

**UNIVERZITA KARLOVA
V PRAZE
FARACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA FARMAKOLOGIE

**PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH
METABOLITŮ V ROSTLINNÝCH
EXPLANTÁTOVÝCH KULTURÁCH**

(diplomová práce)

Michaela Dvořáková

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

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

OPONENT : PharmDr. MARIE KASPAROVÁ, Ph.D.

OBHAŠOBA : 06.06.2006

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a pouze s použitím uvedené literatury.

Michaela Dvořáková

Chtěla bych poděkovat PharmDr. Tomáši Siatkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytoval během vypracovávání diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. Obecná charakteristika <i>Angelica archangelica</i> L.	10
3.1.1. <i>Angelica archangelica</i> subsp. <i>officinalis</i>	11
3.1.2. <i>Angelica archangelica</i> subsp. <i>litoralis</i>	11
3.1.3. Využití <i>Angelica archangelica</i> L.	12
3.2. Sekundární metabolismus	14
3.3. Kumariny a jejich deriváty	15
3.3.1. Struktura kumarinů	15
3.3.2. Biosyntéza látek s aromatickým jádrem	16
3.3.3. Šikimátova dráha a její metabolity	17
3.4. Rostliny a vlivy vnějšího prostředí	19
3.4.1. Stresové faktory	19
3.4.2. Průběh stresové reakce	20
3.4.3. Charakteristika obranných reakcí rostlin	21
3.4.4.1. Stresové proteiny	22
3.4.4.2. Aktivní formy kyslíku	22
3.4.4.3. Fytohormony	23
3.4.4. Obrana rostlin proti patogenním organismům	24
3.4.5. Rostliny a těžké kovy	25
3.5. Měď	26
3.6. Explantátové kultury	28
3.6.1. Rozdělení rostlinných explantátových kultur	28
3.6.1.1. Suspenzní kultura	29
3.6.2. Vlastnosti rostlinných explantátových kultur	30
3.6.3. Kultivace explantátových kultur	30
3.6.4. Podmínky kultivace explantátových kultur	32
3.6.3.1. Složení kultivačního média	32
3.6.3.2. Fyzikální podmínky kultivace	35

3.6.5. Využití explantátových kultur	35
3.6.3.1. Mikropropagace rostlin.....	36
3.6.3.2. Biotransformace.....	36
3.6.3.3. Produkce sekundárních metabolitů.....	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
4.1. Přístroje.....	38
4.2. Chemikálie	38
4.3. Tkáňová kultura <i>Angelica archangelica</i> L.	39
4.3.1. Tkáňová kultura	39
4.3.2. Kultivace tkáňové kultury	39
4.3.3. Živné médium podle Murashigeho a Skooga	39
4.4. Stanovení skopoletinu	40
4.5. Statistické zpracování	41
5. VÝSLEDKY	42
6. DISKUSE	46
7. ZÁVĚR	48
8. LITERATURA.....	49

1. ÚVOD

„Rostliny, zprvu jen planě rostoucí, skýtaly člověku potravu, člověk jimi později také topil a oheň jej učinil skutečným pánem přírody. Jimi se odíval a léčil...“ (Bohumil Němec 1873-1966) (1)

Již první doklady o používání léčivých rostlin pocházejí z období před 4000 lety v Asii a Severní Americe. Údajně i staří Číňané snižovali horečky výtažkem z kořene čang-šan před 3000 lety a účinek opia byl znám ve Starém Egyptě. Nejstarší písemné údaje o rostlinných léčivech pocházejí patrně z čínského herbáře z roku 2700 př. n. l. (2)

Léčivé rostliny se dříve užívaly na základě tehdejších zkušeností. Zpracovávaly se určité orgány rostlin na výluhy a extrakty, ale podstata terapeutického efektu zůstávala neobjasněná. Jedny z nejstarších receptů z léčivých rostlin jsou zachyceny na Eberově papyru ze Starého Egypta z roku 1500 př. n. l. Průkopníky vědecktějšího poznávání rostlinných léčiv pro Evropu se stalo Řecko a Řím. K velkým znalcům rostlin patřili Demokritos, který na základě egyptských pramenů sestavil první antický přehled léčivých rostlin, Theophrastus, jenž položil základy systematické botaniky, či Dioskorides popisující ve svém díle „*De Materia Medica*“ více jak 500 léčivých rostlin a drog. (3)

Nesmíme zapomenout ani na Hippokrata, slavného lékaře, který se snažil osvobodit léčitelství od kněžského mysticismu. Jeho vliv zasahoval z 5. stol. až do středověku a oslovil řadu lékařů a vědců. (2)

Dalším význačným znalcem léčivých rostlin byl lékař Galén z 2. stol., v jehož receptech zaujímaly rostlinné drogy jedno z předních míst.

Poznávání rostlin se v této době rozvíjelo i mimo Evropu. V arabských zemích vznikaly od 9. stol. „domy moudrosti“, kde se zdokonalovaly destilační procesy a začal se vyrábět alkohol, užívaný též jako antiseptikum. Významným mezníkem byly i cesty do Indie a Ameriky, odkud se dovezla spousta léčivých rostlin a drog, které se užívají dodnes např. *Cortex chinae*. Nemaleý význam měl i objev knihtisku, na jehož základě se začaly vydávat herbáře, z nichž nejvýznamnější byl

Matthioliho herbář z 16. století. Herbáře podpořily používání léčivých rostlin, ale do dob Parcelsových nemělo jejich používání racionálního vysvětlení.

Paracelsus v 16. stol. jako první hlásal, že vlastní terapeutický účinek je v látkách, které se v rostlinách nacházejí, ale neměl dostatečné technické možnosti, aby své učení dokázal.

