

UNIVERZITA KARLOVA
V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

Kateřina Veškrňová

Abiotická elicítace explantátové kultury *Trifolium pratense* L.

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

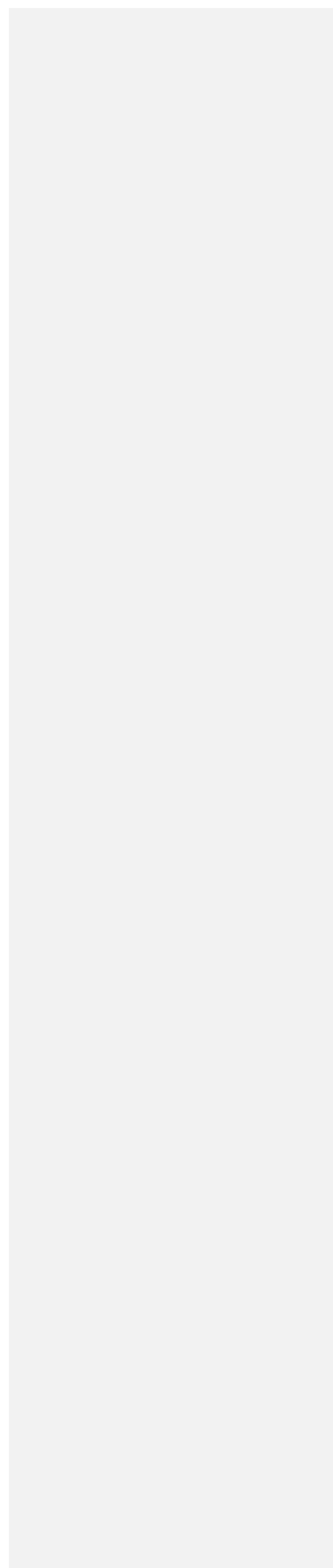
Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Oponent:

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

|

-



Úvodem mé diplomové práce bych chtěla poděkovat PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	3
3. TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1 Jetel Luční	4
3.1.1 Botanický popis	4
3.1.2 Charakteristika drogy	6
3.1.3 Obsahové látky	6
3.1.4 Biologické účinky a použití drogy	9
3.2 Rostlinné explantáty	11
3.2.1 Charakteristika	11
3.2.2 Odvození a udržování kultury	12
3.2.3 Kultivační podmínky	13
3.3 Elicitace	15
3.3.1 Obranné mechanismy rostlin	15
3.3.2 Elicitace	18
3.3.3 Mechanismus účinku elicitoru	18
3.4 Měď	22
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1 Přístroje a pomůcky	25
4.2 Chemikálie	25
4.3 Rostlinný materiál	26
4.4 Stanovní ztráty sušením	27
4.5 Kultivace explantátové kultury	27
4.5.1 Kultivační nádoby a nástroje, podmínky pasážování	27
4.5.2 Příprava živného média	28
4.6 Elicitace	30

4.6.1	Příprava roztoku elicitoru	30
4.6.2	Elicitace a odběr kultur	30
4.7	Stanovení obsahu flavonoidů	31
4.7.1	Princip stanovení	31
4.7.2	Postup stanovení	31
4.8	Stanovení obsahu isoflavonoidů	33
4.9	Statistické zpracování výsledků	34
5.	VÝSLEDKY	36
5.1	Tabulky	36
5.2	Grafy	39
6.	DISKUSE	41
7.	ZÁVĚR	43
8.	SEZNAM LITERATURY	44

1. ÚVOD

Historie využívání rostlin sahá hluboko do lidských dějin. Člověk je všežravec a rostlinná strava byla důležitou součástí jeho jídelníčku. Již v té době se musel naučit znát a rozlišovat rostliny, které jsou jedovaté a které naopak zdrojem obživy. Aniž to tenkrát dokázal pojmenovat, poznal, že každá rostlina má trochu jiné složení. Postupně se zkušeností naučil rozlišovat rostliny, které mu pomohly v případě nemoci. Jak vědomosti o rostlinách rostly, bylo třeba je zaznamenávat, a tak začaly vznikat první herbáře. K léčbě byly užívány rostliny jako takové, ale daleko častěji upravené ve formě extraktů či čajů. Léčivé rostliny a účinné látky v nich zastoupené zaujaly nezastupitelné místo v terapii a prevenci chorob.

S rozvojem vědy a techniky bylo možno rostliny blíže zkoumat a zjišťovat, která jejich část je za účinek rostliny zodpovědná a tyto látky syntetizovat. Kvůli značné ekonomické náročnosti a rostoucím nárokům na drogy je potřeba najít jiný způsob získávání terapeuticky účinných látek. Mnohé z nich jsou léčiva s velkým terapeutickým účinkem, a proto se komplexně zkoumají z farmakodynamického, chemického i botanického hlediska. Vypracovávají se stále modernější a dokonalejší způsoby izolace a identifikace jednotlivých přírodních sloučenin a zkoumají se možnosti jejich terapeutického využití. Přírodní látky s terapeutickým účinkem jsou současně modely pro syntézu těchto látek a jejich analogů.

Většina světové produkce léčivých rostlin pochází z pěstitelských ploch, menšina z volně rostoucích porostů. Sběr léčivých rostlin ve volné přírodě dnes už nestačí krýt jejich spotřebu. Zákon na ochranu přírody v mnoha oblastech sběr omezuje nebo úplně znemožňuje a kvůli mechanizaci a chemizaci polnohospodářství rychle ubývají lokality léčivých rostlin v přírodě. Na sběr z volné přírody jsme však odkázáni tehdy, kdy se určitým druhům rostlin v kulturách nedaří a jejich pěstování je nerentabilní.

Pěstování léčivých rostlin se zaměřuje na kulturní odrůdy, které plně vyhovují jak po stránce výnosu, tak po stránce složení a obsahu účinných látek. Rajonizace pěstování umožňuje výběr klimaticky nejvhodnějších pěstitelských ploch pro jednotlivé druhy a to zaručuje jistotu výnosu. Pěstováním se snižuje nebezpečí záměn a falšování. Správný sběr a posběrové úpravy pěstovaných druhů zabezpečuje žádanou kvalitu drog. Nedostatkem kultur léčivých rostlin je však výskyt škůdců, proti kterým se zasahuje

užitím pesticidů, které mohou nepříznivě ovlivnit biosyntézu sekundárních metabolitů i znehodnotit rostlinnou drogu rezidui, navíc je produkce účinných látek závislá na klimatických podmínkách.

Obsahové látky mají značnou variabilitu. Jedním ze způsobů zvýšení obsahových látek v rostlině je šlechtění. Základními metodami šlechtění je selekce, křížení, mutační šlechtění, nebo šlechtění pomocí rostlinných explantátů. Právě explantátové kultury se jeví jako velmi výhodný alternativní způsob zajištění přírodních účinných látek. Tato biotechnologická metoda může být použita na získání látek z kterékoliv rostliny. Kultivace probíhá bez závislosti na ročním období a produkovaná biomasa je vysoce sterilní a homogenní. Explantátové kultury se získávají z parenchymatických pletiv různých částí rostlin. Odvodí se z nich kalusové explantáty prezentované nediferencovanou hmotou buněk rostoucích na polotuhém mediu a z nich potom explantáty suspenzní, které rostou v tekutých půdách.

Buňky rostlinných explantátů nejsou funkčně diferencované a obsahují veškerý genetický materiál přítomný v buňce intaktní rostliny. Nediferencované buňky obsahují i genetické informace podmiňující tvorbu sekundárních metabolitů a je jich tedy možno využívat na produkci léčivých látek.

Zvýšení produkce je možné použitím vhodného elicitoru. Elicitace je metoda využívající obranných mechanismů rostlin ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinách i v kulturách *in vitro*. Elicitor působí v rostlinách jako induktor exprese genů obranných proteinů.

Díky stoupajícímu zájmu o využití flavonoidů a iso flavonoidů, kvůli jejich bohatému spektru využití biologických účinků, stoupá i jejich spotřeba, proto se snažíme přijít na nejefektivnější získávání těchto látek z rostlin. Nadějnou možností se jeví právě ovlivňování produkce těchto sekundárních metabolitů u explantátových kultur biotickou a abiotickou elicitací.

Vhodný zdroj flavonoidů a iso flavonoidů představuje jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*).⁽¹⁾

2. CÍL PRÁCE

1. Seznámení s metodikou kultivace a elicitace kalusové a suspenzní kultury *Trifolium pratense* L.
2. Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů u explantátových kultur různými koncentracemi abiotického elicitoru síranu měďnatého v závislosti na době jeho působení

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Jetel luční (*Trifolium pratense* L.)

3.1.1 Botanický popis

Jetel luční je vytrvalá 10 až 100 cm vysoká bylina (pěstované kultivary jsou pouze dvouleté) vyrůstající z trsnatého oddenku z čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Lodyhy jsou četné, přímé, vystoupavé až poléhavé, jednoduché nebo málo větvené, bělavě chlupaté a často načervenalé. Všechny listy jsou trojčetné, dolní tvoří přizemní růžici a jsou dlouze řapíkaté, prostřední a horní krátce řapíkaté až přisedlé. Jednotlivé úkrojky jsou podlouhle kopinaté až takřka okrouhlé, celokrajné s bělavou nebo červenohnědou skvrnou ve tvaru půlměsíce. Květenství vytváří kulovité květní hlávky mající 2 až 4 cm v průměru a obsahující 30 - 60 jednotlivých květů. Květní hlávky jsou podepřené velkými palisty podpůrných listů. Jednotlivé květy jsou 16 až 20 mm dlouhé, přisedlé, bez listenů, červené, karmínové, vzácně bílé. Kveté v květnu až říjnu. Plodem je vejčitý, tenké blanitý, jednosemenný lusk.

