

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE



Veronika Vašková

Explantátové kultury léčivých rostlin

(diplomová práce)

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

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, PhD.

Oponent: PharmDr. TOMAŠ ŠTADKA, CSc.

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

*Pašková*

Úvodem své diplomové práce bych ráda poděkovala PharmDr. Marii Kašparové, PhD. za odborné vedení, cenné rady a připomínky a za ochotu paní laborantce Koubkové z katedry farmakognozie.

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>4</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
3.1. REVEŇ DLANITÁ.....	9
3.1.1. <i>Botanický popis rostliny</i> .....	9
3.1.2. <i>Původ a výskyt</i> .....	9
3.1.3. <i>Charakteristika drogy</i> .....	9
3.1.4. <i>Sběr a úprava drogy</i> .....	9
3.1.5. <i>Obsahové látky</i> .....	10
3.1.6. <i>Biologické účinky a použití drogy</i> .....	13
3.1.6.1. <i>Účinky obsahových látek</i> .....	13
3.1.6.2. <i>Použití</i> .....	13
3.2. ROSTLINNÉ EXPLANTÁTY.....	15
3.2.1. <i>Charakteristika</i> .....	15
3.2.2. <i>Produkce sekundárních metabolitů explantátovými kulturami</i> .....	15
3.2.3. <i>Faktory ovlivňující produkci sekundárních metabolitů</i> .....	16
3.2.4. <i>Odvození a udržování kultury</i> .....	17
3.2.5. <i>Kultivační podmínky</i> .....	18
3.2.5.1. <i>Živná média</i> .....	18
3.2.5.2. <i>Fyzikální podmínky kultivace</i> .....	19
3.3. ELICITACE.....	20
3.3.1. <i>Obranné reakce rostlin</i> .....	20
3.3.2. <i>Elicitory</i> .....	22
3.3.3. <i>Mechanismus účinků elicitorů</i> .....	23
3.3.4. <i>Podmínky elicitace</i> .....	24
3.3.5. <i>Fytoalexiny</i> .....	24
3.4. KOBALT.....	25
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>26</b>
4.1. PŘÍSTROJE.....	26
4.2. CHEMIKÁLIE.....	26
4.3. ROSTLINNÝ MATERIÁL.....	27
4.4. STANOVENÍ ZTRÁTY SUŠENÍM.....	27
<b>5. KULTIVACE TKÁŇOVÉ KULTURY</b> .....	<b>28</b>
5.1.1. <i>Kultivační nádoby a nástroje</i> .....	28
5.1.2. <i>Příprava živného média</i> .....	28
5.1.3. <i>Pasážování kultur a podmínky kultivace</i> .....	29
5.2. ABIOTICKÁ ELICITACE.....	29
5.2.1. <i>Příprava roztoků elicitoru</i> .....	29
5.2.2. <i>Elicitace a odběr kultur</i> .....	30
5.3. STANOVENÍ ANTHRACENOVÝCH DERIVÁTŮ.....	31
5.3.1. <i>Princip stanovení</i> .....	31
5.3.2. <i>Postup stanovení</i> .....	31
5.3.3. <i>Sestrojení kalibrační křivky</i> .....	31
5.4. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	34
<b>6. VÝSLEDKY</b> .....	<b>36</b>
6.1. TABULKY.....	36
6.2. GRAFY.....	38
<b>7. DISKUSE</b> .....	<b>40</b>

8. ZÁVĚR.....	42
9. SEZNAM LITERATURY .....	43

# 1. ÚVOD

Léčivé účinky rostlin znali lidé od nepaměti. Už pravěký člověk trpěl nemocemi. V přírodě měl nejbližší k rostlinám, které mu poskytovaly především potravu. Při konzumování rostlin objevil jejich léčivé i jedovaté účinky. (1)

Empirickou formou šťastných náhod i tragických omylů se vyčlenila skupina léčivých rostlin (2). Ty se staly objektem současných vědeckých farmaceutických disciplín.

Léčivé rostliny obsahují organické sloučeniny schopné určité choroby léčit, předcházet jim nebo zmírňovat jejich průběh. Slouží také jako průmyslová surovina k výrobě čistých léčivých látek, případně jsou zpracovány do různých léčivých přípravků (1).

Většina světové produkce léčivých rostlin pochází z pěstitelských ploch, menší část z divoce rostoucích porostů. Sběr léčivých rostlin ve volné přírodě už nestačí krýt jejich spotřebu už proto, že ubývá lokalit léčivých rostlin kvůli chemizaci a mechanizaci polního hospodářství. Pěstování léčivých rostlin se zaměřuje na kulturní odrůdy, které plně vyhovují jak ze stránky výnosu, tak i složení a obsahu účinných látek (2).

Kromě zemědělské produkce jsou středem zájmu jiné alternativní zdroje. Příkladem je kultivace rostlinných kultur. Explantátové kultury se využívají při produkci rostlinných metabolitů. Lze je pěstovat dlouhodobě (3). Biotechnologické pěstování rostlinných buněk a jejich metabolitů je zcela nezávislé na podnebí, na výkyvech počasí, kvalitě půdy a situaci v zahraničním obchodě. Rostlinný materiál je sterilní a neobsahuje zbytky insekticidů nebo herbicidů. Kontinuální produkce umožňuje ekonomičtější technologii, případně výhodnější metody zpracování. Jedná se o technologii, která je oproti chemickým výrobním procesům téměř bezodpadová (5).

Všechny sloučeniny vyskytující se v nativních rostlinách lze teoreticky získat v kulturách *in vitro*. V některých případech je produkce určitých látek velmi nízká nebo nulová. Tento jev pravděpodobně souvisí s lokalizací syntézy těchto látek v určitých orgánech a pletivech intaktní rostliny. Proto se výtěžky různých látek tolik liší. V některých případech však překračují hodnoty získané u nativních rostlin (5). Hlavním úkolem je nalezení takových způsobů kultivace, zejména z hlediska složení živné půdy, které by urychlily růst a množení buněk (3). V posledních letech se stále více projevují obtíže při zajišťování přísunu přírodních surovin, neboť dochází k drastickému

omezování rostlinných zdrojů. Toto je způsobeno zabíráním půdy pro nezemědělské účely, narušováním životního prostředí a dalšími faktory. Vzdávající ceny surovin a současně stoupají nároky farmaceutického průmyslu. Sběr divoce rostoucích rostlin i jejich pěstování je sezónní záležitost, jejíž výsledek závisí na mnoha činitelích. Některé rostliny v našem klimatickém pásmu nerostou a jejich potřebu je nutno uspokojovat dovozem. Problematika aplikace rostlinných kultur při získávání terapeuticky významných látek přírodního původu je perspektivní oblastí farmaceutické biotechnologie. (5)

Jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšení produkce a akumulace sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro* je elicitace buněčných kultur. Jedná se o metodu založenou na signálem (elicitorem) indukované expresi genů, což vede k nárůstu hladiny metabolicky aktivních enzymů, a následně i k zesílení syntézy sekundárních metabolitů (4).

Tato diplomová práce se zabývá elitací rostlinné kultury *Rheum palmatum* chloridem kobaltnatým.

## 2. CÍL PRÁCE

1. Seznámení se s metodikou kultivace a elicitace kalusové a suspenzní kultury *Rheum palmatum* L. *in vitro*.
2. Ověření vlivu čtyř různých koncentrací abiotického elicitoru chloridu kobaltnatého na produkci anthracenových derivátů explantátovou kulturou *Rheum palmatum* L. v závislosti na délce jejich působení.



## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1. Reveň dlanitá

#### 3.1.1. Botanický popis rostliny

Je to vytrvalá bylina z čeledi rdesnovitých – *Polygonaceae*. Podzemními orgány jsou oddenky se silnými postranními kořeny. Tato statná bylina má lodyhu dutou, podélně rýhovanou, vysokou 1,5 až 2 m a s hnědožlutou korovou vrstvou. Listy jsou střídavé, dlanitě členěné a dlouze řapíkaté. Lodyha je zakončena bohatou latou oboupohlavných květů bělavé až načervenalé barvy. Kvete v červenci a srpnu. Plodem je 1 cm velká nažka. (6-9)

#### 3.1.2. Původ a výskyt

Reveň roste na březích řek a potoků, v lesích a na úpatí hor v západní Číně, Mongolsku, Koreji a Japonsku. Vyskytuje se v nadmořské výšce až 3000 - 4000 m (1, 6). Velmi často se pěstuje i u nás (8). Bylina je rozšířená od Sibíře po Himálaje a Středozeří (2). Domácí je v západní Číně a východním Tibetu (10).

Potřebuje úrodnou, hlinitopísčitou a hnojenou půdu (2). Vyžaduje spodní vláhu a snáší polostín (10).

#### 3.1.3. Charakteristika drogy

Droga *Rhei radix* je uvedena v ČL 2005 (11).

Tvoří ji usušené celé nebo řezané kořeny a oddenky druhu *Rheum palmatum* L., *Rheum officinale* BAILL, kříženců obou druhů nebo jejich směs. Podzemní části jsou většinou rozřezané, zbavené stonků a zevní vrstvy kůry s postranními kořínky. Usušená droga je na lomu načervenalá, má charakteristický pach a slabě kořenitou hořkou vůni (1, 9).

#### 3.1.4. Sběr a úprava drogy

Podle tradičního čínského postupu se oddenky s kořeny dobývají na podzim nebo na jaře, za čerstva se loupou a suší na slunci nebo umělým teplem (7). Teplota

v sušárně nemá překročit 50 °C (1). Větší kusy se podélně rozřezávají, provrtávají a suší na provazech (7).