Zásadní obrat v poznávání rostlin přineslo osvícenství, kdy nastal rozvoj všech věd. Začaly se vydávat vědecké časopisy, byl objeven mikroskop, což přispělo ke studiu rostlin a jejich zařazování do botanického systému.

V 18. a 19. stol. byla objevena a izolována řada rostlinných látek jako tanin, morfin, strychnin, atropin, kolchicin a další terapeuticky užitečné látky. (3)

Vlivem těchto objevů se přestává rostlina jako taková považovat za nositelku léčebného účinku a léčebná hodnota již nezávisí pouze na vzhledu rostliny či příznivé konstelaci hvězd, ale za pomoci chemie se prokázalo, že hlavním léčebným činitelem jsou účinné látky obsažené v rostlinách v různých mírách a určitém chemickém složení.

Dnes u mnoha rostlin už obsah účinných látek známe, ovšem existuje řada léčivých rostlin, jejichž všechny obsahové látky ještě nejsou prozkoumány. Skutečnost, že neznáme ještě některé účinné látky, nebo že jejich účinek není dosud experimentálně dostatečně zdůvodněn, vede někdy k podceňování léčivých rostlin. Nedůvěru může vyvolat také neúspěch při nevhodném použití některých rostlinných drog. Proto je dnes snaha zbavit léčivou rostlinu balastu, různých domněnek a převzít drogu jako skutečně vzácný materiál k průmyslové výrobě léčiv. (2)

Zhruba z třiceti tisíc známých přírodních látek je více než 80 % rostlinného původu. Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky únosnou organickou syntézou a jejich výroba pomocí genetického inženýrství v mikrobiálních systémech není zatím řešitelná, protože vnikají mnoha stupňovými biosyntézami. Proto jejich jediným zdrojem zůstávají rostliny.

V poslední době se však stále více projevují obtíže při zajišťování přísunu přírodních surovin v důsledku drastického zmenšování rostlinných zdrojů, zabíráním půdy pro zemědělské účely či narušováním životního prostředí. Vzrůstají proto nároky a současně i ceny farmaceutického průmyslu. Vzhledem k tomu, že i sběr léčivých rostlin či jejich pěstování je spojeno se spoustou problémů. Rostliny mohou být ohroženy klimatickými vlivy, mikrobiální nákazou nebo mohou být snadno

napadeny hmyzem. Z těchto důvodů se v posledních letech věnuje úsilí na vypracování výroby žádaných rostlinných látek pomocí biotechnologie.

V biotechnologii jsou v současné době rozvíjeny směry týkající se produkce komerčně využitelných sloučenin kulturami rostlinných buněk, propagace rostlin tkáňovými kulturami, uchovávání a skladování rostlinných buněk, genetická manipulace s rostlinami *in vitro* a genové inženýrství vyšších rostlin.

Nejpokročilejší je zatím pěstování tkáňových kultur s hlavním cílem jejich použití pro výrobu žádaných rostlinných látek. Pokusy s kulturami rostlinných explantátů prováděl Haberlandt již v roce 1902, avšak první práce o úspěšném využití kultur rostlinných buněk k produkci sekundárních metabolitů, pocházejí z padesátých let minulého století. (4)

2. CÍL PRÁCE

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

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Obecná charakteristika *Angelica archangelica* L.

Angelica archangelica L. (andělíka lékařská) patří do čeledi miříkovitých (*Apiaceae*). 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. Na oddenku se vyskytuje mnoho jemných kořenů, zvláště v dolní polovině, kde se nacházejí četné provazcovité adventivní kořeny. Kořenová hlava je krátce jemně čupřinatá. U starších rostlin nalezneme oddenek vícehlavý.

Přízemní listy jsou v počtu 2-5, mají mohutnou listovou pochvu a postupně celé odumírají. Lodyha je jedna, přímá, v horní polovině přímo odstále větvená. Dosahuje výšky 90-200 cm. Je oblého tvaru, nezřetelně rýhovaná, zelená či tmavě nachově zbarvená, s velkou centrální dutinou.

Andělíka lékařská má listy zpeřené, v obrysu trojúhelníkovité a mohou být až 110 cm dlouhé. Lístičky jsou nepravidelně vejčité, tři až pětilaločnaté, postranní většinou nesouměrně dvoulaločnaté. Mají nestejně hrubě ostře pilovité, zašpičatělé zuby s bělavou špičkou. Řapíky jsou dlouhé 25-50 cm a stejně jako větvena listů jsou duté, listové pochvy dosahují délky až 16 cm a šířky 15 cm. Nejhornější listeny jsou téměř redukováné v pouhou listovou pochvu. Pochvy, řapíky i větvena čepelí jsou jemně rýhované.

Květenstvím této rostliny je složený okolík. Okolíky mají 8-19 cm v průměru, jsou polokulovité, husté. Květů v okolíčku je nejčastěji 24-59. Kališní cípy jsou nezřetelné, kališní lístky vejčité kopinaté s dovnitř zahnutou špičkou a krátce klínovitouází. Barva květů je zelenavě bělavá až žlutozelená. Nitky tyčinek jsou dlouhé 3 mm, prašníky 0,7-0,8 mm. Středem přirůstají k nitce. Semeník má elipsoidní tvar. Čnělky jsou krátké, za plodu až do 3 mm prodloužené.

Plodem je světle hnědá dvounažka, která je elipsoidní až široce elipsoidní, 5-8 mm dlouhá, ze hřbetu smáčklá, po stranách křídlatá. Sekreční kanálky nacházející se ve vnitřní vrstvě mezokarpu jsou prstencovitě uspořádané po jednom v hřbetních žebrech a po dvou v okrajových žebrech.

