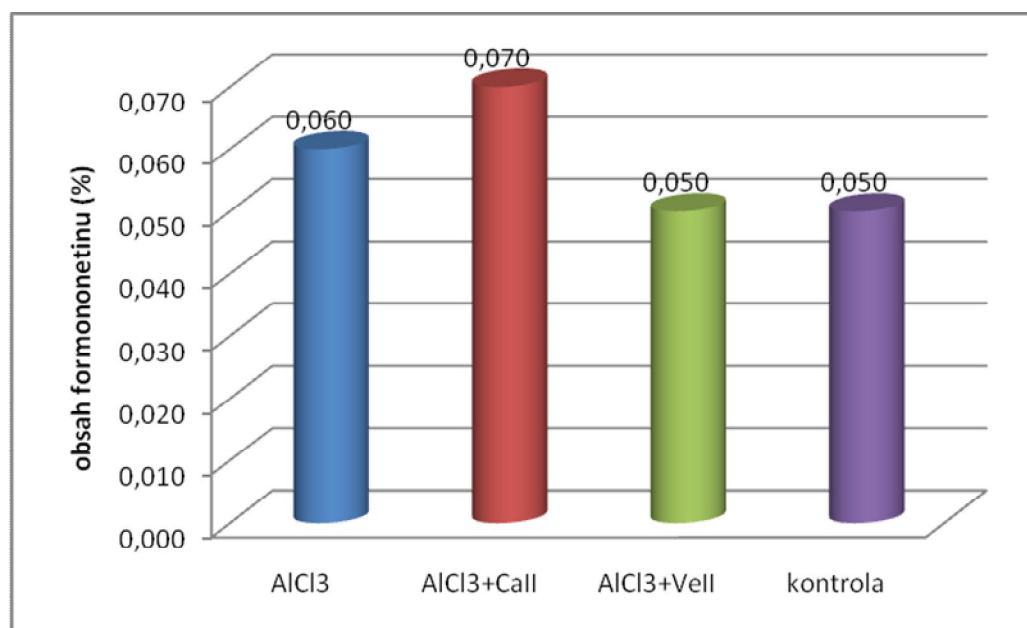
Graf 6 Porovnání produkce flavonoidů u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým (10 μmol), kombinací chloridu hlinitého (10 μmol) a chloridu vápenatého (10 mmol) a kombinací chloridu hlinitého (10 μmol) a verapamilu (100 μmol)



Graf 7 Porovnání produkce genistinu u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým (10 μ mol), kombinací chloridu hlinitého (10 μ mol) a chloridu vápenatého (1 mmol) a kombinací chloridu hlinitého (10 μ mol) a verapamilu (10 μ mol)



Graf 8 Porovnání produkce formononetinu u nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým (10 μ mol), kombinací chloridu hlinitého (10 μ mol) a chloridu vápenatého (1 mmol) a kombinací chloridu hlinitého (10 μ mol) a verapamilu (10 μ mol)



6 Diskuse

Vzhledem k stále zvyšujícímu se zájmu lidské populace o potravní doplňky, stoupá také význam fytofarmak. Jedná se především o rostlinné drogy a rostlinné extrakty obsahující účinné látky, které jsou vhodným doplňkem léčby u řady onemocnění. Nejvýznamnější obsahové látky jetele lučního (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) – flavonoidy a isoflavonoidy - působí v organismu také mnoha způsoby, např. vykazují protizánětlivou, antialergickou a estrogenní aktivitu, mají antitrombotické nebo vasoprotektivní účinky.

Stále významnější se stává i biotechnologická kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Tuto kultivaci lze využít pro množení, šlechtění a ozdravování rostlin, perspektivně je možné explantátové kultury využít i jako zdroje důležitých rostlinných metabolitů pro farmacii, potravinářství, kosmetiku a zemědělství. Ekonomické parametry takto získaných produktů jsou však obvykle horší než u látek získaných z intaktních rostlin a to v souvislosti se snížením nebo zablokováním enzymové aktivity a metabolismu. Proto jsou hledány nové techniky, kterými by bylo možné produkci a akumulaci sekundárních metabolitů v těchto kulturách zvýšit. Jednou z možností je metoda elicitace (63,68).