### 3.1.5. Obsahové látky

Droga obsahuje 3 – 12 % anthracenových derivátů volných i glykosidicky vázaných, 10 – 25 % dianthronových glykosidů, 5 – 10 % tříslovin, 2 – 3 % flavonoidů, 15 % škrobu, organické kyseliny, pektin a steroly (2).

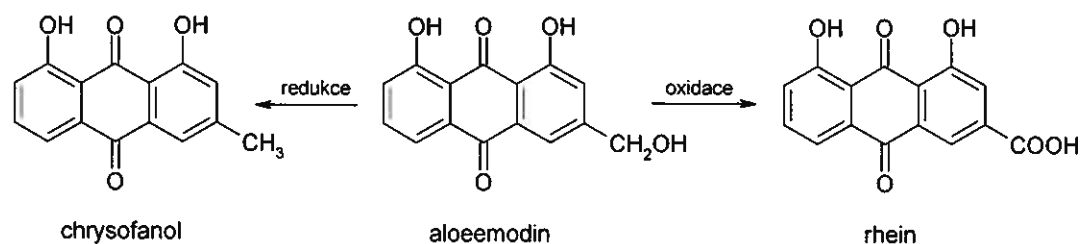
Anthracenové deriváty se vyskytují v oxidované i redukované formě v poměru přibližně 1:1. V oxidované formě jsou to anthrachinony, v redukované pak anthranoly, anthrony a heterodianthrony (6). Při skladování se redukované formy oxidují na anthrachinony.

Anthraglykosidy se skládají z cukerné a necukerné části. Cukernou složkou bývá glukosa a rhamnosa (7). Anthraglykosidy jsou v droze rozložené nestejně. Ve spodních a vnějších částech drogy je jich nejvíc (2). Jsou uloženy v buňkách dřevných paprsků a v okolí kambia (7). Mladé části obsahují víc volných derivátů, starší zase glykosidů. Při úpravě drogy a nevhodném skladování se uvolňují necukerné části, aglykony enzymatickou hydrolýzou (2).

Celkový obsah účinných látek je nejvyšší v době květu, což je květen až červen. Druhé, poněkud nižší maximum, je v prosinci (7).

Mezi volné anthrachinony patří chrysofanol, aloemodin, rhein a fycion.

**Hlavní anthrachinony v droze *Rhei radix* jsou v tomto vzájemném vztahu:**



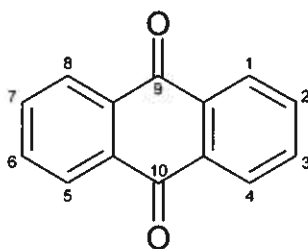
Anthrony se vyskytují převážně jako dianthrony: sennidin A a B, aloemodindianthron, difyciondianthron, frangulaemodindianthron, sennidin C, rheidin A, B, C, palmidin A, B, C, D.

Vedle volných anthrachinonů se vyskytují i jejich glykosidy, a to monoglykosidy (aloemodin-8- $\beta$ -D-glukosid, chrysofanol-1- $\beta$ -D-glukosid) a diglykosidy (chrysofanoldiglykosid, aloemodindiglykosid, rheindiglykosid) (7).

Třísloviny obsažené v droze patří do skupiny tannoglykosidů, hydrolyzovatelných tříslovin. Především jde o glukogalin, dále pak o katechin a epikatechin (2).

Vedlejšími látkami jsou amorfni pryskyřice, flavonové glykosidy (rutin), organické kyseliny (jablečná, šťavelová, jantarová, kávová) volné i ve formě solí, mastný olej, fytoosteroly, cukry, škrob, pektin, enzymy (7).

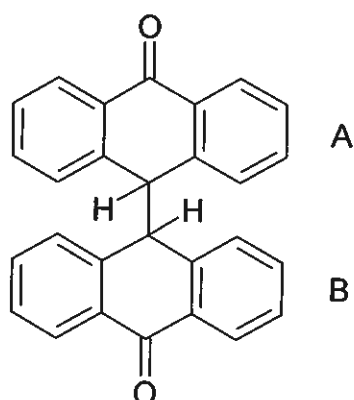
### Hlavní aglykony vyskytující se v droze *Rhei radix*:



**Anthrachinon**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Chrysofanol</b>	-OH	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	-H	-OH
<b>Aloemodin</b>	-OH	-H	-CH <sub>2</sub> OH	-H	-H	-H	-H	-OH
<b>Frangulaemodin</b>	-OH	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-OH	-H	-OH
<b>Fyscion</b>	-OH	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH
<b>Rhein</b>	-OH	-H	-COOH	-H	-H	-H	-H	-OH

**Přehled dianthronů obsažených v droze *Rhei radix*:**



<b>ISODIANTHRONY</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Sennidin A a B	Rhein	Rhein
Aloeemodin-dianthron	Aloeemodin	Aloeemodin
Frangulaemodin-dianthron	Frangulaemodin	Frangulaemodin
Chrysofanol-dianthron	Chrysofanol	Chrysofanol
Fyscion-dianthron	Fyscion	Fyscion

<b>HETERODIANTHRONY</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Rheidin A	Rhein	Frangulaemodin
Rheidin B	Rhein	Chrysofanol
Rheidin C	Rhein	Fyscion
Palmidin A	Aloeemodin	Frangulaemodin
Palmidin B	Chrysofanol	Aloeemodin
Palmidin C	Chrysofanol	Frangulaemodin
Palmidin D	Chrysofanol	Fyscion
Sennidin C	Rhein	Aloeemodin

(7)

### 3.1.6. Biologické účinky a použití drogy

#### 3.1.6.1. Účinky obsahových látek

Anthrachinonové sloučeniny dráždí sliznici tlustého střeva, zvyšují střevní peristaltiku, a tím působí projímavě. Podle dávky drogy se uplatňuje různý účinek. V malé dávce (až 0,5 g) působí třísloviny, které svírají a staví. Ve velké dávce (1 – 3 g) anthraglykosidy působí projímavě. Souhrn glykosidů se označuje jako rheopurgarin (9).

Anthracenové deriváty působí v tlustém střevě. Spojením s cukry klesá jejich rozpustnost v lipidech a tím i resorpce v žaludku a v tenkém střevě. Glykosid je transportní formou vlastního účinného aglykonu, který se uvolňuje až v tlustém střevě činností bakteriální flóry. Není však vyloučena částečná resorpce v tenkém střevě a transport krevním oběhem na místo působení. Nejúčinnější jsou anthrony a dianthrony. (7)

Anthrony nejspíše působí svou lokální dráždivostí zvýšení peristaltiky, ve větších dávkách mohou vyvolávat dávení, bolesti a krvavé průjmy. Anthrachinonové a dianthronové glykosidy nemají vedlejší účinky. Směsi různých glykosidů působí silněji než samotné látky ve stejné dávce. Účinek nastupuje po 6 - 12 hodinách. Jsou vhodné při chronické obstipaci (7). Při menších dávkách se po projímavém působení může dodatečně dostavit zácpa (9).

Anthracenové deriváty se zčásti vylučují ledvinami a přitom zbarvují moč do oranžova až hněda (1). U kojících matek se vylučují mlékem.

Dále přítomné třísloviny tlumí nadměrnou tvorbu žaludeční kyseliny (1).

#### 3.1.6.2. Použití

Droga se používá při snížené chuti k jídlu, ke zlepšení vylučování žluči do střeva, při poruchách zažívání a nechutenství, spojených s nadměrnou tvorbou žaludeční kyseliny (1).

Droga obsahuje dle ČL 2005 nejméně 2,2 % hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako rhein (11). Podle ČSL 4 musí obsahovat nejméně 3,5 % volných a vázaných anthrachinonů, počítáno jako 1,6,8-trihydroxy-3-methylantrachinon (12).

Při podání nižších dávek kořene se projevuje adstringentní působení tříslovin antidiarhoicky. Vyšší dávky naopak působí díky anthrachinonům projímavě (1).

hořkou chuť je droga také stomachikem (7). V těhotenství a při kojení se droga zásadně nepoužívá (1).

Pro lepší zažívání se droga podává ve formě prášku, a to 0,1 – 0,3 g dvakrát denně, jako projímadlo se podává 1 g dvakrát denně (1). Droga se nesmí užívat při ledvinových kamenech a jiných chorobách močového ústrojí (9).

Kořeny rostlin ze sekce *Rhaponticum* obsahují navíc derivát stilbenu, rhaponticin, s estrogením účinkem. Použití drog s obsahem rhaponticinu je nepřístupné. (7)

I jiné druhy rodu *Rheum* obsahují v podzemních orgánech antrachinony, ale v menším množství a v odlišném složení. Některé z účinných látek chybějí, proto je jejich účinek podstatně nižší. (2)

Podle čínské medicíny má droga vztah k dráze žaludku, tlustého střeva a jater. Silně rozptyluje nahromaděnou horkost, odstraňuje městnání krve, zlepšuje trávení a léčí zácpu. Kontraindikacemi jsou těhotenství, šestinedělí, menstruace a chudokrevnost. (8)

Z denní dávky 3 – 12 gramů drogy se připravuje odvar, který se podává 2krát denně na lačno. Vaření by nemělo trvat déle než 10 minut, neboť se pak snižuje projímavý účinek drogy. Syrová droga s vínem nebo octem má posilující účinek na krev, opražená léčí krvácivé stavy. Odvar se také používá zevně k obkladům. (8)

Reveň se v homeopatii uplatňuje v potencích 2D a 3D v léčbě dětských a kojeneckých průjmů, u střevních kolik a poruch trávení (13).