Jetel luční ve volné přírodě roste na loukách a pastvinách na čerstvých, vlhčích a na živiny bohatých půdách.

Původní areál rozšíření zahrnoval Evropu a západní Asii po Altaj a Severní Indii. Pěstováním však zdomácněl takřka po celém světě. V ČR na celém území hojný, od nížin až do horských oblastí.(3)

Rodové jméno jetele - *Trifolium* odvozuje se z latinského *tres* = tři + *folium* = list, tj. trojlístek a druhové *pratense* = rostoucí na louce.(4)



Jetel luční (*Trifolium pratense* L.)

3.1.2 Charakteristika drogy

Drogu tvoří květní hlávky, z kterých je při sběru nutno odstranit podpůrné listy. Květy se sbírají v květnu až srpnu, na začátku kvetení, kdy jsou červené, nebo světle karmínové hlávky ještě nerozpadlé. Úplně rozkvetlé, nebo odkvétající hlávky sušením rychle hnědnou a rozpadají se, podobně i při nešetrném sběru se takto znehodnocují zapařené květy. Droga se suší ihned a rychle v tenkých vrstvách, řídce rozložená na tmavém a vzdušném místě, nejlépe umělou teplotou do 35°C. Hnědé hlávky se vyřadí. Poměr seschnutí je asi 6:1.

Droga (*Trifolii pratensis flos*) se neuskładňuje, ale zpracovává, neboť rychle podléhá zkáze.(4)

3.1.3 Obsahové látky

Droga obsahuje glykosidy, třísloviny, flavonoidy, barviva, fenolické látky, organické kyseliny, pryskyřice, silice, tanin a flavonové substance pratol a pratensol. Z těchto obsahových látek patří k terapeuticky účinným látkám hlavně flavonoidy a isoflavonoidy.

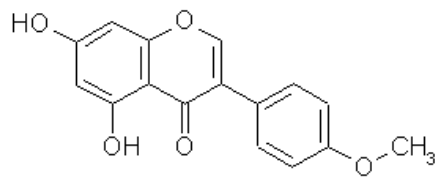
Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany), 4 (neoflavany). Vyskytují se pouze v rostlinné říši a to nejčastěji jako flavany, méně často jsou isoflavany. Neoflavany se vyskytují řídce a v terapii se nepoužívají. Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavany dělí do několika skupin: flaven, flavanon, flavanol, flavanonol, flavandiol, flavon, flavonol. Jednotlivé flavonoidy se od sebe liší počtem a polohou hydroxylových a metoxylových skupin a napojením cukru nebo organických kyselin.(5) Flavonoidy se obvykle vyskytují v rostlinách ve formě glykosidů, rozpuštěných v buněčné šťávě vakuol, spojených s cukernými substituenty, jako je např. galaktóza, rhamnóza nebo glukóza, nebo ve formě glukosidmalonátů. Rostliny mohou využít této konjugované formy k uchování méně rozpustných flavonoidů aglykonu. V okamžiku mikrobiální infekce jsou aglykony uvolněny z těchto prekurzorů hydrolýzou.(2) Metoxyderiváty, které jsou lipofilní, se vyskytují i v silicích.

Flavonoidy mohou být ve formě aglykonů i jako glykosidy. Mezi hlavní flavonoidní glykosidy patří rutin, hesperidin, kvercitrin a myricitrin.(5)

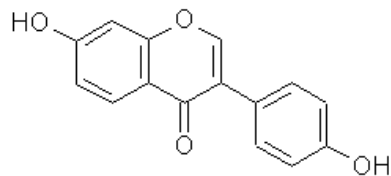
Dalšími látkami, kterými jsem se v práci zabývala, byly isoflavonoidy. Všechny isoflavonoidy jsou látky barevné, které jsou zodpovědné za barvu květů a plodů. Isoflavonoidy jsou strukturně velmi rozmanité a tvoří několik skupin, které se od sebe liší oxidací pyranového kruhu.

Mezi hlavní isoflavonoidy v *Trifolium pratense* L. patří:

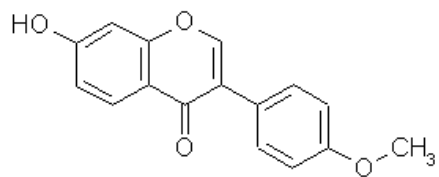
Biochanin A



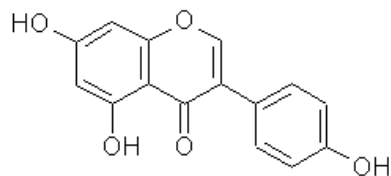
Daidzein



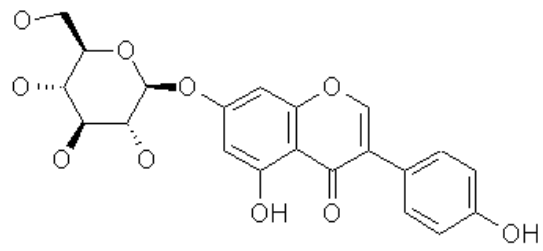
Formononetin



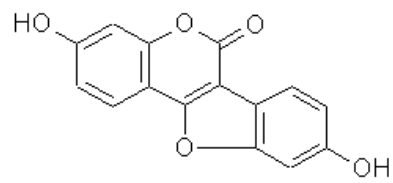
Genistein



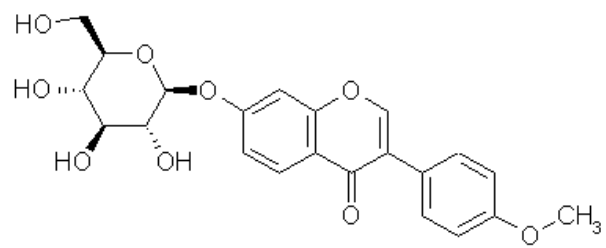
Genistin



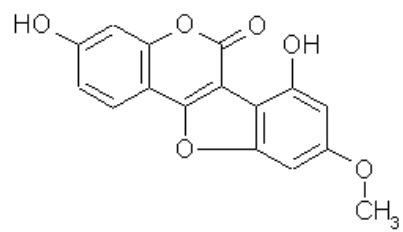
Kumestrol



Ononin



Trifolilol



3.1.4 Biologické účinky a použití drogy

Flavonoidy se nazývají též bioflavonoidy, nebo také vitamin P díky svým terapeuticky bohatým vlastnostem. V rostlině účinkují jako antioxidanty, neboť jsou schopny inhibovat tvorbu superoxidových anionů.(7)

V terapii flavonoidy vycházíme z jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemoragicky a antiedematozně. Jsou inhibitory hyaluronidázy a brání tak rozšiřování mikrobiálních toxinů tkáněmi a jsou proto podpornými prostředky při léčbě infekčních onemocnění. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S ionty Ca^{2+} tvoří komplexní soli, čím brání srážení krve. Zadržují v organismu vápník, potencují účinek vitaminu C a mají vlastnosti choleretické, cholagogní a spasmolytické.

Účinné jsou glykosidy a aglykony. Užívají se v izolovaném stavu, častěji však jako drogy nebo jejich extrakty. Z glykosidů *rutin* se využívá k léčbě hemoragií, hypertenze, alergií a jako adjuvans při infekcích. *Hesperidin* k léčbě lámavosti kapilár spolu s vitaminem C, hemoragiích a hypertenzi.(5)

V poslední době se věnuje stále větší pozornost možnosti využití isoflavonoidů jako tzv. fytoestrogenů. Fytoestrogeny jsou látky nesteroidní povahy, jimž je vlastní estrogenní účinek. Jejich vlastnosti jsou založeny na strukturální podobnosti isoflavonoidů a estrogenu (17 β -estradiolu). Společným znakem je fenolové jádro v molekule, které propůjčuje isoflavonoidům estrogenní vlastnosti, umožňuje jejich vazbu na estrogenní receptory. V jádře buněk cílových tkání se fytoestrogeny váží na estrogenní receptor, regulují expresi genů, jejich doba retence je však krátká. Estrogenní receptory mají dvě isoformy (alfa a beta). Afinita k β receptoru je asi 5krát větší. β receptory jsou v kostech, plicích, prostatě, močovém měchýři, kůži a mozku. Isoflavonoidy mohou tedy spolu s estrogény působit na kostní tkáň. Isoflavonoidy zvyšují vstřebávání vápníku a jeho utilizaci do kostí a zvyšují také aktivitu osteoblastů. V mozku a hypofýze snižují hladinu gonadotropinu, tímto mechanismem mohou ovlivnit změny nálad, spánek, deprese, ale i cévní změny, mírnit návaly pocení a příznaky z nedostatku estrogenů. Nepůsobí téměř na mléčnou žlázu a dělohu, které obsahují převážně α receptory.(6)

Fytoestrogenní aktivita isoflavonoidů je asi 10000 krát menší nežli účinek estradiolu a při estrogenním deficitu působí jako slabé estrogény. Tyto vlastnosti by mohly být využity pro menopauzální terapii u žen, kde je riziko prsní či děložní rakoviny při terapii hormonálními estrogenními preparáty.