Elicitace je založena na signálem (elicitorem) 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, ke kterým patří především vápenaté ionty. Po objevení kalmodulinu a dalších bílkovin vážících Ca^{2+} ionty je vápník považován za významného posla při přenosu signálů v rostlinách. Základním předpokladem úspěšné elicitace je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby jeho působení na rostlinnou kulturu *in vitro*.

Cílem této práce bylo ověřit vliv chloridu vápenatého (jako extracelulárního zdroje vápenatých iontů) a verapamilu (naopak jako blokátoru vápníkového kanálu ze skupiny fenylalkylaminů) na průběh abiotické elicitace chloridem hlinitým.

Byl zjišťován vliv tří koncentrací chloridu hlinitého (1 μmol , 10 μmol , 100 μmol) v kombinaci s chloridem vápenatým (0,1 mmol, 1 mmol, 10 mmol) a verapamilem (1 μmol , 10 μmol , 100 μmol) na produkci flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. Všechny uvedené koncentrace přidávaných látek byly zvoleny na základě předcházejících pokusů (45,57,69,70,71).

Sledovaná 24hodinová doba působení elicitoru vycházela z poznatků již provedených pokusů (46), kde byla jako nejučinnější vyhodnocena právě 24hodinová aplikace chloridu hlinitého. Kontrolní kultury byly odebírány také po 24 hodinách. Elicitace suspenzní kultury byla prováděna v 21. dni kultivace, který byl dříve zjištěn jako optimální (5). U všech vzorků bylo provedeno fotometrické stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2009 (po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé) a stanovení isoflavonoidů HPLC s fluorimetrickou detekcí.

Z pokusů u 4-leté suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. je zřejmé, že po 24hodinové aplikaci samotného chloridu hlinitého (tab 1) se produkce flavonoidů s rostoucí koncentrací elicitoru zvyšovala. Nejvyšší obsah flavonoidů (0,151 %) vyvolala nejsilnější koncentrace 100 μmol . V porovnání s kontrolní kulturou došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů o 36%.

Stimulace sledované elicítace přidáním extracelulárních vápenatých iontů se projevila u všech sledovaných koncentrací chloridu vápenatého (tab 2, graf 1). Maximální produkce flavonoidů (0,262 %) byla zjištěna u koncentrace chloridu hlinitého 1 μmol po přidání nejslabší koncentrace chloridu vápenatého (0,1 mmol), kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce oproti kontrolní kultuře o 136 % a oproti elicítované kultuře o 106 %. Tedy u nejslabší koncentrace elicitoru, která samotná měla nejmenší elicitační účinek.

Aplikace verapamilu (tab 3, graf 2) jako blokátoru vápníkových kanálů způsobila snížení produkce pouze v porovnání s elicítovanou kulturou. Nejnižší obsah flavonoidů (0,114 %) a tedy snížení produkce o 10 % bylo zjištěno po přidání nejslabší koncentrace elicitoru (1 μmol) a nejsilnější koncentrace verapamilu (100 μmol).

Z výsledků elicitace nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. samotným chloridem hlinitým (tab. 4) je zřejmé, že u všech sledovaných koncentrací bylo dosaženo pozitivního elicitálního účinku. Nejvyšší obsah flavonoidů (0,179 %) vyvolala koncentrace 10 μmol , což představuje v porovnání s kontrolou zvýšení produkce o 20 %.

Následující stimulace elicitace extracelulárními vápenatými ionty se projevila stejně jako u 4-leté kultury v kombinaci se všemi sledovanými koncentracemi chloridu vápenatého (tab 5, graf 3). Maximální produkci flavonoidů (0,220 %) vyvolala opět jako u 4-leté kultury kombinace nejslabší koncentrace chloridu hlinitého (1 μmol) a nejslabší koncentrace chloridu vápenatého (0,1 mmol). Šlo o statisticky významné zvýšení produkce oproti kontrolní kultuře o 48 % a oproti elicitované kultuře o 24 %.

Aplikace verapamilu (tab 6, graf 4) způsobila snížení produkce pouze v porovnání s elicitovanou kulturou. Nejnižší obsah flavonoidů (0,150 %) a tedy snížení produkce o 16 % bylo zjištěno po přidání koncentrace elicitoru 10 μmol a nejsilnější koncentrace verapamilu 100 μmol , tedy stejně jako u 4-leté kultury.

U nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. elicitované po 24 hodin samotným chloridem hlinitým nebo v kombinaci s vápenatými ionty a verapamilem byla metodou HPLC sledována také produkce isoflavonoidů. U kontrolní kultury byly zjištěny isoflavonoidy genistein, genistin, daidzein a formononetin, jejichž obsah (s výjimkou genisteinu) nejvíce zvýšila aplikace nejslabší koncentrace chloridu hlinitého (1 μmol) a to o 50 %, 50 % a 40 % v porovnání s kontrolou (tab 7).

Působení kombinace chloridu hlinitého a chloridu vápenatého zvýšilo produkci všech sledovaných isoflavonoidů (tab 8). Největší elicitální účinek na produkci genistinu (0,14 %) měla koncentrace elicitoru 10 μmol a chloridu vápenatého 1 mmol (graf 7). V porovnání s kontrolní kulturou došlo ke zvýšení produkce o 133 % a oproti elicitované kultuře o 56 %. U biochaninu A došlo dokonce k indukci jeho produkce (v kontrolní ani elicitované kultuře zjištěn nebyl) a to při aplikaci koncentrace chloridu hlinitého 10 μmol a chloridu vápenatého 10 mmol.

Ovlivnění produkce isoflavonoidů verapamilem se nejvíce projevilo opět u jeho nejsilnější koncentrace. Největší snížení produkce bylo zjištěno po přidání nejsilnější koncentrace elicitoru i verapamilu (100 μmol). U genistinu došlo ke snížení oproti kontrolní kultuře o 20 % a oproti elicítované kultuře o 60 %. Snížení produkce genisteinu i daidzeinu bylo o 100 % oproti kontrolní i elicítované kultuře. U formononetinu bylo snížení produkce zjištěno pouze oproti elicítované kultuře a to o 20%.

Porovnáme-li výsledky elicítace chloridem hlinitým u obou sledovaných suspenzních kultur *Trifolium pratense* L. lze konstatovat, že 4-letá suspenzní kultura reagovala na elicítaci samotným chloridem hlinitým i v kombinaci s vápenatými ionty větším zvýšením produkce než nově odvozená kultura, což je pravděpodobně způsobeno vyšší produkcí její kontrolní kultury. Tím se potvrdilo, že elicítace má pozitivní vliv především na ty kultury, u nichž jsou výchozí hladiny sekundárních látek nízké. Maximální produkci flavonoidů (0,262 % a 0,220 %) vyvolalo u obou sledovaných kultur přidání nejslabších koncentrací chloridu hlinitého (1 μmol) a vápenatých iontů (0,01 mmol). To lze vysvětlit tím, že v rostlinných buňkách se hlinité ionty chovají v závislosti na jejich koncentraci buď jako induktory nebo jako inhibitory influxu Ca^{2+} iontů, které mají mimořádnou roli v předávání signálů v průběhu elicítace. Vyšší koncentrace Al^{3+} iontů mohou potlačovat produkci blokováním Ca^{2+} kanálů (18,19).

Stimulace elicítace závisí také na optimální koncentraci přidávaných extracelulárních Ca^{2+} iontů, což se prokázalo např. při produkci ajmalicinu v methyljasmonátem indukovaných kulturách *Catharanthus roseus*, kdy po přidání nízké koncentrace extracelulárního vápníku (3 mmol) byla produkce nejvyšší (57). Významnou roli může hrát i to, že vápenaté a hlinité ionty mezi sebou kompetují a hliník se v roli stresového činitele tolik neuplatní. Přidání vápenatých iontů může také snížit toxicitu hlinitých iontů a tím i jejich elicitační účinek. Dalším vysvětlením by mohl být i fakt, že hliník negativně ovlivňuje vazbu vápníku na kalmodulin, což vede k jeho konformačním změnám. Tyto změny pak inhibují aktivitu různých enzymů (39,43,44).

Přidáním verapamilu jako blokátoru vápníkových kanálů došlo k ovlivnění elicítace. Snížení produkce sledovaných metabolitů u obou kultur způsobila pouze aplikace nejsilnější koncentrace verapamilu (100 μmol). V grafech 5-8 jsou uvedeny příklady porovnání produkce všech kombinací aplikované elicítace u obou sledovaných suspenzních kultur *Trifolium pratense*.

