

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA FARMAKOGNOSIE

*Produkce sekundárních metabolitů v rostlinných
explantátových kulturách*

(diplomová práce)

Kateřina Týmalová

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

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

OPONENT: PharmDr. MARIE KASPAROVÁ, Ph.D.

180

Katedra
farmakognosie
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a že
jsem použila pouze uvedenou literaturu.

Děkuji PharmDr. Tomášovi Siatkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytoval během vypracovávání diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1 <i>ANGELICA ARCHANGELICA L.</i>	13
3.1.1 <i>Popis</i>	13
3.1.2 <i>Ekologie druhu</i>	14
3.1.3 <i>Rozšíření v ČR</i>	14
3.1.4 <i>Užívaná část</i>	14
3.1.5 <i>Sběr a úprava</i>	15
3.1.6 <i>Obsahové látky</i>	15
3.1.7 <i>Účinky</i>	15
3.1.8 <i>Užití</i>	15
3.2 KUMARINY	17
3.2.1 <i>Účinky kumarinů</i>	17
3.2.2 <i>Biosyntéza kumarinů</i>	19
3.2.2.1 Primární a sekundární metabolity	19
3.2.2.2 Aromatické látky.....	20
3.2.2.2.1 Kyselina šikimová.....	20
3.2.2.2.2 Metabolity šikimátové dráhy	21
3.2.2.2.3 Kumariny	22
3.3 EXPLANTÁTOVÉ KULTURY	25
3.3.1 <i>Explantátové kultury a sekundární metabolity</i>	26
3.3.2 <i>Elicitory</i>	27
3.3.3 <i>Kultivace explantátových kultur</i>	27
3.3.3.1 Kultivační média pro explantátové kultury	27
3.3.4 <i>Využití explantátových kultur</i>	29
3.3.5 <i>Mikropropagace rostlin</i>	29
3.4 VLIVY PROSTŘEDÍ NA FYZIOLOGII ROSTLIN.....	30
3.4.1 <i>Stresové faktory</i>	31
3.4.2 <i>Stresová reakce</i>	31
3.4.3 <i>Mechanismy stresových reakcí</i>	32

3.4.4 Působení některých stresových faktorů.....	33
3.5 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA.....	36
3.5.1 Princip a vlastnosti metody SIA.....	37
3.5.2 Technické provedení	37
3.5.3 Uplatnění SIA v praxi	38
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
4.1 PŘÍSTROJE.....	40
4.2 CHEMIKÁLIE	40
4.3 TKÁŇOVÁ KULTURA <i>ANGELICA ARCHANGELICA L.</i>	41
4.3.1 Kultivace tkáňové kultury	41
4.3.2 Živné médium podle Murashigeho a Skooga.....	41
4.4 STANOVENÍ KUMARINŮ.....	42
4.5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	43
5. VÝSLEDKY	44
6. DISKUSE.....	53
7. ZÁVĚR	56
8. LITERATURA.....	58

1. ÚVOD

Říká se, že se jedním způsobem rodíme a tisícerým umíráme.

Už prvobytný člověk trpěl různými nemocemi, které mu zkracovaly život. Ale protože se živil tím, co mu poskytovala okolní příroda, postupně poznával vlastnosti rostlin k léčení svých nemocí.

Zkušeností s používáním rostlin, at' už v dobrém, nebo zlému smyslu slova, přibývalo. Aby nezanikly se smrtí jedince, rodiny nebo rodu, shromaždovali je u sebe schopní lidé, k nimž se potom v případě potřeby uchylovali ostatní z širokého okolí, když potřebovali radu nebo pomoc v nemoci. Stávali se z nich léčitelé.

Bylo to v době, kdy si lidé představovali, že všechno v přírodě má svou duši: slunce, měsíc, kámen, rostlina. V léčivé rostlině, která přemáhala nemoc, tušili tajemné síly, kouzelnou moc. Léčitelé předstírali, že jsou prostředníky mezi nevědomým, slabým člověkem a oněmi tajuplnými silami, a stávali se z nich kouzelníci. Tito kouzelníci sbírali staré lidové zkušenosti a zapisovali si je. Časem se z nich stávali lékaři.

V Asii a severní Africe nalézáme už z období před 4000 lety doklady o léčení rostlinami. Stejně tomu je i u národů Střední a Jižní Ameriky a Dálného východu.

Číňané snižovali horečky výtažkem z kořene čang-šán už před 3000 lety. Účinek opia byl znám už ve starém Egyptě. Jihoameričtí indiáni léčili zimnici rozemletou kůrou chinovníku už před španělskou okupací (1861-1865). V Indii léčili své duševní choré výtažkem z kořene rostliny Rauwolfie, z kterého bylo získáno v roce 1950 známé hypotenzivum reserpin.

Nejstarší písemné údaje o rostlinných léčivech pocházejí patrně z čínského herbáře z roku 2700 př.n.l. První zemí, která vyvážela drogy a koření, byla Indie. Cesty karavan vedly kolem roku 2000 př.n.l. z Indie a Číny babylonskou říší k Černému moři do Sýrie, Palestiny a Egypta. V 17. století bylo Asyřanům a Babyloňanům známo 65 druhů léčivých rostlin.

Znamenití obchodníci s drogami a kořením byli i Feničané. Ovšem tvář světa brzy určovali Řekové, Egypťané a později Římané. Slavní staří řečtí a římskí filozofové, přírodopisci a lékaři – Hippokrates, Aristoteles, velký znalec rostlin Theophrast, Dioscorides a jiní žili 500 let př.n.l.

Hippokrates byl autoritou, která převyšovala všechny současníky. Snažil se osvobodit léčitelství od kněžského mysticismu. Už ve dvaceti letech byl slavným lékařem. Dokazoval, že neléčí lékař, ale sama příroda, v níž přední místo zaujímají rostliny.

Aristoteles, žák Hippokrata, je považován za prvního systematického botanika. Theophrastova díla (O dějinách rostlin a Působení rostlin), sloužila dlouho do středověku jako podklad k bádání o léčivech přírodního původu.

V Římě zejména přírodopisec Plinius a proslulý Galénus zanechali po sobě zprávy o užívaných rostlinách a jejich vybájených a skutečných účincích.

Galénus byl po 14. století vzorem lékařů celého světa. Avšak Galénovy recepty jsou velmi rozsáhlé, komplikované a často také velmi scestné. Galénovo učení se udrželo až do dob Paracelsových (do 16. století). Paracelsus, vědec a lékař, byl zapřísáhlým odpůrcem Galéna. Žádal od vědců pozorování, zkušenost a nový pohled na léky. Hledal zkušenosti u prostých lidí, sedláků, lazebníků, pastevců, cikánů, ba i katů. Získal od nich původní recepty a zkoumal jejich masti, obsahující výtažky z bylin. Prohlásil, že naše pole, louky a stráně jsou velikou lékárnou a že je možno obejít se bez nákladného dovozu léčiv ze zámořských krajů.

Ve středověku nastalo zatemnění vlivem náboženství. Církev zakazovala některé nemoci léčit, uzdravení bylo věcí boží.

Je zajímavé to, že lidé v různých vzdálených zemích, žijící přibližně za stejných podmínek, si pomáhali téměř stejnými prostředky. Všude se užívala mléčná šťáva z makovic k utišení bolesti, kostival při zlomeninách, plicník lékařský proti chrapotu a zánětům v krku...

Lid si léčivých rostlin velmi vážil a uctíval je. Jeví se to i v pojmenování druhů bezprostředně spjatých s jejich účinností (jaterník hojí játra, plicník plíce, průtržník pomáhá při kýlách...). (1)

Druhá polovina 19. století navázala na celkem ojedinělé, ale významné objevy začínající chemie a podnítila její intenzivní rozvoj. Léčivé rostliny se v 19. století dostaly do středu hlavního zájmu tehdejších lékárníků – „chemiků“, kteří z nich izolovali čisté látky, spíše však souhrny látek, jimiž se mohly postupně nahrazovat dosavadní drogy. Objevila se i první syntetická léčiva, jež postupně zatlačila drogy, stala se dokonce jakousi módou a brzy ovládla terapii. Tento postup se v podstatě nezastavil dodnes, i když je už neudržitelná původní představa, že by bylo možné léčivé rostliny nebo účinné látky z nich izolované zcela nahradit léčivy syntetickými. (2)

Lékařská věda zkoumá dnes všechny poznatky lidového léčitelství, znovu je zkouší a přísně vědecky hodnotí. Snaží se především z léčení rostlinnými prostředky vyloučit falešné představy a nepravdy. Chce zbavit léčivou rostlinu balastu a různých

domněnek a převzít drogu jako skutečně vzácný materiál k průmyslové výrobě léčiv. Prověřuje mechanismus účinků a podle něho zdůvodňuje a zpřesňuje indikace při určitých nemocech. Tam, kde se rostlina jeví málo účinná nebo neúčinná, nahrazuje ji jinými léky.

Lidové léčitelství minulosti, i když mělo spousty nedostatků, poskytlo nám při svých praktických zkušenostech veliké množství vzácných poznatků.

V dřívějších dobách užíval člověk v lidovém léčitelství a v oficiálním lékařství asi 4000 druhů léčivých rostlin. Dnes, po vědeckém zhodnocení, se na našem území používá asi 200 druhů.

U mnoha rostlin obsah účinných látek už známe. Ovšem existuje řada léčivých rostlin, jejichž všechny obsahové složky ještě nejsou prozkoumány, anebo se přichází na zcela nové využití látek již známých.

Skutečnost, že neznáme ještě některé účinné látky, nebo že jejich účinek není dosud experimentálně dostatečně zdůvodněn, vede někdy k podceňování léčivých rostlin, a to často i druhů velmi známých a mnohdy prakticky osvědčených. (1)

Ideální stav by byl, kdyby přírodní prevence a léčba byla vedena lékařem. Skutečnost je však bohužel zcela odlišná. Ze začátku medicína přejímala zkušenosti z přírodních způsobů uzdravování, ale postupem času zcela zapomněla na svůj původ a začala se „modernizovat“, což se dá v principu nazvat odcizováním od přírodních postupů, ale hlavně zákonitostí. (3)

Léčivé rostliny jako drogy, především však účinné látky z nich izolované, byly, jsou a budou stále platným pomocníkem lékařů a právě další rozvoj chemie, farmacie, lékařských a biologických věd je pro to nejen podmínkou, ale i zárukou. (2)

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je sledování vlivu různých koncentrací vanadičnanu sodného na produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Angelica archangelica* L.

3.1.1 *Popis*

Je to dvouletá až čtyřletá, statná, téměř lysá, monokarpická bylina. Oddenek má mohutný, řepovitý, kroužkovitě svrasčitý, 5-30 cm dlouhý, 3-8 cm široký, s bělavou nebo žlutavou mlékovitou šťávou, s množstvím jemných kořenů a zvláště v dolní polovině s četnými provazcovitými adventivními kořeny. Kořenová hlava je krátce jemně čupřinatá. U starších rostlin je oddenek vícehlavý.

Přízemní listy bývají v počtech 2-5, s mohutnou listovou pochvou, celé postupně odumírající. Lodyha je jedna, přímá, v horní polovině přímo odstále větvená, 90-200(-250) cm vysoká, oblá, jen nezřetelně rýhovaná. Bývá zelená nebo tmavě nachově zbarvená, s velkou centrální dutinou. Někdy mohutnější rostliny mají u báze několik postranních, tenčích lodyh.

Listy jsou střídavé, 2-3 krát trojeně zpeřené. V obrysu široce trojúhelníkovité, až 110 cm dlouhé. Lísteky mají tvar nepravidelně vejčitý až široce vejčitý, koncové jsou ± třílaločnaté až pětilaločnaté. Postranní lístečky jsou většinou nesouměrné dvoulaločnaté, 8-23 cm dlouhé, 6-19 cm široké, nestejně hrubě ostře pilovité, zašpičatělé zuby s bělavou špičkou, řapíky i vřetena listů dutá. Řapíky dosahují délky 25-50 cm, listové pochvy jsou až 16 cm dlouhé a 15 cm široké.

