

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE

Lucie Kunzová

KULTURY LÉČIVÝCH ROSTLIN *IN VITRO* – IV.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Datum zadání:	15.11.2006
Vedoucí katedry:	Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.
Vedoucí diplomové práce:	Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.
Termín odevzdání:	15.5.2008
Počet stran:	64
Oponent diplomové práce:	PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Kultury léčivých rostlin *in vitro*“ vypracovala samostatně a veškeré informace a literární prameny, které jsem použila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení v průběhu diplomové práce. Zároveň děkuji také ostatním pracovníkům katedry farmakognozie za pomoc a vytvoření dobrých pracovních podmínek.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	6
2.	CÍL PRÁCE.....	7
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1.	Explantátové kultury rostlin.....	8
3.1.1.	Kategorie rostlinných explantátů	9
3.1.2.	Kultivace explantátových kultur.....	10
3.1.3.	Kultivační média pro explantátové kultury.....	10
3.1.4.	Faktory ovlivňující explantátové kultury.....	13
3.1.5.	Využití explantátových kultur.....	14
3.1.6.	Mikropropagace rostlin.....	14
3.1.7.	Kalusová kultura.....	16
3.1.8.	Suspenzní kultura.....	17
3.2.	Fyziologie stresu	18
3.2.1.	Stresová reakce a stresové faktory.....	18
3.2.2.	Společné mechanismy stresových reakcí	20
3.2.3.	Biotické stresy	22
3.2.4.	Příklady abiotických stresových faktorů	24
3.2.5.	Elicitace a elicitory.....	27
3.3.	Fotooxidační stres a působení methylviologenu	30
3.4.	Flavonoidní glykosidy.....	35
3.5.	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.....	36
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
4.1.	Přístroje a vybavení.....	38
4.2.	Chemikálie a pomocné látky.....	39
4.3.	Biologický materiál.....	39
4.4.	Složení a příprava živného média.....	40
4.5.	Kultivace kultur.....	41
4.6.	Příprava roztoků elicitoru.....	42
4.7.	Elicitace <i>in vitro</i> kultur.....	43
4.8.	Stanovení obsahu rutinu.....	44
4.9.	Stanovení ztráty sušením.....	46

4.10.	Statistické zpracování výsledků.....	47
5.	VÝSLEDKY.....	49
6.	DISKUZE.....	56
7.	ZÁVĚR.....	60
8.	SEZNAM LITERATURY.....	61
9.	ABSTRAKT.....	64

1. ÚVOD

Vyšší rostliny jsou pro lidstvo nejen nepostradatelným zdrojem potravin, dřeva, vláknin a olejů, ale také poskytují nejbohatší výběr přírodních látek, z nichž mnohé jsou využívány v medicíně, kosmetice a potravinářství. Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky únosnou organickou syntézou, jejich jediným zdrojem jsou rostliny.

V posledních letech se však stále obtížněji zajišťuje přísun těchto přírodních surovin, neboť dochází k drastickému zmenšování rostlinných zdrojů. Ceny surovin vzrůstají a současně stoupají nároky, zejména farmaceutického průmyslu. Sběr divoce rostoucích léčivých rostlin i jejich polní pěstování je značně sezónní záležitostí, jeho výtěžnost závisí na mnoha faktorech. Často se jedná o rostliny, jejichž pěstování může být ohroženo klimatickými vlivy, hmyzem nebo bakteriálními nákazami. Proto bylo v posledních letech věnováno velké úsilí na vypracování biotechnologického postupu výroby žádaných rostlinných látek (4).

Rychlý rozvoj technik explantátových kultur dosáhl takové úrovně, že je možno seriózně hodnotit jejich biotechnologické aplikace pro výrobu farmaceuticky důležitých rostlinných produktů (1). Nelze očekávat, že by kultury rostlinných buněk mohly kdykoli v budoucnu konkurovat mikroorganismům při průmyslové výrobě primárních metabolitů. Nezastupitelné postavení by však měly získat při výrobě řady sekundárních metabolitů (4).

Produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách může být podpořena různými specifickými činiteli – elicitory. Mechanizmy působení elicitorů jsou různé, ale společným znakem je obranná reakce rostliny a s tím související produkce sekundárních metabolitů.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo seznámit se s metodikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Zjistit vliv oxidačního stresu na produkci flavonoidů kalusovou a suspenzní kulturou *Fagopyrum esculentum* působením methylviologenu. Na základě stanovení obsahu flavonoidů metodou HPLC v této kultuře zjistit, zda oxidační stres ovlivňuje jejich tvorbu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Explantátové kultury rostlin

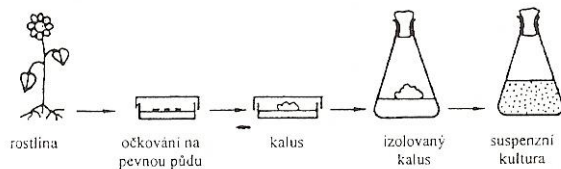
Explantátové kultury rostlin znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek (2). Jako explantáty se tedy označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristemických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. Explantátové kultury se využívají jak při šlechtění rostlin, tak při produkci rostlinných metabolitů (1).

Základem rostlinného organismu, vznikajícího pohlavním rozmnožováním, je jedna buňka – zygota, která vznikne oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou. Zygota obsahuje v jádře kompletní genetickou informaci a v cytoplazmě mechanismy umožňující realizaci této informace. Zygota je totipotentní a mitoticky se dělí. Procesem mitotického dělení vznikají dceřiné buňky, které se dále vyvíjejí a dochází k jejich diferenciaci. Stávají se stavebními jednotkami specializovaných pletiv.

Možnost vegetativního množení rostlin však ukazuje, že rostlinné buňky touto diferenciací nijak nedegenerují, ale že jsou schopny dediferenciace a opětného dělení. Buňky diferencovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristemických. Proces diferenciaci je totiž založen na tzv. diferenční genové aktivitě, kdy se specializace buňky vytváří na základě aktivace či inaktivace určitých genů příslušného rostlinného druhu. V rostlinném organismu je tedy totipotentní nejen zygota a meristemická buňka, ale i kterákoli jiná rostlinná buňka. Změnou podmínek, ve kterých se specializovaná rostlinná buňka nachází, je možné v mnohých případech vyvolat dediferenciaci a neorganizovaný růst. Teoreticky je jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem vhodné pro odvození explantátové kultury (2).

Explantátová kultura se získá z kterékoli části rostliny, nadzemní nebo podzemní, explantací parenchymatické tkáně, jejím přenesením na tuhou živnou půdu a inkubací v teplotním rozmezí 23 až 28°C. Po nárůstu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné je opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat tak získanou kulturu v aktivním stavu. Obsah růstových látek a vitamínů v živné půdě má rozhodující význam nejen pro růst kalusové kultury, ale i pro převádění kalusu do suspenzní kultury. Zejména rozpadavý kalus po přenesení do tekuté živné půdy zajišťuje homogenitu suspenzní kultury, která je pro další vývoj

postupu nezbytná. Homogenní kultura v tomto případě znamená, že obsahuje kromě jednotlivých buněk i shluky dvou až několika buněk (1).



Obr.1. Odvození explantátové kultury z rostliny (1).

3.1.1. Kategorie rostlinných explantátů (3)

Podle morfologické charakteristiky se rozlišují:

- **Kultury orgánové** – orgánové systémy, orgány, resp. jejich základy či části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a vcelku zachovává jejich stavbu a funkci.
- **Kultury tkáňové (resp. pletivové, kalusy)** – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně (pletiva), pomnožované buď na polotuhých, či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě.
- **Kultury suspenzní** – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendované v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.
- **Kultury buněčné (resp. kultury volných buněk)** – volné jednotlivé a identifikované buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotuhé půdě nebo na nosiči nasyceném půdou.
- **Kultury protoplastů** – kultury buněk zbavených buněčných stěn.

3.1.2. Kultivace explantátových kultur (1)

Volba vhodného kultivačního zařízení má pro přípravu explantátových kultur rostlinných buněk značný význam. Při šetrném avšak nedostatečném způsobu promíchávání explantátové kultury mohou být metabolické procesy limitovány

kyslíkem a kromě toho vzniká trvalý třífázový systém v důsledku nadměrné sedimentace nebo flotace buněk. Vhodným zařízením jsou pomaloběžné rollery nebo plastické vaky umístěné na pomaloběžném reciprokém třepacím stroji. Nevýhodou je značně dlouhá doba kultivace, buněčný cyklus explantátových kultur se pohybuje od 15 h výše. Tím jsou zvýšené nároky na udržení sterility procesu.

3.1.3. Kultivační média pro explantátové kultury (2)

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v explantátových kulturách je složení kultivačního média. Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo další zdroj organického dusíku, sacharidy, nedefinované organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory.

Mezi nejčastěji používaná média patří ta, která popsali White (1963), Murashige a Skoog (MS, 1962), Gamborg et al (B5, 1968), Gautheret (1942), Shenk a Hildebrandt (SH, 1968), Nitsch a Nitsch (1969) a Lloyd a McCown (1981).

a) Makroelementy

Makroelementy zahrnují: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu. Kultivační médium by mělo obsahovat přinejmenším 25-60 mM anorganického dusíku, nejčastěji ve formě dusičnanu draselného a dusičnanu amonného. Draslík se do médií dodává ve formě dusičnanu nebo chloridu v koncentraci 20-30 mM. Optimální koncentrace fosforu, hořčíku, síry a vápníku se pohybuje v rozsahu 1-3mM.

b) Mikroelementy

Mezi mikroelementy patří: železo, mangan, zinek, bor, měď a molybden. Železo a zinek se obvykle dodávají v chelátové formě. Také se někdy přidává kobalt, jód, sodík a chlór. Měď a kobalt se dávají v koncentraci 0,1 μ M, železo 100 μ M, molybden 1 μ M, jód 5 μ M, zinek 5-30 μ M, mangan 20-90 μ M a bor 25-100 μ M.

c) Zdroj uhlíku

Nejčastěji je používána sacharóza, někdy je možné ji nahradit glukózou či fruktózou. Obvykle používaná koncentrace sacharózy je 2-3 %.

d) Vitamíny

Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Nejčastěji se používají thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. Thiamin se používá v koncentraci 0,1-10,0 mg/l, je součástí většiny médií a je nepostradatelný pro růst tkáňových kultur. Kyselina nikotinová se dodává v koncentraci 0,1-5,0 mg/l, pyridoxin v koncentraci 0,1-10,0 mg/l. Myo-inositol se vyskytuje ve většině živných médiích, nemusí být pro růst explantátu nezbytný, ale může tento růst stimulovat. Předpokládá se jeho účast na tvorbě fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, které hrají roli v buněčném dělení. Myo-inositol se používá v koncentraci 50-5000 mg/l. Další vitamíny, které se někdy používají, jsou biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin atd.

e) Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku

Aminokyseliny mohou stimulovat růst explantátů, a to hlavně při kultivaci buněčných suspenzí a protoplastů. Slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být využívány přímo k syntéze proteinů. Dusík se v organické formě dodává hlavně ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát). Také se používá L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin. Nejčastěji se používá koncentrace 1-100 mg/l, při vyšších koncentracích mohou inhibovat růst.

f) Nedefinované organické složky médií

Do této skupiny patří celá řada organických extraktů jako např. protein hydrolyzát, kokosové mléko, kvasniční extrakt, sladový extrakt, extrakt z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Nejčastěji se používá protein (kasein) hydrolyzát v koncentraci 0,05-0,1 % a kokosové mléko v koncentraci 5-20 %. Také se někdy do médií přidává aktivní uhlí, které má jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů. Aktivní uhlí má v živném médiu tři základní funkce: absorpce látek inhibujících růst, absorpce růstových regulátorů a ztmavnutí média. Inhibici růstu v přítomnosti aktivního uhlí v médiu je možné vysvětlit absorpcí růstových regulátorů. Stimulační účinek je připisován jeho schopnosti vázat toxické fenolické sloučeniny produkované explantátem. Aktivní uhlí se před použitím propláchně kyselinou a zneutralizuje. Používá se v koncentraci 0,5-1,0 %.

g) Látky používané pro zpevnění média

Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. K vytvoření gelu, je-li agar smíchan s vodou, dojde při teplotách 60-100°C, který tuhne přibližně při 45°C. Agarové gely jsou tedy stabilní při teplotách používaných ke kultivaci. Agar se obvykle používá v koncentraci 0,8-1,0 %. Je možno také používat agarózu, Phytigel a Gerlite. Phytigel a Gerlite se přidávají v koncentraci 1,25-2,5 g/l, rychle tuhnou a výsledný gel je velmi čistý. V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty fixovat na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě, perforovaném celofánu atd.

h) Růstové regulátory

Růstové regulátory je možno rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová. Přičemž není důležitá pouze koncentrace jednotlivých hormonů, ale i jejich vzájemný poměr.

K auxinům se řadí především kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolylmásečná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina naftyloctová (NAA). IAA představuje nativní auxin, ostatní jsou látky syntetické. Dalšími syntetickými látkami patřící k této skupině jsou kyselina chlorfenoxyoctová (4-CPA), kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T). Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu prýtů.

Mezi cytokininy patří benzylaminopurin (BAP, jinak benzyladenin BA), 6-dimethylaminopurin (kinetin) a zeatin. Cytokininy se používají v kultivačních médiích za účelem stimulace buněčného dělení a stimulaci tvorby axilárních prýtů.

Dalšími regulátory jsou gibereliny (především GA_3 a GA_7), jejich přítomnost zpravidla není až tak důležitá. GA_3 stimuluje růst buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, dále stimuluje růst kalusu a růst zakrslých rostlin.