Význam chloridu hlinitého, vápenatých iontů a verapamilu při elicítaci lze na základě literárních zdrojů dokumentovat také na následujících příkladech.

Působením chloridu hlinitého bylo pozorováno u suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. zvýšení produkce kumarinů (14). Elicítace AlCl_3 stimulovala také produkci flavonoidů v kultuře *Ononis arvensis* (16) nebo produkci fytoalexinů v kultuře *Cassia obtusifolia* (17). Pozitivní ovlivnění produkce antracenových derivátů po aplikaci vápenatých iontů a chloridu olovnatého bylo sledováno u kalusové a suspenzní kultury *Rheum palmatum* L. (12). U *Arabidopsis thaliana* byl zjišťován vliv rozdílných koncentrací hlinitých iontů jako induktorů nebo inhibitorů vápníkových kanálů (18). Jiným příkladem může být aplikace AlCl_3 , LaCl_3 a GdCl_3 na buňky *Nicotiana tabacum* L., které spouští tvorbu superoxidu (O_2^-) a tím stimulují vtok Ca^{2+} iontů do buňky (19).

Příkladem úspěšné abiotické elicítace může být také elicítace explantátové kultury *Rheum palmatum* L. hlinitými ionty, kdy po 6hodinové aplikaci 100 μmol koncentrace chloridu hlinitého bylo zjištěno maximální 60% zvýšení produkce antracenových derivátů oproti kontrole (69). Pozitivní vliv hlinitých a kademnatých iontů na produkci sekundárních metabolitů byl zjištěn také u explantátové kultury *Ononis arvensis* L., kde byla stimulována akumulace flavonoidů (67,72).

V kalusové kultuře *Daucus carota* byl studován také vliv houbového elicitoru a modulátorů vápníkového kanálu na produkci anthocyaninu. Přidání elicitoru mělo za následek vyšší akumulaci anthocyaninu v třetím dni kultivačního cyklu. Kalciový ionofor A23187 způsobil zvýšení produkce anthocyaninu, zatímco blokátory vápníkového kanálu, verapamil a chlorpromazin, snížily produkci anthocyaninu (28).

Aplikace kalciového ionoforu A23187 zvýšila 1,43x celkovou produkci kapsaicinu také v buněčné suspenzní kultuře *Capsicum frutescens*, zatímco naopak verapamil a chlorpromazin jeho tvorbu snížily (29).

Přidání elicitoru odvozeného z plísně *Penicillium expansum* (PE-elicitor) nebo kalciového ionoforu A23187 k buněčné suspenzní kultuře *Sanguinaria canadensis* indukovalo tvorbu benzofenanthridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu. Aplikace EGTA nebo verapamilu před přidáním PE-elicitoru snížila akumulaci obou alkaloidů (39).

Elicitace buněčné suspenzní kultury *Allium cepa* L. biotickým elicitorem odvozeným z plísně *Botrytis cinerea* měla za následek syntézu fytoalexinu. Přidání EGTA a verapamilu anulovalo elicitorem zprostředkovanou syntézu fytoalexinu, zatímco přidání Ca^{2+} ionoforu A23187 zvýšilo akumulaci fytoalexinů v nepřítomnosti elicitoru (66).

Z uvedených studií a provedených pokusů vyplývá, že chlorid hlinitý patří k signálním látkám rostlinných obranných reakcí, které vedou ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů. Dále je zřejmé, že akumulaci fytoalexinů v explantátových kulturách podporuje přidání extracelulárních vápenatých iontů, zatímco blokátory vápníkového kanálu, např. verapamil, jejich produkci snižují.

7 Závěr

Zjištěné výsledky lze shrnout do následujících bodů:

a) 4-letá suspenzní kultura *Trifolium pratense* L.

Nejvyšší obsah flavonoidů (0,151 %) po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým vyvolala nejsilnější koncentrace 100 μmol . V porovnání s kontrolní kulturou došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce flavonoidů o 36%.

Stimulace elicitace extracelulárními vápenatými ionty se nejvíce projevila u nejslabší koncentrace chloridu hlinitého (1 μmol) po přidání chloridu vápenatého o koncentraci 0,1 mmol. Byla tak zjištěna nejvyšší produkce flavonoidů (0,262 %) a došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce oproti kontrolní kultuře o 136 % a oproti elicitované kultuře o 106 %.