## **3.2. Rostlinné explantáty**

### **3.2.1. Charakteristika**

Jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, pletiv, buněk, protoplastů a kalusů (3). Je to každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů, odebraný buď z intaktní rostliny nebo z již existující kultury s cílem pěstovat jej v podmínkách *in vitro* (5).

Rostlinné explantáty pěstované po určitou dobu v podmínkách *in vitro* se označují jako kultury rostlinných explantátů. Kultury se zakládají z matečné rostliny. Lze je odvodit z každého orgánu rostliny. Na agarovém médiu je z orgánu pletiva odvozen primární kalus, což je původně neorganizované pletivo vzniklé na povrchu nenádorových buněčných explantátů. Pokud je kultura pravidelně pasážována, lze ji pěstovat neomezeně dlouho. V průběhu růstu dochází k dediferenciaci, ale kultura není homogenní. Z morfologického hlediska rozdělujeme kultury kromě kalusové a suspenzní na orgánovou, buněčnou a kulturu protoplastů. Orgánovou kulturou rozumíme orgány nebo orgánové systémy pěstované způsobem, při kterém dochází k diferenciaci. Kulturu buněčnou tvoří jednotlivé buňky a kulturu protoplastů tvoří buňky bez stěn, jejichž obsah je obalen jen pružnou elastickou plasmolemou. (5)

### **3.2.2. Produkce sekundárních metabolitů explantátovými kulturami**

Explantátové kultury se využívají při šlechtění rostlin a při produkci rostlinných metabolitů. Hlavní výhodou explantátových kultur je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk. Z každé buňky lze pak vypěstovat plnohodnotnou rostlinu. I diferencovaná buňka obsahuje veškerý genetický materiál pro regeneraci celé rostliny.

Při přípravě explantátových kultur využíváme mikrobiologických technik a biotechnologických procesů založených na mikroorganismech. Ovšem kultivace explantátových kultur probíhá delší dobu, je citlivější na střížné síly při mechanickém míchání. Pro selekci a stabilizaci některých genotypů se používají složitější postupy a živné půdy jsou dražší.

Obsah růstových látek a vitamínů v živném médiu 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 (shluk dvou i více buněk) suspenzní kultury, která je pro další vývoj postupu nezbytná. (3)

Problémem je dlouhá kultivace a s tím související zvýšené nároky na sterilitu procesu. Hlavním úkolem je nalezení složení půdy, která by urychlila růst a množení buněk. (3)

V poslední době nastal významný pokrok ve vývoji nových technik. Příkladem je biotransformace, imobilizace, elicítace a jejich vzájemné kombinace. Metody genového inženýrství také zvyšují produkci a akumulaci sekundárních látek kulturami *in vitro*. (5)

Zvýšená produkce sekundárních metabolitů se v současné době využívá spíše za účelem studia chemického složení a účinků těchto látek. V budoucnosti se však počítá s průmyslovým využitím buněčných kultur pro produkci přírodních látek v bioreaktorech, což závisí především na vývoji postupů a technologií zkracujících periodu fermentace a zvyšující výtěžek a na ekonomice celého procesu. (5)

### 3.2.3. Faktory ovlivňující produkci sekundárních metabolitů

Mnoho léčivých rostlin produkuje charakteristické sekundární metabolity v kultuře *in vitro*. Většinou ovšem v malém množství. Zejména u kalusových tkání je znatelná nízká produkce sekundárních metabolitů. Nejsou tudíž vhodné pro průmyslové využití. Oproti tomu suspenzní tkáně a buněčné kultury nám nabízejí více možností. (14)

Mezi základní příčiny nedostatečné produkce sekundárních metabolitů kulturami *in vitro* patří:

- kultura neprodukuje sekundární metabolity během celého životního cyklu
- akumulace sekundárních metabolitů je výsledkem složitých interakcí mezi biosyntézou, transportem, transformací, odbouráváním, akumulací a exkrecí, které jsou složitě regulovány
- ztráta zásobních (biosyntetických) orgánů
- odbourávání sekundárních látek
- častá vysoká genetická variabilita pěstovaných kultur, která může ovlivnit produkci pozitivně i negativně



- rostlina, která je převedena do tkáňové kultury je vystavena stresu, který může vést k nežádoucím změnám v produkci sekundárních látek
- nedostatečné množství nebo nepřítomnost enzymu odpovídajícího za produkci sekundárních metabolitů způsobené chybějící genetickou informací
- nedostatečné podmínky pro aktivaci enzymů (teplota, hodnota pH, iontové prostředí)
- nedostatečné množství prekursorů v místě reakce
- únik meziproduktů metabolitu do média nebo rozklad meziproduktů

Produkci sekundárních metabolitů kulturami *in vitro* ovlivňuje celá řada faktorů mezi než patří složení živného média, růstové regulátory, teplota, světlo a hodnota pH. Důležitý je výběr samotné rostliny, části rostlinného těla a typu kultury. U mnoha rostlinných druhů probíhá biosyntéza sekundárních metabolitů v jednom orgánu, zatímco akumulace je v celé rostlině nebo různých orgánech. Biosyntéza a akumulace jsou spjaty s diferenciací na úrovni buněčné i orgánové a vývojem (tvorba plodů, květů). (15, 16)

### 3.2.4. Odvození a udržování kultury

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

Stabilní a homogenní materiál (bez morfologických a morfogenetických odchylek, jako jsou změny pigmentace a regenerační schopnosti) 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 ve druhém případě pomocí pomaloběžných rolerů a třepaček. Získané kultury lze udržovat za podmínek *in vitro* neomezeně dlouho. Kultura musí být pravidelně pasážována

za aseptických podmínek, aby se zabránilo nežádoucí kontaminaci rostlinného explantátu. (4)

### **3.2.5. Kultivační podmínky**

Kultivace rostlinných explantátů probíhá za přesně definovaných podmínek. Jde především o sterilní prostředí, optimální složení živného média, vhodné fyzikální podmínky a opatření zabraňující kontaminaci kultury. (3, 4)

#### **3.2.5.1. Živná média**

Živné médium je zpravidla označováno podle badatele, který půdu sestavil, použil a vyzkoušel jako první. Jedna z univerzálních živných půd vhodná pro většinu rostlinných druhů je živné médium Murashigeho a Skooga.

Složky živného média můžeme rozdělit do těchto skupin:

- směs anorganických makroelementů
- směs anorganických mikroelementů
- zdroje organického uhlíku
- vitaminy
- nedefinované směsi přírodních látek
- růstové hormony

#### Makroelementy

Jsou to látky, které jsou nutné pro kultivaci intaktních rostlin. Jde o dusík, síru, fosfor, hořčík, vápník, chlór a draslík. Ionty se přidávají ve formě solí. Jejich kvantitativní zastoupení v médiu je větší než 30 mg/l.

#### Mikroelementy

K esenciálním mikroelementům patří železo, bor, mangan, jod a molybden. Nepostradatelné jsou většinou měď a zinek.

#### Zdroje organického uhlíku

Uhlík je základní stavební jednotka pro nově se tvořící tkáň. Nejlepším zdrojem uhlíku je sacharóza v koncentraci 2 - 5 %. Druh zvoleného cukru závisí na rostlinném druhu a na typu tkáně. Alkoholy nemají takový význam jako cukry. Organické kyseliny

působí v malém množství (méně než 2 %) stimulačně a přidávají se k sacharóze. Příkladem je kyselina jablečná.

### Vitaminy

Ačkoliv si rostlinné kultury syntetizují všechny důležité vitaminy, je nutno některé dodávat. Největší význam mají vitaminy skupiny B, vitamin C a kyselina nikotinová.

### Nedefinované směsi přírodních látek

Dříve se do médií běžně přidávalo kokosové mléko, extrakty z pšenice, kukuřice a kvasnic, které obsahovaly směs aminokyselin, cukrů, organických kyselin, DNA a RNA. Dnes se dává přednost definovaným kombinacím látek.

### Stimulátory růstu

Jsou to takové látky, které podněcují rostlinu k větší životaschopnosti. Rostliny intenzivněji a lépe využívají živiny. Stimulátory lze rozdělit do skupiny auxinů, cytokininů a gibberelinů. Nejčastěji se používají kyseliny  $\alpha$ -naftyloctová, 2, 4 -dichlorfenoxyoctová a  $\beta$ -indolyloctová. (4)

### Destilovaná voda

Vlastnostmi destilované vody jsou apyrogenost, deficit organických nečistot a plynů a minimální obsah anorganických látek (4, 17).

## **3.2.5.2. Fyzikální podmínky kultivace**

Fyzikálními podmínkami rozumíme světlo, teplotu a pH živného média. Tyto ovlivňují enzymovou aktivitu rostlinného materiálu.

### Světlo

V závislosti na světle dochází ke změně intenzity biosyntézy a akumulaci sekundárních metabolitů. Může být také indukčním faktorem biosyntetických pochodů, jako syntézy flavonoidů v buňkách petržele, anthokyanů v buňkách mrkve.

### Teplota

Teplota ovlivňuje průběh kultivace a její hodnota se pohybuje blízko 25 °C. Má vliv na dobu zdvojení počtu buněk.

### pH živného média

U rostlinných tkáňových kultur není nutná přesná hodnota pH média. Používané roztoky bývají obvykle slabě kyselé. Optimální hodnota závisí na typu kultury. Půdy se upravují přidáním hydroxidu sodného nebo kyselinou chlorovodíkovou. (4)

### Vlhkost vzduchu

Vlhkost vzduchu se liší podle typu kultury. Bývá v rozmezí 20 - 98 % (17).