Kyselina abscisová stimuluje i inhibuje růst kalusu v závislosti na rostlinném druhu, stimuluje proliferaci prýtů a inhibuje pozdější fáze embryogeneze.

V živném médiu je také velice důležité dané pH, obvykle se pohybuje mezi 5,5-6,0. Daná hodnota se upravuje přidáním hydroxidu draselného nebo kyseliny chlorovodíkové.

3.1.4. Faktory ovlivňující explantátové kultury (5)

Na explantáty nemá vliv pouze složení kultivačního média, ale i další faktory:

- světlo (kvalita, intenzita a fotoperiodicita)
- teplota
- plynná složka kultivačního prostředí

Vedle kultivačních podmínek závisí růst také na vlastním explantátu:

- orgán, ze kterého byl explantát izolován
- fyziologické a ontogenetické stádium
- období odběru explantátu
- velikost explantátu
- kvalita donorové rostliny
- genotyp
- orientace explantátu
- předchozí působení na donorovou rostlinu
- inokulační hustota

Uvedené pořadí nepředstavuje v žádném případě pořadí důležitosti. Dnes se považuje za jeden z rozhodujících faktorů genotyp. Právě u explantátových kultur se však velmi názorně ukazuje vzájemná neoddělitelnost genetických a fyziologických zákonitostí.

3.1.5. Využití explantátových kultur (1)

- Alternativní příprava produktů získávaných dosud z rostlin v polní kultuře, předností je určení si vlastních podmínek, bez závislosti na ročním období, bez závislosti na počasí. Tyto produkty jsou homogenní, bez kontaminantů, hmyzu a chemikálií.
- Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách.
- Získávání nových látek při změně metabolismu explantátových rostlinných buněk. Tyto látky nebyly zjištěny v mateřských rostlinách.
- Produkty biotransformací, získávají se farmaceuticky významné látky.

3.1.6. Mikropropagace rostlin

Mikropropagace představuje způsob vegetativního množení rostlin s využitím explantátových kultur. Proti tradičním způsobům vegetativního množení má řadu výhod:

- Kultura se odvozuje z velmi malých částí rostlin a nevyžaduje se příliš prostoru.
- Rozmnožování se provádí ve sterilních podmínkách, a tím je zabráněno virovým a mikrobiálním nákazám.
- Podmínky množení jsou přesně definovány.
- Je možno produkovat druhy nebo klony rostlin, které se tradičními metodami vegetativního množení množí pomalu nebo vůbec.
- Rostliny je možno množit po celý rok bez závislosti na ročním období.
- Vzhledem k malé velikosti výchozího materiálu nejsou nároky na velké skleníkové plochy pro uchovávání matečných rostlin.
- Rostliny *in vitro* mezi pasážemi nevyžadují prakticky žádnou péči (1).
- Mikropropagace umožňuje zkrátit šlechtitelský cyklus a rychlé namnožení nově vyšlechtěných odrůd.

Mezi hlavní nevýhody patří relativně drahé laboratorní vybavení a poměrně vysoká pracnost metody, která zatím neumožňuje využití mechanizace. Další nevýhodou je poměrně drahý provoz laboratoře explantátových kultur (2).

Fáze mikropropagace (2)

1) Stádium 0 – výběr matečné rostliny a její příprava pro odběr explantátu

Je důležité znát původ matečné rostliny, která by měla být zdravá a pěstovaná v optimálních podmínkách. Odvození a růst explantátu je ovlivňován ročním obdobím, ve kterém je odebírán. Nejlepších výsledků je dosahováno, je-li explantát odebrán z rostliny v aktivní fázi růstu.

2) Stádium I – odvození aseptické kultury

Hlavním cílem tohoto stádia je odvodit sterilní primokulturu. To je spojeno s povrchovou dezinfekcí materiálu používaného jako explantát. Tento proces zahrnuje opláchnutí explantátu vodou a jeho povrchovou dezinfekci pomocí jednoho nebo více dezinfekčních činidel (chloramin B, chlorové vápno). Po dezinfekci je nutné dezinfekční roztok z explantátu odstranit opakovaným vypíráním ve sterilní

destilované vodě. Poté se explantáty umístí do kultivační nádoby na povrch média, popř. do média.

3) Stádium II – fáze proliferace explantátové kultury

Hlavním cílem je namnožení explantátu, primokultura je opakovaně pasážována na čerstvé médium. Tento proces trvá do dosažení žádaného počtu explantátů.

4) Stádium III – zakořeňování *in vitro*

Tato fáze představuje jednorázovou kultivaci prýtů. K zakořeňování je nutné použít jiné kultivační médium, které má odlišné složení a obsahuje jak cytokininy tak auxiny. U některých druhů se používá médium s nižším obsahem makro a mikroelementů. Kořeny se také lépe tvoří při kultivaci prýtů na můstcích z filtračního papíru. Důležitý vliv hraje i teplo a světlo. Teploty, které obvykle stimulují růst kořenů, se pohybují v rozmezí 25 - 28°C.

5) Stádium IV – zakořeňování *in vivo* a aklimatizace

V tomto stádiu dochází k zakořeňování prýtů v nesterilních podmínkách na substrátech, jiných než jsou kultivační média (např. směsi obsahující písek, rašelinu). Substrát by měl být slabě kyselý až neutrální a měl by mít vysokou vodní kapacitu, proto je někdy nutné používat směsi jednotlivých substrátů. Je také potřeba aklimatizovat rostliny na sníženou vlhkost a přechod na autotrofní způsob výživy.

Jelikož rostliny rostoucí v kultuře nemají vytvořenou dostatečně silnou kutikulu a mají velmi často nefunkční průduchy (tento jev je označován jako vitifikace), je nezbytná aklimatizace na sníženou vzdušnou vlhkost. Je to způsobeno vysokou vlhkostí v kultivačních nádobách a malou intenzitou světla.

Dalším problémem je přechod z heterotrofie na autotrofii. Pokud totiž probíhá v explantátech fotosyntéza, není hlavním zdrojem organického uhlíku, tím je médium. Listy rostlin rostoucích v explantátech mají odlišnou vnitřní stavbu a to jim znemožňuje intenzivní fotosyntézu. Proto jsou listy vzniklé v explantátových kulturách považovány spíše za zásobní orgány, které poskytují organické látky pro růst nových listů. Nově vzniklé listy jsou již schopné fotosyntézy a regulují výdej vody rostlinou.

3.1.7. Kalusová kultura

Kalus představuje soubor nediferencovaných buněk. Kalusové kultury mohou být embryogenní a non-embryogenní. Embryogenní kalusové kultury obsahují diferencované buňky, které mohou regenerovat celé rostliny přes proces zvaný somatická embryogeneze. Non-embryogenní kalusové kultury obsahují více či méně shluků nediferencovaných buněk, jsou používány pro produkci sekundárních metabolitů (7). U většiny dvouděložných rostlin je možné kalus odvodit z různých explantátů jako např. ze segmentu listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, vzrostných vrcholů, embryí atd. U jednoděložných rostlin je možné použít embrya, velmi mladé listy, nodální segmenty stonků či květní základy. Růst kalusu je indukován umístěním explantátu na médium s relativně vysokou koncentrací auxinu (1–10mg/l) v přítomnosti nižší koncentrace cytokininu. Kalus může být použit k odvození suspenzní kultury. Kalusová kultura s opakovanými pasážemi ztrácí morfogenní schopnost a stoupá u ní pravděpodobnost genetických změn (2).

3.1.8.Suspenzní kultura (2)

Suspenzní kultury rostlin představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybuujícím se tekutém živném médiu. Buňky suspenze mají díky tomu přímý kontakt s živným médiem, takže jednotlivé složky jsou rychle přístupné. Snadný přístup živin a také dobrá výměna dýchacích plynů v pohybuujícím se médiu umožňuje velmi rychlý růst suspenze. Při dlouhodobé kultivaci se suspenze stává heterogenní směsí, je to způsobeno genetickými změnami.

Pro získání suspenzní kultury je nezbytné nejprve odvodit kalusové pletivo. Suspenze se nejlépe tvoří z rozpadavého kalusu. Poté jsou kousky kalusu kultivovány na tekutém médiu na třepačce nebo rolleru. Při kultivaci na rolleru či třepačce se kultivační nádoby plní pouze z jedné pětiny až jedné čtvrtiny.

3.2. Fyziologie stresu

3.2.1. Stresová reakce a stresové faktory (5)

Rostliny jsou během svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Ty mohou nejen zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést i k jejich uhynutí.

Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu označujeme jako stresové faktory (stresory).

Přehled nejdůležitějších stresových faktorů, se kterými se rostliny setkávají v přírodě:

Abiotické faktory

- fyzikální
 - mechanické účinky větru
 - nadměrné záření (UV, viditelné)
 - extrémní teploty (horko, chlad, mráz)
- chemické

- nedostatek vody (sucho)
- nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
- nedostatek živin v půdě
- nadbytek iontů solí a vodíku v půdě
- toxické kovy a organické látky v půdě
- toxické plyny ve vzduchu

Biotické faktory

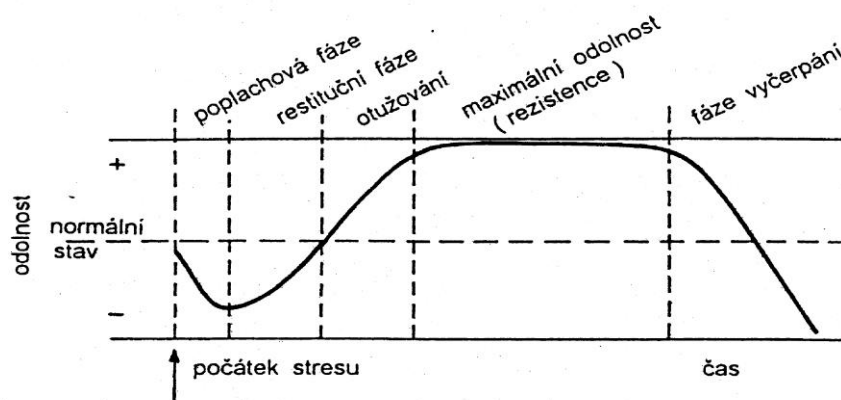
- herbivorní živočichové (spásání, poranění)
- patogenní mikroorganismy (viry, mikrobi, houby)
- vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus)

Stresové faktory, ať už fyzikálně-chemické či biotické, mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů nestejně snadno, a to především v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur. Tento způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter (např. tlustá kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn). Jedná se vlastně o schopnost vyhnout se stresu, ke které přispívají také vhodně načasované životní cykly.

Z fyziologického hlediska jsou mnohem zajímavější mechanismy aktivní odolnosti omezující negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn, který bývá označován jako stresová reakce.

Zjednodušeně můžeme popsat průběh stresové reakce:

- **poplachová fáze** – bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí
- **restituční fáze** – intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň a záhy dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů
- **fáze rezistence** – kompenzační mechanismy směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům
- **fáze vyčerpání** – při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru dochází k dalšímu poklesu



Obr.2. Idealizovaný průběh stresové reakce (podle Larchera 1995) (5).

Základní schéma průběhu stresové reakce však nevypovídá vůbec nic o rozmanitosti vlastního působení stresorů ani o koordinaci složitého komplexu reakcí, kterými je podložena odpověď rostliny na jejich působení.

Průběh stresové reakce a její konečný výsledek závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru na danou rostlinu, tak i na geneticky vázaných předpokladech odpovědi, souhrnně označovaných jako adaptační schopnosti.

Přechodné zvýšení odolnosti získané pod vlivem stresoru a nazývané jako aklimatizace může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých (tvorba specifických metabolitů), tak i na změnách trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře).

Studium stresu u rostlin rostoucích v přírodních podmínkách bývá komplikováno tím, že často více stresových faktorů působí současně (např. silné záření, vysoká teplota a nedostatek vody). Interakce mezi nimi mohou podstatně měnit charakter stresové reakce ve srovnání s působením každého faktoru odděleně. Působení stresorů bývá také často omezeno pouze na část rostliny, ve které dochází k lokální stresové reakci, ale ta může druhotně způsobovat stres i v ostatních orgánech.

3.2.2. Společné mechanismy stresových reakcí

Existují jisté výhrady o obecné stresové reakci rostlin, přesto byly nalezeny společné dílčí komplexy reakcí, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresům současně.

K nejčastějším společným změnám, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresovým faktorům současně, patří:

- tvorba stresových proteinů;
- tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku (viz. kapitola 3.2.6.);
- tvorba „stresových“ fytohormonů (kyseliny abscisové, ethylenu, kyseliny jasmonové, methyljasmonátu a polyamidů);
- tvorba osmoregulačních sloučenin (cukrů, polyalkoholů a jednoduchých dusíkatých látek) (5).

Tvorba stresových proteinů

Vlivem stresoru se začínají v buňce syntetizovat proteiny, které se za normálních okolností vůbec nedají v buňce zjistit. Tyto proteiny se nazývají stresové proteiny. Jen některé proteiny se vyskytují pravidelně i u jiných typů stresů, většina je specificky vázána na určitý stresový faktor.

Proteiny, jejichž syntéza je indukována nesespecificky (různými typy stresorů), můžeme rozdělit do tří funkčních skupin: molekulární chaperony, proteázy a ubikvitin. Jejich intenzivní tvorba souvisí se vzrůstem počtu poškozených proteinů v různých buněčných strukturách.