Nejhořejší listy jsou téměř redukované v pouhou listovou pochvu. Pochvy, řapík i vřetena čepelí jsou jemně rýhované.

Lodyha i postranní větve jsou s terminálními složenými okolíky, které mají 8-19 cm v průměru. Okolíky jsou polokulovité, husté, obal jim chybí, anebo je utvořen na postranních větvích z 1-6 nepravidelně rozložených čárkovitých šídlovitých listenů.

Obalíčky jsou s (5)-7-10 (-17) čárkovitými až šídlovitými, lysými až drsnými listeny. Okolíčku v okolíku je (20)- 24-66 (-82). Květů v okolíčku je 24-59. U vnějších okolíčků je počet květů vždy větší než u vnitřních.

Korunní lístky mají tvar vejčitě kopinatý, s dovnitř zahnutou špičkou a krátce klínovitou bází. Barva je zelenavě bělavá až žlutozelená.

Nitky tyčinek jsou 3 mm dlouhé, prašníky 0,7-0,8 mm dlouhé a středem přirůstají k nitce. Semeník je široce elipsoidní. Čnělky krátké, za plodu jsou až do 3 mm prodloužené.

Dvounažky jsou elipsoidní, ze hřbetu smáčklé (4-)5-8(-9) mm dlouhé, 3,5-5,0 mm široké, po stranách křídlaté. Merikarpia mají na hřbetě 3 žebra, barva je světle hnědá, lysá. (4)

3.1.2 Ekologie druhu

Horské nivy, břehy potoků a řek, vlhké příkopy jsou místa výskytu anděliky lékařské. V horských oblastech se může vyskytovat např. ve společenstvech svazů *Calamagrostion arundinaceae* a *Adenostylion*. Jinak je pěstovaná v zahradách i v polních kulturách, zvláště ve vyšších polohách, kde zplaněné rostliny přetrhávají v antropofilních společenstvech. Semena po několika měsících ztrácejí klíčivost. Rostou na půdách vlhkých v blízkosti vodní hladiny, humózních a živinami bohatých, občas zaplavovaných. Především však vyplňují spáry mezi kamením a balvany, kde kořeny dosahují snadno k hladině podzemní vody, prosakující z říčního koryta. Osíduje říční úseky se značně znečištěnou vodou s obsahem různých solí a jiných látek. Je to polosvětlomilná až světlomilná rostlina, náročná na vyšší hladinu podzemní vody. (4)

3.1.3 Rozšíření v ČR

Dosavadní představa o původním výskytu anděliky lékařské u nás v horách, především v Krkonoších (např. Labský důl), vznikla zřejmě na základě nejstarších zpráv z našeho území, které výskyt anděliky lékařské lokalizovaly právě do Krkonoš. Tuto teorii nelze však přesvědčivě vyvrátit.

Všechny ostatní výskypy na území ČR jsou již zjevně druhotné, jednak šlo o rostliny pěstované v zahradách, vzácněji jde o rostliny zplaněné z těchto kultur do okolí. (4)

3.1.4 Užívaná část

Z anděliky lékařské se používá především oddenek s adventivními kořeny (*Radix angelicae*), někdy i plody (*Fructus angelicae*) a listy (*Folium angelicae*). (4)

V homeopatii se užívá i list, trhaný v květu rostliny, jinak hlavně kořen a semena, která se sbírají v září po úplném dozrání. (3)

3.1.5 Sběr a úprava

Z pěstovaných rostlin se v září a v říjnu druhého roku sbírá kořen. Rychle se omyje, silnější exempláře se půlí, suší se ve stínu. Teplota při event. umělém sušení nemá překročit 35 °C. Droga snadno vlhne a pak bývá napadena hmyzem. Plody se sbírají v srpnu a v září seřezáváním zralých částí okolíků, které se pak dosuší, vydrolí a vytrídí. (4)

V homeopatii se zpracovává silně rozmělněná droga macerací v ethanolu 50%, po dobu 14 dní. Dále se pak ředí ethanolem 45% až do potence D3. (3)

3.1.6 Obsahové látky

Droga se vyznačuje kořenitou vůní a ostře kořenitou a hořkou chutí. (4) Kořen a plody obsahují hlavně silice a terpeny (kořen 0,3-1,0 %, plody 1-2 %) s hlavní obsahovou složkou felandrenem, pinenem a cymolem. Dále obsahují hořčinu angelicin, furanokumariny a jiné látky. (1)

3.1.7 Účinky

Andělika působí povzbudivě na sekreci žaludečních šťáv a uklidňuje zvýšenou střevní peristaltiku. Ve velkých dávkách může zprvu působit povzbudivě, ale později ochromuje centrální nervovou soustavu. Zevně mírně dráždí kůži. Vlivem furanokumarinů vyvolává fotosensibilizaci. Je-li tedy kůže ozářená, může vytrysklá šťáva vyvolat kožní projevy. (1)

3.1.8 Užití

Silice (*Oleum angelicae*), obsahující hlavně felandren, se přidává do likérů, k aromatizování rybích konzerv a používá se v kosmetickém průmyslu. Mladé stonky sloužily v cukrářství. (4)

Vnitřně se užívá jako stomachikum a karminativum (půl čajové lžičky na šálek vody jednou denně před hlavním jídlem). Používá se při nemozech trávicí trubice (při nechutenství, při nedostatečné sekreci žaludeční, k zvýšenému vylučování žluči aj.). Zpravidla se užívá v kombinaci s jinými žaludečními prostředky. Osvědčuje se rovněž jako prostředek podporující odkašlávání a jako kloktadlo při zánětech dutiny

ústní (ve formě lihového roztoku *Spir. angelicae comp.*). Obklad z odvaru se používá při myalgiích. (1)

Zkušení včelaři pěstují anděliku lékařskou jako pastvu pro včely. Andělika jako nektarodárná rostlina dodává totiž medu příjemné, balsamické vůně. (5)

V homeopatii se používá hlavně na zažívací potíže, při nadýmání, na špatné a nedostatečné vylučování žluče, na podporu odkašlávání apod. Obecně se používá tinktura D2 s dávkováním 3krát 10 kapek před jídlem. (3)

Recepty z lidového léčitelství

a) Při poruchách trávení po nadměrném požití alkoholu nebo při zažívacích poruchách pijáků dobrou službu koná následující přípravek:

kořene andělikového	7g
dřeva guajakového	10g
vody	300g

se nechá přejít varem a ihned se scedí. Ke scezenému odvaru se přidá:

jedlé sody	10g
------------	-----

co 3 hodiny se užívá jedna lžíce.

b) Při neurastenii, hysterii, nervóze, nespavosti a nervových poruchách, při přechodu mužů i žen se užívá lihového výtažku:

kořene andělikového	8g
kořene kozlíkového	1g
lihu	300g

nechá se stát 36 hodin. Potom se scedí a užívá se 2x denně deset kapek na kostku cukru. (5)

Léčiva

Kořenová droga je součástí čajové přípravku Valofyt a Stomaran. (1)

3.2 Kumariny

Kumarin je aromatická, vonná látka. Byl izolován v r. 1820 z tonkových bobů, což jsou semena jihoamerického stromu silovoně vonného (*Dipteryx odorata*, *Fabaceae*), domácího v Guayaně a Brazílii.

Od kumarinu se odvozují glykosidické látky, které se řadí obecně mezi tzv. kumariny. Jsou to podle substituentů hydroxykumariny, metoxykumariny, furokumariny, pyranokumariny atd. Kumarinových glykosidů je známo asi 200. Z nich více než polovina byla izolována z rostlin čel. miříkovitých (*Apiaceae*). Kromě toho byly nalezeny v zástupcích 30 dalších čeledí rostlin. Jsou to např. bobovité (*Fabaceae*), routovité (*Rutaceae*), hluchavkovité (*Lamiaceae*), hvězdnicovité (*Asteraceae*), lipnicovité (*Poaceae*) atd. (2)

Nejvíce kumarinů se nachází obyčejně v kořenech a semenech. To dalo podnět k vyslovení teorie, že mají v rostlinách funkci jakýchsi usměrňovačů růstu a klíčení.

Co se týče jejich dnešního terapeutického významu, není zatím nijak rozsáhlý, ale není také bez nadějně budoucnosti. Prozatímní zkušenosti jsou spíše negativní, protože nadměrné množství kumarinů vyvolává toxicke příznaky a poškozuje játra. Zájem mohou vzbudit některé kumariny jako sedativa s působením na centrální nervový systém, se schopností rozšiřovat cévy, se spasmolytickým účinkem atd. Významný je jejich fotosenzibilizující efekt a z něho vyplývající terapie depigmentace kůže (vitiligo). Účinky odstraňující krevní srážlivost jsou zvláště patrné u dikumarolu, protože omezuje v játrech tvorbu protrombinu, který se na srážlivosti krve podílí. (2)

3.2.1 Účinky kumarinů

Angelica keiskei obsahuje kumarin laserpitin, u kterého byla prokázána schopnost zvyšovat podíl lipoproteinů s vysokou hustotou bílkovin a zároveň snižovat triglyceridy v játrech a tím pozitivně ovlivňovat poměr lipidů při hyperlipidémích a aterogenezi. (13)

Vodný extrakt rostliny *Angelica sinensis* působí protektivně při letální endotoxémii a experimentální sepsi, kdy zmírňuje systémovou akumulaci pozdního prozánětlivého cytokinu. (14)

Hongkongská studie používala při svých experimentech také vodný extrakt z rostliny *Angelica sinensis* (tzv. dong quai). Výsledky ukazují na možné používání dong quai při premenopausálních a postmenopausálních symptomech a zejména pozitivní vliv u karcinomu prsu žen. (16)

Silice extrahovaná z rostliny *Angelica gigas* inhibuje nikotinem způsobený návyk a neurochemickou citlivost, a proto by tato silice mohla být efektivní při léčbě nikotinové závislosti. (15)

Studie z Los Angeles zjistila antikancerogenní účinek běžně se vyskytujících kumarinů při experimentech na myších. Porovnávala vliv furanokumarinů a běžně se vyskytujících kumarinů na vazbu kancerogenu (7,12-dimethylbenz[a]anthracen) s DNA, tvořící se v myší prsní žláze po aplikaci kancerogenu. Lineární furanokumariny měly větší inhibiční efekt na tuto vazbu než jednoduché kumariny. Mechanismus účinku furanokumarinů je nejspíše inhibice cytochromu P4501. (10)

Harmalin a kumarinové analogy prokazují i antibakteriální aktivitu, zvláště proti grampozitivním bakteriím. (11)

Mammea A/BA a mamme C/OA – kumariny izolované z *Calophyllum brasiliense* inhibují H⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPasu a tím vykazují gastroprotektivní vlastnosti při ulceracích, ale i možné farmakologické a toxikologické interakce. (12)

Dle korejské studie skopoletin indukuje apoptózu u leukemických promyeloidních buněk. Skopoletin způsobí aktivaci jaderného faktoru kappaB, který nejprve aktivuje enzym kaspáza-3 s následnou degradací enzymu poly(ADP-ribosa)polymerasa. Nakonec tato kaskáda vede k apoptóze promyeloidních buněk. (6)

Na antiproliferativní účinek skopoletinu ukazuje i studie z Argentiny. Dichlormethanový extrakt z lípy srdčité, jehož hlavní komponentou je skopoletin, inhibuje množení buněk lymfomu. (7)