## **3.3. Elicitace**

Elicitací rozumíme indukční proces , který vede ke zvýšení hladiny enzymů nebo jejich aktivaci, čímž dochází ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů (19).

### **3.3.1. Obranné reakce rostlin**

Rostliny i ostatní organismy mají způsoby, kterými se dokáží bránit vůči okolí, které je často ohrožuje. Dokáží spustit obranné reakce. Podnětem obvykle bývá specifický metabolit (elicitor). Elicitor se uvolňuje při počáteční interakci buňky s patogenem a nasedá na specifický receptor hostitelské buňky. Dále spouští celou řadu reakcí a pochodů.

Elicitory můžeme rozdělit na exogenní a endogenní. Exogenními elicitory rozumíme metabolity vylučované patogeny, jsou jimi specifické enzymy, peptidy, polysacharidy. Z narušených buněčných stěn organismů se vylučují endogenní elicitory, což jsou glykoproteiny, oligomery chitinu a oligoglukany uvolněné hydrolyzou z buněčných stěn hub a oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky (18).

Stresové faktory dělíme na biotické a abiotické.

#### Biotické faktory

- herbivorní živočichové, které rostliny spásají a poškozují
- patogenní mikroorganismy, kterými rozumíme viry, bakterie a houby

- vzájemné ovlivňování zahrnuje alelopatii (sekundární metabolit jedné rostliny působí inhibičně až toxicky na jinou rostlinu v těsné blízkosti) a parazitismus (rostlina čerpá živiny z jiné rostliny a uvolňuje do hostitele produkty svého metabolismu, a tím ho oslabuje)

### Abiotické faktory

- Fyzikální:
  - mechanické účinky větru
  - nadměrné záření (UV, viditelné)
  - nadměrné teploty (horko, mráz, chlad)
- Chemické:
  - nedostatek vody (sucho)
  - nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
  - nedostatek živin v půdě
  - nadbytek iontů solí v půdě
  - toxické kovy a anorganické látky v půdě (18)

Aby mohly rostliny přežít, vyvinuly se u nich obranné mechanismy. Pasivní (dlouhodobý) způsob ochrany je založen na zamezení průniku stresových faktorů do vnitřního prostředí rostliny. K tomuto účelu slouží především speciální anatomické ochranné struktury – trny, ostny, trichomy, ztlustlá kutikula, impregnovaná buněčná stěna. Jiným rostlinám slouží jako nespecifická prevence syntéza dvou nebo více či méně toxických látek (kyanogenní glykosidy, taniny). Další mechanismy jsou realizovány pouze v případě napadení škůdcem. (17, 18)

Pronikne-li stresor k plazmatické membráně buněk a do symplastu, je jeho negativní dopad omezen spuštěním mechanismů aktivní odolnosti. Průběh této stresové reakce a její konečný výsledek závisí na charakteru, intenzitě a délce působení stresového faktoru nebo faktorů a dále na geneticky zakódovaných (adaptačních) i přechodných – indukovaných schopnostech napadených rostlin. (18)

Atakům ostatních organismů se jednotlivé rostliny brání několika způsoby:

- anatomickými strukturami (trny, žahavé trichomy)
- produkcí toxických látek (látky nespecifické, produkované i bez přítomnosti patogenů – fytoncidy)
- hypersenzitivní reakcí (v místě napadení vzniká nekróza, uvnitř ložiska byly prokázány nízkomolekulární antibioticky účinné produkty látkové výměny rostlin – fytoalexiny)
- tvorbou fytoalexinů (syntéza je závislá na kontaktu s patogenem; signál, který vydává škůdce, označujeme jako elicitor; tato reakce je nespecifická, produkci jednoho fytoalexinu je schopno vyvolat více elicitorů)
- lokální anatomickou reakcí (lечение ran způsobených škůdci tím, že rostlina utěsní buněčné stěny produkcí kalosy a ligninu)
- aktivací enzymů (zrychlená syntéza hydroláz štěpících povrch parazita, například chitináza a glukonáza)

### 3.3.2. Elicitory

Elicitory jsou signální látky biologického i nebiologického původu. Jsou potřebné pro expresi genů nutných k syntéze fytoalexinů. Jejich působením jsou v buňkách infikovaných pletiv krátkodobě aktivovány určité enzymy, které katalyzují tvorbu fytoalexinů. Tyto reakce jsou vyvolány jak u intaktních rostlin, tak v buněčných kulturách (18, 20).

Elicitory dělíme do dvou skupin.

Biotické elicitory jsou organické sloučeniny, které mají v nepatrných koncentracích signální účinky. Radíme mezi ně:

- celé intaktní organismy nebo jejich části (bakterie, viry, kvasinky, mykoplazmy)
- organické molekuly parazitických mikroorganismů (oligosacharidy, glykoproteidy, polypeptidy)
- endogenní konstitutivní elicitory (organické molekuly pocházející z buněk napadené rostliny, například oligogalakturonidy, kyselina jasmínová)

Abiotické elicitory zahrnují chemické a fyzikální vlivy, které rostlinu stresují a tím spouštějí tvorbu fytoalexinů. Patří sem:

- extrémní teploty (chlad nebo vysoké teploty)
- různé typy záření
- ionty těžkých kovů ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ )
- změny pH
- změny osmotického tlaku
- detergenty
- inhibitory látkové výměny (kyselina trichloroctová, 2,4-dinitrofenol)
- pesticidy (18, 20)

### 3.3.3. Mechanismus účinků elicitorů

Předpokládá se, že molekuly elicitoru interagují s membránovými receptory, které mají schopnost přenést extracelulární signál do intracelulárního signálního systému. Byly nalezeny některé komponenty transdukčního signálního řetězce, které pomáhají přenosu signálu přes membránu do buňky. Jedná se o G-proteiny, vápenaté ionty, kalmoduliny a proteinkinázy (proteinová fosforylace má za následek ovlivnění vápníkových kanálů). (21)

U abiotických elicitorů ovšem nedochází k vazbě na specifický receptor, ale například těžké kovy pravděpodobně spouštějí peroxidaci lipidů membrány, a tak dochází ke zvýšené propustnosti membrány pro vápenaté ionty. U abiotických elicitorů je nutná přítomnost přenašečů signálu. Komplex nebo přenašeč aktivuje geny, které kódují mRNA enzymů katalyzujících biosyntézu fytoalexinů. (20, 22)

Ionty těžkých kovů, jako  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , jsou esenciální mikroelementy pro rostlinný metabolismus, ale pokud jsou v nadbytku, mohou být vysoce toxické. Mechanismus transportu iontů těžkých kovů slouží k ochraně buněk proti toxickým účinkům kovových iontů. Tyto mechanismy ještě nebyly definovány, ale počet genů, které kódují možné transportní struktury, již určen byl. (22)

Těžké kovy v rostlinných buňkách vyvolávají aktivaci transkripce několika genů tvorbu fytochelatinů. To jsou malé peptidy syntetizované z glutathionu, které váží kovy a vznikají tak inaktivní komplexy. Tímto se intracelulární těžké kovy detoxikují. (23)



### 3.3.4. Podmínky elicitace

Stejný vliv jako mají elicitory na intaktní rostlinu, mají také na rostlinné kultury pěstované *in vitro*. Přidání elicitoru do buněčné kultury indukuje zvýšení produkce sekundárních metabolitů. Aby k tomuto procesu došlo, musí být splněny určité podmínky pro vzájemnou interakci elicitoru a buněčné kultury.

Jde o:

- volba vhodného elicitoru, neboť ne každý elicitor stimuluje v buněčné kultuře produkci sekundárních látek
- optimální koncentrace elicitoru
- doba působení elicitoru na kulturu
- volba vhodného rostlinného explantátu pro kultivaci
- stáří kultury
- růstová fáze kultury
- složení živného média (14)

### 3.3.5. Phytoalexiny

Phytoalexiny jsou obranné látky sekundárního metabolismu, které mohou mít antimikrobiální účinky. Jejich akumulace je indukována patogenním činitelem nebo škůdcem. Tato indukce je především sledována u infekcí patogenními houbami, viry a bakteriemi.