Isoflavonoidy zřetelně zlepšují prokrvení a nárůst tloušťky kůže, zvýšenou tvorbu hyaluronové kyseliny a výrazně zlepšují hydrataci pokožky a zvyšuje tvorbu kolagenních i elastických vláken. Pozitivní je i vliv na růst vlasů. Při dlouhodobém užívání mohou spolupůsobit na cílové tkáni společně s estrogény, ale mohou působit i antagonisticky, pokud vazbou na estrogenní receptory blokují endogenní účinek estrogenu.(6)

Isoflavonoidy mohou být využity při protinádorové terapii. Nádor potřebuje k svému růstu výživu a tu si zajišťuje tvorbou nových cév. Fytoestrogeny zabraňují cévní novotvorbě a této vlastnosti se při terapii může do budoucna využít. Předpokládá se preventivní vliv na spontánní výskyt hormonálně závislých nádorů. Dále mohou působit prostřednictvím enzymů inhibicí aromatáz v cílové tkáni, limitují lokální konverzi prekurzorů na estrogény. Působí i na další enzymy ve steroidní kaskádě, například na 5 α -reduktázu, enzym ovlivňující konverzi testosteronu na aktivní dihydrotestosteron.

Využití při ochraně kardiovaskulárního systému je odůvodněno schopností snižovat hladinu LDLcholesterolu v séru, prostřednictvím přímé stimulace receptorů pro LDL v játrech. Isoflavony navíc inhibují lipooxygenázu a snižují tak riziko aterosklerózy.(7)

Droga je účinná proti ledvinovým a jaterním problémům, kašli, bronchitidě a jiným dýchacím problémům, při kterých podporuje tvorbu ochranných hlenů a působí desinfekčně. Léčí ekzémy a lupenku. Má desinfekční a adstringenční účinky, kterých se využívá na infikované rány a kožní léze.

3.2 Rostlinné explantáty

3.2.1 Charakteristika

Při přípravě terapeuticky významných látek syntetickou či polysyntetickou metodou narážíme často na problematiku přípravy komplikovaných chemických struktur a tím i jejich ekonomickou náročnost přípravy. Proto hledáme jiné technologické metody získávání těchto látek. Jednou z možností jsou kultury rostlinných explantátů. Přičemž explantát znamená: uměle odebraná, izolovaná část rostliny za účelem kultivace.(9)

Rostlinné explantáty jsou fragmenty živého pletiva, orgánů, nebo komplexů orgánů odebrané z intaktní rostliny, nebo z již existující kultury pěstované ve sterilních podmínkách *in vitro* na definované živné půdě.

Kultury se zakládají z matečné rostliny a lze je odvodit z kteréhokoliv orgánu rostliny, kromě vysoce specializovaných buněk – například sítkovice. V každé buňce je obsažen kompletní soubor genů (totipotence) daného genotypu, potřebný pro všechny rostlinné funkce. Působením vhodných růstově aktivních látek a optimalizací kultivačních podmínek lze i z jedné somatické buňky vypěstovat životaschopnou rostlinu.(8) Na agarovém mediu je z orgánu pletiva odvozen primární kalus (původně neorganizované pletivo vzniklé na povrchu nenádorových primárních explantátů). Pokud je kultura pravidelně pasážována, lze ji pěstovat neomezeně dlouho.

Z morfologického hlediska dělíme kultury rostlinných explantátů na:

- buněčné kultury – tvořené jednotlivými buňkami
- suspenzní kultury – tvořené volnými buňkami a malými shluky buněk rozptýlenými v promíchané a provzdušněné tekuté živné půdě
- kultury protoplastů – tvořené buňkami zbavenými buněčných stěn, obalenými pružnou, elastickou plazmolemou(8)
- kultury tkáňové – tvořené do různého stupně soudržnými, morfologicky dezorganizovanými mnohobuněčnými komplexy pletiva
- kultury orgánové – orgánové systémy, orgány nebo jejich základy

pěstované takovým způsobem, při kterém může docházet k diferenciaci

- kalusové kultury – komplexy buněk, které nejsou uniformní, jsou to výchozí materiály pro suspenzní a kultury protoplastů

Pro studium biosyntézy přírodních látek se jako nejvýhodnější jeví kultura suspenzní. Jsou to populace buněk, nebo malé shluky buněk kultivované v pohyblivém, tekutém mediu. Tyto buňky jsou v neustálém kontaktu s živným mediem, což jim zajišťuje stálý přísun živin a při pohybu je medium provzdušňováno, buňkám je tedy nabídnut i dostatečný přísun vzduchu. Takto připravovaný buněčný materiál roste rychleji než na pevných půdách a je více homogenní. Suspenzní kultury jsou většinou udržovány vsádkově v malých baňkách na rolerech nebo třepáčkách. S kulturou je třeba třepat z důvodu zabránění sedimentace. Je snaha z této kultury získávat sekundární metabolity rostliny.

3.2.2 Odvození a udržování kultury

Pro úspěšné odvození je nutné vybrat vhodnou matečnou rostlinu a část jejího rostlinného těla. Před vlastní explantací je nutné rostlinu povrchově sterilizovat nebo pěstovat v aseptických podmínkách. Poté odebereme fragment a přeneseme na tuhou živnou půdu a inkubujeme v teplotním rozmezí 23 - 28 °C. Dochází k dediferenciaci již specializovaných buněk pletiva – dochází k ztrátě funkcí, struktury a změně metabolismu. Po několika týdnech kultivace se objeví primární kalus. Jde o pletivo vzniklé dělením povrchových vrstev primárních explantátů, jehož buňky jsou při pravidelném pasážování schopné trvalé proliferace.

Stabilní a homogenní materiál (bez morfologických a morfogenetických odchylek, jako jsou změny pigmentace a regenerační schopnost) lze získat až po provedení většího počtu pasáží při dodržení konstantních podmínek kultivace.

Z kalusové kultury lze enzymatickým nebo mechanickým způsobem odvodit kulturu suspenzní. Dosáhne se toho buď použitím vhodných pektináz, nebo pomocí pomaloběžných rolerů a třepáček. Získané kultury lze udržet za podmínek *in vitro* neomezeně dlouho. Kultura musí být pravidelně pasážována za aseptických podmínek, aby se zabránilo nežádoucí kontaminaci rostlinného explantátu.(8)

3.2.3 Kultivační podmínky

Kultivace rostlinných explantátů musí probíhat za přesně definovaných podmínek. Musíme hlavně udržovat sterilitu prostředí, optimalizovat složení živného media, zajistit vhodné fyzikální podmínky a zamezit kontaminaci.

Živné půdy

Živná půda je růstové medium, které je substrátem poskytujícím výživu kulturám pěstovaným *in vitro*. Suspenzní kultury jsou extrémně citlivé a vyžadují velice přesné složení živné půdy. Mohou být tekuté, polotuhé, nebo tuhé. Jejich složení je dáno typem kultivace.

- voda - destilovaná (musí být apyrogenní), prostá organických nečistot, může obsahovat jen stopové množství anorganických látek
- makroelementy - uhlík, kyslík, vodík, dusík, fosfor, síra, draslík, hořčík, vápník. Elementy se používají ve formě solí a množství se udává v mg/l, nebo v mmol
- mikroelementy - železo, bór, kobalt, měď, jod, molybden, mangan, zinek. Elementy jsou nezbytné pro růst a jejich množství se v živné půdě vyskytuje v μmol
- zdroj organického uhlíku - nejlepším zdrojem jsou sacharidy. Nejčastěji sacharóza, glukóza, laktóza, nebo škrob
- zdroj dusíku - média musí obsahovat dusík pouze ve formě nitrátů, nejlepších kultivačních podmínek je však dosaženo při podání směsi nitrátů a amonných solí, nebo dodání organických sloučenin jako například aminokyselin
- vitamíny - explantátové kultury si na rozdíl od rostlin nedokáží nasyntetizovat dostatek vitamínů pro svou potřebu, proto musíme do media dodávat především thiamin, pyridoxin, kyselinu nikotinovou, biotin a vitamin C
- růstové regulátory = fytohormony - auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová, etylén, kyselina jasmínová, fenolické látky, polyamidy atd.(9)

Fyzikální podmínky:

- teplota - obvykle se explantáty kultivují při konstantní teplotě. Optimální teplota je specifická pro danou explantátovou kulturu. Pro jetel luční se nejvýhodněji jeví rozmezí 23 až 28 °C. Teplota ovlivňuje rychlost metabolismu, růst, vývoj a dělení buněk. Krátkodobých výkyvů v úzkých rozmezích se tak dá využít ke zpomalení nebo urychlení růstu. Při vysokých teplotách by došlo k poškození buněk
- osvětlení - ovlivňuje biosyntézu a je nezbytné při autotrofně pěstovaných kulturách. Důležitá je intenzita a kvalita světla, jakož i případná fotoperioda. Doba a způsob osvětlení se liší podle objektu a typu kultivace. Nejběžnější je při nepřetržitém osvětlení 500 - 1000 luxů a při fotoperiodě (8-16 hodin) osvětlení nad 2000 luxů
- pH živného media - většinou se používá slabě kyselé medium s hodnotami okolo 5,5 - 6,0. Kyselost se upravuje kyselinou chlorovodíkovou nebo hydroxidem sodným
- vlhkost vzduchu - bývá v místnosti kultivace v rozmezí 20-98% v závislosti na kultuře(8,11)