Další možné účinky skopoletinu jsou na srdce – zasahuje proti atheroskleróze. Studie odborníků z Korey ukazuje, že skopoletin inhibuje oxidaci LDL (lipoproteinů s nízkou hustotou bílkovin) a tím pádem zasahuje do aterogeneze. Kromě toho skopoletin brání fragmentaci apolipoproteinu B 100 a tím snižuje tvorbu LDL v játrech. (8)

Antifungální účinek byl popsán v argentinské studii. Minimální inhibiční koncentrace byla pro *Fusarium verticillioides* 1,50 mg/ml skopoletinu. Mnohem silnější efekt byl však v kombinaci s ostatními složkami, které byly také izolovány z rostliny zvané *Melia Azadirachta L.* (9)

3.2.2 Biosyntéza kumarinů

Kumariny, sekundární metabolity rostlin, jsou strukturně laktony kyseliny o-hydroxyskořicové. Jsou to deriváty 2-benzopyronu. Kyselina o-hydroxyskořicová se v rostlinách nachází ve formě glykosidových prekurzorů a až po hydrolýze probíhá cyklizace na laktón. V rostlinách jsou kumariny tedy ve formě enzymaticky štěpitelných glykosidů. (17)

3.2.2.1 Primární a sekundární metabolismy

Buňky živých organismů jsou schopné syntetizovat organické látky, z nichž se mnohé pro svoji biologickou aktivitu používají jako přírodní léčiva. Výslednými produkty fotosyntézy jsou sacharidy, ze kterých dalšími procesy v primárním metabolismu vznikají jednoduché nízkomolekulární látky (karboxylové kyseliny, aminokyseliny). Tyto všeobecně se vyskytující látky (primární metabolismy) tvoří materiál pro specifické, geneticky zakódované a kontrolované, enzymy katalyzované reakce, při nichž vzniká množství dalších sloučenin. Ty charakterizují druhotný (sekundární metabolismus) a označují se jako sekundární metabolismy. Vzájemné vztahy v metabolismu rostlin z hlediska aromatických látek znázorňuje schéma č. 1. (17)

Schéma č. 1:



Sekundární metabolity oproti primárním mají taxonomicky ohraničený výskyt. Význam pro organismy, které je produkují, nebývá jednoznačně známý. Nejsou zpravidla bezprostředně nepostradatelné pro rostliny, ve kterých se nacházejí. Je ale těžké zařadit některé látky do skupiny primárních nebo sekundárních metabolitů. Kyselina šikimová se ještě do roku 1950 pokládala za sekundární metabolit, přítomný v asijské rostlině *Illicium anisatum* (*Illiciaceae*), a skvalén, nenasycený alifatický triterpén, byl známý pouze v oleji ze žraločích jater. Dnes o obou látkách víme, že patří k nejrozšířenějším základním složkám metabolismu rostlin. (17)

3.2.2.2 Aromatické látky

Látky, které mají ve struktuře aromatické kruhy, jsou v přírodě velmi rozšířené. Vznikají dvěma biologickými cestami:

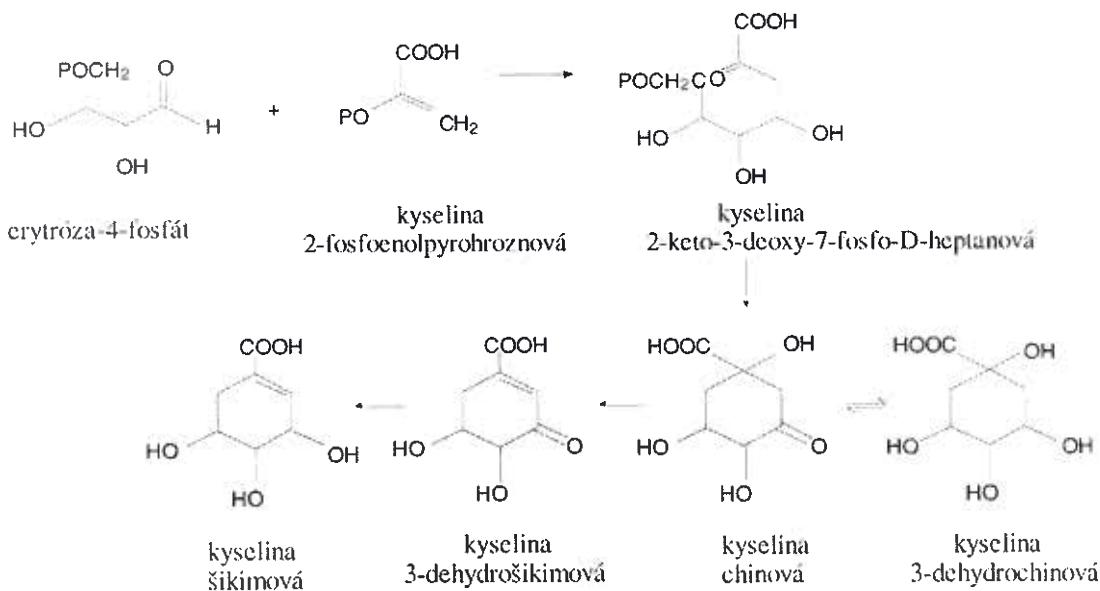
- 1, **Vznik aromatického kruhu cyklizací β -polyketokyselin** – aromáty acetátového původu, kde fenolové skupiny jsou v metapoloze (floroglucinol)
- 2, **Vznik aromatického kruhu z kyseliny šikimové** – přírodní látky odvozené od kyseliny šikimové mají fenolové skupiny v ortopoloze, anebo vicinálně (catechol, kys. galová)

3.2.2.2.1 Kyselina šikimová

Biosyntéza kyseliny šikimové vychází z erytróza-4-fosfátu, který reaguje s fosfoenolpyruvátem za vzniku kyseliny 2-keto-3-deoxy-7-fosfo-D-araboheptanové.

Ta cyklizuje na kyselinu 3-dehydrochinovou. Její redukce vzniká kyselina chinová, která se vyskytuje v rostlinách jednak volná, jednak vázaná s fenolovými látkami. Dehydratační kyseliny 3-dehydrochinové vznikají kyselina 3-dehydrošikimová, která se redukuje na kyselinu šikimovou. Viz schéma č. 2 (17).

Schéma č. 2:

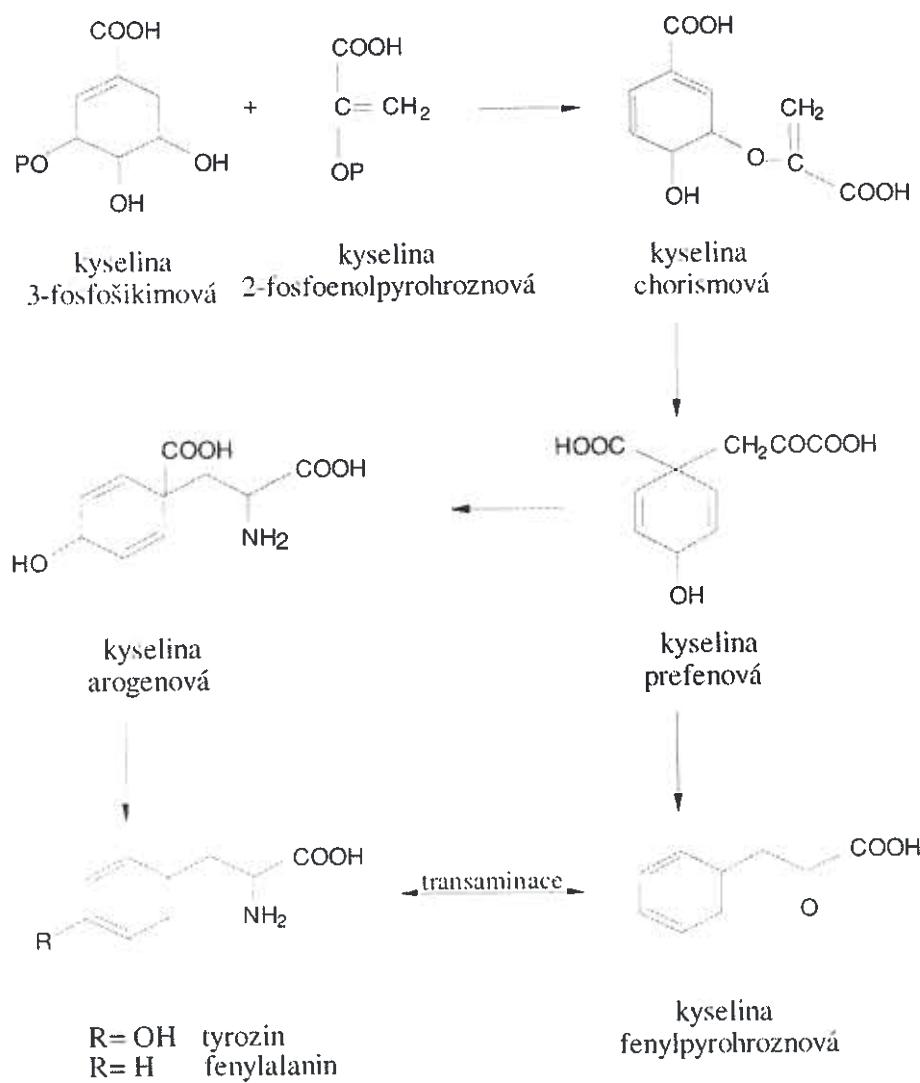


3.2.2.2 Metabolity šikimátové dráhy

Jak již bylo výše uvedeno, kyselina šikimová je prekurzorem významné skupiny látok, které mají na aromatickém kruhu navázaný C₃-řetězec. Vznikají z kyseliny 3-foshošikimové, která reaguje s fosfoenolpyruvátem za vzniku kyseliny chorismové, která je prekurzorem substituovaných fenykarboxylových kyselin. Přesmykem radikálu kyseliny pyrohroznové vzniká z kyseliny chorismové kyselina prefenová. Její dekarboxylaci a dehydrataci se tvoří kyselina fenylypyrohroznová, která přechází transaminací na fenyłalanin.

Druhý způsob je z kyseliny prefenové transaminací přes kyselinu arogenovou, její aromatizaci a dekarboxylaci na tyrozin. Viz schéma č. 3 (17).