V současné době je známo více než 300 phytoalexinů, které po chemické stránce patří mezi velmi různorodé typy sloučenin. U systematicky příbuzných druhů se obvykle vyskytují podobné druhy phytoalexinů. U rostlin čeledi *Fabaceae* převažují isoflavonoidy, u jiných čeledí to mohou být seskviterpeny (*Solanaceae*), diterpeny (*Poaceae*), furanokumariny (*Apiaceae*), polyacetyleny (*Asteraceae*) či stilbeny (*Vitaceae*). Jako phytoalexiny byly identifikovány i další typy glykosidů, alkaloidů a dalších látek. U téže rostliny se někdy mohou tvořit dva či více druhů různých phytoalexinů. Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plasmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanismům toxického působení phytoalexinů. Phytoalexiny mají vysoce toxické účinky již v koncentracích  $10^{-6}$  až  $10^{-5}$  mol/l zejména na patogenní houby, méně pak na bakterie. (18)



### 3.4. Kobalt

Kobalt je prvkem zařazeným do VIII. vedlejší podskupiny Mendělejevovy periodické soustavy prvků pod atomovým číslem 27, s atomovou hmotností 58,9332. V přírodě se vyskytuje v sulfidických rudách jiných kovů zejména železa a mědi jako doprovodný prvek. (24, 25)

Kobalt se projevuje jako typický přechodný kov. Nejčastěji se vyskytuje v oxidačních stavech  $\text{Co}^{\text{II}+}$  a  $\text{Co}^{\text{III}+}$ . Je prvkem poměrně vzácným a těžko se získává. V přírodě se nachází jako průvodce niklu. Technickým zdrojem kobaltu jsou zbytky po zpracování arsenidových rud niklu a mědi. Postup oddělování je poměrně složitý. (26)

Kobalt je jako součást vitamínu  $\text{B}_{12}$  esenciálním prvkem pro člověka, živočichy a prokaryoty. V rostlinách se tento vitamin nevyskytuje a není známa ani jiná biologická funkce pro kobalt ve vyšších rostlinách. Vitamin  $\text{B}_{12}$  ovlivňuje krvetvorbu. Anémie z poruchy výživy u skotu a ovcí žijících v oblastech s půdou chudou na kobalt se úspěšně léčí kobaltem. Mikroorganismy v bacheru těchto živočichů využívají tento prvek pro syntézu vitamínu  $\text{B}_{12}$ . Nedostatek kobaltu v přijímané stravě je bezpochyby činitelem působícím anémií. (27, 28)

Je popsáno úspěšné použití kobaltu u dětských anémií. Injekčním podáváním nebo krmením krys tímto prvkem byla vyvolána nadměrná tvorba červených krvinek, zvaná polycytémie. Podáváním chloridu kobaltnatého vedlo k vzestupu červených krvinek také u lidí. Isotopický kobalt se rychle vyloučí ledvinami. Kobalt je nezbytný pouze pro bobovité rostliny se symbiotickými bakteriemi fixujícími atmosférický dusík v kořenových hlízkách. Existují rostlinné druhy, které rostou na půdách s vysokým obsahem příslušného kovu a dokonce jej bez poškození hromadí v organismu, často v množství vyšších než  $1000 \mu\text{g}$  na gram sušiny. Tyto rostlinné druhy se označují jako hyperakumulátory. Jde o *Crotalaria cobalticola* nebo *Nyssa sylvatica*, které kobalt hromadí. (29)

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Přístroje

Analytické váhy, Sartorius A 200 S, Sartorius, Göttingen

Autokláv, PS 20 A, Chirana, Brno

Horkovzdušný sterilizátor HS 31 A, Chirana, Brno

Laminární box Fatran LF, výrobné družstvo Pokrok, Žilina

Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha

Spektrální kolorimetr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge

Vodní lázeň KL-1, Laboratorní přístroje, Praha

### 4.2. Chemikálie

Ajatin Slovakofarma, Hlohovec

chlorid thiaminia č. Koch-Light Laboratories, Colnbrook

chlorid pyridoxinia č. Koch-Light Laboratories, Colnbrook

myoinositol č. Sigma, St. Louis

amoniak konc. č.

diethylether p.a.

dihydrogenfosforečnan draselný č.

dusičnan amonný p.a.

dusičnan draselný p.a.

ethanol 96 %

glycin č.

hydroxid sodný p.a.

chloramin B

chlorid chromitý p.a.

chlorid kobaltnatý p.a.

chlorid vápenatý p.a.

jodid draselný p.a.

kyselina  $\alpha$ -naftyloctová č.  
kyselina boritá p.a.  
kyselina chlorovodíková p.a.  
kyselina nikotinová č.  
kyselina octová p.a.  
molybdenan sodný p.a.  
sacharosa p.a.  
síran hořečnatý p.a.  
síran mědnatý p.a.  
síran zinečnatý p.a.  
a síran železnatý p.a. Lachema, Brno

### **4.3. Rostlinný materiál**

K pokusům byla použita explantátová kultura odvozená z klíčící rostliny *Rheum palmatum* L. (*Polygonaceae*). Intaktní rostlina byla získána z polní kultury v Osečnici v Orlických horách. Rostliny byly přesazeny do skleníku zahrady léčivých rostlin Univerzity Karlovy v Praze, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Na založení explantátové kultury byla odebrána semena dvouletých rostlin. V diplomové práci byla použita šestiletá kalusová kultura a z ní odvozená suspenzní kultura.

### **4.4. Stanovení ztráty sušením**

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do váženky, předem vysušené 1 hodinu při 105 °C, byly odváženy asi 2,000 g kalusu. 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 kalusu a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením 4,87 % je aritmetickým průměrem ze tří stanovení. (30)

## 5. KULTIVACE TKÁŇOVÉ KULTURY

### 5.1.1. Kultivační nádoby a nástroje

Ke kultivaci bylo použito nádobí z varného skla SIAL, které je vyrobeno z materiálu odolného vůči vodě, chemikáliím a rozdílům teplot. Kalusové kultury byly kultivovány na knotech, což jsou můstky z filtračního papíru, ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách. Suspenzní kultury byly kultivovány ve 250 ml varných baňkách z téhož skla. Kovové pinzety byly opláchnuty 96 % ethanolem a po zabalení do hliníkové fólie sterilizovány 2 hodiny při 200 °C v horkovzdušném sterilizátoru. Pipety s chomáčkem vaty vloženým do jejich horního konce byly také sterilizovány v hliníkové fólii 15 minut při 121 °C v autoklávu.

### 5.1.2. Příprava živného média

Pro kultivaci explantátové kultury *Rheum palmatum* L. bylo použito živné médium podle Murashigeho a Skooga (31) tohoto složení:

CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	440,000 mg.l <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	1 900,000 mg.l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370,000 mg.l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650,000 mg.l <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000 mg.l <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,840 mg.l <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	22,300 mg.l <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	11,500 mg.l <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200 mg.l <sup>-1</sup>
KI	0,830 mg.l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025 mg.l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,250 mg.l <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025 mg.l <sup>-1</sup>
edetan disodný	37,340 mg.l <sup>-1</sup>
myoinositol	100,000 mg.l <sup>-1</sup>
hydrolyzát kaseinu	1 000,000 mg.l <sup>-1</sup>
glycin	2,000 mg.l <sup>-1</sup>
kyselina nikotinová	0,500 mg.l <sup>-1</sup>
pyridoxin hydrochlorid	0,500 mg.l <sup>-1</sup>
thiamin hydrochlorid	0,100 mg.l <sup>-1</sup>
sacharóza	30 000,000 mg.l <sup>-1</sup>

Jako stimulátor růstu byla použita kyselina  $\alpha$ -naftyloctová v koncentraci 10 mg.l<sup>-1</sup> živného média.

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

### 5.1.3. Pasážování kultur a podmínky kultivace

Pasážování bylo provedeno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl dezinfikován vodným roztokem Ajatinu (1:10) a vystaven záření germicidní zářivky minimálně po dobu 1 hodiny. Po celou dobu pasážování byly zachovány přísně aseptické podmínky, bylo používáno sterilní sklo a nástroje. Části kalusové kultury (inokula) byly přeneseny pinzetou do baněk s živným médiem a vloženy na knot. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií. Kalusové kultury byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách při teplotě 25 °C a umělém osvětlení s 16 hodinovou periodou. Subkultivační interval byl 35 dní.

Suspenzní kultura byla odvozena z kalusové kultury mechanickou cestou. Kultivace suspenzních kultur probíhala na roleru za neustálého pohybu půdy za stejných světelných a tepelných podmínek jako u kultury kalusové. Pasážování bylo prováděno vždy po 14-ti dnech kultivace přenesením části narostlé suspenze do baněk s čerstvým médiem.

## 5.2. Abiotická elicitace

### 5.2.1. Příprava roztoků elicitoru

Byly připraveny čtyři vodné roztoky chloridu kobaltnatého o koncentracích:

I.	100 μM
II.	10 μM
III.	1 μM
IV	0,1 μM

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

Nejslabší koncentrace chloridu kobaltnatého použitá při elicitaci odpovídá množství chloridu kobaltnatého obsaženém v živném médiu podle Murashigeho a Skooga. Ostatní koncentrace představují deseti-, sto- a tisícinásobek tohoto množství.

### 5.2.2. Elicitace a odběr kultur

Elicitace kalusové a suspenzní kultury byla prováděna za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. V 21. dni kultivace kalusové kultury a 14. dni kultivace suspenzní kultury byla provedena elicítace čtyřmi výše uvedenými koncentracemi chloridu kobaltnatého.

K pokusu bylo vzato 108 kultivačních baněk s kalusovou kulturou. Soubor 12-ti baněk bez elicitoru sloužil jako kultura kontrolní. Do ostatních 96-ti baněk s kulturou byl napipetován vždy 1,0 ml elicitoru o příslušné koncentraci. Poté byly baňky pečlivě uzavřeny hliníkovou fólií a dále kultivovány za již uvedených podmínek. Vznikly tak čtyři soubory šesti baněk s kulturou elicítovanou vždy jednou koncentrací elicitoru. Po 6, 24, 48 hodinách a 7 dnech působení elicitoru byly stresované kultury odebrány. Odběry kontrolních kultur byly provedeny po 6 hodinách a 7 dnech. U kalusových kultur byly pinzetou vyjmuty kalusy na filtrační papír a sušeny při laboratorní teplotě. U suspenzních kultur byly buňky odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a také sušeny při laboratorní teplotě.

U každého vzorku bylo provedeno stanovení obsahu anthracenových derivátů dle článku *Radix rhei* v ČSL 4 (12) a statistické vyhodnocení výsledků.