Aplikace verapamilu (blokátoru vápníkových kanálů) způsobila snížení produkce pouze v porovnání s elicitovanou kulturou. Nejnižší obsah flavonoidů (0,114 %) a tedy snížení produkce o 10 % bylo zjištěno opět po přidání nejslabší koncentrace elicitoru (1 μmol) a nejsilnější koncentrace verapamilu (100 μmol).

b) nově odvozená suspenzní kultura *Trifolium pratense* L.

Nejvyšší obsah flavonoidů (0,179 %) po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým vyvolala koncentrace 10 μmol . V porovnání s kontrolní kulturou došlo ke zvýšení produkce flavonoidů o 20 %.

Stimulace elicitace extracelulárními vápenatými ionty se nejvíce projevila stejně jako u 4-leté kultury u nejslabší koncentrace chloridu hlinitého (1 μmol) po přidání chloridu vápenatého o koncentraci 0,1 mmol. Byla tak zjištěna nejvyšší produkce flavonoidů (0,220 %) a došlo k statisticky významnému zvýšení produkce oproti kontrolní kultuře o 48 % a oproti elicitované kultuře o 24 %.

Aplikace verapamilu (blokátoru vápníkových kanálů) způsobila snížení produkce také pouze v porovnání s elicitovanou kulturou. Nejnižší obsah flavonoidů (0,150 %) a tedy snížení produkce o 16 % bylo zjištěno po přidání střední koncentrace elicitoru (10 μmol) a nejsilnější koncentrace verapamilu (100 μmol).

U nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. byl sledován i obsah isoflavonoidů po 24hodinové elicitaci chloridem hlinitým a také v kombinaci s vápenatými ionty a verapamilem.

Metodou HPLC bylo zjištěno, že kultura *Trifolium pratense* L. obsahuje isoflavonoidy genistin, genistein, daidzein a formononetin. Nejlepší elicitální účinek měla nejslabší koncentrace chloridu hlinitého (1 μmol), neboť v porovnání s kontrolní kulturou byl obsah genistinu, daidzeinu a formononetinu zvýšen o 50 %, 50 % a 40 %.

Působením kombinace chloridu hlinitého a chloridu vápenatého došlo ke zvýšení produkce všech sledovaných isoflavonoidů. Maximální obsah byl zjištěn u genistinu (0,14 %) po aplikaci chloridu hlinitého (10 μmol) a chloridu vápenatého o koncentraci 1 mmol. V porovnání s kontrolní kulturou došlo ke zvýšení produkce o 133 %, v porovnání s elicitovanou kulturou o 56 %. V případě kombinace koncentrací chloridu hlinitého (10 μmol) a chloridu vápenatého 10 mmol došlo k produkci biochaninu A (0,01 %), která nebyla v kontrolní kultuře zaznamenána.

Ovlivnění produkce isoflavonoidů verapamilem se nejvíce projevilo u jeho nejsilnější koncentrace. Největší snížení produkce bylo zjištěno po přidání nejsilnější koncentrace elicitoru i verapamilu (100 μmol). U genistinu došlo ke snížení oproti kontrolní kultuře o 20 % a oproti elicitované kultuře o 60 %. Snížení produkce genisteinu i daidzeinu bylo o 100 % oproti kontrolní i elicitované kultuře. U formononetinu bylo snížení produkce zjištěno pouze oproti elicitované kultuře a to o 20%.