Chaperony slouží nejen k řízení změn konformace proteinů při transportech přes membrány, ale jsou schopny upravit jejich konformaci i při mírném poškození. Pokud ovšem dojde k velkým, nenapravitelným změnám, je takový protein „označen“ malou molekulou ubikvitinu a rozložen pomocí proteáz na aminokyseliny. Ty jsou pak využity k syntéze nových proteinů.

Nejdůležitější skupiny stresových hormonů jsou:

- proteiny indukované zvýšenou teplotou;
- proteiny indukované chladem;
- proteiny indukované dehydratací;
- proteiny indukované sníženou koncentrací kyslíku;
- proteiny indukované patogeny (5).

Tvorba stresových fytohormonů

Působením stresových faktorů se mohou vytvářet některé fytohormony (kyselina abscisová, ethylen, kyselina jasmonová, methyljasmonát a polyaminy).

Kyselina abscisová (dormin) je přirozeným inhibítozem růstu krytosemenných rostlin. Inhibuje klíčení, tvoří oddělovací vrstvy mezi řapíkem a stonkem, což vede k opadávání listů a řapíků. Urychluje stárnutí buněk a také brzdí dělení a růst buněk. Její působení ve stresových situacích je spojeno s indukci tvorby specifických proteinů, které chrání buňku před působením stresových podmínek.

Ethylen je přírodní regulátor zrání plodů, brzdí syntézu auxinu. Dále inhibuje prodlužovací růst a stimuluje růst radiální. Zvýšení tvorby ethylenu je jednou z prvních reakcí rostlin na působení stresoru.

Kyselina jasmonová a metyljasmonát urychlují stárnutí listových segmentů a důležitou úlohou je jejich funkce jako signál při reakci na dotyk, na patogeny a na poranění. Stoupá tím jejich obsah v buňce, který nese informaci o působení vnějšího faktoru.

Polyaminy stimuluje růst v systémech *in vitro*, ve kterých probíhá intenzivní buněčné dělení. Také stimuluje somatickou embryogenezi a iniciují kvetení. Hrají významnou úlohu v obraně proti stresům, a to díky jejich ochranným působením na membrány a na DNA (mohou ovlivnit její konformaci i expresi genů) (5,6).

3.2.3. Biotické stresy (5)

a) alelopatie

O alelopatii hovoříme tehdy, jestliže dojde k přenosu účinné látky z rostliny a dojde tak k ovlivnění sousední rostliny. Látky mohou na rostlinu působit inhibičně v některých případech až toxicky. Účinné látky musí být z jedné (zdrojové) rostliny vyloučeny a přeneseny na jinou (cílovou) rostlinu v dostatečné koncentraci. Zdrojová rostlina tedy musí být vůči účinné látce mnohem méně citlivá než rostlina cílová.

b) interakce s býložravými živočichy

Rostliny jsou neustále vystaveny nebezpečí poškození svých orgánů mnoha druhy živočichů. Existuje celá řada morfologických a morfogenetických adaptací k omezení tohoto poškození (např. ostré trny či trichomy). Kromě toho se setkáváme i s adaptacemi biochemickými. Mnohé sekundární metabolity syntetizované v rostlinách působí odpudivě či toxicky na živočichy. Tyto látky lze z hlediska množství výskytu rozdělit na kvalitativně významné a kvantitativně významné. Látky

kvalitativně významné se v rostlinách vyskytují v malých koncentracích, přesto jsou pro živočichy velmi toxické. Patří sem nejrůznější alkaloidy, glykosidy uvolňující kyanovodík, glukosinoláty a mnoho dalších. Mezi kvantitativně významné metabolity, které nejsou natolik toxické, ale vyskytují se ve větším množství, patří lignin, taniny a fenolické látky. Tyto látky způsobují špatnou stravitelnost, nechutnost až toxicitu.

c) reakce na patogenní organizmy

Rostliny mohou napadat také patogenní mikroorganismy (viry, bakterie, houby). Především patogenní houby disponují celou řadou velmi účinných lytických exoenzymů. Na počátku všech obranných reakcí je podnět k jejich spuštění, kterým bývá specifický metabolit (elicitor) uvolňovaný při počáteční interakci buňky s patogenem a identifikovaný vhodným receptorem hostitelské buňky. Jako elicitory mohou sloužit některé metabolity vylučované patogeny tzv. exogenní elicitory (např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy) a sloučeniny uvolňované z narušených buněčných stěn obou organismů tzv. endogenní elicitory (např. oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteidy uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub).

K obranným reakcím rostlin na patogeny můžeme zařadit tvorbu fytoalexinů, specifických nízkomolekulárních látek, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začínají se vytvářet až po napadení patogenem. Většina těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů a mohou tak poškodit membránové funkce. Působí toxicky hlavně na patogenní houby, méně na bakterie. Další obrannou reakcí je tzv. hypersenzitivní reakce. Při této reakci dochází k rozpadu membránového systému hlavně náhlým zvýšením koncentrace vysoce reaktivních volných radikálů a peroxidu vodíku. Dochází tak k rychlé zkáze vlastní buňky i houbové hyfy. Postupně odumírají i buňky v blízkém okolí místa infekce. Jiným typem obranné reakce je zvýšená tvorba polysacharidu kalózy, který vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa a je velmi odolný vůči houbovým hydrolýzám.

Navzdory těmto mechanismům existují silně virulentní kmeny hub, které snadno překonají ochranná opatření a to díky tvorbě specifických látek tzv. supresorů, které potlačují vznik ochranných metabolitů.

3.2.4. Příklady abiotických stresových faktorů (5)

a) Reakce na přehřátí

Při zvýšení teploty nad 40°C dochází u většiny druhů rostlin k zásadním změnám ve fyzikálně-chemických vlastnostech buněčných membrán i proteinů. Lipidová vrstva přechází do lamelárně kapalného (superfluidního) stavu, ve kterém nemůže plnit svoje základní funkce. Stává se propustnou pro ionty a přestává poskytovat dostatečně pevnou oporu pro membránové proteiny. Proteiny za vysoké teploty mění konformaci a dochází ke ztrátě jejich funkcí.

První postiženou membránou je tylakoidní membrána v chloroplastech. Indikátorem vznikajícího stresu je poškození fotosystému II, které lze zjistit měřením fluorescence chlorofylu *in vivo*. Jiná metoda k určení stupně odolnosti je mikroskopické pozorování buněk za postupného zvyšování teploty. Dosažení kritické teploty se projeví zastavením proudění cytoplazmy, a to v důsledku rozpadu cytoskeletu.

b) Stresové účinky nízkých teplot

Citlivost na chlad (nízké teploty nad bodem mrazu) vykazují zejména některé užitkové rostliny původem z teplejších oblastí, např. okurky, rajčata, papriky a kukuřice. Velmi citlivé na chlad jsou také květní orgány v raném stádiu vývoje a v průběhu gametogeneze, a to i u rostlin, jejichž vegetativní orgány na chlad citlivé nejsou. Vlivem nízkých teplot dochází ke změnám fyzikálně-chemických vlastností membrán. Volná propustnost membrán pro ionty vede ke ztrátě transmembránového potenciálu, k zastavení selektivního a aktivního transportu a k zastavení osmotických

procesů. Po jisté době tohoto stavu dochází k vyčerpání energetických zdrojů a k odumření buňky.

Poškození rostlin mrazem je obvykle spojeno s tvorbou ledu a s mrazovou dehydratací buněk. Led vytvořený uvnitř buněk způsobuje téměř vždy neobnovitelné poškození mnoha struktur a rychlé odumírání. V přírodních podmínkách je pokles teplot pozvolný, proto se led vyskytuje v buňce málokdy. Voda v mezibuněčných prostorech začíná mrznout při teplotách -1 až -3°C . Avšak ani při teplotách nižších, než je očekávaný bod tuhnutí, nemusí ještě nutně dojít k tvorbě ledu. Pokud nejsou přítomna vhodná krystalizační jádra, voda zůstává v tekutém podchlazeném stavu i do -38°C .

c) Vodní stres

Ze všech abiotických faktorů, které omezují růst a produktivitu rostlin, stojí na prvním místě nedostatek vody. Voda, na rozdíl od minerálních živin, má velmi rychlý koloběh v ekosystémech a její zásoba v rostlinách i v půdě stačí jen na poměrně krátkou dobu. Vzhledem ke složitým vztahům mezi množstvím vody v rostlině a v okolním prostředí nelze dosti dobře zavést jednoduché kritérium, podle kterého bychom hodnotili, jak velkému stresu z nedostatku vody je rostlina vystavena. Charakteristiky vycházející ze stavu vody v rostlině jsou proto spolehlivější než údaje o vodě v prostředí. Nejvíce postiženým orgánem jsou vždy listy.

Při poklesu vodního potenciálu na hodnotu $-0,2$ až $-0,8\text{MPa}$ dochází v buňkách k velmi podstatnému zvýšení koncentrace kyseliny abscisové, zejména v listech, kde má za následek zavírání průduchů. Při větším poklesu vodního potenciálu k hodnotám okolo $-1,0\text{MPa}$ dochází u mnoha druhů k tvorbě aminokyseliny prolinu. Hlavní význam této látky je zřejmě zvýšení osmotického tlaku v buňkách. Jestliže se vodní potenciál listů dále snižuje dochází k vážným metabolickým změnám. Pokud v této pokročilé fázi vodního stresu dojde k doplnění ztrát vody, všechny buněčné funkce se postupně vracejí do normálního stavu, i když tento návrat není okamžitý. V případě ještě delšího trvání nedostatku vody může silnou dehydratací dojít k tak vážným změnám, že odumření orgánu či celé rostliny je nevyhnutelné.

d) Nedostatek kyslíku v půdě

K tomuto nedostatku dochází, pokud je málo vzdušných pórů v půdě a navíc jsou úzké, jak tomu bývá u těžkých jílových půd nebo v důsledku zvýšeného obsahu vody v půdě. Jakmile koncentrace kyslíku v intercelulárách klesne pod 2 až 4 %, dochází k inhibici aerobních respiračních procesů. Přechod na anaerobní disimilační procesy má pro rostlinu vážné důsledky. Jednak se získávají těmito procesy pouze 2 molekuly ATP místo 32 molekul, a dalším nebezpečím jsou konečné produkty fermentace (etanol a kyselina mléčná). Na pokrytí normálních energetických potřeb musí rostlina spotřebovat větší množství organických látek, což brzy vede k jejich úplnému vyčerpání.

Kromě přímých účinků na rostliny vyvolává nedostatek kyslíku změny v samotné půdě. Příkladem je nečinnost nitrifikačních bakterií za nedostatku kyslíku. Většina přijatelného dusíku je proto ve formě amonných iontů, které mohou působit ve vyšší koncentraci na některé druhy rostlin inhibičně až toxicky.

e) Zasolené a kyselé půdy

Problémy, kterým rostliny musí čelit při růstu na zasolených půdách, jsou komplexní povahy. Kromě vlastního toxického vlivu vysoké koncentrace některých iontů (zejména Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} a Mg^{2+}) to bývá velmi nízký vodní potenciál a zhoršené fyzikální vlastnosti půdy. Dochází tak k zastavení dělivého i plouživého růstu a nakonec k odumření celé rostliny.

V kyselých půdách dochází k poklesu pH půdy jednak vstupem vodíkových iontů do půdy z kyselých srážek a také nevhodným způsobem obhospodařování. Přímé poškození rostlin je poměrně vzácné. Mnohem významnější je nepřímé působení vysokou koncentrací vodíkových iontů. Dochází ke zvýšení rozpustnosti některých sloučenin v půdě, zejména dochází k uvolňování vysoce toxických iontů hliníku, železnatých a manganatých iontů, které v nadbytku působí velice toxicky.

f) Toxické látky v prostředí

Oxid siřičitý vstupuje do listů hlavně otevřenými průduchy a difúzí v intercelulárách se snadno šíří ke všem buňkám listového mezofylu. Po proniknutí buněčnou stěnou se rychle rozpouští a mění na siřičitanové anionty, jejichž naprostá většina vstupuje do chloroplastů. Ve vyšších koncentracích blokuje činnost karboxylačního enzymu Rubisko, a tím je inhibován i průběh sekundárních procesů fotosyntézy.

Ozón vstupuje do listů výhradně průduchy a již v intercelulárách v kontaktu s vlhkými buněčnými stěnami se velmi rychle rozkládá. Při rozkladu ozónu vzniká nejen molekulární kyslík, ale jako meziprodukty i vysoce reaktivní superoxid a hydroxylový radikál, které jsou z části zneškodněny již v buněčné stěně přeměnou na peroxid vodíku a pak na vodu. Při vyšších koncentracích ozónu dochází k poškození buněčných součástí, nejvíce je postižena plazmalema a částečně i vnitřní membránový systém buněk a organely, včetně chloroplastů.

Toxické kovy (zejména zinek, olovo a kadmium) jsou velmi snadno přijímány kořeny. Po vstupu do buněk inaktivují některé enzymy a redoxní systémy. Dochází ke zpomalení růstu primárního kořene a k hromadění těžkých kovů v kořenech. Část toxických iontů se dostává i do nadzemních orgánů, kde nejvíce ovlivňuje fyziologické procesy v listech, v první řadě fotosyntézu.

3.2.5. Elicitace a elicitory

Za jednu z možností, jak získávat sekundární metabolity rostlin, je považována produkce pomocí *in vitro* kultur. V těchto kulturách však bývá biosyntéza těchto látek často nedostatečná, nebo je potlačena úplně. Ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů se používá řada metod, jako jsou například optimalizace kultivačního média, genetická manipulace, přidávání prekurzorů do média, a také elicítace (12).