### **5.3. Stanovení anthracenových derivátů**

#### **5.3.1. Princip stanovení**

Fotometrická metoda podle ČSL 4 (12) je založena na barevné reakci anthracenových derivátů s alkalickými hydroxidy po jejich kyselé hydrolýze a jejich oxidaci. Intenzita zbarvení se hodnotí fotometricky.

#### **5.3.2. Postup stanovení**

Na analytických vahách bylo odváženo asi 0,2000 g upráškovaného usušeného vzorku a vařilo se v 100 ml varné baňce po dobu 15 minut pod zpětným chladičem se směsí 7,5 ml koncentrované kyseliny octové a 1,0 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Po ochlazení bylo přidáno 30 ml etheru a vařilo se 15 minut na vodní lázni. Etherový výluh se nechal vychladnout a byl zfiltrován přes chomáček vaty do 250 ml dělicí nálevky tak, že vzorek zůstal v baňce. Ke zbytku vzorku bylo opět přidáno 30 ml etheru a vařilo se znovu 10 minut. Etherový výluh byl po ochlazení zfiltrován přes stejný kousek vaty k prvnímu výluhu v dělicí nálevce. Poté byla vata promyta malým množstvím etheru. Ke spojeným etherovým výluhům bylo přidáno 12 ml koncentrovaného roztoku hydroxidu sodného a 24 ml amoniakálního roztoku hydroxidu sodného a 5 minut se protřepávalo. Vodná vrstva se vypustila do varné baňky a etherová vrstva se opět protřepávala s 20 ml amoniakálního roztoku hydroxidu sodného. Tento postup byl opakován ještě jednou. Spojené alkalické výtřepky byly zahřívány na vodní lázni pod zpětným chladičem 2 hodiny. Po ochlazení byl roztok zfiltrován přes vatu do 100 ml odměrné baňky, vata byla promyta amoniakálním roztokem hydroxidu sodného a stejným roztokem byla doplněna po značku v odměrné baňce. Ihned poté byla změřena absorbance při 530 nm proti amoniakálnímu roztoku hydroxidu sodného. Obsah volných anthracenových derivátů, počítaných jako frangula-emodin, se odečetl z kalibrační křivky nebo byl vypočten pomocí směrnice přímky ( $y = 0,337 \cdot x$ ) a následně vyjádřen v procentech.

#### **5.3.3. Sestrojení kalibrační křivky**

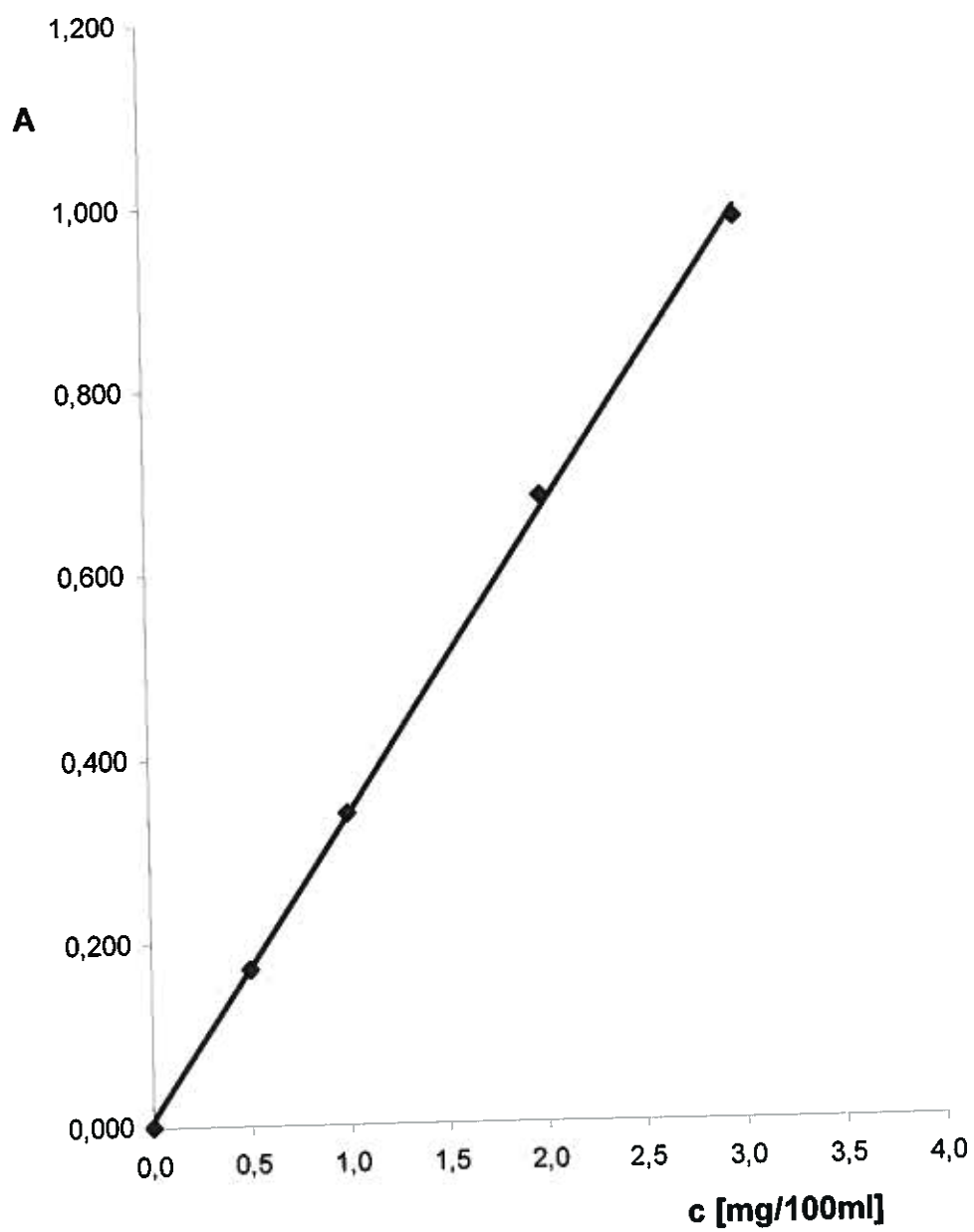
Odvážené množství 0,0100 g frangula-emodinu (1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthrachinon) se rozpustilo v 10 ml etheru prostého peroxidických látek. Roztok byl

vytřepán čtyřikrát 20 ml amoniakálního roztoku hydroxidu sodného. Spojené alkalické výtřepky byly doplněny v 100 ml odměrné baňce po značku tímž roztokem. Zředěním amoniakálním roztokem hydroxidu sodného byly připraveny roztoky, které obsahovaly 0,5 – 1,0 – 2,0 – a 3,0 mg frangula-emodinu ve 100 ml. Ihned byla změřena jejich absorbance při 530 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena vynesemím absorbance proti obsahu frangula-emodinu. (12)

Koncentrace roztoku [mg/100ml]	Absorbance A	Objem odebraného roztoku [ml]
0,00	0,000	0
0,50	0,171	5
1,00	0,339	10
2,00	0,680	20
3,00	0,982	30



### Kalibrační křivka frangula-emodinu



## 5.4. Statistické zpracování výsledků

Ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na produkci anthracenových derivátů byl použit *t*-test (test významnosti dvou průměrů) pro zvolenou hladinu významnosti  $p = 0,05$  (32).

K výpočtu testovacího kritéria bylo použito následujícího vztahu:

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

$t$	testovací kritérium
$\bar{x}_1$	aritmetický průměr kontrolního souboru
$\bar{x}_2$	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

Směrodatná odchylka se vypočítá podle vztahu:

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

Aritmetický průměr se vypočítá podle vztahu:

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

$x_i$  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  $n_2=3$  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  $p(0,05)=3,182$ . (32)

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. Tabulky

Tabulka 1: Suspenze

Elicitor	Doba působení (hod)	Elicitace		Kontrola		t-test
		Obsah (%)	Směrodatná odchylka	Obsah (%)	Směrodatná odchylka	
CoCl <sub>2</sub> 100µM	6	0,687	0,062	0,460	0,011	4,783
	24	0,186	0,051	0,460	0,011	6,980
	48	0,256	0,078	0,460	0,011	3,445
	168	0,571	0,048	0,504	0,004	1,876
CoCl <sub>2</sub> 10µM	6	0,459	0,042	0,460	0,011	0,030
	24	0,485	0,081	0,460	0,011	0,410
	48	0,585	0,029	0,460	0,011	5,224
	168	0,495	0,110	0,504	0,004	0,103
CoCl <sub>2</sub> 1µM	6	0,545	0,075	0,460	0,011	1,497
	24	0,379	0,027	0,460	0,011	3,614
	48	0,626	0,046	0,460	0,011	4,635
	168	0,343	0,025	0,504	0,004	8,335
CoCl <sub>2</sub> 0,1µM	6	0,364	0,041	0,460	0,011	9,547
	24	0,492	0,035	0,460	0,011	1,137
	48	0,526	0,095	0,460	0,011	0,925
	168	0,370	0,040	0,504	0,004	4,495

Poznámka: Zvýrazněné hodnoty obsahu anthracenových derivátů jsou statisticky významně zvýšené oproti hodnotám kontroly,  $p=0,05$ .