Průběhu kultivace lze rozdělit do několika fází, které můžeme vyjádřit růstovou křivkou, vyjadřující závislost koncentrace biomasy na čase. Nejprve se buňky přizpůsobují novým podmínkám po přesazení na medium. Jejich množství se po dobu této fáze nemění. Fáze se jmenuje **lag-fáze** a její délka je závislá jak na vlastnostech media, tak i buněk. Poté dochází ke zrychlení, kdy dosahují všechny reakce nejvyšší rychlosti a ustalují se na konstantní stav - **fáze zrychlení**. V exponenciální fázi rostou buňky stálou rychlostí a tahle fáze trvá dokud mají buňky dostatek živin, nebo dokud nedojde k zastavení vlastními regulačními mechanismy. Se stárnutím buňky a hromaděním toxických metabolitů dochází k zpomalování růstu - **fáze zpomalení**, až dojde k dosažení maximální koncentrace buněk a ty se dál už nemnoží - **stacionární fáze**. Poslední fází je **odumírání**, které může nastat vyčerpáním živin a tedy nemohou probíhat reakce, nebo sebedestrukci buněk vlastním mechanismem.(8)

3.3 Elicitace

3.3.1 Obranné mechanismy rostlin

Většina základních fyziologických poznatků byla získána na modelových druzích rostlin za optimálních podmínek. V přírodě však rostliny rostou za podmínek mnohem méně příznivých. Faktory prostředí, které je obklopuje, kolísají v širokých mezích, často až na samou hranici existence. Přežití v těchto podmínkách by bylo sotva možné bez přizpůsobování. Přizpůsobováním rozumíme veškeré modifikace funkcí a struktury rostliny pod vlivem určitého typu prostředí, které zvyšuje pravděpodobnost přežití a reprodukce. (12) Dědičné změny označujeme jako adaptace, krátkodobé nedědičné znaky jako aklimatizace. Každý rostlinný druh prošel od svého vzniku složitým selekčním sítím. Selektce neprobíhala na úrovni jednoho procesu či funkce, ale vždy na úrovni fenotypových projevů celé rostliny.

Přizpůsobení může mít podobu kvalitativní (např. syntéza látek nové struktury), či kvantitativní (syntéza většího množství již dříve přítomných sloučenin).

Faktory prostředí dělíme na tři kategorie - **fyzikální, chemické a biotické**. Z prostorového hlediska ještě můžeme dělit vlivy na **klimatické** (působí na nadzemní část rostliny) a **edafické** (půdní). Při studování vlivů faktorů na rostliny vznikl i pojem stresové faktory - což jsou nepříznivě působící faktory prostředí. Stresové faktory mohou pronikat do rostliny a způsobovat reakce na tyto podněty vedoucí k spuštění řetězce změn proti těmto stresorům - rozvíjí se stresová reakce. Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí (**poplachová fáze**). Pokud intenzita působení stresoru nepřekročí letální úroveň, dochází záhy k mobilizaci kompenzačních mechanismů (**restituční fáze**), které směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům (**fáze rezistence**). Ne vždy však toto zvýšení má trvalý charakter. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídáno dalším poklesem (**fáze vyčerpání**). (12)

Působení stresorů (např. nízké teploty) může podmiňovat průběh důležitých morfogenetických procesů, např. produkci sekundárních látek, klíčení či tvorbu květních orgánů, a tím zvýšit reprodukční schopnosti rostliny.

Ke vzniku odpovědi na podnět vede dlouhá cesta - reakce jsou spouštěny

podněty (signály), které působí přes přenašeče a šíří signál dál do buňky. Nedochází většinou k expresi genů přímo, ale přes skupinu sekundárních posílů. Ty přenášejí signál v buňce transdukčními signálními cestami, což vede k genové expresi a tvorbě chemických látek jako odpověď na stresor.

K abiotickým, fyzikálním stresorům patří:

- poškození rostlin zářením UV – dochází k poruše stavby makromolekulárních proteinů a nukleových kyselin
- poškození rostlin zářením ve viditelné oblasti – může při nadměrném osvětlení docházet k fotoinhibici
- extrémní teploty
 - vysoké - dochází k změnám na membránách a k změně konformace nemembránových proteinů a tím ztrátě jejich funkce
 - nízké - způsobuje poruchu osmotických tlaků a oxidativní poškození membrán v důsledku zpomalení reakcí a nespotebování aktivních forem kyslíku vzniklých při fotosyntéze
 - mráz - dochází kekrystalizaci vody a tím vzniká mrazová dehydratace buněk

K chemickým stresorům náleží:

- nedostatek vody - klesá turgorový tlak v buňkách a listy začínají vadnout
- vliv nedostatku minerálních živin - makroelementy, mikroelementy a prospěšné prvky. Jejich nedostatek pozorujeme většinou až po několika dnech zpomalením růstu a fotosyntézy, protože rostlina si dělá zásoby, které jsou schopny krátkodobé výkyvy pokrýt
- nedostatek kyslíku - v okolí nadzemních částí rostliny je většinou koncentrace kyslíku stálá, horší je to v půdě, kde množství kyslíku značně kolísá. Dochází ke zpomalení elektronového transportu v mitochondriích a hromadí se NADH inhibuje činnost citrátového cyklu. Navíc v glykolýze přechází rostlina na anaerobní cestu a postupně dochází k nedostatku energie a produkty fermentace (etanol a kyselina mléčná) jsou ve vyšších koncentracích toxické
- kyselost a zasolenost půdy

- zasolené půdy vznikají hlavně v oblasti moří a tam, kde převažuje výpar nad srážkami (pouště a polopouště). Dochází k zhoršení funkcí enzymů a následuje zastavení dělení a růstu rostliny
- kyselost půdy je zapříčiněna kyselými srážkami a také nevhodným obhospodařováním (hnojení, monokultury, sklizení veškeré biomasy). Vysoká koncentrace vodíkových iontů má spíš sekundární vliv neboť půda je do značné míry schopná kyselost korigovat dalšími prvky obsaženými v půdě. Vodíkové ionty ovšem vytěsňují v půdě jiné kationy, které rostlina pro svou existenci potřebuje. Rostlinám přizpůsobeným k životu v kyselých oblastech se říká *acidofytní*
- toxické látky v prostředí
 - z plynů je nejnebezpečnější ozon a oxid siřičitý
 - v půdě pak ionty těžkých kovů a aromatické organické kyseliny

Biotické stresory:

Při studiu vztahů mezi prostředím a funkcemi rostlin nemůžeme zanedbat biotické složky prostředí, protože rostliny v přírodě nežijí nikdy bez interakcí s jinými organismy. Mechanismus vzájemného ovlivňování může být založen na změnách fyzikálně-chemických složek prostředí (kompetice o zdroje, alelopatie tráva a jetelovina), anebo na přímém působení (herbivorie, parazitismus, symbiózy).⁽¹²⁾

Jako obranu si rostliny vyvinuly řadu mechanismů, od tvorby toxických látek (alkaloidy, glykosidy, uvolňování kyanovodíku atd.), po morfologické změny, jako trny, ostny, trichomy, ztloustlá kutikula, impregnovaná buněčná stěna.

Rostliny se naučily reagovat a bránit se mnoha způsoby. Téměř u všech se vyvinul způsob obrany tvorbou enzymů, pomáhajícím eliminovat, nebo snížit nežádoucí dopady stresoru.

Extrémním teplotám se naučily odolávat rostliny v teplých pouštích a polopouštích úpravou plochy (zmenšením), systémem zavřených průduchů přes den, a tím neztrácí potřebnou vláhu výparem a tolerancí vodního deficitu. Zvláštností jsou i semena z oblastí častých požárů, která ke svému vyklíčení potřebují zvýšení teploty na 120°C. Pro přežití v mrazech si rostliny musely vyvinout schopnost snášet dehydrataci,

kvůli minimalizaci vody v organismu. Došlo u nich téměř k vymizení vakuol a tvorbě proteinů indukovaných nízkou teplotou zvyšujících odolnost vůči chladu a mrazu.

Rostliny mokřadlové, které mají stálý nedostatek kyslíku pro své kořeny, si vyvinuly systém rychlého transportu kyslíku do kořenů díky množství intercelulár a dále zdokonalení anaerobní glykolýzy, kdy přebytečný etanol okamžitě vypouští do svého okolí.

Zasolenost půdy rostliny překonaly vytvořením vysoce selektivní membrány pro transport iontů do buněk kořenů. Těžké kovy se rostliny naučily vytěšňovat chelatací.

3.3.2 Elicitace

Elicitace je proces vedoucí k zvýšení hladiny enzymů, nebo jejich aktivity, čímž dochází ke stimulaci produkce sekundárních metabolitů v rostlinách i v rostlinných kulturách *in vitro*.

Na počátku reakcí je podnět (elicitor) spouštějící kaskádu obranných reakcí. Dává podnět k expresi genů, syntéze enzymů a navozuje tak zvýšenou syntézu sekundárních metabolitů.