Elicitace je proces, který využívá schopnosti rostlin a rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty celou řadou obranných reakcí. Díky těmto reakcím dochází ke zvýšené biosyntéze a kumulaci sekundárních látek (14).

Elicitor je specifický metabolit, který je podnětem ke spuštění obranných reakcí v postižené buňce. Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (označovaných také jako druzí poslové).

Velmi častým a neobyčejně rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je tvorba superoxidu. Vzniklý peroxid vodíku má kromě přímého účinku na expresi genů ještě účinek nepřímý, při kterém nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmonová a methyljasmonát a ty pak teprve ovlivňují transkripci. Také zvýšená tvorba ethylenu se podílí na iniciaci genové exprese (5).

K elicítacím se používají jak biotické elicitory (houby, bakterie, viry, kvasinky), tak abiotické elicitory (UV záření, soli těžkých kovů, kyselina trichloroctová, změny pH). Výhoda abiotických elicitorů spočívá v jejich definované chemické struktuře, v možnosti použití jejich přesné hmotnosti nebo objemu a jejich menší ekonomické náročnosti (8).

Příklady abiotických a biotických elicítací

Základním předpokladem úspěšné elicítace, která se využívá ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů, je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby působení elicitoru na rostlinnou kulturu *in vitro*. V kalusové a suspenzní kultuře *Rheum palmatum* L. byl sledován vliv 6, 24, 48 a 168 hodinového působení suspenzního roztoku mrtvých buněk *Pseudomonas aeruginosa* (v pěti koncentracích) na produkci anthracenových derivátů. Maximální obsah anthracenových derivátů, zjištěný fotometrickým stanovením podle ČSL 4, byl prokázán u kalusové kultury (1,03 %) po 24 hodinovém působení elicitoru (1,7 mg/baňku) a u suspenzní kultury (0,94 %) po 48 hodinovém působení elicitoru (0,0017 mg/baňku) (9).

V další práci byl testován vliv kyseliny jodoctové ve 4 různých koncentracích na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. Elicitor byl v kontaktu s kulturou po dobu 6, 24, 48, 72 a 168 hodin. Maximální zvýšení produkce flavonoidů v suspenzní kultuře nastalo při použití kyseliny jodoctové v koncentraci 1 mg/l, a to o 586 %. U kalusové kultury došlo k maximálnímu zvýšení tvorby flavonoidů při použití kyseliny jodoctové v koncentraci 10 mg/l a po 24 hodinách elicítace, obsah flavonoidů byl zvýšen o 529 % oproti kontrole (10).

Byl sledován vliv abiotických elicitorů – CuSO_4 a CdCl_2 na produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. po 24, 48 a 168 hodinové aplikaci. Testované elicitory ovlivňovaly výrazně produkci flavonoidů v této kultuře. Statisticky významný nárůst produkce flavonoidů byl zaznamenán při použití roztoku CdCl_2 v koncentraci 0,5 mg/l a koncentraci 0,05 mg/l po 48 hodinách kultivace, u koncentrace 0,005 mg/l po 24 i 48 hodinách kultivace. U roztoku CuSO_4 v koncentraci 0,5 mg/l po 48 i 168 hodinách. Nejvyšší nárůst hladiny flavonoidů byl zjištěn po elicítaci CdCl_2 v koncentraci 0,005 mg/l, kde se produkce zvýšila o 67 % oproti kontrole po 48 hodinách (8).

Byly také testovány manganaté (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 a 50 mM/l média), kobaltnaté a nikelnaté ionty (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200 a 500 μ M/l média) jako potenciální elicitory produkce kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Současně byla sledována toxicita těchto kovů pro kulturu hodnocením vlivu na růst (charakterizován čerstvou a suchou hmotností biomasy na konci čtrnáctidenní kultivace). Kultury byly kultivovány ve tmě a na světle. Bylo zjištěno, že růst kultur není ovlivněn manganem v koncentracích 0 až 2 mM, poté mírně klesá, při koncentraci 50 mM je o 20 % nižší při kultivaci ve tmě a o 30 % při kultivaci na světle ve srovnání s kontrolou. Kobalt v koncentracích 0 až 50 μ M neovlivňuje významně růst kultury, vyšší koncentrace snižují nárůst biomasy, výrazněji při kultivaci na světle (při 500 μ M Co o 60 %, ve tmě jen o 30 % ve srovnání s kontrolami). Nikl v koncentracích 0,1 až 200 μ M neovlivňuje růst, v koncentraci 500 μ M jej snižuje přibližně o 30 % ve srovnání s kontrolou při kultivaci na světle i ve tmě. Produkce kumarinů nebyla žádným kovem stimulována v porovnání s kontrolními kulturami. Pouze odstranění manganu z média v kultuře kultivované ve tmě zvýšilo produkci asi o 15 % oproti kontrole (11).

Byl testován vliv abiotického elicitoru – AgNO_3 v různých koncentracích na produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. Použití tohoto abiotického elicitoru se osvědčilo pro zvýšení produkce flavonoidů v kultuře *in vitro*. Maximální produkce bylo dosaženo po 24 hodinové elicitaci AgNO_3 v koncentraci 0,5 mg/l, kdy nastalo zvýšení o 934 % oproti kontrole (13).

V další práci byl sledován účinek dvou biotických elicitorů (homogenáty *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida utilis*) v suspenzní kultuře *Bellis perennis* L. kultivované za tmy a za denní světelné periody. Růst kultury nebyl působením elicitorů negativně ovlivněn. Zvýšení produkce flavonoidů v kultuře záviselo na druhu, koncentraci a době působení elicitoru a na způsobu kultivace z hlediska světelného režimu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo homogenátem *Candida utilis* po 24 hodinách při kultivaci za denní světelné periody a po 48 hodinách při kultivaci za tmy (15).

3.3. Fotooxidační stres a působení methylviologenu

Jedním ze společných mechanismů stresové reakce u rostlin je tvorba aktivních forem kyslíku.

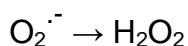
Aktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species)

Běžný molekulární kyslík v naší atmosféře je poměrně málo reaktivní, ovšem některými procesy v rostlinách může být přeměněn na mnohem aktivnější formy (singletový kyslík a superoxidový anion) či silně oxidační sloučeniny (hydroxylový radikál, peroxid vodíku).

Úloha těchto látek je rozmanitá. Vznikají jako nebezpečné produkty při působení řady stresových faktorů a rostliny musí mít účinné systémy na jejich deaktivaci. Na druhé straně mohou mít kladnou úlohu jako signály či ochranné látky při některých typech stresů a je tudíž žádoucí jejich koncentraci udržovat na jisté úrovni.

Tvorba aktivních forem kyslíku probíhá na prvním místě v chloroplastech, kde se soustřeďuje velké množství energie při absorpci záření asimilačními pigmenty a současně je v nich zvýšená koncentrace kyslíku z rozkládající se vody ve fotosystému II. K fotoredukci kyslíku může docházet především ve fotosystému I (Mehlerova reakce), produktem při Mehlerově reakci je superoxid, z něhož se mohou dále tvořit nebezpečnější hydroxylové radikály a peroxid vodíku. Zvýšení tvorby aktivních forem kyslíku je v chloroplastu dáno snížením rychlosti sekundárních procesů fotosyntézy vlivem nejrůznějších stresových faktorů (5).

Superoxid funguje jako oxidační i redukční činidlo. Je schopný reagovat a vytvářet další aktivní formy kyslíku. Enzym superoxidodismutáza, která se nachází v matrix chloroplastů a na tylakoidní membráně, dismutuje superoxid na peroxid vodíku, a to zvláště za mírně kyselého pH.



Když spolu reagují superoxid a peroxid vodíku dochází k reakci, kdy je produkována nejreaktivnější forma kyslíku – hydroxylový radikál. Tato reakce, známá pod jménem Haber-Weiss, však musí být katalyzována přeměnou kovových iontů, zejména železa a mědi (16).



V chloroplastu také může docházet k tvorbě singletového kyslíku za vysoké ozáření přenosem excitační energie z chlorofylu (v excitovaném tripletovém stavu) na kyslík v základním stavu (5). Absorpce dostatečného množství energie způsobí převrácení spinu jednoho z nepárových elektronů kyslíku. Biradikální forma kyslíku v tripletovém základním stavu po absorpci potřebné energie přejde do stavu singletového, ve kterém mají oba elektrony opačný spin. Vzniklý singletový kyslík je ve srovnání s molekulárním kyslíkem velmi reaktivní (16).

V mitochondriích může docházet k tvorbě superoxidu a následně i peroxidu vodíku autooxidací ubichinonu, zejména je-li transport elektronů běžnými cestami z ubichinonu na oxidázové systémy z nějakých důvodů zpomalen. Tvorba superoxidu byla dokázána také na membránách peroxizomů, glyoxyzomů a mikrozomů.

Negativní působení aktivních forem kyslíku spočívá především v peroxidaci lipidů. Nejvíce náchylné jsou membránové lipidy s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Poškozeny mohou být i některé aminokyseliny, proteiny a nukleové kyseliny. K oxidaci je zejména náchylný histidin, metionin, tryptofan a guanin.

Mechanismy ochrany před oxidačním poškozením:

- systémy přímé deaktivace: karotenoidy, α -tokoferol;
- specializované enzymy a enzymatické systémy: superoxidodismutáza, askorbát a glutation.

Protistresová úloha aktivních forem kyslíku je důležitá při napadení rostliny patogenem, regulovaná tvorba má i přímý antimikrobiální účinek, přispívá ke zpevnění buněčné stěny a tím má rostlina větší odolnost vůči stresorům (5).

Aktivní forma kyslíku	Lokalizace	Cílové místo
Singletový kyslík	Chloroplasty	Peroxidace membránových lipidů, destrukce chlorofylu

Superoxid	Chloroplasty, Mitochondrie, Peroxisomy, Buněčná stěna, Endoplazmatické retikulum, Glyoxyzomy, Plazmatická membrána	Destrukce chlorofylu, peroxidace membránových lipidů
Peroxid vodíku	Peroxisomy, Buněčná stěna, Apoplast	Inaktivace enzymů Calvinova cyklu
Hydroxylový radikál	Chloroplasty, Buněčná stěna	Všechna místa v buňce

Tabulka č.1. Lokalizace a cílová místa aktivních forem kyslíku (16).

Methylviologen

Methylviologen (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium; paraquat) je široce užívaný, neselektivní kontaktní herbicid. Methylviologen přijímá elektrony z fotosystému I. a následně inhibuje fotosyntézu. Jeho působením dochází k nárůstu aktivních forem kyslíku v buňce. Následkem tohoto působení dochází ke zvýšené peroxidaci lipidů a větší propustnosti membrán (17).

Bylo provedeno mnoho studií, ve kterých byl methylviologen používán jako zdroj ROS.

Bustos a kol. (18) ve své studii sledovali účinky enzymu glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy pod vlivem oxidačního stresu. Oxidační stres byl navozen přidáním methylviologenu do sazenic pšenice a kukuřice. Enzym glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza hraje klíčovou úlohu v energetickém metabolismu buňky, účastní se tvorby NADPH v cytosolu. Po přidání methylviologenu se jeho aktivita výrazně zvýšila.

Oracz a kol. (19) ve studii zkoumali vztah zvýšeného hromadění ROS na inhibici období klidu při zrání semen rostliny *Helianthus annuus* L. Byl prokázán vliv

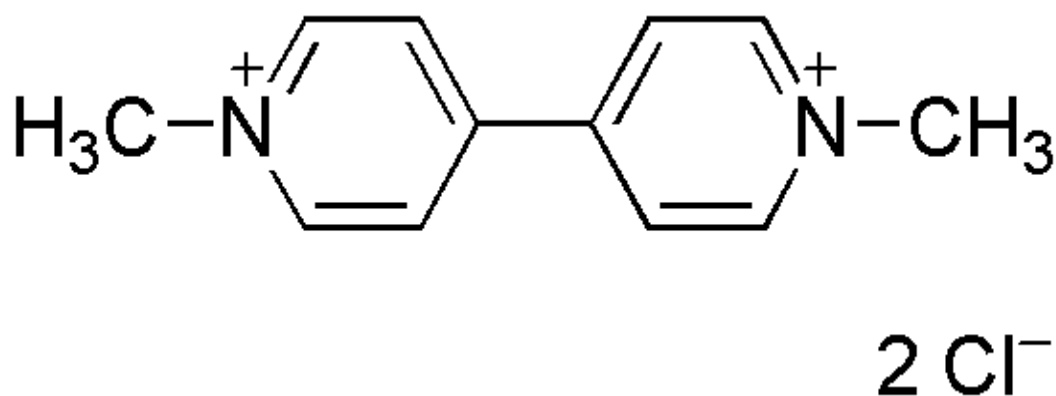
ROS při dozrávání semen. Jako zdroj ROS byl použit methylviologen. Inkubace spících semen společně s methylviologinem vedla k nahromadění ROS a tím k inhibici období klidu.

Marino a kol. (21) prokázal vliv ROS na inhibici fixování dusíku, které je v přírodě ovlivněno těžkými kovy a vodním stresem. Methylviologen byl aplikován do kořenů hrachu a byl sledován jeho vliv na fixaci dusíku sledováním rostlinné fyziologie. Po 96 h působení methylviologenu se zvýšilo množství ROS a došlo k poklesu fixace dusíku.

Durmus a kol. (32) ve své studii zjistili, že cytokinin benzyladenin má protektivní účinek vůči toxicitě způsobené methylviologinem. Účinek benzyladeninu byl zkoumán na listech kukuřice. Za normálních podmínek methylviologen snížil obsah chlorofylu v rostlině. Po přidání benzyladeninu k tomuto snížení nedošlo nebo bylo opožděno. Díky benzyladeninu mohou být rostliny lépe chráněny vůči oxidačnímu stresu.