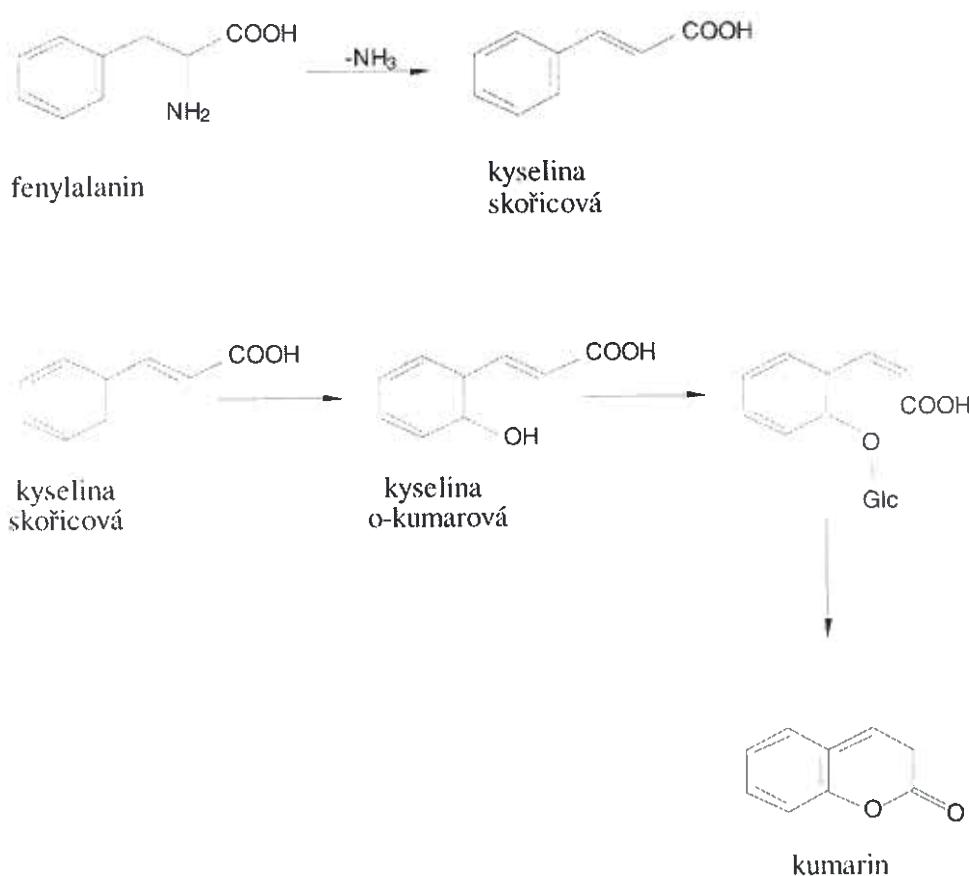
Schéma č. 3:



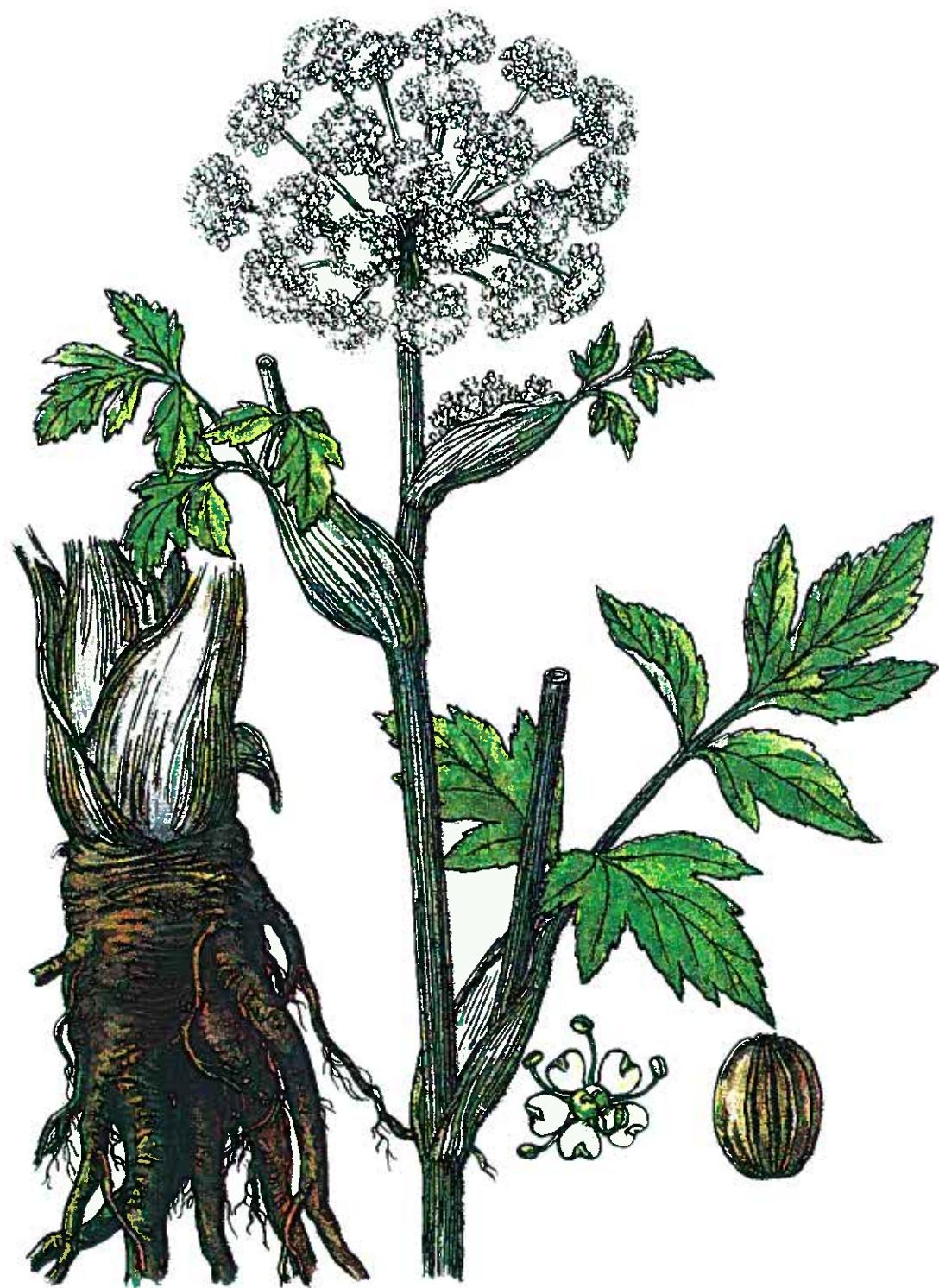
3.2.2.3 Kumariny

Jak již bylo výše uvedeno, kumariny jsou deriváty kyseliny skořicové. Mechanismus vzniku znázorňuje schéma č. 4 (17).

Schéma č. 4:



Obr. č. 1: *Angelica archangelica* L. (1)



3.3 Explantátové kultury

Jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů a kalusu. Explantátové kultury se využívají jak při šlechtění rostlin, tak při produkci rostlinných metabolitů. Hlavní výhodou explantátových kultur je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk a z každé lze vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. (18)

Základem rostlinného organismu, vznikajícího pohlavním rozmnožováním, je jedna buňka – zygota. Zygota obsahuje v jádře kompletní genetickou informaci – je totipotentní. Zygota se mitoticky dělí a vznikají dceřiné buňky, které se dále vyvíjejí a diferencují. 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 meristematických. (23)

To znamená, že každá somatická buňka více či méně specializovaných rostlinných pletiv je totipotentní (= obsahuje celou genetickou výbavu rostliny). Teoreticky by tedy měla explantátová kultura produkovat tytéž látky jako celá rostlina. Ta je však diferencovaná jak v čase, tak v prostoru. Důsledkem toho je, že metabolismus (syntéza, transport, vzájemná přeměna, odbourávání, akumulace a případná exkrece) sekundárních metabolitů probíhá pouze během určitých omezených vývojových stádií organismu. Navíc tyto procesy podléhají v intaktní rostlině složité regulaci. Jen zřídka jsou sekundární metabolity tvořeny ve všech orgánech a během celého životního cyklu rostliny. Proto po převedení explantátů rostlin do tkáňové kultury (což samo o sobě představuje pro buňku značný stres) většinou nastává nepříznivá situace: tkáňová kultura buď žádanou látku neprodukuje, nebo ji produkuje ve velmi nízké koncentraci nebo, v důsledku často nastávajících poruch regulací, dochází k hromadění určitého meziproduktu. (19)

Metodologie explantátových kultur v podstatě využívá mikrobiologických technik a biotechnologických procesů založených na mikroorganismech. Existují však rozdíly mezi kultivacemi mikroorganismů a rostlinných buněk. Kultivace explantátových kultur probíhají delší dobu, jsou citlivější na střížné síly při mechanickém míchání, pro selekci a stabilizaci určitých genotypů se používají komplikovanější postupy a živné půdy jsou dražší. (18)

Prvým úkolem je získat stabilní vysokoprodukční explantátové kultury sestávající z jednotlivých buněk nebo jejich několikačetných agregátů. Explantátová kultura se získává 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 náruštu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné opakováně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat tak získanou kulturu v aktivním stavu. Obsah růstových látek a vitaminů 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. (18)

3.3.1 Explantátové kultury a sekundární metabolismus

Syntézu a akumulaci sekundárních metabolitů je možné považovat za aspekt diferenciace, jev, který je charakterizován biochemicky, histochemicky a morfologicky. Bylo demonstrováno, že v rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se akumuluje malé množství sekundárních metabolitů a že při procesech cytodiferenciace, buněčné aggregace a morfologické organizace dochází ke zpomalení růstu, což přímo koreluje se vzestupem syntézy sekundárních metabolitů v tkáňové kultuře. Ukazuje se, že faktory zpomalující růst buněčných kultur působí také často stimulačně na produkci sekundárních metabolitů především cestou omezení primárního metabolismu.

Tento poznatek naznačuje určitý antagonismus primárního a sekundárního metabolismu, což na molekulární úrovni představuje rozdílné využívání společných prekurzorů. Za podmínek rychlého růstu a dělení jsou tyto látky využívány např. k syntéze proteinů, ale za podmínek inhibice růstu jsou tyto využity k syntéze sekundárních metabolitů (např. fenolů a alkaloidů).

Stimulačně na produkci sekundárních metabolitů může působit i vliv určitého stresu – např. snížení koncentrace živin v živném roztoku, vynechání růstového regulátoru, nebo aplikace prekurzorů či tzv. elicitorů do média. (23)

3.3.2 Elicitory

Jsou to sloučeniny biologického původu, které působí jako aktivátory enzymů v pletivech rostlin nebo stimulují syntézu těchto enzymů. V laboratorních podmínkách se jako elicitorů používá kompletních homogenátů inaktivovaných kultur mikroorganismů – bakterií a hub (nejčastěji se používají fytopatogenní houby *Phytophthora*, *Botrytis*, *Verticillium* nebo nepatogenní mikroorganismy *Aspergillus*, *Micromucor* a *Rhodotorula*). (22, 23)

Elicitory působí jako jakýsi stresový faktor vyvolávající obrannou odpověď buněk založenou na produkci sekundárních metabolitů. Jako příklad obranné reakce rostlin založené na produkci sekundárních metabolitů vyvolané elicitory je možné uvést produkci fytoalexinů.

Většina rostlin reaguje na napadení patogenem produkcí fytoalexinů. Tyto látky mají bakteriostatické, fungistatické a cytostatické účinky. Produkce sekundárních metabolitů může být vedle biotických elicitorů stimulována také elicitory abiotickými. Jako abiotické elicitory produkce sekundárních metabolitů může působit UV záření, chlad, vysoká teplota, soli těžkých kovů, změny pH, změny osmotického potenciálu atd. (23)

3.3.3 Kultivace explantátových kultur

Volba vhodného kultivačního zařízení má pro přípravu explantátových kultur rostlinných buněk značný význam, neboť při kultivacích ve větších objemech se rostlinné buňky liší od mikrobních buněk zejména vysokou zdánlivou viskozitou buněčných suspenzí spojenou s citlivostí ke střížným silám v důsledku značného buněčného objemu. 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 rolery nebo plastikové vaky umístěné na pomaloběžném reciprokém třepacím stroji. (18)

3.3.3.1 Kultivační média pro explantátové kultury

Tkáně mohou být kultivovány na pevném agaru nebo v tekutém médiu. Jestliže rostou tkáně na agaru, vytvářejí zpravidla kalus, tj. masu neorganizovaných buněk. Chceme-li získat buněčnou suspenzi, převedeme kalus do tekutého média.