3.3.3 Mechanismus účinku elicitoru

Mechanismu elicitace se využívá při zvyšování produkce sekundárních metabolitů u kultur *in vitro*. Očekáváme u těchto kultur, že budou reagovat jako rostliny *in vivo*, které přišly do styku s elicitem a reagují na něj obrannými reakcemi.

Elicitory rozdělujeme podle původu na biotické a abiotické.

Biotické:

- intaktní patogenní organismy - viry, bakterie, plísňe
- metabolity, které vylučují patogenní organismy - enzymy, polysacharidy, peptidy
- sloučeniny uvolňované narušenou stěnou patogenními organismy - glykopeptidy, oligoglukany
- endogenní elicitory pocházející z napadených rostlinných buněk - kyselina jasmínová, oligogalakturonany

Abiotické:

- extrémní teploty
- záření
- pH
- změny osmotického tlaku
- detergenty, pesticidy
- ionty těžkých kovů

Ke vzniku odpovědi na podnět vede dlouhá cesta - reakce jsou spouštěny **signály**, které mají fyzikální nebo chemickou povahu a pro které je v buňce vhodný receptor. Přenos signálu z receptorů k efektorům není přímý, ale nejčastěji bývá zprostředkován pomocí G-proteinů (GTP-áz). Tyto proteiny se aktivují přeměnou GDP na GTP, ke které dojde kontaktem se stimulovanou molekulou receptoru. Aktivované G-proteiny jsou pak schopny přivádět do funkčního stavu další proteiny zapojené do šíření signálu. Jedním z nich je *fosfolipáza C* v plazmatické membráně, štěpící *fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát* (vznikající z hojného membránového lipidu fosfatidylinositolu) na *diacylglycerol* (DAG) a *inositol-1,4,5-trisfosfát* (IP₃). Z těchto dvou sloučenin má zvláště významnou úlohu vodorozpustný IP₃, který je schopen rychle se šířit v cytosolu a aktivovat vápníkové kanály v membráně endoplazmatického retikula (ER). Tím dojde k náhlému zvýšení koncentrace Ca²⁺ iontů v buňce. Jakmile dojde

k dostatečnému zvýšení intracelulárního vápníku, váže se kalcium na kalmodulin a komplex kalcium-kalmodulin ovlivňuje další reakce. Lipofilní DAG sice zůstává v membráně, ale i tak může přispívat k šíření signálu interakcí s proteinkinázami, které vedou přímo k efektorům. K otevření kalciových kanálů může dojít i přímo. Úloha iontů vápníku je pro vnitrobuněčnou signalizaci skutečně zásadní, je totiž známo asi sto enzymů aktivovaných navázáním Ca^{2+} .(12) Po proběhnutí těchto kaskád až k efektorům, dochází k expresi genů a biochemickým změnám a tvorbě stresových proteinů, které jsou zodpovědné za odpověď rostliny na signál. (12)

Abiotické elicitory, jako těžké kovy, nemají specifický receptor a expresi genů navozují jinými způsoby. Jedním z nich je stresově podmíněné uvolnění endogenních elicitorů z narušené buněčné stěny.

Každá půda se vyznačuje určitou hodnotou těžkých kovů, která vyjadřuje jejich přirozený obsah. Některé těžké prvky patří mezi mikroprvky, nebo prvky, které pokud nepřesáhnou stopové koncentrace jsou rostlinám prospěšné - Fe, Mo, Mn, Zn, Ni, Cu, Co, W, Cr a další. Množství a vlastnosti těžkých kovů jsou závislé na mnoha faktorech - kyselosti půdy, obsahu vody, ostatních těžkých kovů a solí jiných prvků. Jiné prvky jako například As, Hg, Ag, Sb, Cd, Pb nemají žádnou známou funkci a zdají se být pro rostliny více či méně toxické. Ionty těchto kovů se mohou vázat na proteiny či jiné buněčné komponenty a blokovat tak jejich biologicky aktivní funkční skupiny nebo je přímo poškozovat a mohou také indukovat vznik cytotoxických volných radikálů. Je třeba zdůraznit, že podobně působí i kovy biologicky významné při nefyziologicky vysokých koncentracích.

Hlavními antropogenními zdroji znečištění prostředí kovy jsou metalurgie a těžební operace, energetický průmysl, papírenství, textilní a chemický průmysl, průmysl odpadů a zemědělství. Neustálý rozvoj těchto odvětví vedl k tomu, že těžké kovy a metaloidy (např. arsen, kadmium, měď, kobalt, olovo, selen, rtuť) dosáhly v mnoha oblastech toxických koncentrací, a to jak ve vodě a v půdě, tak i v ovzduší, čímž se výrazně redukoval ekonomický potenciál zamořených území. Postižené oblasti jsou navíc zdrojem kontaminace vodních zdrojů, které rozšiřují oblast zamoření na další lokality. (20)

A právě studium neživých (abiotických) faktorů, jako jsou těžké kovy, může odpovědět na otázky vlivu znečištění životního prostředí na rostlinné organismy jako celku. Pokud jsou rostliny vystaveny takovým vlivům, např. UV záření, chladu, vysoké teplotě, solím těžkých kovů, změnám kyselosti prostředí a řadě dalších, začnou se rostlinné buňky bránit „výrobou vlastních zbraní“, tedy produkcí obranných sloučenin (glutathion, fytochelatiny apod.). Například právě fytochelatiny, peptidy (malé bílkoviny) mají schopnost vázat na sebe těžké kovy a odklidit je do těch partií buňky, kde svou toxicitou rostlinný organismus již bezprostředně neohrožují. Význam těchto obranných prostředků je především v zachycování a rozkladu nebezpečných látek. (19)

3.4 Měď

Měď, chemická značka **Cu** (*Cuprum*)

Měď je ušlechtilý kovový prvek načervenalé barvy, používaný člověkem už od středověku. Je to prvek II.B skupiny periodické soustavy prvků. Vyznačuje se velmi dobrou tepelnou a elektrickou vodivostí. Je to velmi měkký a tažný kov a dobře se mechanicky zpracovává a jeho oxidační odolnost je velmi dobrá. Teplota tání je 1084°C. Měď se dá rozpustit pouze v minerálních kyselinách za přítomnosti oxidačních činidel. V případě kyseliny dusičné je oxidačním činidlem sama kyselina a měď se v ní velmi snadno rozpustí za silného vývoje oxidu dusíku.

Sloučeniny mědi mají oxidační číslo I až III. Patří mezi ně například:

- dusičnan měďnatý krystalizuje jako hexahydrát $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a bezvodý je bezbarvý. Jeho roztoky se používají k povrchové úpravě železných slitků (moření)
- oxid měďný (Cu_2O) používá se při barvení skla do červena
- síran měďnatý (CuSO_4) používá se k výrobě pigmentů (23)

Měď jako čistě ryzí se vyskytuje v zemské kůře poměrně vzácně, spíše se objevuje ve sloučeninách. Ve formě sulfidů patří mezi ně např. chalkosin a chalkopyrit, které se vyskytují v cementačních částech rudných žil a ve výlevných horninách. Mezi největší producenty mědi v Evropě patří Polsko, ve světě pak Chile, Zair, Zambie, Kanada.

Do ovzduší se měď uvolňuje při těžbě a zpracování měděných rud a při spalování fosilních paliv a odpadů. Atmosférickou depozicí se dostává ze vzduchu do ostatních složek životního prostředí. Antropogenním zdrojem mědi v povrchových vodách mohou být odpadní vody z povrchové úpravy kovů (galvanizovny, oplachové vody z moření mědi), dále se měď může dostat do vod aplikací některých algicidních preparátů, které se dávkuje proti nadměrnému rozvoji řas a sinic. Přírodním zdrojem

mědi je zvětrávání, sopečné výbuchy, lesní požáry a rozklad biomasy. V pitné vodě se měď vyskytuje hlavně z důvodu koroze měděných trubek. Atmosférickou depozicí přechází měď ze vzduchu do vody a půdy. Měď je v půdách silně vázána na organické látky a jílové částice. Proto zůstává většina mědi v povrchových částech půdy a nedochází k transportu hlouběji. Rozpustnost mědi je limitována rozpustností hydroxidu měďnatého, společným srážením s méně rozpustnými hydroxidy kovů a adsorpcí. V letních obdobích může u dna hlubších nádrží docházet ke vzniku sulfanu a ke srážení mědi ve formě sulfidu měďnatého. Měď je esenciálním prvkem pro živočichy a vyšší rostliny, ve větším množství je však značně toxická pro vodní organismy.

Měď patří mezi esenciální prvky pro lidský organismus. Je nezbytná pro růst a vývoj kostí, pojivových tkání, mozku, srdce a dalších orgánů. Uplatňuje se při tvorbě hemoglobinu a některých enzymů a při vstřebávání a metabolismu železa. Je také důležitá pro správné využití vitamínu C. U dětí se nedostatek mědi projevuje fyzickou a duševní retardací.

Vysoké dávky mědi způsobují žaludeční a střevní bolesti, poškození jater a ledvin a anemii. Některé sloučeniny mědi dráždí kůži, po opakovaných expozicích můžou způsobovat záněty. Mohou také vyvolat zánět spojivek.