Volkova a kol. (33) ve své studii zkoumali účinek steroidních glykosidů v buněčné kultuře *Solanum tuberosum* L. během oxidačního stresu. Ke tvorbě ROS byl použit methylviologen. Steroidní glykosidy zvýšily aktivitu peroxidáz a díky tomu byla snížena peroxidace lipidů vlivem ROS.

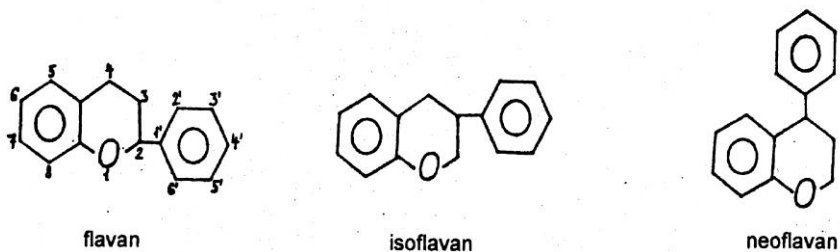
Mascher a kol. (34) ve své studii sledovali účinek 2-aminoethanolu na rostlinu *Hordeum Bulhare* L. Rostlina byla vystavena působení methylviologenu, který v ní zvýšil produkci ROS. Přidáním 2-aminoethanolu se zvýšila ochrana rostliny proti oxidačnímu stresu, 2-aminoethanol zvýšil produkci superoxid dismutázy a katalázy.



Obr.3. Vzorec methylviologenu (20).

3.4. Flavonoidní glykosidy

Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem struktury je chroman arylovaný v poloze 2(flavany), 3(isoflavany) nebo 4(neoflavany).



Obr.4. Strukturní vzorec flavanu, isoflavanu a neoflavanu (22).

Flavany jsou v přírodě hojně rozšířeny v cévnatých rostlinách. Zvláště významné jsou flavonoidy (deriváty 4-oxoflavanu) – flavony, flavonoly a flavanoly. Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin.

Flavonoidy se v rostlinách vyskytují převážně glykosidně vázané a rozpuštěné v buněčné šťávě vakuol. Methoxylované deriváty jsou lipofilní a vyskytují se v silicích. V rostlinném organismu se flavonoidy patrně účastní oxidačně redukčních pochodů.

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemorhagicky a antiedematózně. Jsou inhibitory hyaluronidázy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi. Používají se jako diuretika, antihypertenziva a při léčení infekčních nemocí. Mají také vlastnosti choleretické, cholagogní a spasmolytické. Účinné jsou jak glykosidy tak aglykony (22). Také byly zjištěny účinky antioxidační, kancerostatické a kardioprotektivní. Na druhé straně jsou známy i informace o možném toxickém efektu některých flavonoidů (7).

3.5. *Fagopyrum esculentum* Moench.

Popis

Pohanka obecná (Fagopyrum esculentum) Moench. je rostlina dvouděložná, patří do čeledi rdesnovitých (Polygonaceae) (24). Jednoletá 50 až 140 cm vysoká bylina. Lodyha přímá, často červeně zbarvená, nevětvená nebo je málo větvená. Listy řapíkaté, jen horní přisedlé, čepel trojúhelníkovitá, na bázi srdčitá až střelovitá, botka malá, jen asi 5 mm dlouhá. Květy jsou uspořádány ve svazečcích, které skládají květenství podobná hroznům, jednotlivé květy jsou oboupohlavní, 5četné, bílé nebo růžové, tyčinek je 8, pestík 1, čnělky 3. Plodem je tmavě hnědá, 3hranná nažka (26). Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky lodyhy a čepele listu, na plošném pohledu buňky lodyhy tvořené buňkami protáhlými, na zevní straně buňkami rýhovanými z čepele listu s mnohohrannými buňkami

s četnými anomocytickými průduchy, četné drúzy šťavelanu vápenatého, malé hranolovité krystaly šťavelanu vápenatého roztroušené v mezofylu listu (23).

Obsahové látky

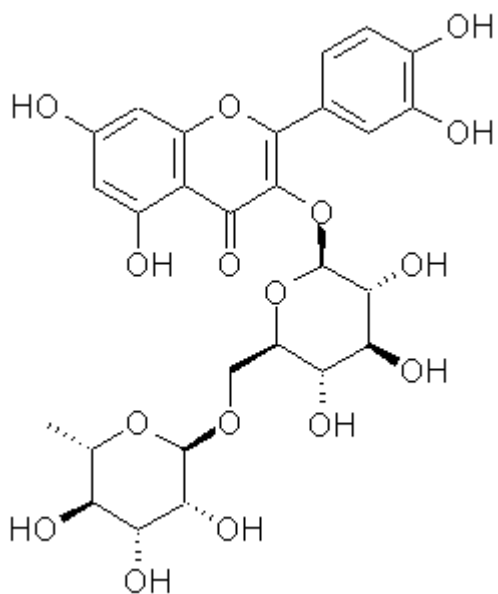
Pohanka obsahuje flavonoidy rutin, isoorientin, orientin a vitelin (24). Rutin (quercetin-3-rutinosid) je nejvíce akumulován v květenství (nad 12%), ve stoncích (0,4 – 1%) a v horních listech (8 – 10%) (25). V plodech nacházíme komplex vitamínů skupiny B, vitamín E a řadu prvků, hlavně draslík, fosfor, hořčík, vápník a ve stopách železo, měď, mangan a zinek. Pohanka také obsahuje cholin a pohankové nažky řadu plnohodnotných bílkovin. Hlavní fenolické látky ve slupkách a mouce pohanky jsou rutin, 2-epikatechin, hyperosid a kvercetin (24).

Droga

V Českém lékopisu (ČL) 2005 je jako droga uvedena *Fagopyri herba*, je to celá nebo nařezaná nať sbíraná v časně fázi kvetení a ihned sušená. Droga obsahuje nejméně 4,0 % rutinu, což je počítáno na vysušenou drogu (23).

Použití

Pohanková nať se podává pro zvýšení pevnosti a pružnosti cévních stěn. Využívá se při léčbě křečových žil, hemeroidů, bércových vředů, ale i při poruchách prokrvení končetin, charakterizovaných červenými nitkami a také jako prevence proti praskání cév uvnitř organismu. Nažky se léčebně využívají ke snižování cholesterolu, při chorobách střev a k detoxikaci organismu. Pohanka se také využívá při artritidách a má posilující účinek na imunitní systém (24).



Obr.5. Vzorec rutinu (27).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Přístroje a vybavení

- Analytické váhy Sartorius PRLT A 1
- Autokláv P S 20 A, Chirana
- Autosampler Jasco AS-2055 Plus
- Box s laminárním prouděním Fatran LF
- Diodový detektor Jasco MD-2015
- Horkovzdušný sterilizátor, Chirana SVS9/1

- Kolona Li Chrospher RP-18 125-4, sorbent Li Chrospher 5 μ m
- Mikrofiltry (0,45 μ m), Tessek
- Předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5 μ m
- Pumpa Jasco PU-2089 Plus
- Sušárna HS 61A Chirana
- Termostat kolony Jetstream 2 Plus
- Těsnění na vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc
- Třepačka UNIMAX 2010, Heidolph Instruments
- Vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc
- Vodní lázeň, typ 1042, GFL
- Ultrazvuk Bandelin Sonorex RK100H

4.2. Chemikálie a pomocné látky

- Acetonitril R
- Ajatin
- Destilovaná voda R
- Ethanol 96%
- Kyselina fosforečná R
- Methanol R
- Methylviologendichlorid hydrát

- Rutin R

4.3. Biologický materiál

K vypracování diplomové práce jsem použila tkáňovou kulturu odvozenou z kořenové části klíčící rostliny *Fagopyrum esculentum* Moench. v 11. – 20. pasáži.

4.4. Složení a příprava živného média

Ke kultivaci bylo použito živné médium připravené dle Murashigeho a Skooga ve složení (28):

	mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00
KNO ₃	1900,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00
NH ₄ NO ₃	1650,00
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,00
FeSO ₄	27,84

Na ₂ EDTA	37,31
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,50
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,830
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Inozitol	100,00
Hydrolyzát kaseinu	1000,00
Glycin	2,00
Kyselina nikotinová	0,50
Pyridoxin	0,50
Thiamin	0,10
Sacharóza	30000,00

Množství výše uvedených substancí je vyjádřeno v miligramech na litr živné půdy. Substance byly odváženy na analytických vahách, látky používané v malých množstvích se pipetovaly z koncentrovaných zásobních roztoků. Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě v odměrné baňce na 1000,0 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku. Jako stimulant růstu byl použit roztok kyseliny dichlorfenoxyoctové (2,4-D) v množství 10 mg na litr živného média.

4.5. Kultivace kultur

Kalusové kultury byly kultivovány ve 100 ml Erlenmayerových baňkách předem umytých horkou vodou se saponátem, vypláchnutých pitnou a destilovanou vodou a vysušených v horkovzdušném sterilizátoru při 200°C. Živné médium s růstovým regulátorem bylo rozplněno do vysterilizovaných baněk, do každé baňky se odměřilo 30 ml média. Po uzavření hliníkovou folií byly baňky sterilizovány v autoklávu 15 min při 121°C a 100kPa. Takto připravené půdy se mohly použít pro pasážování tkáňových kultur.

Pasážování se provádělo 30-tý den kultivace kultury v boxu s laminárním prouděním vzduchu, který byl předem vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vysvícen

germicidní lampou. Poté se vždy přenesla část kalusu z předchozí kultivace na můstek z filtračního papíru do vysterilizovaných Erlenmayerových baněk, před pasáží byl omyt také hliníkový kryt baněk.

Kultivace kultury probíhala po dobu 4-5 týdnů za teploty 25°C a osvětlení s 16-ti hodinovou světelnou periodou.

Suspenní kultura se získala z kalusové kultury mechanickým rozmělněním kalusu. Byla kultivována ve stejném médiu po dobu dvou týdnů na třepačce (120 ot/min) za stejné teploty a osvětlení jako kalusová kultura.

4.6. Příprava roztoků elicitoru

Jako elicitor byl použit methylviologendichlorid dihydrát ve třech koncentracích a to: 10,0 mg/100ml; 1,0 mg/100ml; 0,1 mg/100ml.

Navážka čisté substance dané látky (25,00 mg) byla kvantitativně přenesena do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněna 96% ethanolem po rysku. Takto byla připravena koncentrace c_1 .

Odpipetováním 10 ml tohoto roztoku do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněním rozpouštědlem po rysku byla získána koncentrace c_2 .

10 ml z roztoku c_2 bylo přeneseno do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněno rozpouštědlem po rysku, takto byla získána koncentrace c_3 .

Všechna ředění roztoků elicitoru byla prováděna za podmínek aseptické práce v boxu s laminárním prouděním vzduchu předem vysvíceném germicidní UV lampou. K přípravě roztoků bylo používáno sterilní sklo a nástroje.

Koncentrace připravených roztoků methylviologenu:

$$c_1 = 10,0 \text{ mg/100ml (} 2,1929 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l)}$$

$$c_2 = 1,0 \text{ mg/100ml (} 2,1929 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l)}$$

$$c_3 = 0,1 \text{ mg/100ml (} 2,1929 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l)}$$

4.7. Elicitace *in vitro* kultur

Elicitace kalusových kultur byla prováděna po 4 – 5 týdnech kultivace kultury a elicítace suspenzních kultur po 2 týdnech od poslední pasáže. Ke vnášení roztoku elicitoru byly použity sterilní pipety, práce probíhala za aseptických podmínek.

K elicítaci bylo použito celkem 35 baněk pro každou koncentraci elicitoru. Do všech baněk byl přidán 1 ml roztoku elicitoru dané koncentrace. Baňky byly rozděleny do šesti skupin, a to podle doby odběru. Kalusy byly odebírány v šesti časových intervalech od aplikace elicitoru po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách.

Stejný postup byl použit za identických podmínek i u suspenzních kultur.

Jako kontrola byla zvolena kalusová a suspenzní kultura pěstovaná bez přídavku elicitoru.

Kalusy se po vyjmutí z baněk sušily na filtračním papíru za laboratorní teploty. Suspenzní kultury byly přefiltrovány přes filtrační papír. Papír se zachycenými shluky byl sušen opět za laboratorní teploty.

Usušené kalusy a buněčné shluky byly pomocí třenky s těrkou upráškovány a použity ke stanovení obsahu rutinu.

Bylo sledováno i vylučování metabolitů do živného média. Vzorke média nebyly odebírány pravidelně. Odebrané médium (6 ml) bylo odpařeno na vakuové odparce a získaný odparek byl rozpuštěn v 10 ml methanolu a analyzován.

4.8. Stanovení obsahu rutinu

Princip stanovení:

Vysokouúčinná kapalinová chromatografie High – Performance Liquid Chromatography (HPLC) je separační metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi (23).

Tato metoda využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi, z nichž mobilní fází je kapalina, která prostupuje stacionární fází naplněnou do kolony. K separaci tedy dochází na základě různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi. Detekce probíhá až za kolonou vhodným detektorem. Základní kvalitativní charakteristikou je retenční čas, což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Kvantitativní charakteristikou je plocha (ebeny. výška) chromatografického píku (29).

Parametry analýzy (23):

HPLC analýza byla prováděna na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonovým filtrem a kolonou Li Chrospher RP-18 125x4 (5 µm) s ochrannou předkolonkou.