V průběhu několika týdnů této kultivace a častým pasážováním získáme suspenzi buněk. (24)

Buněčné suspenze se skládají z buněčných agregátů, buněčných skupin a z jednotlivých buněk. Rychlosť rústu takových kultur je obyčejně mnohem větší než rúst kultur kultivovaných na agaru, jelikož použití tekutých médií umožňuje buňkám suspenze přímý kontakt s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou jim rychle přístupné. Z tohoto důvodu bývá buněčný materiál také fyziologicky jednotnější. (23, 24)

Složení médií

Média používaná pro kultivaci buněk, rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky:

- *makroelementy*: mezi šest nejdůležitějších prvků patří: N, P, K, Ca, Mg, S; optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální rústové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu
- *mikroelementy*: Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo
- *zdroj uhlíku*: nejčastěji je používána sacharóza (jako zdroj uhlíku i jako zdroj energie)
- *vitaminy*: normální rostlina si sama syntetizuje vitaminy nezbytné k jejímu rústu a vývoji, vitaminy jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů; mezi nejčastěji používané vitaminy patří: thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol
- *aminokyseliny nebo další zdroj organického dusíku*: přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, může přítomnost některých aminokyselin v živném médiu stimulovat rúst explantátů; velmi často se používá: L-glutamin, L-asparagin, glicin a adenin
- *nedefinované organické složky*: kultury je možné často stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např. proteinového hydrolyzátu, kokosového mléka,

kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu banánů, pomerančové či rajčatové šťávy

- *zpevňující látky*: pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar
- *růstové regulátory*: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová (23)

3.3.4 Využití explantátových kultur

- a) Alternativní příprava produktů získávaných dosud z rostlin v polní kultuře. Předností je možnost vést proces za řízených podmínek, bez závislosti na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech. Výsledné produkty jsou po kvalitativní stránce homogenní, prosté kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultur.
- b) Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách.
- c) Získávání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových buněk. Z explantátových kultur byly izolovány látky, které nebyly zjištěny v mateřských rostlinách, z nichž byly kultury odvozeny.
- d) Produkty biotransformací, kdy z poměrně levných a dostupných substrátů lze získat farmaceuticky významné látky, protože příslušné enzymy se u mikroorganismů nevyskytují. (18)

3.3.5 Mikropropagace rostlin

Mikropropagace představuje způsob vegetativního množení rostlin s využitím explantátových kultur. (18)

Princip mikropropagace je zhruba následovný:

matečná rostlina → explantát → mikropropagace → zakořenování → aklimatizace → intaktní rostlina (23)

 ... Proti tradičním způsobům vegetativního množení má řadu výhod:

- A) Kultura se odvozuje z velmi malých částí rostlin (explantátů) a nevyžaduje příliš prostoru.
- B) Rozmnožování se provádí za sterilních podmínek a tím se zabrání virovým a mikrobním nákazám.
- C) Podmínky množení jsou přesně definovány, čímž se zvýší koeficient množení.
- D) Je možno produkovat druhy nebo klony rostlin, které se tradičními metodami vegetativního množení pomalu nebo vůbec nemnoží.
- E) Rostliny je možno množit po celý rok bez závislosti na ročním období.
- F) Vzhledem k malé velikosti výchozího materiálu nejsou nároky na velké skleníkové plochy pro uchovávání matečných rostlin.
- G) Rostliny *in vitro* mezi pasážemi nevyžadují prakticky žádnou péči (zálivka, pletí, chemické ošetřování, apod.). (18)

 ... Hlavní nevýhodou je relativně drahé laboratorní vybavení a poměrně vysoká pracnost metody neumožňující využití mechanizace. (18)

3.4 Vlivy prostředí na fyziologii rostlin

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Ty mohou nejen zpomaľovat 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). Termín stres je obvykle používán pro souhrnné označení stavu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů. Nejde přitom nikdy o nějaký ustálený a snadno definovatelný stav, ale spíše o dynamický komplex mnoha reakcí.

Problematika stresu u rostlin je komplikovanější než ve fyziologii živočichů. Je to dáno nejen přisedlým způsobem života, který neumožňuje únik před působením stresorů, ale také tím, že u rostlin je mnohem větší mezidruhová variabilita i heterogenita vnitřního prostředí (buněk, pletiv). (20)

3.4.1 Stresové faktory

Základní dělení stresových faktorů je na abiotické a biotické.

ABIOTICKÉ: □ **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 : ▪ herbivorní živočichové (spásání, poranění)

- patogenní mikroorganismy (viry, mikrobi, houby)
- vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus) (20)

Stresové faktory, at' 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, rezervoáry vody a rezervoáry snadno rozložitelných organických látok tlumící jejich nedostatek). Jedná se vlastně o schopnost vyhnout se stresu, ke které přispívají také vhodně načasované životní cykly. (20)

3.4.2 Stresová reakce

Po proniknutí stresoru k plazmatické membráně dochází ke spuštění řetězce změn, který bývá označován jako stresová reakce. Průběh reakce má následující fáze:

- 1) poplachová fáze** - bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur
- 2) restituční fáze** - nastává, pokud intenzita působení stresorů nepřekračuje letální úroveň a dochází tedy záhy k mobilizaci kompenzačních mechanismů
- 3) fáze rezistence** - směřující ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům
- 4) fáze vyčerpání** - nastává při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru (20)

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 aklimace může být založeno jak na změnách rychle poměřitelných (tvorba specifikovaných metabolitů), tak i na změnách trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře).

Zvýšení odolnosti a opětovné ustanovení rovnováhy i za dlouhodobého působení stresorů bývá obvykle dosahováno jen za cenu jistých dodatečných energetických nákladů, hlavně na syntézu specifických metabolitů. Působení stresorů (např. nízké teploty) však může na druhé straně podmiňovat průběh důležitých morfogenetických procesů, např. klíčení či tvorby květních orgánů a tím zvýšit reprodukční schopnosti i kompetitivní úspěšnost. (20)

Nelze se tomu divit, vždyť celý dlouhý proces evoluce rostlin nepochybňuje probíhal pod vlivem stresových faktorů. (20) Výsledných různých typů životních prostředí, tzv. biotopů, je veliké množství, a proto také existuje nesmírné množství rostlinných druhů, které se vyvinuly za dlouhá geologická období trvající stamilióny let pozvolným vývojem, tj. přizpůsobováním se daným podmínkám. (21)

3.4.3 Mechanismy stresových reakcí

I přes velkou různorodost aklimačních biochemických změn v buňkách lze přesto najít některé procesy, které se opakují i při působení velmi odlišných stresorů. K nejčastějším společným změnám, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči stresovým faktorům současně, patří:

- tvorba stresových proteinů
- tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku
- tvorba „stresových“ fytohormonů (kyseliny abscisové, etylenu, kyseliny jasmonové, methyljasmonátu a polyamidů)
- tvorba osmoregulačních sloučenin (cukrů, polyalkoholů a jednoduchých dusíkatých látek) (20)

3.4.4 Působení některých stresových faktorů

abiotické

teplota

Teplota je pro život rostlin velmi důležitá, protože vegetační pochody (klíčení, růst, kvetení a tvorba plodů) probíhají jen v jejích určitých hranicích. Teplota ovzduší je ovlivňována hlavně slunečním zářením a závisí na zeměpisné šířce, nadmořské výšce pozemku a jeho expozici, vzdálenosti od moře, ale také na složení a barvě půdy a na její schopnosti teplo přijímat a vydávat a konečně na intenzitě biochemických pochodů, které v půdě probíhají. (21)

Při zvýšení teploty nad 40°C dochází u většiny druhů rostlin k zásadním změnám ve fyzikálně-chemických vlastnostech buněčných membrán i proteinů. Lipidová vrstva membrán přechází do lamelárně kapalného stavu, ve kterém nemůže plnit svoje základní funkce. Stává se propustnou pro ionty a přestává poskytovat dostatečně pevnou oporu pro membránové proteiny. (20)

Většina proteinů není nízkými teplotami poškozována, a tak primární účinky nepříznivého působení chladu dopadají na lipidovou vrstvu, která přechází z polotekuté konzistence do stavu pevného gelu. Následná volná propustnost membrány pro ionty vede ke ztrátě transmembránového potenciálu, k zastavení selektivního a aktivního transportu. (20)

voda

Ze všech abiotických faktorů, které omezují růst a produktivitu rostlinstva na kontinentech naší planety, stojí na prvním místě nedostatek vody. Přibližně v rozmezí -0,2 až -0,8 MPa hodnot vodního potenciálu dochází v buňkách k velmi podstatnému (až čtyřicetinásobnému) zvýšení koncentrace kyseliny abscisové

zejména v listech, kde má za následek zavírání průduchů. Změna v otevřenosti průduchů pak vede ke snížení rychlosti výměny plynů a tím i rychlosti fotosyntézy a transpirace. Některé druhy reagují syntézou jiných metabolitů, zejména cukrů, složitějších alkoholů (polyolů) a kvartérních dusíkatých sloučenin (betainy).

n e d o s t a t e k k y s l í k u

Hypoxické až anoxicke podmínky způsobují vážný stres u těch druhů rostlin, které nemají vhodné adaptace. Přechod na anaerobní disimilační procesy má pro rostlinu velmi vážné následky. Především trpí nedostatkem energie.

Dalším nebezpečím jsou konečné produkty fermentace, neboť etanol a zejména kyselina mléčná jsou ve vyšší koncentraci toxické sloučeniny.

Aklimační reakce na náhlé snížení koncentrace kyslíku (např. při silných deštích či po zaplavení půdy) má značně komplexní charakter. Dochází především ke změnám v koncentraci fytohormonů a k syntéze stresových proteinů. Zvyšuje se syntéza kyseliny abscisové, která zprostředkovává regulaci řady procesů i v nadzemních orgánech (zavírání průduchů, inhibici růstu, aj.). Tvorba cytokininů v kořenech je naopak zpomalena a stejně tak i tvorba etylénu, protože vyžaduje kyslík. Přesto koncentrace etylénu v kořenech vzrůstá, neboť jsou značně omezeny jeho ztráty difúzí do okolního prostředí. Bylo také zjištěno, že v hypoxickém prostředí stoupá citlivost buněk na působení etylénu. Etylén je pravděpodobně hlavním signálem ke spuštění celé řady dalších aklimačních reakcí. (20)

z a s o l e n é p ū d y

Pokud je vystavena běžná, neadaptovaná rostlina náhlému působení zasolené půdy, jednou z prvních reakcí je zvýšení osmotického tlaku v buňkách kořenů. Další významnou reakcí je tvorba stresových proteinů, které jsou velmi podobného typu jako při stresech z vysoké teploty a z nedostatku vody. (20)

t o x i c k é k o v y

Zejména zinek, olovo a kadmium se dostávají do půdy ve větších množstvích usazováním prachu z průmyslových procesů, z výfukových plynů, z kontaminovaných odpadních vod a hnojiv. V odolnosti rostlin k působení těžkých kovů existují velké rozdíly nejen mezi druhy, ale i uvnitř téhož druhu.

K vnitrobuněčným detoxifikačním mechanismům patří zejména tvorba stresových proteinů zahrnující jednak odolnější izoenzymy, ale také proteázy a ubikvitin pro urychlení rozkladu poškozených proteinů.

Další velmi účinnou aklimační reakcí je tvorba specifických sloučenin (fytochelatinů) schopných inaktivovat těžké kovy vazbou do chelátových komplexů. Fytochelatiny jsou zvláštní malé polypeptidy strukturně příbuzné tripeptidu glutathionu. (20)

biotické

herbivorní živočichové

Z velkého množství sekundárních metabolitů, které se syntetizují v rostlinách, mnohé působí odpudivě až toxicky na herbivorní živočichy. Z hlediska množství, v jakém se vyskytují, lze je rozdělit do dvou kategorií. První z nich zahrnuje látky kvalitativně významné, které se sice vyskytují jen v malých koncentracích, ale zato jsou pro živočichy velmi toxicke. Patří sem nejrůznější alkaloidy, glykosidy uvolňující kyanovodík, glukosinoláty a mnoho dalších.