Tato rostlina se vyskytuje ve dvou poddruzích *Angelica archangelica* subsp. *officinalis* a *Angelica archangelica* subsp. *litoralis*. (5)

3.1.1. *Angelica archangelica* subsp. *officinalis*

Angelica archangelica subsp. *officinalis* neboli andělka lékařská pravá je velmi aromatická ve všech svých částech. Kořen má krátký, bohatě rozvětvený. Lodyha je měkká, šťavnatá. Listové pochvy jsou téměř bylinné, listeny v obalíčku čárkovité, ploché, téměř stejné délky jako květní stopky. Korunní lístky mají žlutozelenou barvu. Plodem je široce elipsoidní dvounažka, na bocích křídlatá, s výrazně zřetelným kýlem.

Je to polosvětlo milná až světlo milná rostlina rostoucí na vlhkých, humózních a živinami bohatých půdách v blízkosti vodních hladin. Často se vyskytuje v oblastech horských niv, na březích potoků a ve vlhkých příkopech. Též mohou vyplňovat spáry mezi kamením a balvany na místech, kde kořeny snadno dosahují k hladině podzemních vod, prosakujících z říčního koryta. Bývá pěstovaná v zahradách i polních kulturách, zvláště ve vyšších polohách. V České republice nalezneme andělku lékařskou především v Krkonoších, kde se předpokládá její původní výskyt. V ostatních částech naší republiky jde o druhotný výskyt. Během posledních dvou až tří desetiletí se andělka rozšířila na březích Labe. (5)

3.1.2. *Angelica archangelica* subsp. *litoralis*

Angelica archangelica subsp. *litoralis* neboli andělka lékařská pobřežní postrádá aromatickou vůni. Kořen má řepovitý, většinou jednoduchý. Lodyha je tuhá, listové pochvy poněkud kožovité, listeny obalíčku štětinovité a až dvakrát kratší než květní stopky. Korunní lístky jsou zelenavě bělavé barvy. Plodem jsou dvounažky elipsoidního tvaru s nevýrazně vystupujícími žebry a s nezřetelným kýlem.

Jde o rostlinu vyskytující se původně na mořských pobřežích a při ústí řek, adaptovanou na braktické vody a mírně slané půdy. Ojedinele můžeme tuto rostlinu

nalézt i ve vnitrozemí, kde roste na březích velkých řek a kanálů v úsecích s vysokou koncentrací hlavně chloridových iontů ve vodě. U nás je záznam ze dvou lokalit, z Tocova v Doupovských horách a v Brně nad Labem, ale ekograficky je tento výskyt nepravděpodobný. Tento poddruh se pěstuje pouze výjimečně. (5)

3.1.3. Využití *Angelica archangelica* L.

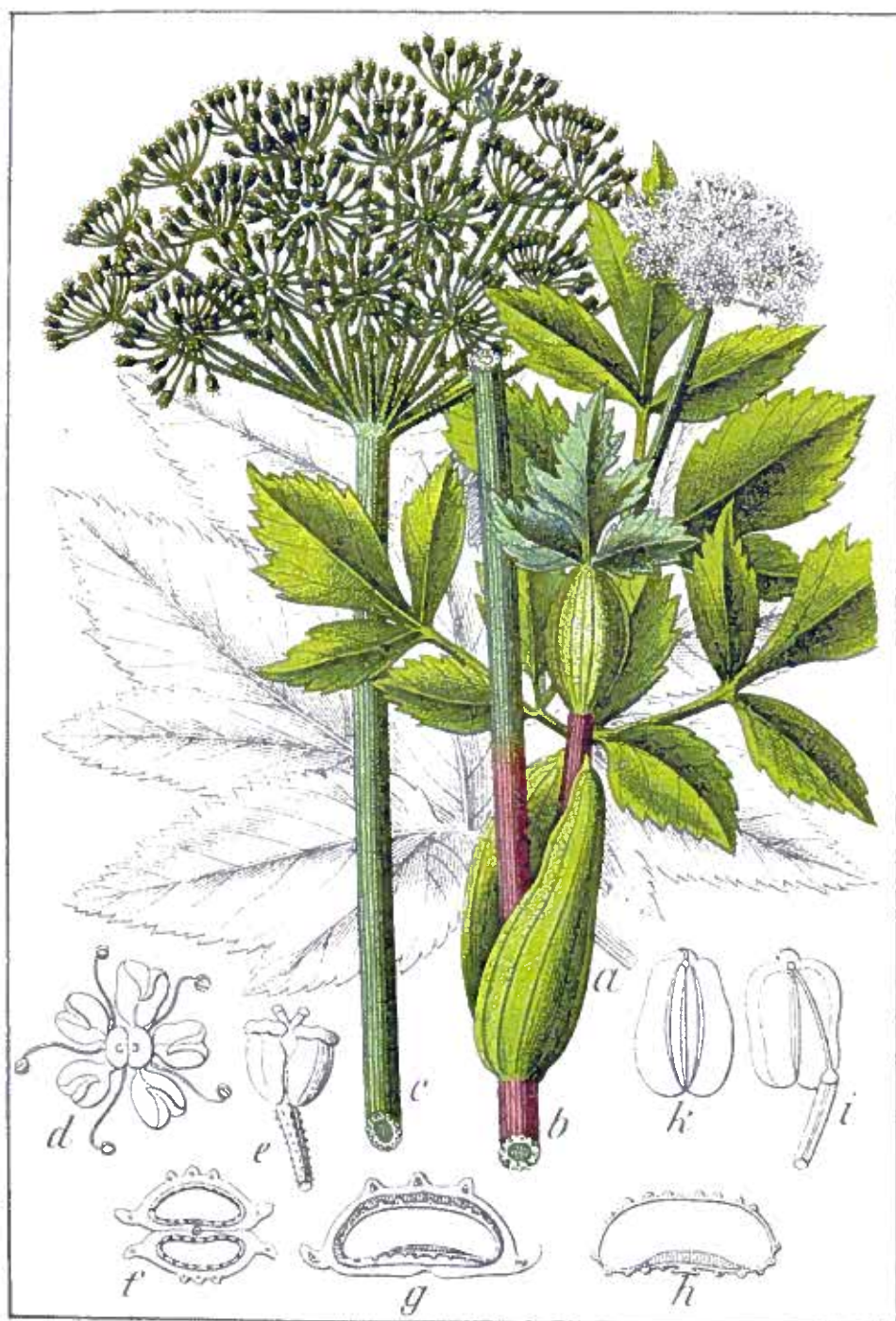
Už ve starých herbářích se uvádí, že andělka dostala název podle archanděla Michaela, ochránce, neboť podobně jako on chránila před zlem. Lidově se také nazývá „rostlinou andělů“. Hodnotu andělky poznali již středověcí mniši, kteří ji pěstovali v klášterních zahradách. (6)