8 Seznam literatury

1. Kolektiv autorů: Český lékopis 2009, Grada, Praha 2009, s. 114, 1801
2. De Rijke, E. et al.: Anal. Chem Acta, 2002, 3, 468
3. Klemra, P., Klemrová, V.: Základy aplikované statistiky pro studující farmacie, Karolinum, Praha 1993, s. 30, 80
4. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojiman, K.: Exp. Cell Res., 1968, 50, 151
5. Kašparová, M. et al.: Čes. slov. Farm., 2006, 55, 44
6. Hubík, J. et al.: Obecná farmakognosie II, SPN, Praha 1989, s. 31-34
7. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1992, s. 84-97
8. Korbelář, J., Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha 1981, s. 178
9. Pilát, A., Ušák, O.: Atlas rostlin, SPN, Praha 1964, s. 108
10. Slavík, B. et al.: Květena České republiky, Academia, Praha 1995, s. 474-476
11. Tůmová, L., Blažková, R.: Čes. slov. Farm., 2002, 51, 44
12. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: Čes. slov. Farm., 2003, 52, 248
13. Tůmová, L. et al.: Čes. slov. Farm., 2006, 55, 186
14. Siatka, T., Kašparová, M.: Čes. slov. Farm., 2010, 59, 112
15. Kolektiv autorů: Remedia Compendium 3. vydání, Panax, Praha 1999, s. 51, 52
16. <http://www.isvav.cz>, 7. 4. 2011
17. Sharon, A., Gressel, J.: Pesticide Biochem. Physiol., 1991, 41, 142
18. Kawano, T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Com., 2004, 324, 40
19. Kawano, T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Com., 2003, 308, 35
20. <http://www.agromanual.cz/cz/atlas/plevele/plevel/jetel-lucni.html>, 7. 4. 2011
21. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/trifolium_pratense.html, 24. 4. 2011
22. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: Čes. slov. Farm., 2009, 58, 67
23. Theiss, P., Theiss, B.: Zdravější život s léčivými bylinami, Verlag, Mnichov 1992, s. 13-21
24. Dušek, J. et al.: Čes. slov. Farm., 1996, 45, 204
25. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie, 1989, 3, 188
26. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: Čes. slov. Farm., 2007, 56, 225

27. Lincová, D. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha 2002, s. 217,218
28. Sudha, G., Ravishankar, G. A.: Curr. Sci., 2003, 84, 775
29. Sudha, G., Ravishankar, G. A.: Curr. Sci., 2002, 83, 480
30. Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1995, s. 13-21, 50-95
31. Jahodář, L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1995, s. 33-45
32. Kincl, M., Causy, L.: Základy fyziologie rostlin, SPN, Praha 1977, s. 103-106
33. Richter, R., Hlušek, J.: Výživa a hnojení rostlin (I. obecná část), VŠZ, Brno 1994, s. 177
34. Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha 1998, s. 89-92, 108-116, 412, 424, 425
35. Rokem, J. S., Schwarzberg, J., Goldberg, I.: Plant Cell Rep., 1984, 159, 3
36. Cline, S. D., Coscia, E. J.: Plant Physiol., 1988, 161, 86
37. Kneer, R., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1997, 44, 69
38. Pelikánová, J.: Explantátová kultura *Trifolium pratense* L., Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2007
39. Mahady, G. B., Becker, Ch. W. W.: Phytochemistry, 1994, 37, 415
40. <http://faf.vfu.cz/>, 11. 10. 2007
41. Maltais, K., Houde, M.: Physiol. Plant., 2002, 115, 81
42. Horák, V., Dolejšková, J., Hejtmánková, A.: Rostl. výroba, 1995, 41, 239
43. Pineros, M., Tester, M.: J. Exp. Bot., 1997, 48, 551
44. Gelti, A., Higgins, V. J.: Plant. Physiol., 1997, 113, 269
45. Lee-Parsons, C. W. T., Ertürk, S., Tengtrakool, J.: Biotech. Lett., 2004, 26, 1595
46. Klabanová, L.: Suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. II, Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2010
47. Pastýrik, L. et al.: Fyziológia rastlín, SPN, Bratislava 1979, s. 138
48. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Hliník>, 24. 10. 2011
49. Holzbecher, Z. et al.: Analytická chemie, SNTL, Praha 1974, s. 370-374
50. Cotton, F. A., Wilkinson, G.: Anorganická chemie, Academia, Praha 1973, s. 427-446
51. Remy, H.: Anorganická chemie 1. díl, SNTL, Praha 1961 s. 354-371