Porovnávací roztoky:

- a) 25,0 mg rutinu R se rozpustilo v roztoku methanolu R 80% a zředilo jím na 50,0 ml;
- b) 25,0 ml roztoku (a) se doplnilo methanolem R 80% na 50,0 ml;
- c) 25,0 ml roztoku (b) se doplnilo methanolem R 80% na 50,0 ml;
- d) 25,0 ml roztoku (c) se doplnilo methanolem R 80 % na 50,0 ml.

Byla sestavena kalibrační křivka, ze které se následně vypočítal obsah rutinu v procentech.

Kolona:

- rozměry: délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm);
- teplota: 30°C.

Mobilní fáze:

- mobilní fáze A: směs objemových dílů acetonitrilu R a vody R (50 + 950), jejíž pH se upravilo kyselinou fosforečnou na hodnotu 2;
- mobilní fáze B: směs objemových dílů vody R, jejíž pH se upravilo kyselinou fosforečnou R na hodnotu 2 a acetonitrilu R (95 + 905).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0 – 6	94	6
6 – 16,5	94→85	6→15
16,5 – 22	85→76	15→24
22 – 25	76→59	24→41
25 – 27	59→94	41→6

Průtoková rychlost: 1,0 ml/min.

Detekce: Spektrofotometrický detektor, 350 nm.

Objem nástřiku: 20 μ l.

Standard: Rutin.

Postup stanovení:

Ke stanovení obsahu rutinu byla použita metoda uvedená v ČL 2005.

Usušené vzorky kalusů a suspenzních kultur byly po rozdrobnění v třecí misce smíchány s 10 ml methanolu R 80% a zahřívány 30 min ve vodní lázni při 60°C. Pak se provedla filtrace přes vatu a vata byla extrahována s 5 ml methanolu R 80% 15 min v ultrazvukové lázni. Opět se zfiltrovalo přes vatu a jednotlivé filtráty byly přeneseny do odměrné baňky na 20,0 ml a doplněny methanolem R 80% po rysku.

Poté byly vzorky filtrovány přes mikrofiltr (0,45 μ m), asi 1,7 ml roztoku bylo převedeno do vialek a vzorky byly analyzovány metodou HPLC.

Vzorky média byly nejprve vysušeny na vakuové odparce. Poté byly rozpuštěny v 10 ml methanolu R 80% a zfiltrovány do vialek a analyzovány metodou HPLC.

4.9. Stanovení ztráty sušením

Do tří předem vysušených váženek se na analytických vahách odvážilo přesně 1,000 g vzorku a sušilo se 2 hodiny v sušárně při 100 až 105°C. Vysušené vzorky na váženkách byly uchovány v exsikátoru do vychladnutí a poté byly zváženy na analytických vahách. Hmotnost sušiny byla vztažena na hmotnost vzorku a vyjádřena v procentech (23).

Byl vypočítán aritmetický průměr těchto tří měření.

4.10. Statistické zpracování výsledků

Směrodatná odchylka je veličina, která vyjadřuje, jak se hodnoty liší od průměrné (střední) hodnoty.

Funkce směrodatné odchylky je definovaná vztahem (30):

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

s – směrodatná odchylka

x – hodnota sledované veličiny

\bar{x} – průměrná hodnota sledované veličiny

n – počet členů souboru

Ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah rutinu byl použit t-test rozdílu dvou průměrů.

Pro testovací kritérium platí vztah:

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

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

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení se stupněm volnosti vypočteném podle vzorce:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Vypočtená hodnota testovacího kritéria 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 (31).

Pro zjištění obsahu rutinu byla provedena vždy 3 paralelní stanovení, proto počet členů souboru je $n_1 = n_2 = 3$, počet stupňů volnosti $v = 4$. Pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ a pro 4 stupně volnosti je tato kritická hodnota testovacího kritéria $t(v)p$ rovna 2,78. Výsledky jsou statisticky významné je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než kritická hodnota (30,31).

Pro výpočet hodnot testovacího kritéria pro odběry po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hod byla použita kontrolní hodnota odběru po 0 hod působení elicitoru.

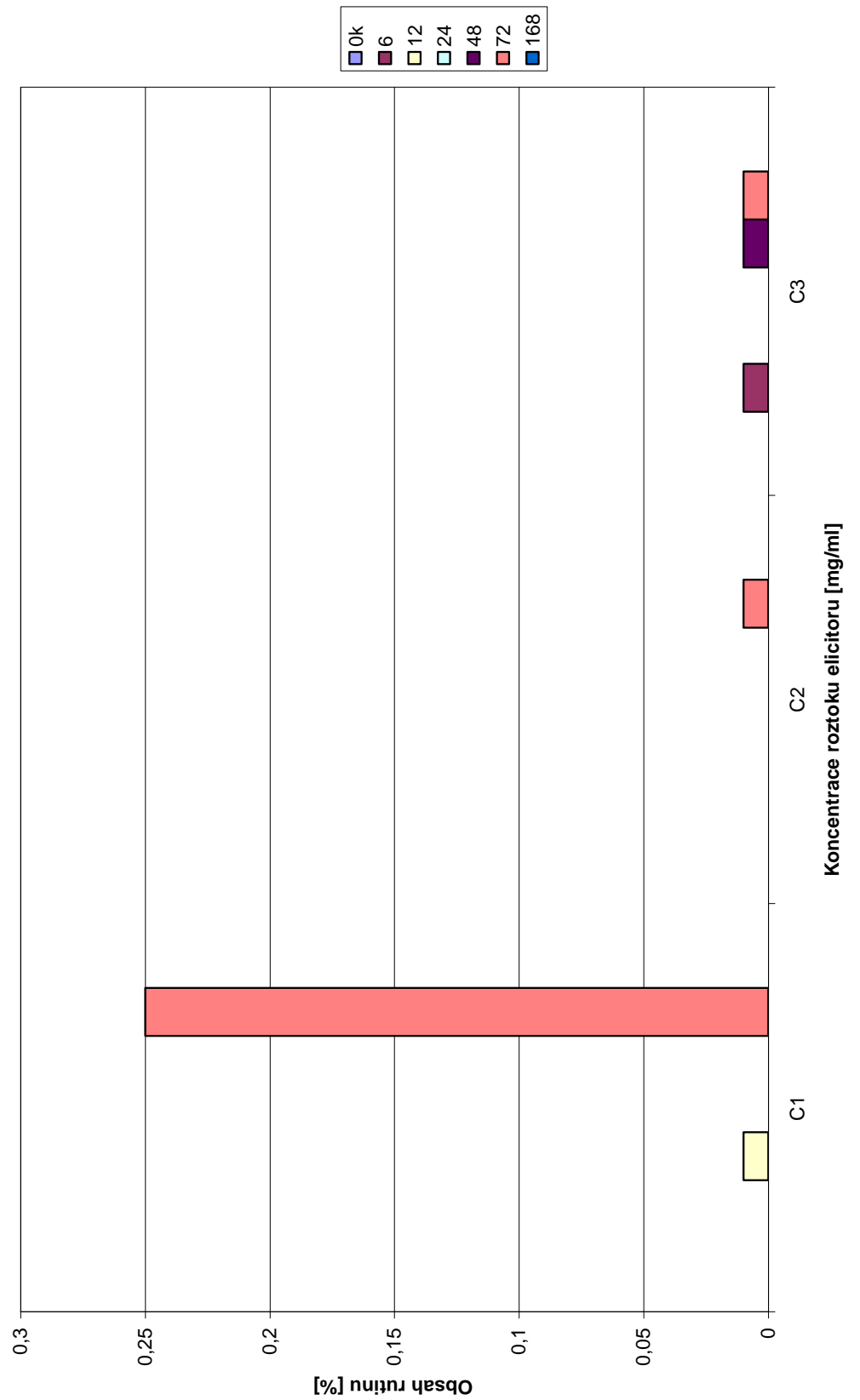
5. VÝSLEDKY

Tabulka č.2. Obsah rutinu v závislosti na čase v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. po elicitaci roztokem methylviologenu o různé koncentraci.

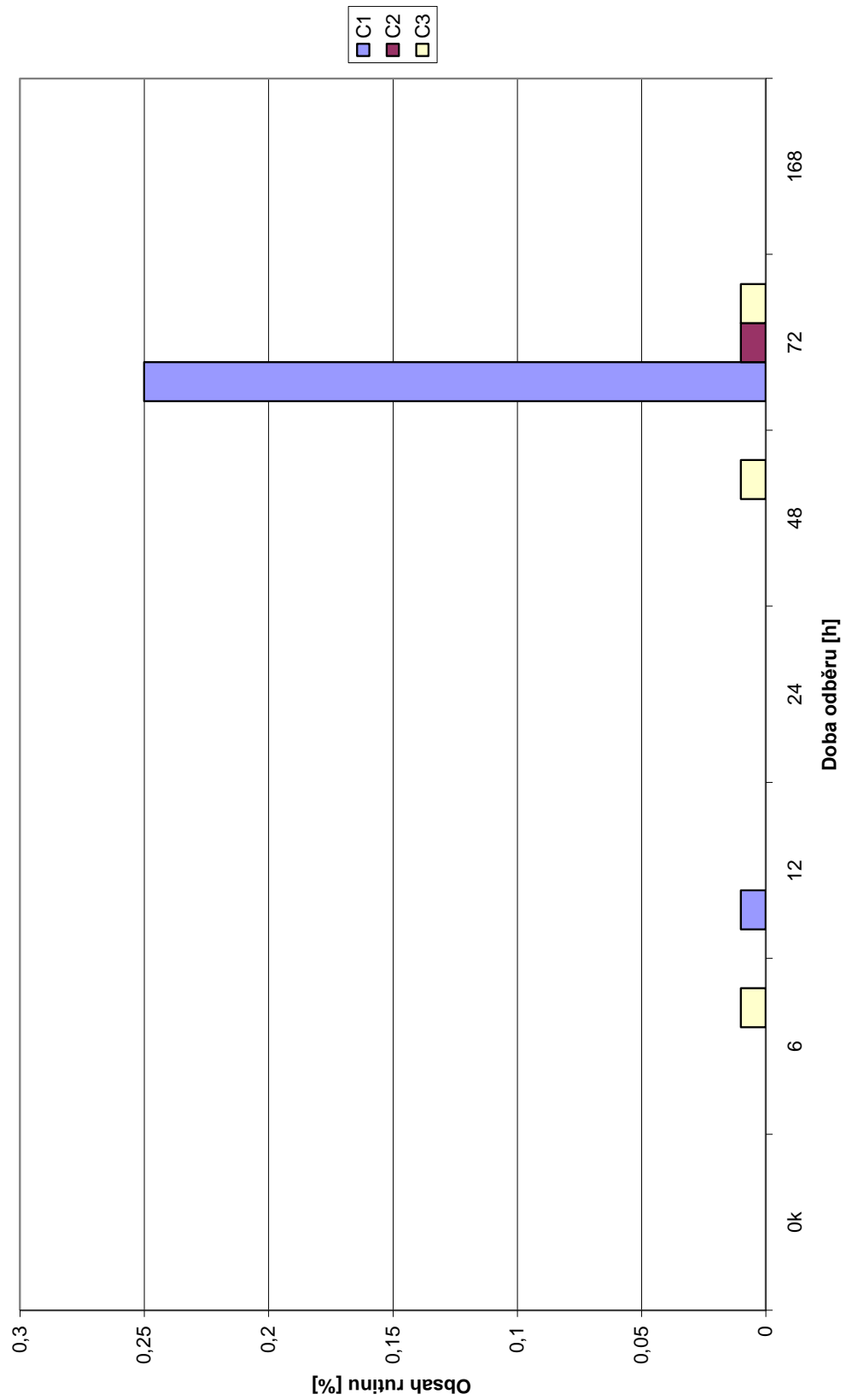
Koncentrace elicitoru [mg/l]	Hodina odběru	Obsah rutinu [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C ₁	0k	0	0	-
	6	0	0	0
	12	0,01	0,003	4,71
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0,25	0,004	88,37
	168	0	0	0
C ₂	0k	0	0	-
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0

	72	0,01	0,003	4,71
	168	0	0	0
	0k	0	0	-
	6	0,01	0,003	4,71
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0,01	0,002	7,07
	72	0,01	0,003	4,71
	168	0	0	0
C₃				

Pozn.: k = kontrola



Graf č.1. Obsah rutinu [%] v závislosti na koncentraci roztoku elicitoru v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench.