Andělka lékařská se vyznačuje ostře kořenitou a hořkou chutí a kořenitou vůní. Uplatňuje se jako nektarodárná rostlina. Používá se z ní především oddenek s adventivními kořeny, někdy i plody a listy. Kořen obsahuje 0,3-1,0 % silice, plody 1-2 %. Silice obsahuje hlavně terpen felandren, který se přidává do likérů, k aromatizování rybích konzerv a své využití nalézá i v kosmetice. (5) Dalšími obsahovými látkami jsou pinen a cymol. (2) Kromě silice obsahuje rostlina i jiné terapeuticky významné látky, jako jsou kumariny a furanokumariny. Z kumarinů se v andělice nacházejí např. angelicin, imperatorin, bergapten či umbeliferon. (3)

Andělka působí povzbudivě na sekreci žaludečních šťáv a uklidňuje zvýšenou střevní peristaltiku. Ve velkých dávkách může zprvu působit povzbudivě, ale později ochromuje nervovou soustavu. Vlivem furanokumarinů vyvolává fotosenzibilní reakci na kůži. (2)

Ve středověku byla andělka pěstována v klášterních zahradách jako lék proti moru. Jinak je droga výrazně močopudná, podporuje pocení, pomáhá při poruchách trávení, při plynatosti, revmatismu, poruchách menstruace, migréně a závratích. Andělikový kořen je součástí receptur při výrobě hořkých likérů. Roztlučená nebo pomletá semena a kořen jsou dobrou přísadou do koupele při bolestech svalů a kloubů. (6)

Osvědčuje se rovněž jako prostředek podporující odkašlávání a jako kloktadlo při zánětech dutiny ústní. Kořenová droga je též součástí čajových přípravků Valofyt a Stomaran, kde podporuje již zmíněnou žaludeční sekreci. (2)



Obr. č. 1: *Angelica archangelica* L. (7)

3.2. Sekundární metabolismus

Metabolismem se rozumí soubor regulovaných biochemických reakcí, které organismům zajišťují stavební látky a nezbytnou energii pro jejich funkci. Jednotlivé reakce jsou zařazené do reakčních řetězců a cyklů, které se nazývají metabolické dráhy. Ty mohou sloužit buď k biosyntéze látek nebo k jejich štěpení. (8)

Metabolismus rostlin dělíme na primární a sekundární. Primární metabolismus zahrnuje tvorbu a přeměny základních sloučenin buňky a jeho cesty jsou ve všech organismech velmi podobné. Týká se sacharidů, bílkovin, nukleových kyselin a lipidů. Sekundární metabolismus zahrnuje tvorbu a přeměny látek, které nepatří k základní molekulární výbavě rostlinné buňky, nýbrž jsou vytvářeny jen v určitých pletivech nebo orgánech v určitých vývojových stádiích. Rostliny mají schopnost syntetizovat velké množství těchto látek tzv. sekundárních metabolitů. Sekundární metabolismus je úzce spjat s primárním metabolismem a nelze mezi nimi vést ostrou hranici.

Sekundární látky mohou mít v rostlinách speciální, životně důležité funkce nebo se jedná pouze o odpadní metabolické produkty, které se z cytoplasmy přemisťují do vakuol a buněčných stěn či se hromadí ve zvláštních buňkách a pletivech.

Syntéza a akumulace látek je jedním z projevů specializace rostlinných buněk v průběhu jejich diferenciaci. Schopnost rostliny tvořit tyto látky je prostorově a časově omezená a často je regulovaná vlivy z vnějšího prostředí. (9)

Rozdělení metabolitů na primární a sekundární je zřejmě z důvodů odlišení látek běžně vznikajících u všech rostlin od těch, které lze dokázat jen u některých čeledí nebo druhů. (8)

Prakticky každý druh vyšších rostlin má vlastní specifický typ sekundárního metabolismu, zatímco svým základním metabolismem se jeden od druhého příliš neliší. Přítomnost určitých sekundárních látek v rostlině může být využita jako taxonomický znak. (9)

3.3. Kumariny a jejich deriváty

Kumarin je aromatická, vonná látka. Byl izolován v roce 1820 z tonkových bobů, což jsou semena jihoamerického stromu *Dipteryx odorata* L, čeleď *Fabaceae*. Kumariny se podle substituentů dělí na hydroxykumariny, metoxykumariny, furanokumariny, pyranokumariny a jiné. Od kumarinů se odvozují i glykosidické látky, z nichž je známo asi 200, a více než polovina těchto glykosidů byla izolována z rostlin z čeledi miříkovitých (*Apiaceae*). Mezi další čeledi, kde lze nalézt kumariny patří i čeledi bobovitých (*Fabaceae*), routovitých (*Rutaceae*), hluchavkovitých (*Lamiaceae*), hvězdnicovitých (*Asteraceae*) a lipnicovitých (*Poaceae*). (10)

Kumariny jsou regulátory klíčení semen, kde mají blastokolinový účinek, což znamená, že semena začnou klíčit až po vyplavení kumarinů vodou.