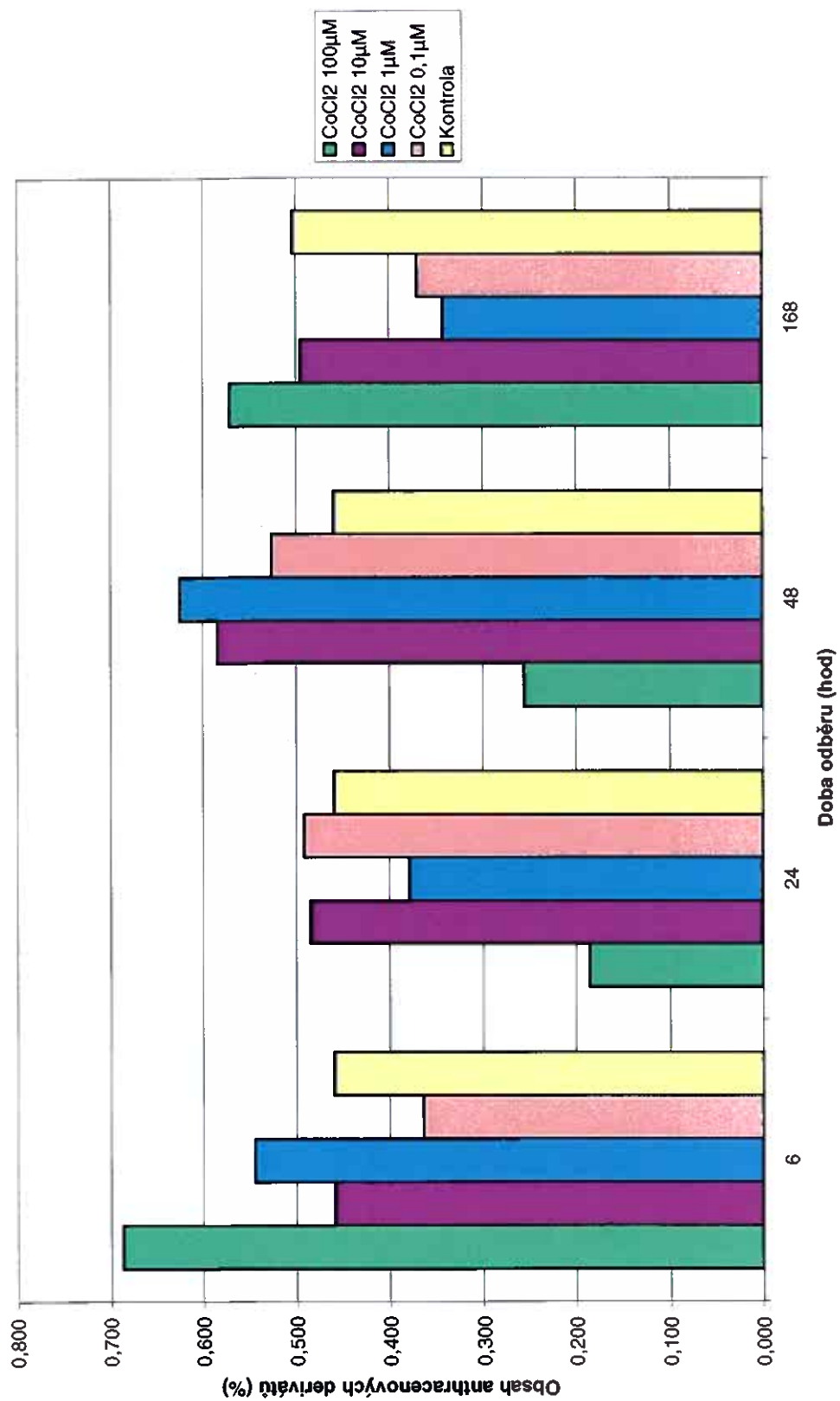
Tabulka 2: Kalusy

Elicitor	Doba působení (hod)	Elicitace		Kontrola		t-test
		Obsah (%)	Směrodatná odchylka	Obsah (%)	Směrodatná odchylka	
CoCl <sub>2</sub> 100μM	6	0,380	0,035	0,369	0,007	0,413
	24	0,187	0,024	0,369	0,007	9,526
	48	0,195	0,021	0,369	0,007	10,482
	168	0,470	0,024	0,406	0,009	3,294
CoCl <sub>2</sub> 10μM	6	0,448	0,011	0,369	0,007	7,477
	24	0,401	0,047	0,369	0,007	0,891
	48	0,130	0,012	0,369	0,007	21,618
	168	0,096	0,021	0,406	0,009	17,580
CoCl <sub>2</sub> 1μM	6	0,269	0,032	0,369	0,007	4,067
	24	0,240	0,016	0,369	0,007	9,386
	48	0,474	0,035	0,369	0,007	3,944
	168	0,207	0,025	0,406	0,009	9,691
CoCl <sub>2</sub> 0,1μM	6	0,321	0,008	0,365	0,007	5,081
	24	0,335	0,031	0,365	0,007	1,232
	48	0,354	0,068	0,365	0,007	0,209
	168	0,292	0,051	0,406	0,009	2,935

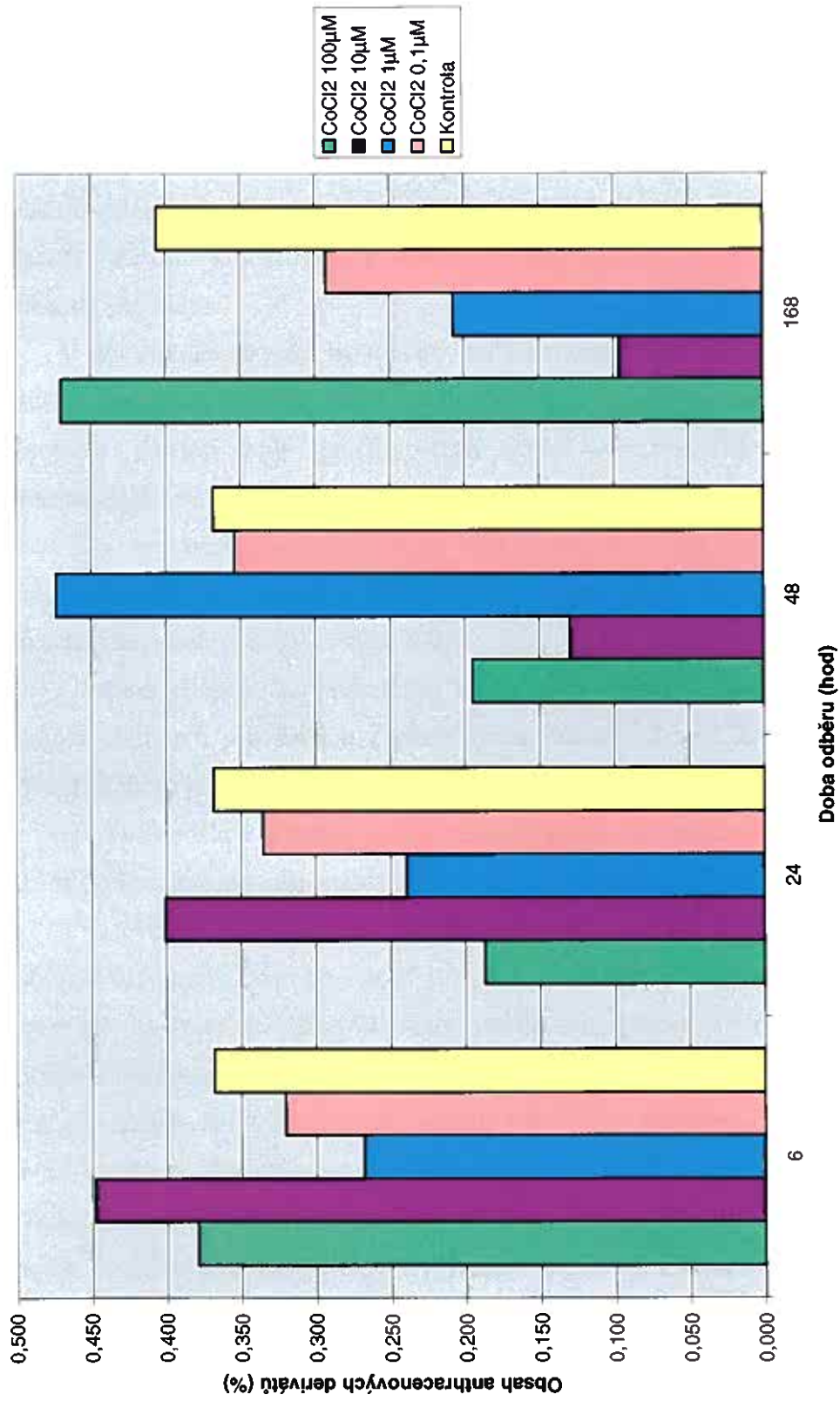
Poznámka: Zvýrazněné hodnoty obsahu anthracenových derivátů jsou statisticky významně zvýšené oproti hodnotám kontroly,  $p=0,05$ .

## 6.2. Grafy

Graf 1: Suspenze



Graf 2: Kalusy



## 7. DISKUSE

Cílem kultivace rostlinných explantátů je zvýšit produkci a dostupnost farmaceuticky významných sekundárních metabolitů. V důsledku nedostatečného poznání regulace sekundárního metabolismu se zvyšuje produkce žádaného metabolitu nejčastěji změnami kultivačních podmínek. Velmi nadějná se jeví metoda elicitace explantátových kultur.

V této diplomové práci byly sledovány kobaltnaté ionty jako potenciální elicitor produkce anthracenových derivátů v kalusové a suspenzní kultuře reveně dlanité. K abiotické elicitaci byly použity čtyři vodné roztoky chloridu kobaltnatého o koncentracích 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$ , které byly zvoleny na základě literární rešerše (32-36). Doba působení elicitoru byla 6, 24, 48 a 168 hodin (17). Kontrolní kultury byly odebrány po 24 a 168 hodinách, neboť jejich produkce se v krátkých časových intervalech výrazně nemění (38).