Je součástí mnoha proteinů s redoxní funkcí, např. cytochromoxidázy, askorbát-oxidázy, polyfenoloxidázy a plastocyaninu. Trávy, a tedy i obiloviny, reagují při výše zmíněném procesu velmi citlivě na nedostatek mědi. Měď se účastní důležitých enzymatických pochodů spojených právě s využitím dusíku a přímo ovlivňuje i stabilitu chlorofylu. Mimo to hraje významnou roli při syntéze ligninu, který zpevňuje buněčnou stěnu a zvyšuje odolnost obilovin k poléhání, což je při vyšších dávkách dusíku také podstatná věc. Při nedostatku mědi dochází k chlorotickému zbarvení a deformacím nejmladších listů, k omezení tvorby generativních orgánů, sníží se obsah bílkovin v zrna a jejich kvalita. V buňkách se totiž zvyšuje obsah volných dusíkatých látek na úkor tvorby bílkovin. Proto je při intenzivním hnojení dusíkem nezbytné, aby rostlina měla také dostatek mědi. Limitující obsah mědi v půdě je v průměru 1ppm (extrahovatelné v DTPA). Při hodnotách pod 0,2 ppm už dochází k uvedeným příznakům deficiencie. U některých typů půd však mohou být tyto hodnoty i výrazně vyšší. Pokud jde o limitní obsah mědi v rostlinách, je to např. u pšenice 4,5 ppm a pod 3,0 ppm v celé rostlině po květu. (22)

Měď není příliš mobilní v rostlinách, i když může být translokována ze starých listů do mladých. Pohyb je závislý na jejím obsahu v rostlině. Obsah mědi v rostlinách závisí především na druhových zvláštích rostlin a na půdních podmínkách. Průměrný obsah mědi v rostlinných pletivech kolísá od 1,5 do 8,5 ppm v sušině. Vysoký obsah mědi byl zjištěn v listech, generativních orgánech, v plodech a semenech.

Relativně vysoká koncentrace mědi se objevuje v chloroplastech, a to až 70% z celkového obsahu Cu v listech. Proto měď plní v rostlině funkci katalytického prvku, kde se bezprostředně váže na molekulu bílkoviny. Dále je složkou proteinu v chloroplastu, kterým je zabezpečován transport elektronů. Měď může hrát významné místo v syntéze nebo stabilitě chlorofylu a dalších rostlinných pigmentů. Mechanismus není dosud plně objasněn. Měď je součástí enzymových oxidáz (cytochromoxidázy, askorbátoxidázy, polyfenoloxidázy ap.). Spolu s železem se podílí na redukci nitrátů v rostlině (je složkou nitritreduktázy). Vedle těchto reakcí se měď objevuje v proteinovém a sacharidovém metabolismu. Při deficienci Cu dochází v rostlinách k destrukci proteinu až na rozpustné aminokyseliny. Tím může být vysvětlena její funkce, jako kofaktoru při syntéze enzymu a vliv mědi na DNA a RNA syntézu. U mladých rostlin, kde je proteinová syntéza velmi aktivní, byly nižší hladiny DNA pozorovány právě při Cu deficienci. Měď potřebují vikkvovité rostliny také k symbiotické fixaci dusíku. Předpokládá se, že ovlivňuje syntézu leghemoglobinu.

Při deficienci Cu se projevují chronická onemocnění. Postižené rostliny rostou zpočátku normálně, avšak v pozdějším období ontogeneze dochází k postupnému odumírání apikálních listů, jejich zasychání a změně barvy do silně žlutého odstínu. Takto jsou postiženy především staré listy, protože měď je ze starých listů transportována do mladých. Dalším z charakteristických příznaků deficience mědi je zastavení růstu, pokles turgoru a vadnutí. Nejcitlivěji na nedostatek mědi v půdě reagují oves, ječmen a pšenice.

I když měď je biogenním prvkem pro rostliny, je u ní často pozorována rovněž vysoká toxicita. Toxicita je způsobena snadným vstupem jejího iontu do buňky a mimořádnou schopností tvořit komplexy s řadou organických látek. Měď se váže pevněji než Fe, a to je jeden z hlavních důvodů, proč ovlivňuje negativně příjem železa. Nadbytek se projevuje u většiny rostlin, podobně jako nedostatek železa, chlorózou.

(27)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen

Autokláv PS 20A, Chirana, Brno

Horkovzdušný sterilizátor HS 31 A, 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

Kapalinový chromatograf Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, automatický dávkovač AS-2055), Tokyo

Kolona LiChrosper RP-18 s předkolonkou, Měrek, Darmstadt

4.2 Chemikálie

6-benzylaminopurin č., Lachema, Brno

Dihydrogenfosforečnan draselný 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 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 horečnatý *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 8). Semena byla získána ze Šlechtitelské stanice Domoradice. Elicitace byla provedena u dvouleté 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 5,69 % je aritmetickým průměrem ze tří stanovení.(13)

4.5 Kultivace explantátové kultury

4.5.1 Kultivační nádoby a nástroje, podmínky pasážování

Pro odvození a kultivaci explantátových kultur bylo používáno varné sklo značky SIAL, které vyhovuje požadavkům kladeným na nádobí pro práci s tkáňovými kulturami a je dostatečně odolné vůči vodě, chemikáliím i rozdílům teplot. Používané kovové nástroje (pinzety, skalpely) byly opláchnuty 96 % ethanolem a zabaleny do hliníkové fólie a sterilizovány 2 hodiny při 200 °C v horkovzdušném sterilizátoru.

Kalusové kultury byly odvozeny a kultivovány na můstcích z filtračního papíru vložených do 100ml Erlenmeyerových baněk s obsahem 30 ml tekutého živného média, při teplotě 25⁰C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma (subkultivační interval 21 dní). Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury a kultivována na pomaloběžném roleru za stejných podmínek jako kultura kalusová (subkultivační interval 14 dní) ve 250ml varných bankách z téhož skla.

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 zachovávány přísně aseptické podmínky a bylo používáno sterilní sklo i nástroje.

4.5.2 Příprava živného média

Explantátová kultura *Trifolium pratense* L. byla odvozena a kultivována podle Gamborga (B5) na živném médiu následujícího složení (15)

KNO ₃	2500,00 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	150,00 mg/l
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	250,00 mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00 mg/l
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150,00 mg/l
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,84 mg/l
Na ₂ EDTA	37,34 mg/l
KI	0,75 mg/l
H ₃ BO ₃	3,00 mg/l
MnSO ₄ . H ₂ O	10,00 mg/l
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	2,00 mg/l
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25 mg/l
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025 mg/l
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,025 mg/l
Myoinositol	100,00 mg/l
kyselina nikotinová	1,00 mg/l
pyridoxin	1,00 mg/l
thiamin	10,00 mg/l
sacharosa	30000,00 mg/l

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 kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová v koncentraci 2 mg/l a 6-benzylaminopurin také v koncentraci 2 mg/l živného média (16).

Živné médium bylo rozlito po 30 ml do Erlenmeyerových a varných baněk. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 min při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa.

4.6 Elicitace

4.6.1 Příprava roztoků elicitoru

Byly připraveny 4 vodné roztoky síranu měďnatého o koncentraci:

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

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

Nejslabší koncentrace síranu měďnatého použita při elicitaci explantátové kultury *Trifolium pretense* L. odpovídá množství obsaženému v živném médiu podle Gamborga a ostatní koncentrace představují deseti-, sto- a tisícinásobek tohoto množství.

4.6.2 Elicitace a odběr kultur

Ve 21. dni kultivace byla provedena za aseptických podmínek elicítace kalusové a suspenzní kultury síranem měďnatým.

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 elicitoru o příslušné koncentraci. Potom byly elicítované kultury dále kultivovány za již uvedených podmínek. Po 6, 24, 48 a 168 hodinách aplikace elicitoru byly elicítované kultury odebrány. Odběry kontrolních kultur byly provedeny po 6 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.

4.7 Stanovení obsahu flavonoidů

4.7.1 Princip stanovení

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé. (13).

4.7.2 Postup stanovení

Základní roztok: 0,400 g usušené 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 ve 250ml baňce, přidá se 40 ml *lihu R 60% (V/V)* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky. 250ml baňka i filtr se promyjí *lihem R 60% (V/V)* a promývací tekutina se přidá do odměrné baňky. Spojené roztoky se zředí *lihem R 60% (V/V)* na 100,0 ml a roztok se zfiltruje.

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

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

bezvodou R na 25,0 ml. Po 30 min se měří absorbance zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

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

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

M

v němž značí:

A - absorbanci roztoku v maximu při 410 nm

M - hmotnost zkoušené kultury v gramech

specifická absorbance má hodnotu 405

4.8 Stanovení obsahu isoflavonoidů

Stanovení daidzeinu, genistinu, genisteinu, formononetinu bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. (32)

Příprava vzorku

Asi 0,8000 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 piků vzorků se standardy.