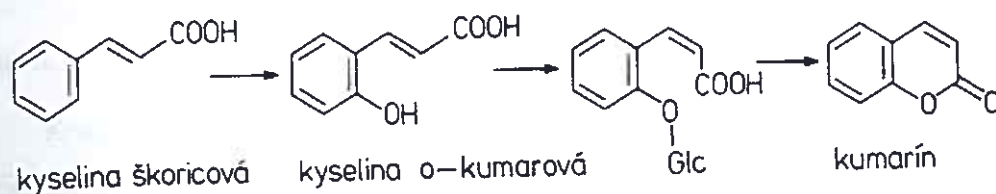
Farmakoterapeuticky se využívají jako antitrombotika, protože působí jako antagonisté vitamínu K. (8) Mají tlumivý účinek na centrální nervovou soustavu, snižují teplotu a některé působí i spasmolyticky. (3) Furanokumariny senzibilizují pokožku na sluneční záření, a proto se používají na léčbu vitiliga a psoriázy. Některé kumariny se vyznačují imunostimulačními a cytotoxickými účinky. Díky těmto vlastnostem jsou zkoušeny u pacientů trpících rakovinou.

Lze je nalézt i v některých kosmetických a opalovacích přípravcích, protože mají schopnost zvyšovat počet melanocytů, čímž poskytují ochranu pokožky před slunečním zářením. (14)

3.3.1. Struktura kumarinů

Po chemické stránce jsou kumariny 2H-1- benzopyran-2-ony, které jsou též považovány za laktony kyseliny o-hydroxyskořicové. (14) Kyselina skořicová se v rostlinách nachází ve formě glykosidových prekurzorů a teprve po hydrolýze přechází cyklizací na lakton. Mechanismus vzniku kumarinů je znázorněn níže (viz schéma č.1). (3)

Schéma č. 1: Mechanismus vzniku kumarinů



Téměř všechny kumariny mají v poloze 7 OH skupinu, která může u některých být methylována či obsazena glykosidovou vazbou.

Častou metodou k získávání kumarinů z rostlin je extrakce, kde se využívá jejich rozpustnosti v alkoholech a organických rozpouštědlech, jako je ether. (17)

3.3.2. Biosyntéza látek s aromatickým jádrem

V rostlinách a mikroorganismech se aromatické jádro může tvořit dvěma cestami, jednak z cukerných metabolitů šikimátovou drahou, jednak lineární kondenzací kyseliny octové, tzn. polyketidovou drahou.

První cesta vede k aromatickým systémům s kyslíkovými funkcemi v *ortho*- a *para*-polohách, druhá cesta k *meta*-substitučním derivátům. Při biosyntéze některých látek s více aromatickými cykly se mohou uplatnit obě cesty. Příkladem mohou být 2-fenylchromony, od nichž jsou odvozeny flavony, aurony, anthokyany a katechiny. (8)

3.3.3. Šikimátova dráha a její metabolity

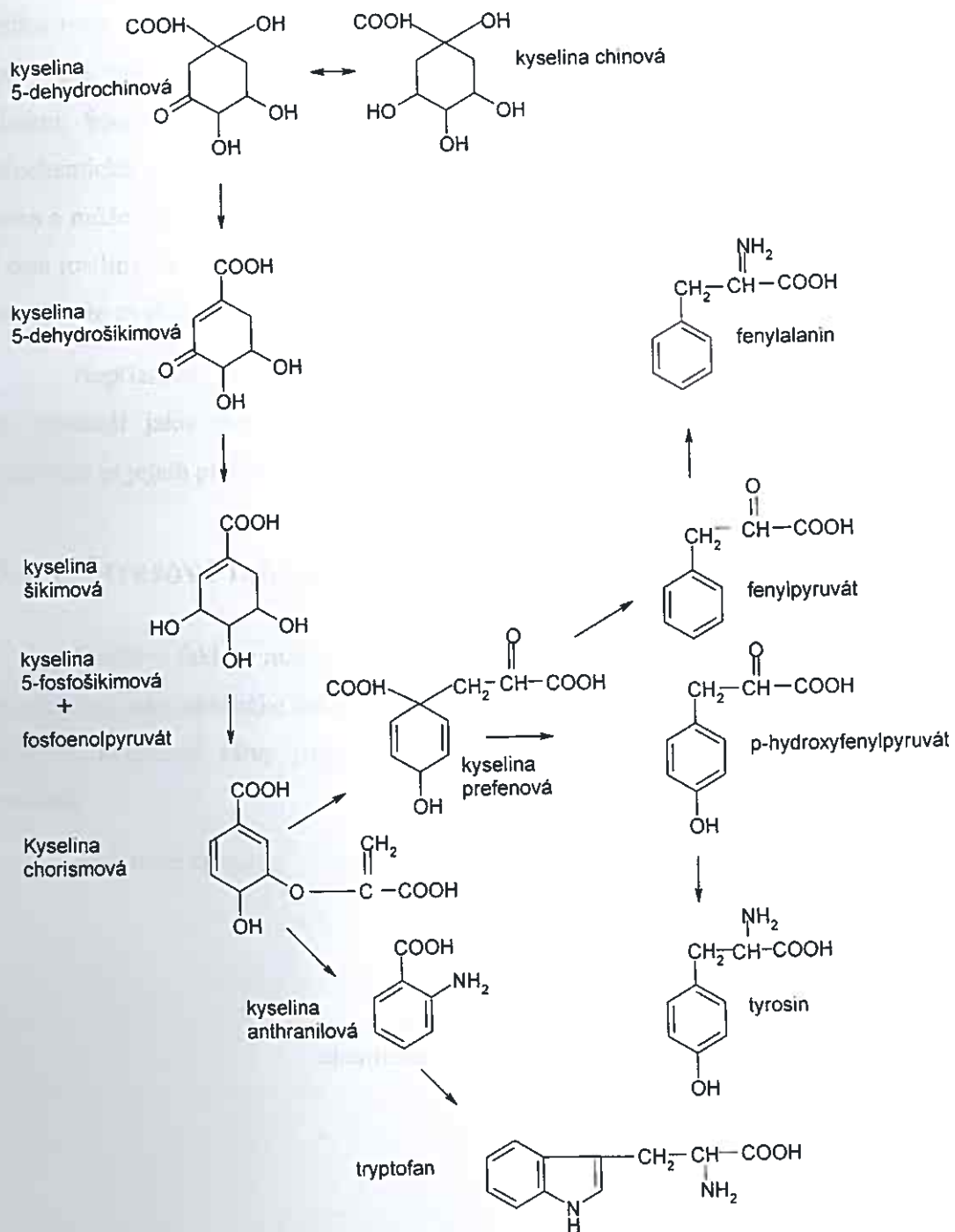
Biosyntéza aromatického cyklu přes kyselinu šikimovou je typická zejména pro zelené rostliny. Souvisí to patrně s tím, že fotosyntetická tvorba cukrů poskytuje dostatek výchozích látek, jako jsou erythrosa-4-fosfát a fosfoenolpyruvát.