Úspěšná elicitace je podmíněna celou řadou faktorů, které jsou specifické pro každý elicitor a pro každou explantátovou kulturu. Kromě koncentrace a doby působení elicitoru je dalším faktorem fyziologický stav kultury, jinak řečeno její růstová fáze. Nejvyšší produkce anthracenových derivátů kalusovou kulturou *Rheum palmatum* je 21. den subkultivace a suspenzní kulturou je to 14. den subkultivace. (38)

U suspenzní kultury *Rheum palmatum* (Tabulka 1, Graf 1) vyvolala maximální obsah anthracenových derivátů (0,687 %) již 6 hodinová aplikace nejsilnější 100  $\mu\text{M}$  koncentrace chloridu kobaltnatého, kdy došlo k statisticky významnému zvýšení produkce oproti kontrole o 50 %. V následujících sledovaných časových intervalech (24 a 48 hodin) byl zaznamenán naopak statisticky významný pokles produkce a po 168 hodinách opět významný nárůst produkce vůči kontrole. U všech ostatních použitých koncentrací elicitoru (10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$ ) měla nejvyšší elicitaci účinek 48 hodinová aplikace elicitoru, která s výjimkou nejsilnější koncentrace také statisticky významně zvýšila produkci ve srovnání s kontrolou.

U kalusové kultury (Tabulka 2, Graf 2) byl maximální obsah sledovaných metabolitů (0,474 %) zjištěn po 48 hodinovém působení 1  $\mu\text{M}$  koncentrace chloridu kobaltnatého, kdy byla produkce zvýšena v porovnání s kontrolní kulturou o 30 %. K statisticky významnému zvýšení produkce došlo také po 168 hodinové aplikaci nejsilnější koncentrace elicitoru a po 6 hodinovém působení koncentrace 10  $\mu\text{M}$ .



V ostatních případech elicítace vedla s výjimkou dvou nevýznamných zvýšení již jen ke snížení produkce v porovnání s kontrolou.

Vliv chloridu kobaltnatého na produkci paklitaxelu byl sledován také v suspenzní kultuře *Taxus chinensis*. Stimulaci produkce vyvolala, podobně jako u suspenzní kultury reveně, koncentrace 100  $\mu\text{M}$  (35). Pozitivní účinek zvýšené koncentrace chloridu kobaltnatého (2  $\mu\text{M}$ ) na tvorbu saponinů byl pozorován také v kalusové kultuře *Agave amaniensis* (39), naopak v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* změny koncentrace kobaltnatých iontů v rozsahu 0 až 100  $\mu\text{M}$  neměly vliv na tvorbu kumarinů a při vyšších koncentracích elicítoru došlo k poklesu produkce (37). Odstranění kobaltnatých iontů z média vedlo ke zvýšení produkce betakyanů v suspenzní kultuře *Beta vulgaris* (40).

Kobalt byl zkoumán také v buněčné suspenzi *Crotalaria cobalticola* (hyperakumulátor kobaltu). Zatímco koncentrace různých sloučenin vlivem kobaltnatých iontů vzrostla, biosyntéza fytochelatinů nebyla indukována. I když se fytochelatiny nepodílí na vzniku komplexu s kobaltem, jejich ústřední role ve vylučování mnoha dalších kovů by však neměla být zpochybňována. V buňkách *Crotalaria cobalticola* bylo pozorováno zvýšené množství kyseliny citrónové a cysteinu. Výsledky naznačují zapojení cysteinu do komplexu s kobaltem. (27)

Interpretovat zjištěné výsledky je obtížné, neboť při hodnocení výsledků je nutné vzít také v úvahu, především u vysokých koncentrací, že při změně kvantitativního zastoupení složek základního média, se mění i celkový osmotický tlak média, což samozřejmě může velmi významně ovlivnit tvorbu sekundárních metabolitů.

## 8. ZÁVĚR

Výsledky této diplomové práce můžeme shrnout takto:

Elicitace 100  $\mu\text{M}$  chloridem kobaltnatým vedla k nejvyššímu obsahu anthracenových derivátů v suspenzní kultuře *Rheum palmatum* L. (0,687 %) již po 6 hodinách. Došlo ke zvýšení produkce o 50 % oproti kontrolnímu vzorku. Další nárůst produkce anthracenových derivátů byl při 48 hodinové elicítaci 10  $\mu\text{M}$  (nárůst o 27 %) a též při 48 hodinové elicítaci 1  $\mu\text{M}$  roztoku chloridu kobaltnatého (36 %).

Oproti suspenzním kulturám byla u kalusů prokázána nejvyšší produkce anthrachinonů o 30 % u 24 hodinové elicítace 1  $\mu\text{M}$  roztoku, dále 21 % nárůst u 6 hodinové elicítace 10  $\mu\text{M}$  roztoku a statisticky významný byl i 17 % nárůst u 168 hodinové elicítace 100  $\mu\text{M}$  roztoku chloridu kobaltnatého.

## 9. SEZNAM LITERATURY

1. Opletal, L., Volák, J.: Rostliny pro zdraví, Praha, Aventinum, 1999, s. 6, 136-137.
2. Tomko J. a kol.: Farmakognózia, Martin, Osveta, 1999, s. 24-25, 203-204.
3. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 2001, s. 75-83.
4. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 1992, s. 34, 41, 84-88, 94.
5. Beiderbeck, R., Reihling, J.: Biologie, 1989; 3, 188.
6. Příhoda, A.: Léčivé rostliny, Praha, Státní zdravotnické nakladatelství, 1980, s. 135-136.
7. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J., Šícha, J.: Obecná farmakognosie II., Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1989, s. 11, 41-44, 51-54.
8. Valíček, P. a kol.: Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny, 1. vydání, Hradec Králové, Svitání, 1998, s. 234-235.
9. Korbelář, J., Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství, Praha, Avicenum, 1981, s. 368.
10. Sovová, M.: Vybrané kapitoly z produkce léčivých rostlin, Praha SPN, 1990, s. 97-98.
11. Kolektiv autorů: Český lékopis 2005, Praha, Grada, 2005, s. 2234. (ČL 2002)
12. Československý lékopis, 4. vydání, Praha, Avicenum, 1987, s. 814. (ČSL 4)
13. Janča, J.: Praktická homeopatie, Praha, Eminent, 1992, s. 106.
14. Řeřábek, J.: In: Biotechnologické využití tkáňových a buněčných kultur vyšších rostlin, Praha, pobočka ČSVTS ÚOCHB a ÚEB ČSAV, 1985, s. 44.
15. Tensoker, E.: Pharmazie, 1973; 28, 6.
16. Alfermann, A.W.: 44<sup>th</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research and a Point Meeting with the Czech Biotechnology Society, Prague, Abstracts of Lectures and Poster Presentations, 1996, s.11.
17. Červená, M. Diplomová práce, UK FaF Hradec Králové 2005.
18. Procházka, S. a kol.: Fyziologie rostlin, Praha, Akademia, 1998, s. 110, 412, 423-425, 430.
19. Kašparová, M.: Siatka, T., Dušek J.: Čes. Slov. Farm., 2003; 52, 248.

20. Reihling, J., Beiderbeck, R.: *Biologie*, 1989; 5, 453.
21. Nürnberger, T., Scheel, D.: *Trends Plant Sci.*, 2001; 6, 372
22. Williams, L.E., Pittman, J.K., Hall, J.L.: *Int. J. Biochem. Biophys.*, 2000; 1465, 104.
23. Kneer, R., Zenk, M. H.: *Phytochemistry*, 1997; 44, 69.
24. Krätzmár-Šmogrovič, J. a kol.: *Všeobecná a anorganická chémia*, Martin, Osveta, 1977, s. 374-375.
25. Drátovský, M., Ebert, M.: *Anorganická chemie II*, Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1997, s. 54.
26. Tržil, J., Ullrych, J.: *Chemie III.*, Ostrava, Vysoká škola báňská, 1977, s.192.
27. Oven, M. a kol.: *Phytochemistry*, 2002; 60, 467.
28. Harper A.H.: *Přehled fyziologické chemie*, Praha, Avicenum, 1977, s. 480.
29. Chatterjee, J., Chatterjee, C.: *Plant Sci.*, 2003; 164, 793.
30. Kolektiv autorů: *Český lékopis 2002*, Praha, Grada, 2002, s. 154.
31. Murashige, T., Skoog, F.: *Physiol. Plant.*, 1962; 15, 473
32. Reisenauer, R.: *Metody matematické statistiky a jejich aplikace*, Praha, Státní nakladatelství technické literatury, 1970, s. 82, 207.
33. Tůmová, L., Poustková, J., Tůma, J.: *Acta Pharmaceutica*, 2001; 51, 159.
34. Repcak, M., Imrich, J., Franková, M.: *J. Plant Physiol.*, 2001; 158, 1085.
35. Zhang, C. H., Wu, J. Y.: *Enzyme Microb. Technol.*, 2003; 32, 71.
36. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. Slov. Farm.*, 2004; 53, 252.
37. Siatka, T. a kol.: *Čes. Slov. Farm.*, 2005; 54, 47.
38. Kašparová, M., Dušek, J.: *Herba Pol.*, 2000; 46,18.
39. Sri Andrijany, V., Indrayanto, G., Adi Soehono, L.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1999; 55, 103.
40. Akita, T., Hina, Y., Nishi, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002; 66, 902.