Do druhé kategorie řadíme kvantitativně významné metabolity, které sice nejsou tak toxicke, ale ve větším množství (často tvoří více než 10 % sušiny) způsobují špatnou stravitelnost, nechutnost až toxicitu (např. lignin, taniny a fenolické látky). Je dokázáno, že syntéza toxickech metabolitů, např. inhibitorů proteáz, se může až překvapivě rychle zvýšit po napadení rostliny živočišným škůdcem. Ke zrychlení syntézy dochází nejen v narušeném orgánu, ale i v ostatních částech rostliny, které nebyly narušeny. To ovšem vyžaduje přenos signálu, ke kterému může být využita jak chemická cesta (pomocí sloučenin typu fytohormonů, např. jasmonové kyseliny), tak i změny elektrického potenciálu. Dokonce existují důkazy o bezkontaktním přenosu signálu k tvorbě inhibitorů proteáz z poraněné rostliny na sousední zdravé rostliny pomocí těkavé sloučeniny methyljasmonátu. (20)

patogenní mikroorganismy

Především patogenní houby disponují celou řadou velmi účinných lytických exoenzymů. Jen málo obranných procesů má zcela obecný charakter, spíše lze pozorovat velkou rozmanitost u jednotlivých skupin rostlinných druhů i u jednotlivých orgánů.

Jako elicitory mohou sloužit jednak některé metabolismy vylučované patogeny (exogenní elicitory, např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy), ale i sloučeniny, které se uvolňují z narušovaných buněčných stěn obou organismů (endogenní elicitory). K těm patří např. oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteiny uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub, či oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky.

Vlastní obranné reakce zahrnují jednak tvorbu specifických stresových proteinů a jednak syntézu a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem. Tyto sekundární metabolismy s ochrannou funkcí jsou u některých druhů rostlin přítomny trvale, i když v menším množství než při infekci. Patří k nim nejrůznější flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy, které bývají souhrnně označovány jako fytoncidy či inhibitiny.

Zvláštní skupinu specifických nízkomolekulárních obranných látek tvoří fytoalexiny, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začnou se vytvářet až po napadení patogenem. U systematicky příbuzných druhů se obvykle vyskytují také podobné druhy fytoalexinů. Tak např. u rostlin čeledi *Fabaceae* převažují izoflavonoidy, u jiných čeledí to mohou být seskviterpeny (*Solanaceae*), diterpeny (*Poaceae*), furanokumariny (*Apiaceae*) či stilbeny (*Vitaceae*).

Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanismům působení fytoalexinů na patogenní organismy.

Jiným typem obranných reakcí rostlin je rychlé zvýšení tvorby polysacharidu kalózy (1,3- β -glukan), který pak vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa. Kalóza je velmi odolná vůči houbovým hydrolázám. Pokud je šíření infekce pomalé, pak se po jisté době může poblíž ohniska infekce založit sekundární meristém (felogen), produkující silně suberinizované či lignifikované buňky s velmi dobrou ochrannou funkcí. Někdy dochází i k tvorbě odlučovací vrstvy a celá infikovaná část rostliny odpadne. (20)

3.5 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (SIA) patří do skupiny průtokových analytických technik, které umožňují racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatným způsobem zvyšovat produktivitu zejména rutinních stanovení. SIA byla vyvinuta během

odstraňování nevýhod a nedokonalostí techniky průtokové injekční analýzy (FIA).
(25)

3.5.1 Princip a vlastnosti metody SIA

Při vysvětlení principu SIA vycházejme z jednoduchého analytického zadání, kdy analyt, obsažený v roztoku vzorku, potřebujeme převést na detektovatelný (např. barevný) produkt reakcí s činidlem a změřit (kvantifikovat) vhodnou analytickou vlastnost tohoto produktu (např. absorbanci při určité vlnové délce). Technika SIA používá odlišný princip od techniky FIA.

Charakteristickým rysem SIA jsou oddělené měřící cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně (jednorázově) aspirovány do jednokanálového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru; tím je jeden cyklus ukončen. V tomto jednoduchém případě je získán výsledný analytický signál ve formě páku podobně jako je tomu u FIA; v podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem. Základem SIA jsou změny přímého a zpětného toku. Výhodou techniky SIA je možnost v jednotlivých cyklech objem vzorku cíleně měnit v rozsahu jednotek až stovek μl .
(25)

3.5.2 Technické provedení

Systém je tvořen jednokanálovým dvousměrným pístovým čerpadlem, vícecestným selekčním ventilem, vhodným detektorem, mísicí cívkou, která slouží zároveň jako pojistka proti vniknutí vzorku a činidel do čerpadla, a spojovacím materiálem (obvykle plastikové hadičky s vnitřním průměrem 0,7-0,8 mm). V podstatě se dá říci, že SIA systém pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. Přesná synchronizace a opakovatelnost těchto kroků je nutnou podmínkou k dosažení reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému a tím i k získání reprodukovatelného koncentračního gradientu reakčního produktu, resp. odpovědi detektoru. Z uvedených skutečností vyplývá, že nezbytnou součástí SIA systému musí být i vhodný mikroprocesor (nejlépe PC) s příslušným programovým

vybavením, který řídí kroky měřícího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data.

Protože SIA pracuje s malými diskrétními objemy vzorků a činidel a využívá zastavení a změnu směru toku, spotřeby činidel a vzorků i objem odpadu jsou podstatně nižší než u FIA. (25)

3.5.3 Uplatnění SIA v praxi

Od roku 1990 bylo publikováno téměř sto prací, týkajících se automatického stanovení většiny běžných anorganických iontů a četných organických látek včetně léčiv technikou SIA. Se vzrůstajícími potřebami kontroly kvality životního prostředí, potravin a léčiv, s požadavky na rychlosť a spolehlivost diagnostických metod v medicíně a biologickém výzkumu, a na racionalizaci řízení technologických procesů se jeví SIA jako jedna z nadějných alternativ, umožňujících provádět analýzy velkých sérií vzorků s vysokou produktivitou a dostatečnou spolehlivostí. (25)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje

Laboratorní analytické váhy, Sartorius, Göttingen

Autokláv PS 20 A, Chirana, Brno

Elektrická sušárna HS 31 A, Chirana, Brno

Laboratorní odstředivka MPW 342, Med-Instruments, Varšava

Pístová pumpa, Alitea Instruments, Seattle

Laboratorní třepačka, IKA, Staufen

Osmicestný selekční ventil, Vici Valco Instruments, Brockville

Spektrofluorimetr FS 970, Spectra-Physics, Darmstadt

Box s laminárním prouděním Fatran, Výrobné družstvo Pokrok, Žilina

Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha

4.2 Chemikálie

dihydrogenfosforečnan draselný <i>p. a.</i>	jodid draselný <i>p. a.</i>
dusičnan draselný <i>p. a.</i>	kyselina boritá <i>p. a.</i>
dusičnan amonný <i>p. a.</i>	kyselina nikotinová č.
chlorid kobaltnatý <i>p. a.</i>	metanol <i>p. a.</i>
chlorid vápenatý <i>p. a.</i>	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová <i>p. a.</i>
chlorid thiaminia <i>puriss.</i>	benzylaminopurin <i>p. a.</i>
chlorid pyridoxinu <i>puriss.</i>	molybdenan sodný <i>p. a.</i>
myoinositol	vanadičnan sodný <i>p. a.</i>
skopoletin <i>p. a.</i>	síran hořečnatý <i>p. a.</i>
glycin č.	síran manganatý <i>p. a.</i>
hydrolyzát kaseinu	síran měďnatý <i>p. a.</i>
sacharóza <i>p. a.</i>	síran zinečnatý <i>p. a.</i>
hydrogenfosforečnan sodný <i>p. a.</i>	síran železnatý <i>p. a.</i>

4.3 Tkáňová kultura *Angelica archangelica* L.

Pro pokusy byla použita dvanáctiletá suspenzní kultura odvozená ze vzrostného vrcholu intaktní rostliny *Angelica archangelica* L., pěstované na zahradě léčivých rostlin farmaceutické fakulty. Kultura byla kultivována v tekutém živném médiu podle Murashigeho a Skooga s přídavkem 2 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 0,4 mg/l benzylaminopurinu na roli ve tmě a na světle (světelná perioda 16 h světlo/8 h tma). Pasážování bylo prováděno ve čtrnáctidenním intervalu.

4.3.1 Kultivace tkáňové kultury

Pro sledování vlivu vanadičnanu sodného na produkci kumarinů byla kultura přepasážována na živná média podle Murashigeho a Skooga bez vanadičnanu sodného a s přídavkem vanadičnanu sodného v koncentraci 0,2; 0,12; 1,22; 12,2; a 122 mg/l média a kultivována čtrnáct dní ve tmě a na světle (světelná perioda 16 h světlo/8 h tma). Na konci kultivace byly kultury sklizeny, buňky byly odděleny od média odsátím za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a usušeny za laboratorní teploty. V usušených buňkách a v médiu byl stanoven obsah kumarinů.

4.3.2 Živné médium podle Murashigeho a Skooga

Složení živného média vztažené na 1 litr je následující (26).

CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440,00 mg
KNO ₃	1900,00 mg
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370,00 mg
NH ₄ NO ₃	1650,00 mg
KH ₂ PO ₄	170,00 mg
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,84 mg
Na ₂ EDTA	37,34 mg
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22,30 mg
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	11,50 mg

H ₃ BO ₃	6,20 mg
KI	0,83 mg
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025 mg
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25 mg
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025 mg
myoinositol	100,00 mg
hydrolyzát kaseinu	1000,00 mg
glycin	2,00 mg
kyselina nikotinová	0,50 mg
pyridoxin hydrochlorid	0,50 mg
thiamin hydrochlorid	0,10 mg
sacharóza	30 000,00 mg

Médium bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

4.4 Stanovení kumarinů

Stanovení kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. bylo prováděno fluorimetricky metodou sekvenční injekční analýzy. Podmínky stanovení byly následující: nosný proud – destilovaná voda, průtoková rychlosť 3 ml/min, míšící cívka 1,5 ml, dávkovaný objem vzorku 40 µl, dávkovaný objem fosforečnanového tlumivého roztoku o koncentraci 0,066 mol/l a pH 6 100 µl, excitační vlnová délka 345 nm, emisní vlnová délka 390 nm. Jako standard byl použit skopoletin.

Stanovení kumarinů v médiu

V médiích bylo stanovení kumarinů prováděno přímo bez další úpravy vzorku. Obsah kumarinů byl vyjadřován v mg skopoletinu na litr média.

Stanovení kumarinů v buňkách

Usušené buňky byly rozpráškovány v třecí misce a extrahovány třikrát směsí metanol-fosforečnanový tlumivý roztok 0,066 mol/l (1:1) vždy 15 minut na třepačce. Získané výluhy byly spojeny a doplněny v odměrné baňce na 25 ml po rysku směsí

metanol-fosforečnanový tlumivý roztok, promíchány, odstředěny (10 minut, 3000 ot./min.) a použity pro stanovení obsahu kumarinů. Obsah kumarinů v buňkách byl vyjadřován v mg skopoletinu na g sušiny.

4.5 Statistické zpracování

Statistické zpracování naměřených hodnot bylo provedeno na základě těchto vzorců (27):

aritmetický průměr:

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

směrodatná odchylka:

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

n rozsah souboru

x_i naměřené hodnoty

\bar{x} aritmetický průměr

s směrodatná odchylka

5. VÝSLEDKY

Tab. 1

Vliv vanadičnanu sodného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L., kultivované za světla.

Konzentrace vanadičnanu sodného [mg/l]	Obsah kumarinů v médiu [mg/l]	Směrodatná odchylka
0,00	1,669	0,093
0,02	2,443	0,334
0,12	2,076	0,072
1,22	1,168	0,044
12,20	2,015	0,239
122,00	0,237	0,037

Tab. 2

Vliv vanadičnanu sodného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L., kultivované za tmy.

Koncentrace vanadičnanu sodného [mg/l]	Obsah kumarinů v médiu [mg/l]	Směrodatná odchylka
0,00	2,286	0,066
0,02	2,391	0,155
0,12	2,549	0,090
1,22	2,602	0,050
12,20	2,427	0,065
122,00	1,710	0,034

Tab. 3

Vliv vanadičnanu sodného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L., kultivované za světla.