Kondenzací erythrosa-4-fosfátu s fosfoenolpyruvátem přes řadu meziproductů vzniká cyklohexanový derivát (kyselina 5-dehydrochinová), která je předstupněm kyseliny šikimové a dalších rostlinných kyselin.

Z kyseliny 3-fosfošikimové kondenzací s fosfoenolpyruvátem se tvoří přes meziproducty kyseliny chorismová a prefenová, což jsou oxokyseliny dávající základ fenylalaninu a tyrosinu. Chorismát je též prekursorem kyseliny anthranilové, z níž se tvoří tryptofan.

Fenylalanin je dále deaminován vysoce specifickou L-fenylalanin-amoniak lyasou na kyselinu skořicovou. Také tryptofan podléhá analogické eliminační deaminaci na kyselinu p-kumarovou, ale tato reakce probíhá u rostlin jen málokdy. Osud skořicových kyselin je složitý a pro různé skupiny rostlin je odlišný. Značná část kyseliny p-kumarové se využívá k biosyntéze flavonoidů, u dřevnatých rostlin se deriváty inkorporují do polymerního ligninu, dále se podílejí na vzniku četných látek, mezi které patří i kumariny, umbelliferon, dafnetin a jiné. (8)

Schéma č. 2: Metabolity šikimátové dráhy (26)



3.4. Rostliny a vlivy vnějšího prostředí

Rostliny jsou trvale přizpůsobeny k vykonávání všech svých životně důležitých funkcí za poměrně velkého kolísání faktorů vnějšího prostředí. Pokud působení vnějších vlivů překročí jistou mez, dojde v rostlině k poruchám struktur a funkcí. Současně však dochází i k nápravným procesům na úrovni molekulární, biochemické a fyziologické, jimiž se rostlina brání. Tento stav rostliny se nazývá stres a může vést k dosažení nové homeostázy či k uhynutí postiženého orgánu nebo i celé rostliny. (11) Na druhé straně může být mírný stres pro rostlinu užitečný v tom smyslu, že zvyšuje její odolnost proti extrémní zátěži. (9)

Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které závažně ohrožují rostlinu, se označují jako stresové faktory. Velkou nevýhodou rostlin proti stresovým faktorům je jejich přisedlý způsob života, který rostlinám neumožní uniknout. (11)

3.4.1. Stresové faktory

Stresové faktory mají povahu fyzikální, chemickou či mechanickou, souhrnně se označují jako abiotické faktory. Zvláštní skupinu tvoří biotické faktory zahrnující závažné negativní vlivy jiných rostlin, živočichů a mikroorganismů na danou rostlinu.

- Abiotické faktory:
- | | |
|-----------|---|
| fyzikální | <ul style="list-style-type: none">· mechanické účinky větru· nadměrné záření· extrémní teploty (horko, chlad, mráz) |
| chemické | <ul style="list-style-type: none">· nedostatek vody· nedostatek kyslíku· nedostatek živin v půdě· nadbytek iontů solí a vodíku v půdě· toxické kovy a organické látky v půdě· toxické plyny ve vzduchu |

- Biotické faktory:
- herbivorní živočichové (spásání, poranění)
 - patogenní organismy (viry, mikroby, houby)
 - vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus)

Stresové faktory fyzikálně-chemické či biotické mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů nesterjně snadno v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur daných rostlin. Tento způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter, jedná se například o tlustou kutikulu na listech, výraznou impregnaci buněčných stěn, rezervoáry vody a snadno rozložitelné organické látky tlumící jejich nedostatek. Jde zde vlastně o schopnost rostlin vyhnout se stresu, ke které přispívají také vhodně načasované životní cykly.

Z fyziologického hlediska jsou mnohem zajímavější mechanismy aktivní odolnosti omezující negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn označovaných jako stresová reakce. (11)

3.4.2. Průběh stresové reakce

Poplachová fáze – se objevuje bezprostředně po začátku působení stresového faktoru, kdy dochází k narušení buněčných struktur a funkcí.