Parametry HPLC analýzy

Chromalograf: Jasco (AS-2055 Plus, PU-2089 Plus, MD-2015)

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

Objem nástřiku: 20 µl

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

Eluce: lineární gradient mobilní fáze A (metanol) ve fázi B (voda s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné) 30-80 % od 0 do 9 minut byl následován isokratickou elucí mobilní fází ve složení 80 % fáze A ve fázi B od 9 do 15 minut

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

Průtok: 1,1 ml/min

4.9 Statistické zpracování výsledků

Získané výsledky obsahu flavonoidů a iso 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:

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

t ... testovací kritérium

x_1 ... aritmetický průměr kontrolního souboru

x_2 ... aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 ... směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 ... směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 ... počet členů kontrolního souboru

n_2 ... počet členů pokusného souboru

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:

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

x_i ... naměřené hodnoty

n ... rozsah souboru

Testovacímu kritériu přísluší t rozdělení se stupněm volnosti (v) vypočteného podle vztahu:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

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).

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 $p(0,05) = 3,182$. (14)

5. VÝSLEDKY

5.1 Tabulky

Tab. 1: produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO 8) elicitované síranem měďnatým

Elicitor (μmol)	Doba aplikace (hod)	Elicitace		Kontrola		t - test
		Obsah flavonoidů (%)	Směrodatná odchylka	Obsah flavonoidů (%)	Směrodatná odchylka	
CuSO ₄ I 100	6	0,065	0,0396	0,065	0,0496	0,0079
	24	0,086	0,1365	0,065	0,0496	0,1513
	48	0,075	0,0567	0,065	0,0496	0,1327
	168	0,180	0,2823	0,040	0,0283	0,5415
CuSO ₄ II 10	6	0,069	0,0548	0,065	0,0496	0,0474
	24	0,075	0,0645	0,065	0,0496	0,1229
	48	0,060	0,0424	0,065	0,0496	0,0766
	168	0,060	0,0361	0,040	0,0283	0,4364
CuSO ₄ III 1	6	0,050	0,0410	0,065	0,0496	0,2330
	24	0,025	0,0415	0,065	0,0496	0,7494
	48	0,050	0,0368	0,065	0,0496	0,2509
	168	0,056	0,0592	0,040	0,0283	0,2364
CuSO ₄ IV 0,1	6	0,095	0,0476	0,065	0,0496	0,4364
	24	0,070	0,0495	0,065	0,0496	0,0713
	48	0,072	0,0456	0,065	0,0496	0,1039
	168	0,098	0,0608	0,040	0,0283	0,8581

Tab. 2: produkce flavonoidů v kalusové kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO 8) elicitované síranem měďnatým

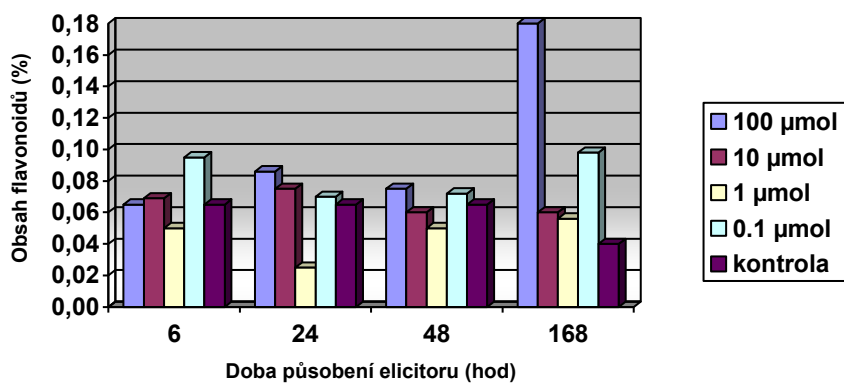
Elicitor (μmol)	Doba aplikace (hod)	Elicitace	Kontrola
		Obsah flavonoidů (%)	Obsah flavonoidů (%)
CuSO ₄ I 100	6	0,060	0,0152
	24	0,034	0,0152
	48	0,080	0,0152
	168	0,030	0,0585
CuSO ₄ II 10	6	0,024	0,0152
	24	0,070	0,0152
	48	0,150	0,0152
	168	0,180	0,0585
CuSO ₄ III 1	6	0,140	0,0152
	24	0,096	0,0152
	48	0,041	0,0152
	168	0,055	0,0585
CuSO ₄ IV 0,1	6	0,056	0,0152
	24	0,032	0,0152
	48	0,029	0,0152
	168	0,040	0,0585

Tab. 3: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO 8) elicitované síranem měďnatým

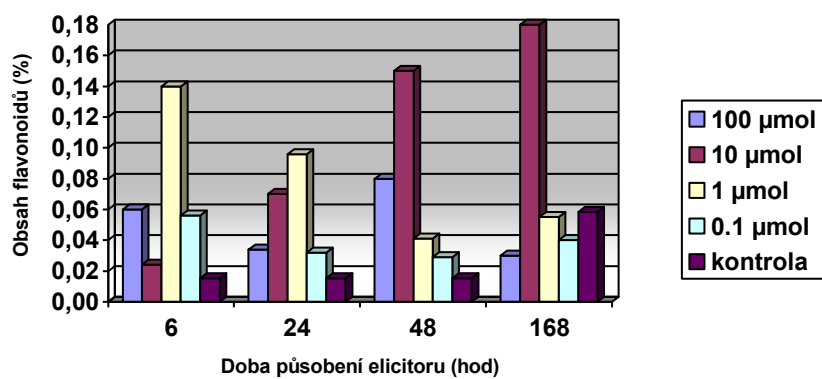
Koncentrace elicitoru (μmol)	Doba aplikace (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)			
		genistin	daidzein	genistein	formononetin
CuSO ₄ I 100	6	0,06	0,01	0,01	0,01
	24	0,08	0,01	0,01	0,01
	48	0,10	0,02	0,02	0,03
	168	0,07	0,01	0,01	0,03
CuSO ₄ II 10	6	0,06	0,01	0,01	0,02
	24	0,08	0,01	0,02	0,03
	48	0,12	0,02	0,02	0,03
	168	0,07	0,01	0,01	0,02
CuSO ₄ III 1	6	0,09	0,01	0,01	0,01
	24	0,10	0,01	0,02	0,03
	48	0,48	0,08	0,03	0,04
	168	0,08	0,01	0,01	0,02
CuSO ₄ IV 0,1	6	0,06	0,01	0,01	0,01
	24	0,05	0,02	0,01	0,01
	48	0,10	0,02	0,02	0,01
	168	0,05	0,02	0,01	0,01
kontrola	6	0,05	0,02	0,02	0,01
	24	0,05	0,02	0,02	0,01
	48	0,05	0,02	0,02	0,01
	168	0,02	0,01	0,01	0,01

5.2 Grafy

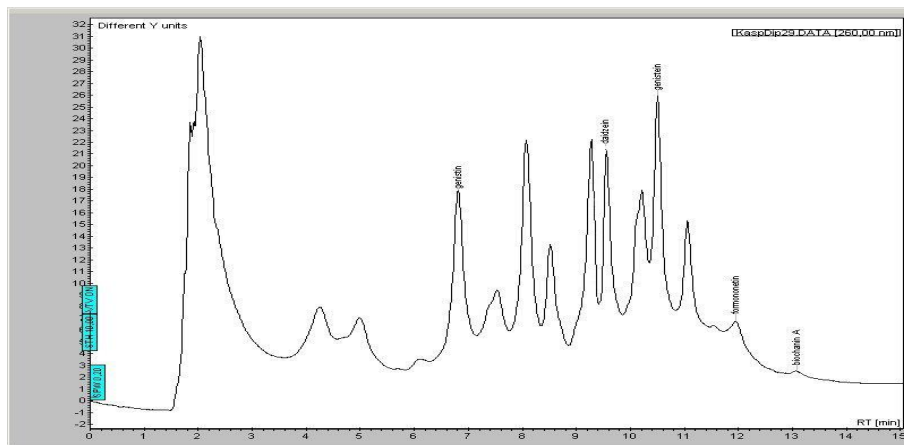
Graf 1: Elicitace suspenzní kultury CuSO_4



Graf 2: Elicitace kalusové kultury CuSO_4



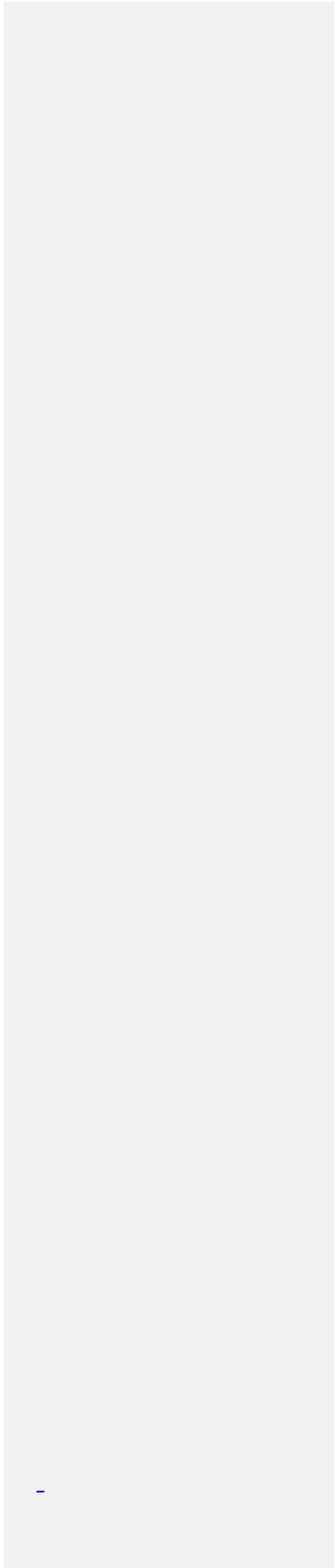
Graf 3: Obsah isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. elicované síranem měďnatým



|

|

-



-6. DISKUSE

Buňky explantátových kultur mohou díky své totipotenci syntetizovat sekundární metabolity, které jsou typické pro matečnou rostlinu. Jejich produkce oproti intaktním rostlinám však zpravidla bývá nižší, a proto se hledají způsoby, jimiž by bylo možné dosáhnout zvýšené akumulace sekundárních metabolitů. Vedle genetické manipulace a přidávání prekurzorů do média je možné použít také metodu elicítace.