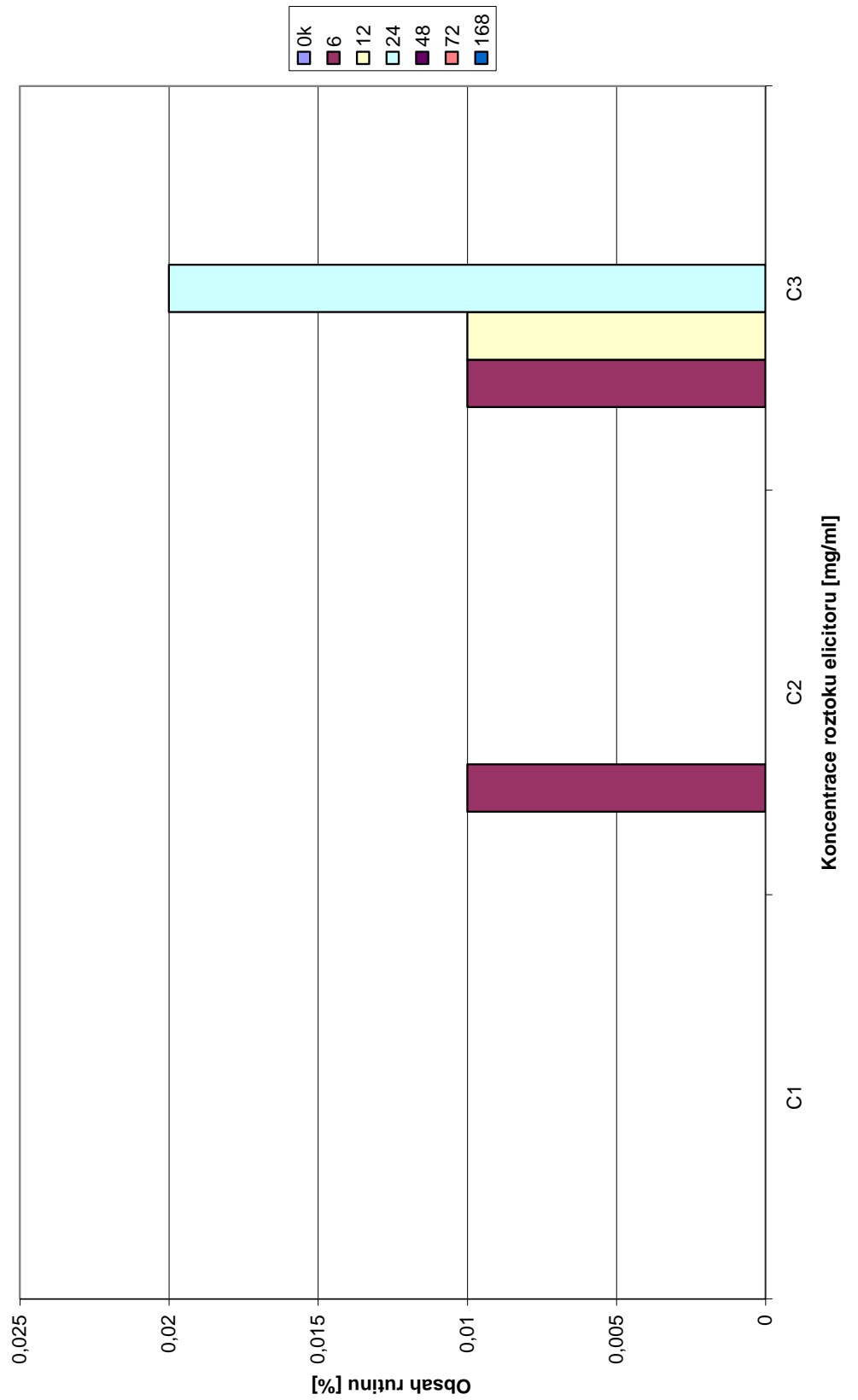


Graf č.2. Obsah rutinu [%] v závislosti na době odběru v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench.

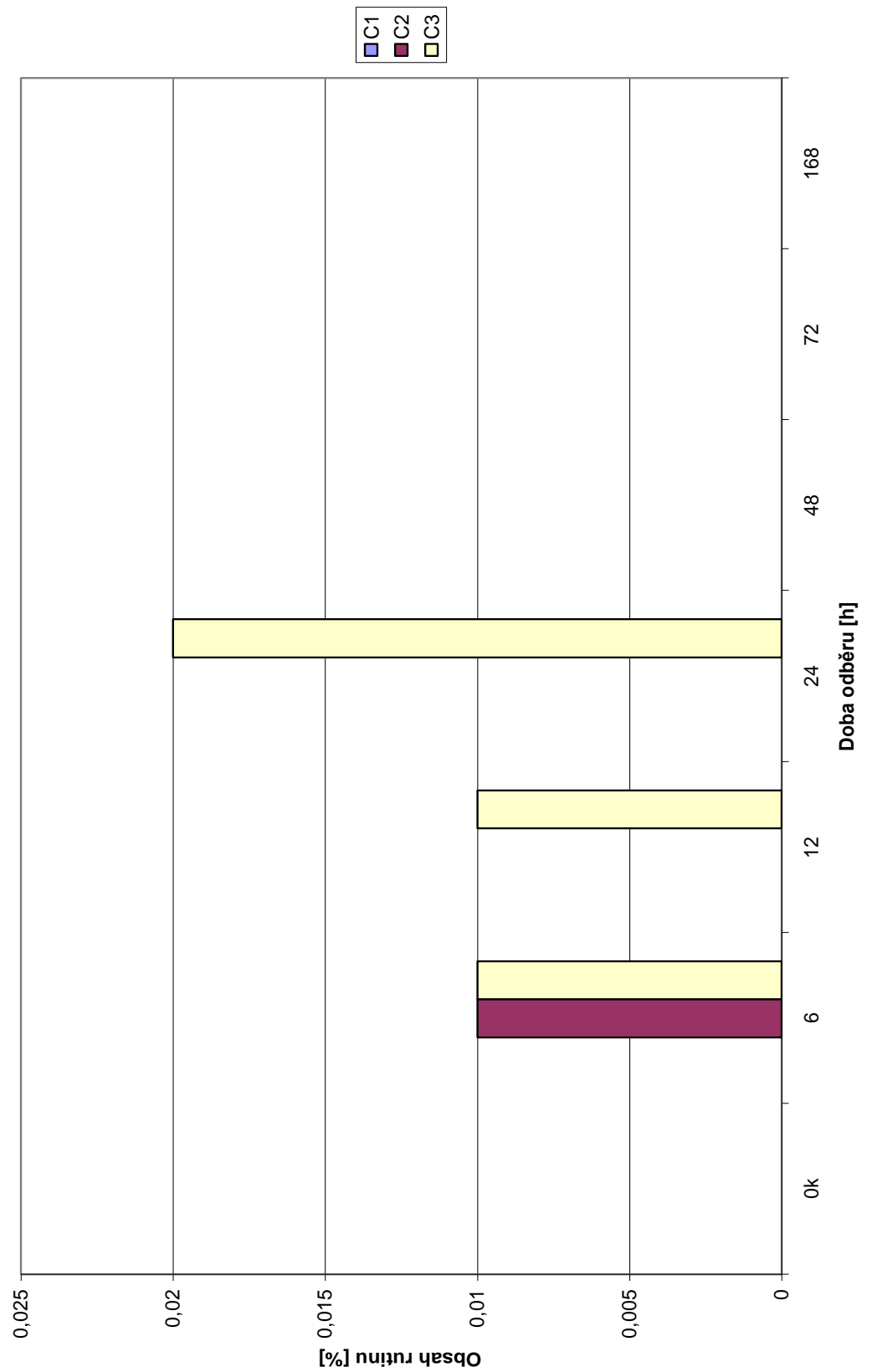
Tabulka č.3. Obsah rutinu v závislosti na čase v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. po elicitaci roztokem methylviologenu o různé koncentraci.

Koncentrace elicitoru [mg/l]	Hodina odběru	Obsah rutinu [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C ₁	0k	0	0	-
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
C ₂	0k	0	0	-
	6	0,01	0,002	7,07
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
C ₃	0k	0	0	-
	6	0,01	0,003	4,71
	12	0,01	0,003	4,71
	24	0,02	0,001	28,28
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0

Pozn.: k = kontrola

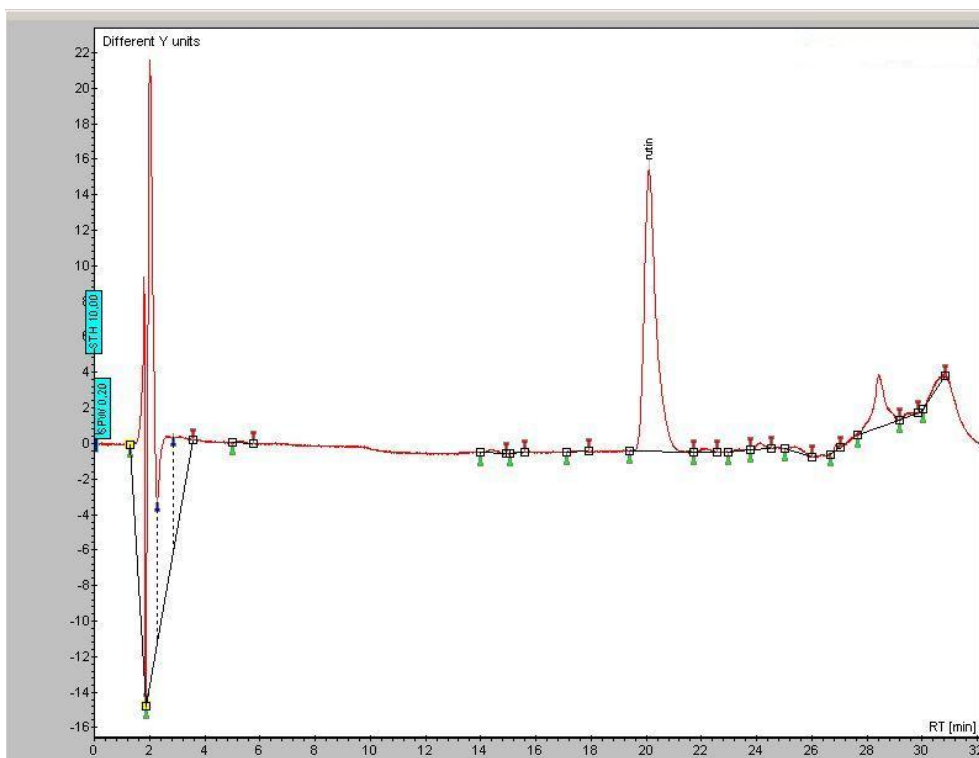


Graf č.3. Obsah rutinu [%] v závislosti na koncentraci roztoku elicitoru v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench.

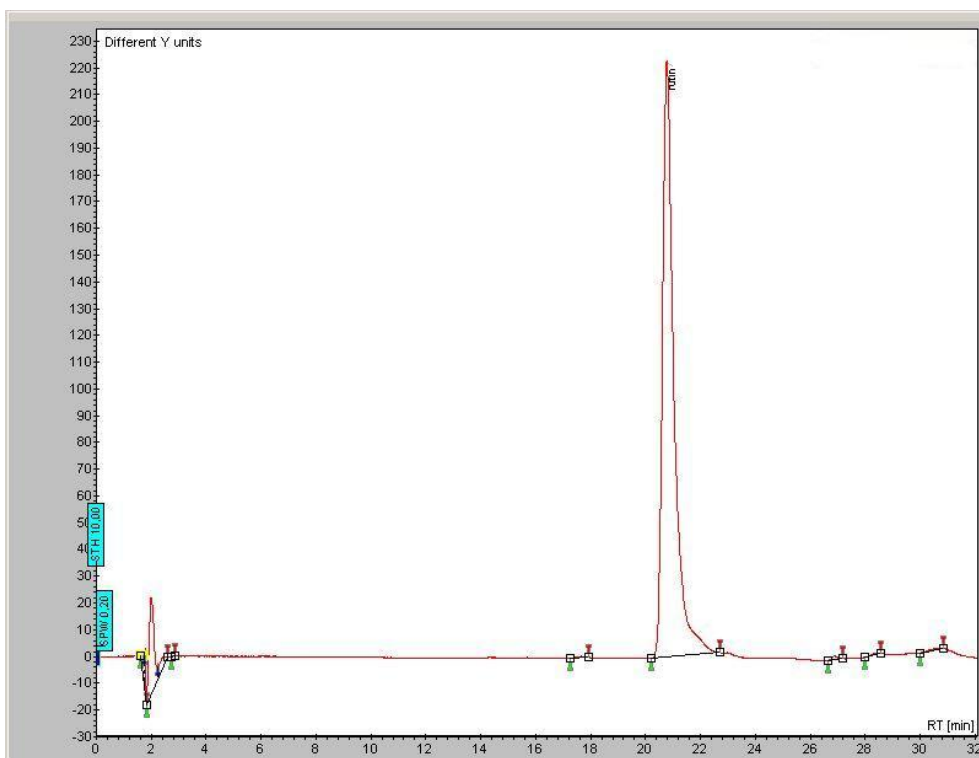


Graf č.4. Obsah rutinu [%] v závislosti na době odběru v suspenzi kultury *Fagopyrum esculentum* Moench.

Obr.6. HPLC chromatogram standardu rutinu



Obr.7. HPLC chromatogram vzorku kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* Moench.



6. DISKUZE

Za jednu z možností, jak ovlivnit produkci sekundárních metabolitů rostlin, je považována produkce pomocí *in vitro* kultur. V *in vitro* kulturách však bývá biosyntéza těchto látek často nedostatečná, nebo je potlačena úplně. Ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů se jako jedna z metod využívá elicitace (12).

Elicitace využívá schopnosti rostlin a rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty celou řadou obranných reakcí, díky nimž dochází ke zvýšené biosyntéze sekundárních látek (14).

Základním předpokladem úspěšné elicitace je nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby působení elicitoru na rostlinnou kulturu *in vitro* (9).

Cílem mé práce bylo stanovit obsah sekundárních metabolitů – flavonoidů, produkovaných kulturou *Fagopyrum esculentum* Moench., která byla kultivována na médiu podle Murashigeho a Skooga s přidavkem 10 mg/l kyseliny dichlorfenoxyoctové, po působení abiotického elicitoru – methylviologenu. Elicitor jsem dodávala ke kalusové kultuře kultivované na papírových můstcích sycených živným médiem a k suspenzní kultuře kultivované na třepačce, ve třech různých koncentracích:

$$c_1 = 10,0 \text{ mg}/100\text{ml} \left(2,1929 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} \right)$$

$$c_2 = 1,0 \text{ mg}/100\text{ml} \left(2,1929 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \right)$$

$$c_3 = 0,1 \text{ mg}/100\text{ml} \left(2,1929 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l} \right)$$

Vliv elicitoru byl sledován v šesti časových intervalech: 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin.