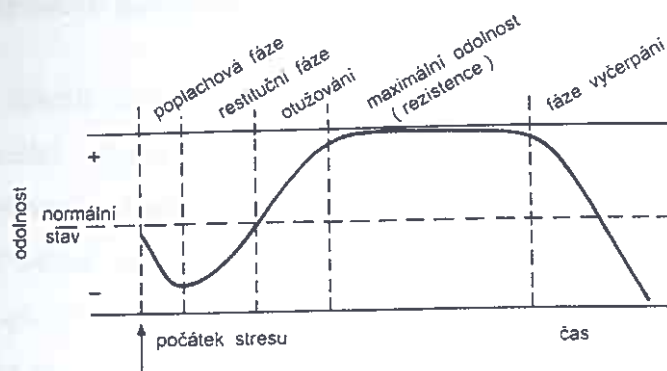
Restituční fáze – je patrná tehdy, pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, a tak záhy dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů.

Fáze rezistence – nastává tehdy, pokud kompenzační mechanismy vedou ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům.

Fáze vyčerpání – přichází při nepřetržitém, intenzivním působení stresového faktoru.

(11)

Schéma č. 3: Znáornění průběhu stresové reakce (11)



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 se nazývá aklimatizace. Ta může být založena na změnách rychle pomíjivých, daných tvorbou specifických metabolitů, nebo na změnách trvalejších, jako je tvorba nových orgánů včetně jejich vnitřní struktury. (11)

3.4.3. Charakteristika obranných reakcí rostlin

Mechanismus působení stresových faktorů je do značné míry specifický, stejně tak i reakce rostliny směřující k potlačení následků působení stresoru, i když některé metabolické změny v buňkách mají společné znaky.

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

- tvorba stresových proteinů
- tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku
- tvorba „stresových“ fytohormonů
- tvorba osmoregulačních sloučenin

3.4.4.1. Stresové proteiny

Pod vlivem kteréhokoliv ze stresových faktorů dochází často již během několika desítek minut k značným změnám v kvantitativním i kvalitativním zastoupení proteinů v buňkách. Tvorba některých proteinů stoupá, u jiných se naopak zastavuje. V hojné míře se však syntetizují proteiny, které se v buňkách za normálních okolností nedají vůbec zjistit. Změny v syntéze obvykle kulminují několik hodin po začátku působení stresoru, a pak dochází k pomalému návratu do původního stavu. Indukce stresových proteinů bývá často specificky vázána na určitý stresový faktor.

Proteiny, které během stresové reakce vznikají, mají velmi rozmanitou velikost i funkci. Dají se snadno separovat podle molekulových hmotností pomocí běžných detekčních metod. Obtížnější je určit jejich funkci, protože většina proteinů vzniká nespecificky vlivem různých stresorů. Jedná se vesměs o konstitutivní proteiny patřící k pravidelné výbavě buněk všech genotypů, ovšem za stresu se jejich množství mnohonásobně zvyšuje. (11)

3.4.4.2. Aktivní formy kyslíku

Některými procesy v rostlinách může být molekulární kyslík z atmosféry přeměněn na mnohem aktivnější formy či silně oxidační sloučeniny. Úloha těchto látek ve stresovaných rostlinách je značně rozmanitá a do jisté míry rozporuplná. Jednak vznikají jako nebezpečné produkty při působení řady stresových faktorů a rostliny tak musí mít účinné mechanismy na jejich deaktivaci. Dále mohou mít funkci signálů či ochranných látek při působení některých stresorů a je pak tedy žádoucí udržovat určitou hladinu těchto látek v buňce.

Tvorba aktivních forem kyslíku v buňkách probíhá několika možnými cestami. Vedle interakce buněk s atmosférickým ozonem jsou hlavními zdroji procesy probíhající v organelách a jejich membránách. Vznik aktivních forem kyslíku může probíhat v chloroplastech či mitochondriích. Nejčastější aktivní formy jsou superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové deriváty.

K negativnímu působení aktivních forem kyslíku patří peroxidace lipidů, především lipidů s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Poškozeny mohou být i některé aminokyseliny, proteiny a nukleové kyseliny. (11)

3.4.4.3. Fytohormony

Fytohormony jsou chemické signály vznikající ve velmi nepatrném množství v určité části rostliny a jsou transportovány do jiných částí rostliny, kde působí regulačně na různé procesy, především růstové, vývojové a pohybové. Na rozdíl od živočišných hormonů jsou fytohormony málo specifické. (1)

Jednou z prvních reakcí rostliny na působení stresoru je zvýšená tvorba etylenu. Vyšší množství etylenu je vyvoláno nedostatkem i nadbytkem vláhy, nedostatkem kyslíku v půdě, teplotními výkyvy, poraněním, zasolením půdy, napadením patogeny i toxickými látkami. Tvorba etylenu stoupá již 20-60 minut po začátku působení stresujícího faktoru a přetrvává různě dlouho. Pod vlivem zvýšené hladiny etylenu stoupá tvorba některých fytoalexinů, zvyšuje se aktivita některých enzymů, které se účastní obranných reakcí rostlin, a vzrůstá odolnost některých pletiv k působení lytických enzymů.

Mezi stresové fytohormony lze i zařadit kyselinu abscisovou (ABA), jejíž obsah kulminuje v závislosti na vnějších vlivech prostředí. Význam ABA poprvé zaznamenali Wright a Hiron v roce 1969. Zjistili, že obsah této kyseliny se v listech pšenice na počátku vadnutí markantně zvyšuje.

Prvním signálem ke zvýšené syntéze ABA je pravděpodobně ztráta vody v protoplastu, čímž dojde k poklesu turgoru. Kyselina abscisová způsobuje uzavírání průduchů inhibicí ATP-protonové pumpy v plasmatické membráně svěřacích buněk. Hladina ABA v rostlinách se zvyšuje i při stresu vyvolaném vysokou či nízkou teplotou, při nedostatku vody a tehdy, když se rostliny vyskytuje na zasolených půdách. Exogenní aplikace ABA v mnoha případech redukovala reakci rostlin na stres a zvyšovala odolnost rostlin proti nízkým teplotám.