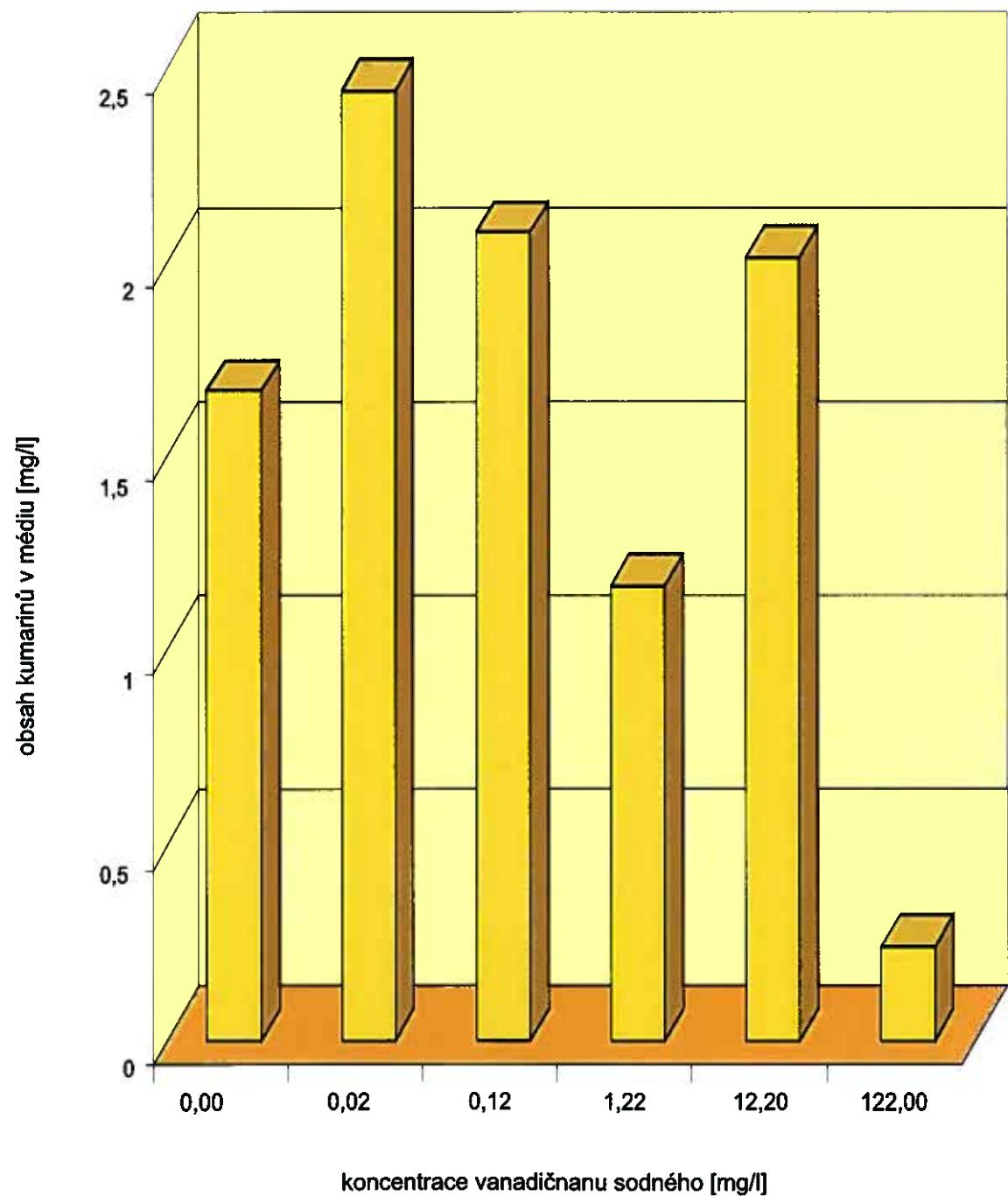
Koncentrace vanadičnanu sodného [mg/l]	Obsah kumarinů v buňkách [mg/g]	Směrodatná odchylka
0,00	0,776	0,016
0,02	0,822	0,049
0,12	0,844	0,025
1,22	0,775	0,010
12,20	0,698	0,024
122,00	0,321	0,032

Tab. 4

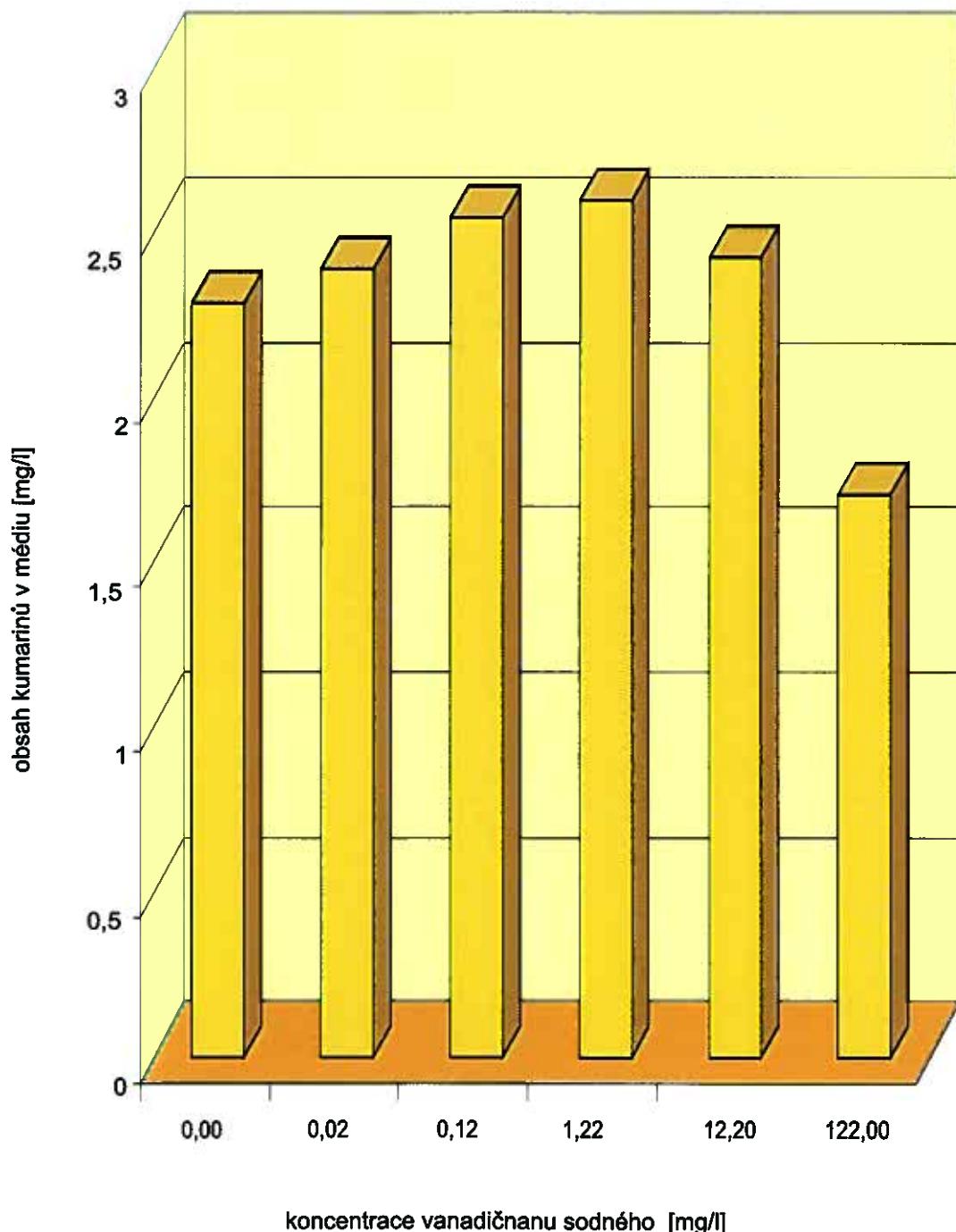
Vliv vanadičnanu sodného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L., kultivované za tmy.

Koncentrace vanadičnanu sodného [mg/l]	Obsah kumarinů v buňkách [mg/g]	Směrodatná odchylka
0,00	0,767	0,012
0,02	0,692	0,035
0,12	0,686	0,053
1,22	0,685	0,081
12,20	0,722	0,053
122,00	0,145	0,020

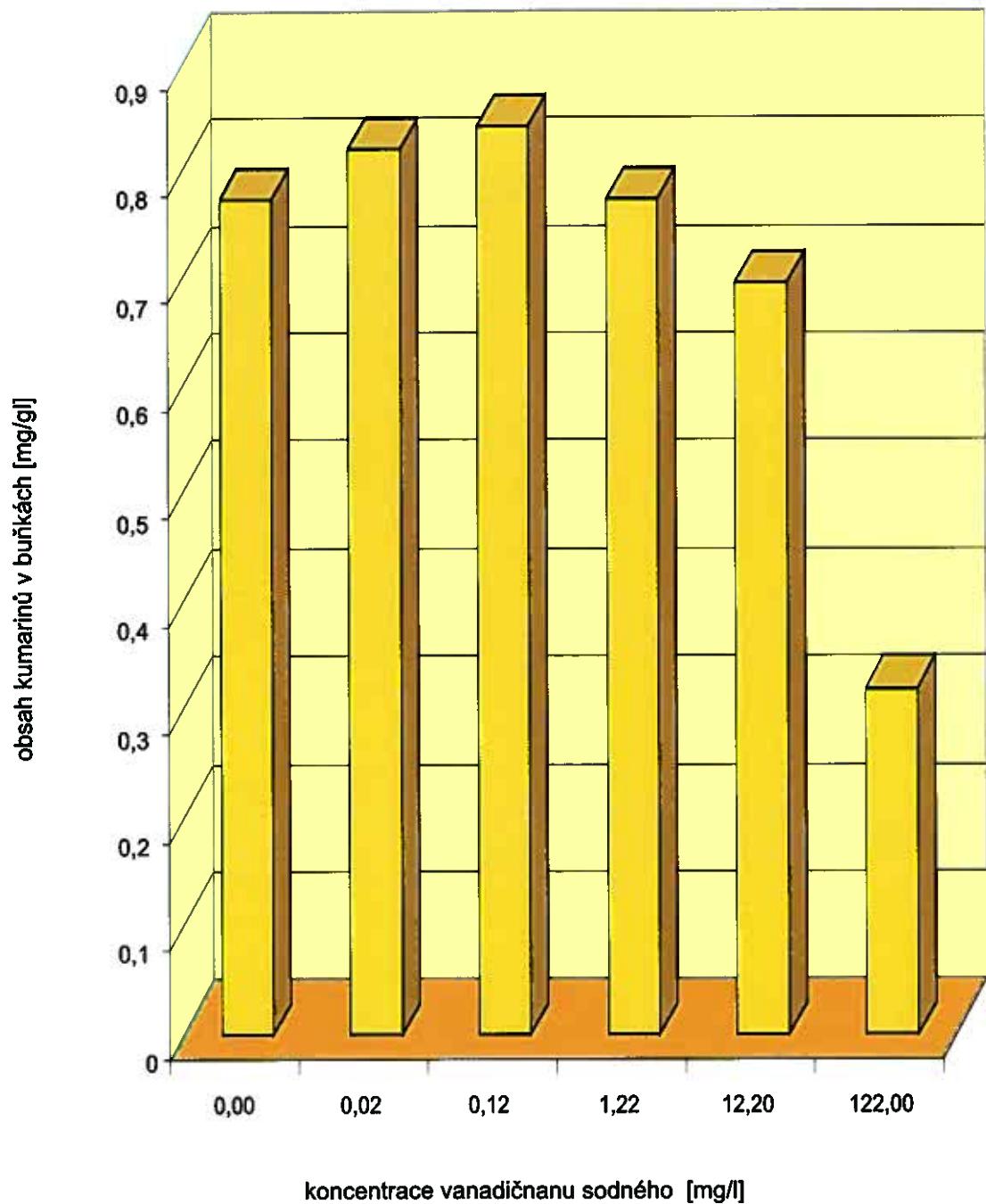
Graf 1: Vliv vanadičnanu sodného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L., kultivované za světla