Pro stanovení obsahu rutinu v kalusové a suspenzní kultuře byla zvolena metoda HPLC podle ČL 2005.

Kalusová kultura

Ke statisticky významnému zvýšení obsahu rutinu došlo po aplikaci roztoku elicitoru v koncentraci c_1 po 12 a 72 hodinách; v koncentraci c_2 po 72 hodinách; v koncentraci c_3 po 6, 48 a 72 hodinách (viz. Tab. č.2, graf č.1).

Kalusová kultura (bez přídavku elicitoru) v 11. – 15. pasáži už rutin neprodukovala. Působením methylviologenu došlo k ovlivnění a zvýšení produkce rutinu kalusovou kulturou.

Všechny tři koncentrace elicitoru způsobily maximální produkci rutinu po 72 hodinách elicítace. Nejvyšší nárůst obsahu rutinu (0,25 %) nastal po působení roztoku elicitoru o koncentraci c_1 po 72 hodinách, kde produkce rutinu vzrostla 25x oproti hodnotám získaným po aplikaci roztoku elicitoru v koncentraci c_1 po 12 hodinách; v koncentraci c_2 po 72 hodinách a v koncentraci c_3 po 6, 48 a 72 hodinách, v těchto koncentracích byl zjištěn obsah rutinu 0,01 %.

Suspenzní kultura

Po aplikaci roztoku elicitoru byl obsah rutinu statisticky významně zvýšen u koncentrace c_2 po 6 hodinách a u koncentrace c_3 po 6, 12 a 24 hodinách (viz. Tab. č.3, graf č.3).

Suspenzní kultura (bez přídavku elicitoru) v 16. – 20. pasáži opět neprodukovala rutin. Působením methylviologenu došlo k ovlivnění a zvýšení produkce rutinu suspenzní kulturou.

Maximální produkci rutinu (0,02 %) způsobil roztok elicitoru o koncentraci c_3 po 24 hodinách, kde produkce rutinu vzrostla 2x oproti hodnotám získaným po aplikaci roztoku elicitoru v koncentraci c_2 po 6 hodinách a v koncentraci c_3 po 6 a 12 hodinách, v těchto koncentracích byl zjištěn obsah rutinu 0,01 %.

Kalusová ani suspenzní kultura (bez přídavku elicitoru) neprodukovala rutin. Pokud porovnááme produkci rutinu u kalusových a suspenzních kultur po aplikaci roztoku methylviologenu, větší tvorba rutinu byla pozorována u kalusových kultur. Nejvyšší nárůst obsahu rutinu v kalusové kultuře byl naměřen po aplikaci roztoku elicitoru u koncentrace c_1 po 72 hodinách, kde produkce rutinu vzrostla 12,5x oproti nejvyšší produkci rutinu v suspenzní kultuře po aplikaci roztoku elicitoru u koncentrace c_3 po 24 hodinách.

Bylo sledováno i vylučování rutinu do živného média. Vzorky média nebyly odebírány pravidelně. Neprokázala jsem však na základě jednotlivých stanovení uvolnění rutinu do živného média.

Důvodů nízké produkce rutinu v kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. může být několik.

Jedním z nich mohlo být stáří kultury. V této práci byly použity kalusové a suspenzní kultury v 11. – 20. pasáži. Stáří kultury mohlo být důvodem nulové produkce rutinu v kalusové a suspenzní kultuře pěstované bez přídavku elicitoru.

Píchová M. (36) ve své studii zjistila, že průměrná produkce flavonoidů kalusovou kulturou *Fagopyrum esculentum* Moench. je 0,023 % bez přídavku elicitoru. Ve své práci pracovala s kulturami v 3. – 10. pasáži.

Dalším důvodem mohl být nevhodně zvolený elicitor. Předpokladem úspěšné elicítace je použití vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doba působení (9).

Methylviologen byl zvolen jako elicitor díky své prokázané oxidační aktivitě a tvorbě superoxidu (35). V řadě prací byl využit pro tvorbu ROS.

Nojavan-Asghari a kol. (35) ve své studii zkoumali účinky methyljasmonátu pod oxidačním stresem, který byl navozen methylviologinem. Kořeny rostliny *Zea Mays* L. byly vloženy do roztoku methylviologenu o koncentraci 20 μmol a ponechány zde 6 hodin. Po propláchnutí vodou byly dány do roztoků methyljasmonátu o koncentracích 5, 10, 20, 50 a 100 μmol po dobu 24 hodin. Ve vzorku, který byl vložen pouze do roztoku methylviologenu, došlo k tvorbě ROS a následně k peroxidaci lipidů. Ve vzorcích s methyljasmonátem o koncentracích 50 a 100 μmol došlo k výraznému snížení peroxidace lipidů.

Marino a kol. (21) prokázal vliv ROS na inhibici fixování dusíku. Methylviologen byl aplikován ke kořenům hrachu ve dvou koncentracích 1 a 10 mmol po dobu 96 hodin. U obou koncentrací došlo k tvorbě ROS a následkem toho došlo k poklesu fixace dusíku.

Bustos a kol. (18) ve své studii sledovali účinky enzymu glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy pod vlivem oxidačního stresu. Oxidační stres byl navozen přidáním methylviologenu do sazenic pšenice a kukuřice. Enzym glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza hraje klíčovou úlohu v energetickém metabolismu buňky, účastní se tvorby NADPH v cytosolu. Po přidání methylviologenu se jeho aktivita výrazně zvýšila.

Mascher a kol. (34) ve své studii sledovali účinek 2-aminoethanolu na rostlinu *Hordeum Bulhare* L. Rostlina byla vystavena působení methylviologenu, který v ní

zvýšil produkci ROS. Přidáním 2-aminoethanolu se zvýšila ochrana rostliny proti oxidačnímu stresu, 2-aminoethanol zvýšil produkci superoxid dismutázy a katalázy.

Oracz a kol. (19) ve studii zkoumali vztah zvýšeného hromadění ROS na inhibici období klidu při zrání semen rostliny *Helianthus annuus* L. Byl prokázán vliv ROS při dozrávání semen. Jako zdroj ROS byl použit methylviologen. Inkubace spících semen společně s methylviologinem vedla k nahromadění ROS a tím k inhibici období klidu.

Silverman a kol. (17) zjistili, že přidáním sodné soli kyseliny salicylové se snížila herbicidní aktivita methylviologenu. Po aplikaci methylviologenu v rostlině *Nicotiana tabacum* došlo ke zvýšení ROS. Vlivem sodné soli kyseliny salicylové se zvýšila aktivita superoxid dismutázy a rostlina byla lépe chráněna vůči oxidačnímu stresu.

7. ZÁVĚR

Výsledky práce lze shrnout následovně:

- Statisticky významný nárůst obsahu rutinu oproti kontrole byl zjištěn v kalusové kultuře po aplikaci roztoku elicitoru v koncentraci c_1 po 12 a 72

hodinách; v koncentraci c_2 po 72 hodinách a v koncentraci c_3 po 6, 48 a 72 hodinách.

- V suspenzní kultuře byl statisticky významný nárůst obsahu rutinu zaznamenán u koncentrace c_2 po 6 hodinách a u koncentrace c_3 po 6, 12 a 24 hodinách.
- Maximální zvýšení produkce rutinu (0,25 %) nastalo v kalusové kultuře po dodání methylviologenu v koncentraci c_1 po 72 hodinách a v suspenzní kultuře po dodání methylviologenu v koncentraci c_3 po 24 hodinách (0,02 %).
- Nejvyšší obsah rutinu byl tedy naměřen v kalusové kultuře po aplikaci methylviologenu v koncentraci c_1 po 72 hodinách.
- V živném médiu nebyl rutin detekován.

8. SEZNAM LITERATURY

- 1) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum Praha 2.vydání, 75-81 (2001)
- 2) Kováč J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství Univerzity Palackého Olomouc, 1-50 (1995)

- 3) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty 1.vydání, Karolinum Praha, 84-86 (1994)
- 4) Vodrážka Z.: Biotechnologie, Academia Praha, 63,69 (1992)
- 5) Procházka S., Macháčková I., Krekule J.: Fyziologie rostlin, Academia Praha, 265-279, 328-329, 412-431 (1998)
- 6) Jahodář L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Karolinum Praha, 35-40 (2000)
- 7) Jedinák A., Faragó J., Pšenáková I., Maliar T.: Biologia, Bratislava 59 (6), 698 (2004)
- 8) Tůmová L., Rusková R.: Vliv CdCl_2 a CuSO_4 na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. *in vitro*, Česká a slovenská farmacie, 47 (6), 261-263 (1998)
- 9) Kašparová M., Dušek J.: Vliv biotické elicitace na produkci anthraglykosidů tkáňovou kulturou *Rheum palmatum* L., Česká a slovenská farmacie, 48 (3), 132-135 (1999)
- 10) Tůmová L., Bartáková M., Zabloudivá J.: Kyselina jodoctová jako potenciální elicitor zvýšené tvorby flavonoidů v kultuře *Ononis arvensis* L. *in vitro*, Česká a slovenská farmacie, 52 (4), 189-192 (2003)
- 11) Siatka T., Kašparová M., Sklenářová H., Solich P.: Vliv manganatých, kobaltnatých a nikelnatých iontů na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L., Česká a slovenská farmacie, 54, 47-51 (2005)
- 12) Martin J., Dušek J.: Nárůst obsahu flavonoidů v *in vitro* kulturách *Scutellaria baicalensis* Georgii po přidání skořičnanu sodného, Česká a slovenská farmacie, 56, 280-283 (2007)
- 13) Tůmová L., Polívková D.: Vliv AgNO_3 na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. *in vitro*, Česká a slovenská farmacie, 55, 186-188 (2006)
- 14) Kašparová M., Siatka T.: Abiotická elicitace explantátové kultury *Rheum palmatum* L. těžkými kovy, Česká a slovenská farmacie, 53, 252-255 (2004)
- 15) Siatka T., Kašparová M.: Vliv biotických elicitorů na produkci flavonoidů v suspenzní kultuře *Bellis perennis* L., Česká a slovenská farmacie, 48 (6), 268-271 (1999)
- 16) Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Jadardhan Reddy K.: Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, Springer, 157-186 (2006)

- 17) Silverman F.P., Petracek P.D., Fledderman C.M., Ju Z.G., Heiman D.F., Warrior P.: Salicylate activity. 1. Protection of plants from paraquat injury. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (25), 9764-9768 (2005)
- 18) Bustos D.M., Bustamante C.A., Iglesias A.A.: Involvement of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to oxidative stress, *Plant Physiology*, 165 (4), 456-461 (2007)
- 19) Oracz K. et al.: ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation, *The Plant Journal*, 50 (3), 452-465 (2007)
- 20) Matteo A.: Structural, electronic and magnetic properties of methylviologen in its reduced forms, *Chemical Physics Letters*, 439 (1-3), 190-198 (2007)
- 21) Marino D., González E.M., Arrese-Igor C.: Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses, *Journal of experimental botany*, 57 (3), 665-673 (2006)
- 22) Hubík J., Dušek J., Spilková J., Šícha J.: *Obecná farmakognosie II*, SPN Praha, 31-33 (1986)
- 23) Kolektiv autorů: *Český lékopis 2005, svazek 1.,3.*, Grada Praha, 187-190, 199, 3038-3040 (2005)
- 24) Tůmová L., Píchová M., Dušek J.: Pohanka obecná a její terapeutické využití, *Praktické lékárenství*, 4, 190 (2007)
- 25) Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K.: Rutin content in buckwheat food materials and products, *Food Chemistry*, 98 (3), 508-512 (2006)
- 26) <http://www.botanika.wendys.cz> (6.4.2008)
- 27) <http://faf.vfu.cz/html/docs/compouods/flavony/rutin/index.html> (6.4.2008)
- 28) Murashige T., Skoog F.: A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Journal of Plant Physiology*, 15, 473 (1962)
- 29) Klimeš J.: *Kontrola léčiv I.*, Karolinum Praha, 22-40 (2002)
- 30) Klemera P., Klemerová V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*, Karolinum Praha, 23, 27 (1997)
- 31) Reisenauer R.: *Metody matematické statistiky*, SNTL Praha, 78-81 (1970)
- 32) Durmus N., Kadioglu A.: Reduction of paraquat toxicity in maize leaves by benzyladenine, *Acta Biologica Hungarica*, 56 (1-2), 97-107 (2005)

- 33) Volkova L.A., Maevskaia S.N., Burgutin A.B., Nosov A.M.: Effect of exogenous steroid glycosides on cultured cells of potato under oxidative stress, *Russian Journal of Plant Physiology*, 54 (5), 639-645 (2007)
- 34) Mascher R., Fischer S., Scheiding W., Neagoe A., Bergmann H.: Exogenous 2-aminoethanol can diminish paraquat induced oxidative stress in barley, *Plant Growth Regulation*, 45 (2), 103-112 (2005)
- 35) Nojavan-Asghari M., Norastehnia A.: A possible role for methyl jasmonate in effecting superoxide dismutase and catalase activities under paraquat-induced oxidative stress in maize seedlings, *Journal of Biological Science*, 6 (1), 55-60 (2006)
- 36) Píčov M.: Rstov a produkn charakteristiky kultury *Fagopyrum esculentum in vitro*, Diplomov prce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutick fakulta v Hradci Krlov, Hradec Krlov (2006)