52. <http://rostliny.prirodou.cz>, 18. 3. 2011
53. Lin, C. et al.: Biochem. Biophys. Res. Com., 2005, 332, 823
54. Vaněk, V. et al.: Výživa a hnojení polních plodin, ovoce a zeleniny, Farmář-Zemědělské listy, Praha 1998, s. 124
55. <http://www.rozhlas.cz/rostliny/motylokvete/zprava/505360>, 22. 11. 2011
56. Zdražilová, L.: Produkce sekundárních metabolitů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L., Rigorózní práce, Faf UK, Hradec Králové 2010
57. Lee-Parsons, C. W. T, Ertürk, S.: Plant Cell Rep., 2005, 24, 677
58. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K69.php>, 18. 3. 2011
59. Kresánek, J., Krejča, J.: Atlas léčivých rostlin a lesných plodov, Osveta, Martin 1982, s. 192 - 193
60. Gran, J., Jung, R., Munker, B.: Bobulovité užitkové a léčivé rostliny, Ikar, Praha 1996, s. 102
61. Zand, R. S. R., Jenkins, D. J. A., Diamandis, E. P.: Clin. Chim. Acta, 2001, 213, 312
62. <http://edukafarm.cz/clanek.php?id=583>, 21. 10. 2011
63. Pence, V. C.: Vitro Cell. Develop. Biol. Plant, 2011, 47, 176
64. Adlelercreutz, H., Mazur, W.: Ann. Med., 1997, 95, 29
65. Kaufman, P. B. et al.: J. Altern. Complem. Med, 1997, 7, 3
66. Dmitriev, A., Djatsok, J., Grodzinsky, D.: Plant Cell Rep., 1996, 15, 945
67. Tůmová, L., Poustková, J., Tůma, J.: Acta Pharm., 2001, 51, 159
68. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E.: Plant Sci., 2001, 161, 839
69. Kašparová, M., Siatka, T.: Čes. slov. Farm., 2004, 53, 252
70. Zhou, Z. S. et al.: J. Inorg. Biochem., 2007, 101, 1
71. Kartosentono, S. et al.: Biotechnol. Lett., 2002, 24, 687
72. Tůmová, L., Blažková, R.: Čes. slov. Farm., 2002, 51, 44

9 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Kandidát: Mgr. Jitka Vaňková

Školitel: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Abiotická elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L.

Byl sledován vliv 24hodinové aplikace samotného elicitoru chloridu hlinitého (1 μmol , 10 μmol , 100 μmol) a v kombinaci s chloridem vápenatým (0,1 mmol, 1 mmol, 10 mmol) a verapamilem (1 μmol , 10 μmol , 100 μmol) na produkci flavonoidů a isoflavonoidů u 4-leté a nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. Kultury byly kultivovány na médiu dle Gamborga s přídáním kyselinou 2,4-dichlorfenoxyoctovou (2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) s 6-benzylaminopurinem (2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), při teplotě 25°C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma.

Maximální produkci flavonoidů (0,262 % a 0,220 %) vyvolalo u obou sledovaných kultur přidání nejslabších koncentrací chloridu hlinitého (1 μmol) a vápenatých iontů (0,01 mmol). Následné ovlivnění elicitace přidáním verapamilu jako blokátoru vápníkových kanálů se prokázalo snížením produkce sledovaných metabolitů u obou kultur pouze po aplikaci nejsilnější koncentrace 100 μmol .

U nově odvozené suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. byla sledována také produkce isoflavonoidů. Největší elicitací účinek na produkci genistinu (0,14 %) měla koncentrace elicitoru 10 μmol a chloridu vápenatého 1 mmol.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Mgr. Jitka Vaňková

Supervisor: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Title of Rigorous Thesis:

Abiotic elicitation of suspension culture of *Trifolium pratense* L.

We investigated the effect of a 24-hour application of aluminum chloride elicitor alone (1 μmol , 10 μmol , 100 μmol) and in combination with calcium chloride (0,1 mmol, 1 mmol, 10 mmol) and verapamil (1 μmol , 10 μmol , 100 μmol) on the production of flavonoids and isoflavonoids in 4-year-old and newly derived suspension cultures of *Trifolium pratense* L. Cultures were cultivated on a medium according to Gamborg added 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) with 6-benzylaminopurine (2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) at 25 ° C and a light period of 16 hours light / 8 hours dark.

The maximal production of flavonoids (0.262% and 0.220%) resulted in two observed groups of cultures add the weakest concentration of aluminum chloride (1 μmol) and calcium ions (0.01 mmol). Subsequent addition of elicitation effect of verapamil as a calcium channel blocker has been demonstrated by reducing the production of metabolites observed in both cultures only after the strongest concentration of 100 μmol .

The newly derived suspension cultures of *Trifolium pratense* L. was also tracked production of isoflavonoids. The greatest effect of elicitation on the production genistin (0.14%) had a concentration 10 μmol of elicitor and 1 mmol of calcium chloride.