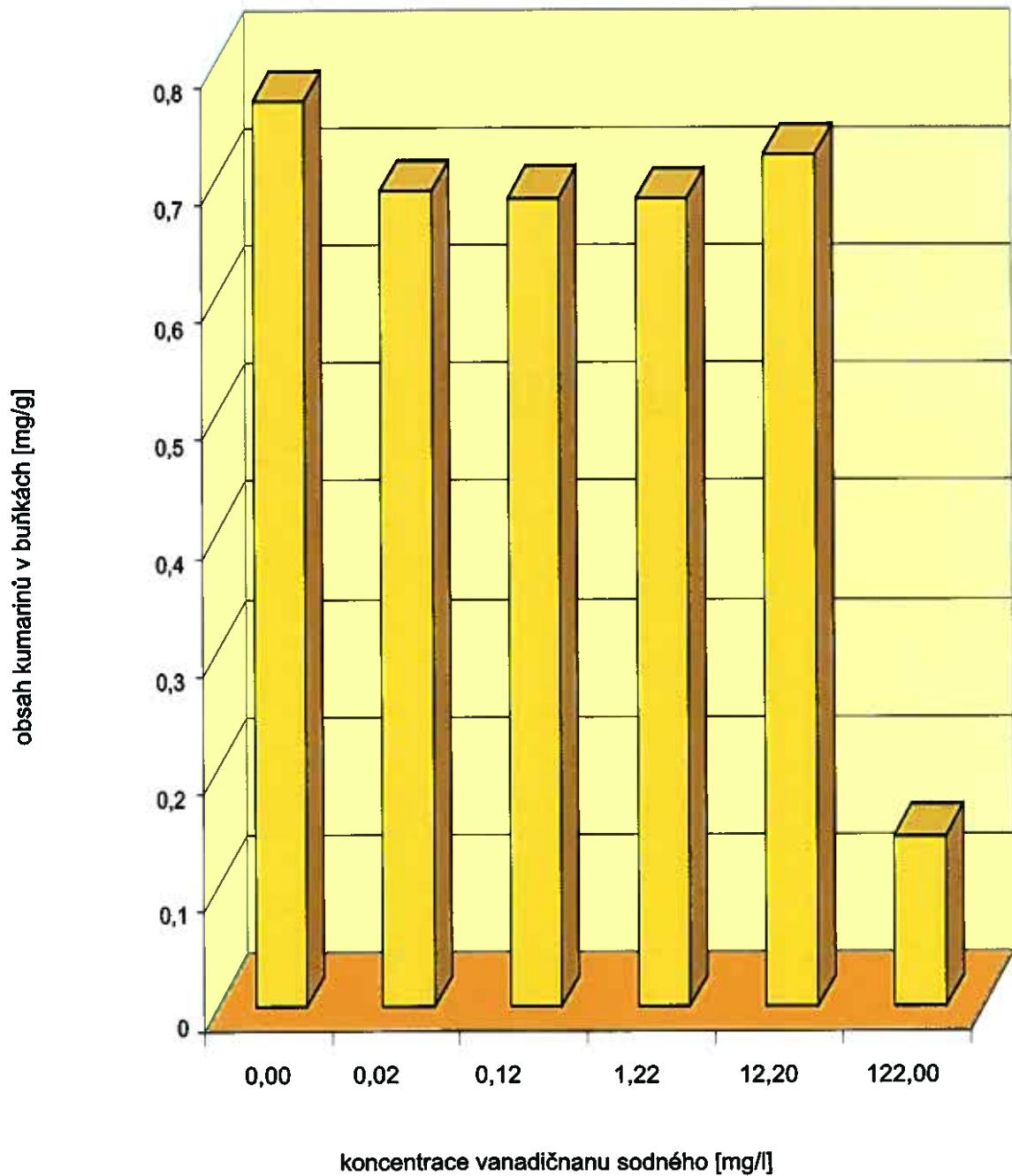
Graf 2: Vliv vanadičnanu sodného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L., kultivované za tmy



Graf 3: Vliv vanadičnanu sodného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L., kultivované za světla



Graf 4: Vliv vanadičnanu sodného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L., kultivované za tmy



6. DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo sledovat a popsat vliv abiotického elicitoru vanadičnanu sodného na produkci kumarinů jako sekundárních metabolitů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L.

Elicitace je komplexní jev a odezva různých druhů rostlin na elicitory je velmi variabilní. Výsledky studií procesu elicitačního naznačují, že je to indukční jev, při kterém nastává zvýšení hladiny mRNA, což je první odezva na kaskádu biochemických reakcí vedoucí k tvorbě sekundárních metabolitů. Nezáleží pouze na druhu elicitoru. (22) Do konečného výsledku se totiž odráží nejen délka a intenzita (koncentrace elicitoru) elicitačního procesu, ale také typ rostlinné kultury, její růstová fáze apod.

V této práci jsem sledovala vliv pěti koncentrací abiotického elicitoru vanadičnanu sodného na produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L. Elicitor se přidával v koncentracích 0,02; 0,12; 1,22; 12,20; 122,00 mg/l média. Doba kultivace byla čtrnáct dní. Polovina kultur byla kultivována za světla (světelná perioda 16 hodin světlo/ 8 hodin tma) a druhá polovina byla kultivována za tmy. Po kultivační době byl porovnáván obsah kumarinů s kontrolní kulturou, ke které elicitor přidáván nebyl.

V médiích suspenzní kultury kultivované za světla byla koncentrace kumarinů u kontroly 1,669 mg/l. Po přidání elicitoru a postupným zvyšováním jeho koncentrace rostl i obsah kumarinů v médiích. Maxima bylo dosaženo při koncentraci vanadičnanu sodného 0,02 mg/l, kdy obsah kumarinů činil 2,443 mg/l, což je o 32 % více než v kultuře bez přidaného elicitoru. Po dosažení maxima obsah kumarinů pozvolna klesal. Při koncentraci vanadičnanu sodného 12,20 mg/l opět vrostl. Při dalším zvýšení koncentrace elicitoru (122,00 mg/l) ale nastal pokles obsahu kumarinů až na 0,237 mg/l.

V médiích suspenzní kultury kultivované za tmy bylo možno vypozorovat určitou závislost. S přídavkem elicitoru byl zaznamenán pozvolný nárůst obsahu kumarinů, kdy maxima 2,602 mg/l bylo dosaženo při koncentraci vanadičnanu sodného 1,22 mg/l. Následné zvyšování koncentrace elicitoru vedlo k pozvolnému poklesu obsahu kumarinů v médiích až na 1,710 mg/l (při koncentraci elicitoru 122,00 mg/l). Nárůst obsahu kumarinů v médiích suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. kultivované za tmy činil tedy 12 %.

Co se týče buněk suspenzní kultury kultivované za světla, tak se stoupající koncentrací elicitoru byl počáteční nárůst a následný pokles obsahu kumarinů pozvolný. I když v buňkách bylo dosaženo maxima obsahu kumarinů až při

konzentraci elicitoru 0,12 mg/l (na rozdíl od médií – při koncentraci elicitoru 0,02 mg/l) nebyla tato hodnota (0,844 mg/g) tak odlišná od hodnoty předcházející (0,822 mg/g), která byla zaznamenána při koncentraci elicitoru 0,02 mg/l. Zvýšení obsahu kumarinů u buněk suspenzní kultury kultivované za světla bylo po srovnání s kontrolní kulturou maximálně o 8 %.

V buňkách suspenzní kultury kultivované za tmy působil abiotický elicitor vanadičnan sodný na obsah kumarinů negativně. Se zvyšující se koncentrací vanadičnanu sodného (0,02; 0,12; 1,22; 12,20; 122,00 mg/l) klesal pozvolna obsah kumarinů. Při nejvyšší koncentraci elicitoru (122,00 mg/l) byl obsah kumarinů pouhých 19 % hodnoty obsahu kumarinů v kontrolní kultuře.

Z jedné práce zabývající se vlivem elicitorů na tvorbu kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. (kdy byl použit chlorid hlinitý jako elicitor) vyplynul závěr, že při kultivaci za světla byla elicitace pozitivní. Dosahovalo se zvýšení obsahu kumarinů až o 29 % v porovnání s kontrolní kulturou, zatímco při kultivaci za tmy nedošlo působením elicitoru ke stimulaci produkce kumarinů. Takže bylo patrné, že elicitace je výhodná pouze za světla. (28)

7. ZÁVĚR

Z výsledků plyne, že vanadičnan sodný se osvědčil jako abiotický elicitor v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Nejvyšší nárůst obsahu kumarinů byl patrný v médiích suspenzní kultury kultivované za světla, kdy se obsah po elicitaci (vanadičnanem sodným – koncentrace 0,02 mg/l) zvýšil o 32 % ve srovnání s kontrolní kulturou kultivovanou bez přídavku elicitoru.

8. LITERATURA

Seznam použité literatury

1. Korbelář J.; Endris Z.: Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha 1981. s. 11-16, 78
2. Jirásek V.; Starý F.: Atlas léčivých rostlin, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986, s. 9, 12
3. Janča J.; Zentrich J. A.: Herbář léčivých rostlin 1.díl, Eminent, Praha 1994, s. 14,19
4. Slavík B.: Květena České republiky, Academia, Praha 1997, s. 399-402
5. Hruška B.: Jak se léčit rostlinami, Volvox globator, Praha 1996, s. 11
6. Kim E. K. et al.: Life Sci. 77, 824 (2005)
7. Barreiro A. M. L. et al.: Phytother. Res. 20, 34 (2006)
8. Thuong P. T. et al.: Biol. Pharm. Bull. 28, 1095 (2005)
9. Carpinella M. C.; Ferrayoli C. G.; Palacios S. M.: J. Agric. Food. Chem. 53, 2922 (2005)
10. Prince M. et al.: Carcinogenesis (2005), v tisku
11. Saify Z. S. et al.: Pak. J. Pharm. Sci. 18, 39 (2005)
12. Reyes-Chilpa R. et al.: J. Ethnopharmacol. 105, 167 (2006)
13. Ogawa H.; Nakamura R.; Baba K.: Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 32, 1104 (2005)
14. Wang H. et al.: J. Nutr. 136, 360 (2006)
15. Zhao R. J. et al.: Biol. Pharm. Bull. 28, 2323 (2005)
16. Lau C. B. et al.: Menopause 12, 734 (2005)
17. Tomko J. et al.: Farmakognózia, Osveta, Banská Bystrica 1999, s. 51, 83-86
18. Sikyta B.; Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001, s. 75-82
19. Vodrážka Z.: Biotechnologie, Academia, Praha 1992, s. 64
20. Procházka S. et al.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha 1998, s. 414-430
21. Baloun J.; Beneš K.; Minařík J.: Farmaceutická botanika, Avicenum, Praha 1978
22. Nádaská M.: Biol. Listy 56, 81 (1991)
23. Kováč J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1995, s. 1, 13-18, 51, 81, 82

24. Votruba M. et al.: Explantátové techniky, Vysoká škola zemědělská, Praha 1987,
s. 7
25. Paseková H.; Polášek M.; Solich P.: Chem.listy 93, 354 (1999)
26. Murashige T.; Skoog F.: Physiol. Plant. 15, 473 (1962)
27. Klemerová V.: Základy aplikované statistiky, SPN, Praha 1993, s. 30, 31
28. Harantová T.: Diplomová práce, UK FaF Hradec Králové 2005