Úspěšná elicítace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor a pro každou explantátovou kulturu. Jedná se např. o koncentraci a dobu působení elicitoru. Z těchto důvodů byly zkoušeny čtyři koncentrace vodného roztoku síranu měďnatého (0,1 μmol , 1 μmol , 10 μmol a 100 μmol), které byly zvoleny v rozmezí koncentrací obvykle používaných u tohoto typu elicitoru (36,29,27,31,30). Sledované doby působení elicitoru (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z poznatků již provedených pokusů (18,28,18) a z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po přidání elicitoru (36,31,30). 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 elicítace, je fyziologický stav kultury, respektive její růstová fáze. Z předcházejících pokusů vyplývá (35), že pro elicítaci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. je optimální 21. den subkultivace, a proto elicítace kultury byla provedena v tomto dni kultivace.

Z výsledků elicítace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) síranem měďnatým (Tab. č. 1, Obr. č. 1) je zřejmé, sledovaný elicitor měl pozitivní elicitační účinek. Kladně lze hodnotit zejména nejdelší 168hodinovou aplikaci koncentrace 100 μmol , která způsobila statisticky významné zvýšení produkce v porovnání s kontrolou o 350 % a kdy byl zjištěn maximální obsah flavonoidů v elicítované suspenzní kultuře (0,18 %). Také koncentrace 0,1 μmol po této nejdelší aplikaci zvýšila produkci o 145 % oproti kontrole; statisticky významné zvýšení o 46 % způsobila i 6hodinová aplikace této koncentrace.

V suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) elicítované síranem měďnatým byla metodou HPLC sledována také produkce isoflavonoidů. U kontrolní kultury byly zjištěny isoflavonoidy genistin, daidzein a genistein a formononetin (Tab. č. 3). Pozitivní elicitační účinek byl zaznamenán u všech použitých koncentrací elicitoru

zejména po 48hodinové aplikaci (v případě produkce genistinu ve všech sledovaných časových intervalech). Kladně lze hodnotit především 48hodinovou aplikaci koncentrace 1 μmol , která stimulovala produkci všech isoflavonoidů. Maximální obsah (0,48 %) a statisticky významné zvýšení produkce v porovnání s kontrolou o 860 % bylo zjištěno u genistinu. Velmi nízký obsah daidzeinu, genisteinu a formononetinu v kontrolní kultuře byl zvýšen touto elicitací o 300 %, 50 % a u formononetinu také o 300 %.

Kalusová kultura *Trifolium pratense* L. (Tab. č. 2 Obr. č. 2) na rozdíl od suspenzní kultury rostla pomalu, proto byl získán pouze omezený počet vzorků ke stanovení obsahu flavonoidů. Nedostatek vzorků neumožnil statisticky významné vyhodnocení elicitace, ovšem i zde je zřejmé, že sledovaný elicitor měl pozitivní elicitaci účinek. Nejvýrazněji sejevila 48hodinová elicitace koncentrací 10 μmol , kde byl zjištěn maximální obsah flavonoidů (0,15), což bylo navýšení oproti kontrolnímu vzorku o 887%.

Z výsledků je zřejmé, že abiotická elicitace suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. síranem měďnatým byla úspěšná, neboť nízká produkce sledovaných sekundárních metabolitů byla po aplikaci elicitoru stimulována. Těžké kovy se využívají jako abiotické elicitory k ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v řadě experimentů. V jedné studii byl zjišťován vliv elicitace roztokem chloridu měďnatého a chitosanu na obsah isoflavonoidu v explantátové kultuře *Lupinus albus*. Maximální zvýšení produkce nastalo po přidání 300 μmol roztoku chloridu měďnatého.(33) V jiné studii byl sledován vliv biotické a abiotické elicitace na produkci fytoalexinu sinalbinu A a B u explantátové kultury *Sinapis alba*. Po elicitaci destruxinem B a CuCl_2 (2 mmol) bylo dosaženo maximální produkce po 24 hod intervalu elicitace. (34)

Naformátováno: Písmo: Kurzíva

7. ZÁVĚR

Výsledky práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Z klíčící rostliny *Trifolium pratense* L. (varieta DO-8) byla odvozena suspenzní kultura. Ta byla elicitována roztokem síranu měďnatého. Nejvyšší obsah flavonoidů (0,18) způsobila 168hodinová elicitace abiotickým elicitorem o koncentraci 100 μmol . Nárůst flavonoidů byl v porovnání s kontrolou o 350%.
- 1+2. U suspenzní kultury byl sledován i obsah isoflavonoidů v průběhu elicitace síranem měďnatým. Výrazně se projevil pozitivní elicitální účinek při koncentraci 1 μmol po dobu elicitace 48 hodin, kdy došlo k významnému nárůstu koncentrací všech isoflavonoidů. Nejvýraznější zvýšení produkce v porovnání s kontrolou nastal u genistinu (0,48%), kdy došlo k nárůstu produkce o 860%.
3. Nejvyšší obsah flavonoidů u kalusové kultury (0,15) způsobila 48hodinová elicitace koncentrací 10 μmol , při které bylo zjištěno navýšení oproti kontrolnímu vzorku o 887%.

Výsledky práce potvrzují možnost využití abiotického elicitoru k získávání vyšších obsahů požadovaných sekundárních látek.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie 3; 188, s. 189
2. Summer, L. W. et al.: J. Mass Spectrom., 1996; 31, s. 472
3. http://cs.wikipedia.org/wiki/JeteI_lu%C4%8Dn%C3%AD (28.2.2007)
4. Kresánek J., Krejča J.: Atlas léčivých rostlín a lesných plodov, Osveta, 1977; s. 192
5. Tomko J. a kol.: Farmakognózia, Osveta, 1999;
6. Vrzáňová, M., Heresová, J.: Praktické lékárenství, 2006; 3, s. 118
7. Slíva, J.: Edukafarm medinews, 2006; 1, s. 44
8. Skyta B., Dušek J.: Biotech. pro farm., Praha, Karolinum, 1992; s. 84 - 88
9. <http://botany.upol.cz/prezentace/navratil/explant.pdf> (28.2.2007)
10. http://kgn.umbr.cas.cz/prednasky/240%20Genetika%20I/Lekce11_GI.pdf (28.2.2007)
11. http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%BDivn%C3%A1_p%C5%AFda (28.2.2007)
12. http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/part_04.pdf (8.2.2007)
13. Kolektiv autorů: Český lékopis 2005, Praha, Grada, 2005; s. 162, 1368
14. Reisenauer, R.: Metody mat. statistiky a jejich aplikace, Praha, SNTL, 1970; s. 82, 207
15. Gamburg, O. L., Miller, R. A., Ojiman, K.: Exp. Cell Res., 1968; 50, s. 151
16. Kašparová, M. et al.: Čes. slov. Farm., 2006; 55, s. 44
17. <http://www.pioneercz.cz/clanek51.php> (28.2.2007)
18. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: Čes. slov. Farm., 2003; 52, s. 148, 248
19. <http://www.21stoleti.cz/view.php?cisloclanku=2006062307> (28.2.2007)
20. <http://www.otvarena-veda.cz/ov/data/konf/sbornik/026.pdf> (28.2.2007)
21. http://www.duhova-zahrada.cz/vse_o_zahrade.php (28.2.2007)
22. <http://www.arysta.cz/download/clanky/Uroda-2004.pdf> (28.2.200)

23. <http://ireferaty.zpravy.cz/303/3197/MED> (28.2.2007)
24. http://opera.krnep.cz/_pdf/oc42-8.pdf (28.2.2007)
25. <http://www.sweb.cz/maniakva/prvky.htm> (28.2.2007)
26. <http://cs.wikipedia.org/wiki/M%C4%9B%C4%8F> (28.2.2007)
27. Kartosentono, S. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 2002; 24, s. 687
28. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.*, 2004; 53, s. 252
29. Zhang, W. H. et al.: *Ann. Bot.*, 1999; 84, s. 559
30. Tůmová, L., Poustková, J., Tůma, J.: *Acta Pharmaceutica*, 2001; 51, s. 159
31. Tůmová, L., Blažková, R.: *Čes. slov. Farm.*, 2002; 51, s. 44
32. De Rijke, E. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 2002; 468, s. 3
33. Gangon, R., Ibrahim, R. K.: *Phytochemistry*, 1997; 44, s. 1463
34. Soledade, M., Pedros, C., Zaharia, I. L.: *Phytochemistry*, 2000; 55, s. 213
35. Kašparová, M. et al.: *Čes. slov. Farm.*, 2006; 55, s. 44
36. Tebayashi, S., Ishihara, A., Iwamura, H.: *J. Exp. Bot.*, 2001; 52, s. 681