Dále můžeme jmenovat i polyaminy, které hrají těž důležitou roli v obraně rostlin, neboť chrání membrány a nukleové kyseliny. Polyaminy stabilizují pH v buňkách a zvyšují buněčnou osmolaritu. Jejich zvýšené hladiny byly pozorovány v kyselém prostředí a při působení osmotického stresu.

V obranných reakcích rostlin se uplatňují i mnohé jiné látky např. kyselina jasmonová či sekundární metabolity odvozené od fenolických látek, mezi které patří i kumariny. (12)

3.4.4. Obrana rostlin proti patogenním organismům

Fytoalexiny představují skupinu nízkomolekulárních látek, které se za normálních podmínek v rostlině nevyskytují, ale začínou se tvořit po napadení patogenem. V současné době je známo více než 300 těchto látek. Převážně jsou to látky fenolické (fenylpropanoidy a flavonoidy, popřípadě isoprenoidy). Většinou se jedná o látky lipofilní povahy, což jim usnadňuje prostup přes plasmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří k hlavním mechanismům jejich toxického působení. Působení fytoalexinů je zaměřené převážně na patogenní houby, méně pak na bakterie. (9)

Nejvyšší akumulace fytoalexinů ve stresovaných rostlinách je dosaženo do dvou dnů, potom jejich hladina klesne. Nejvyšší koncentrace je v buňkách napadených a bezprostředně sousedících s napadeným místem. V místě hypersenzitivní reakce je potlačeno odbourávání fytoalexinů a navíc je silně zvýšena nová syntéza. Signály k syntéze vydává škůdce specifickým působením na určité rostlinné geny. (13)

Tvorba fytoalexinů je vyvolávána elicitory. Elicitory mohou být rostlinné polysacharidy produkované patogenem napadajícím rostlinnou buněčnou stěnu, nebo polysacharidy vznikající při degradaci buněčné stěny patogenní houby rostlinnými enzymy, jejichž sekrece byla vyvolána samotným patogenem. (9)

Poměrně častá a účinná reakce na průnik patogenu je řízená tvorba nektróz. V napadené buňce mohou být během několika desítek minut po kontaktu houbové hyfy s plasmalemou spuštěny biochemické procesy vedoucí k rychlému uhynutí jak vlastní buňky, tak i houbové hyfy. Tato reakce se nazývá hypersenzitivní reakce. Dochází při ní k rozpadu membránového systému především náhlým zvýšením koncentrace vysoce reaktivních volných radikálů a peroxidu vodíku.

Tvorba aktivních forem kyslíku je spojena s aktivací NADPH-oxidázy v plasmatické membráně, inhibicí antioxidantních enzymů v buňce. To vede k rychlé peroxidaci a rozpadu membránových systémů a k smrti buňky samotné. Dále dochází

k odumření buněk i v blízkém okolí místa infekce. Lokalizovaná nekróza ve většině případů spolehlivě zastaví pronikání a šíření další infekce. (11)

Vedle tvorby nekrotů může rostlina získat i rezistenci na daný patogen. Pokusy s kyselinou salicylovou ukázaly, že v pletivech infikovaných patogenem prudce stoupá její obsah. Potom se kyselina salicylová floémem transportuje do neinfikovaných pletiv, kde vyvolává změny vedoucí k získání rezistence daných pletiv. (12)

Jiný typ obranné reakce rostlin představuje zvýšení tvorby polysacharidu kalózy, který vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa. Kalóza je odolná vůči houbovým hydrolázám. Pokud je šíření infekce pomalé, tak se po jisté době může poblíž ohniska infekce založit sekundární meristéum, produkující silně suberizované či lignifikované buňky s velmi dobrou ochrannou funkcí. Jindy může docházet k tvorbě odlučovací vrstvy a celá infikovaná část rostliny odpadne. (11)

3.4.5. Rostliny a těžké kovy

Mnohé půdy jsou kontaminovány řadou toxických kovů, zejména olovem, kadmíem, zinkem, rtutí, cínem, hliníkem aj. Rostliny absorbují tyto kovy kořenovým systémem různě rychle a mají vůči nim i různou odolnost. Některé rostliny těžké kovy téměř neabsorbují, zatímco některé je ve svých orgánech hromadí v dosti značném množství. Existují též rostliny, jež hromadí těžké kovy jen v kořenech. Toxické kovy brzdí v rostlinách růst, fotosyntézu a další procesy tím, že inhibují různé enzymy a redoxní systémy.

Řada rostlin má vyvinuty detoxikační systémy založené na produkci tzv. fytochelatinů, kterými jsou těžké kovy chelatovány. Fytochelatiny jsou peptidy obsahující ve své molekule sírné aminokyseliny. (9)

3.5. Měď

Měď se v periodické tabulce prvků nachází ve společné skupině se zlatem a stříbrem. Jsou to ušlechtilé kovy, odolné vůči korozi a používané jako tzv. mincovní kovy. (15)

Měď patří mezi měkké, kujné, tažné kovy. Výborně vede elektřinu i teplo. Za normálních podmínek je málo reaktivní. Na vlhkém vzduchu se pokrývá za přítomnosti CO_2 zelenou vrstvičkou hydroxid-uhličitanu, s halogeny dává halogenidy CuX_2 , při vysoké teplotě reaguje s kyslíkem i se sírou. Rozpouští se pouze v kyselinách s oxidačním účinkem. (16)

Latinské pojmenování mědi (*cuprum*) je odvozeno od názvu ostrova Cypru, kde Římané poprvé získali kovovou měď. Usuzuje se, že měď byla používána zhruba od roku 5000 př. n. l. Měď se již od roku 3500 př. n. l. vyráběla na Středním východě redukcí rud dřevěným uhlím a roku 3000 př. n. l. byla v Indii, Řecku a Mezopotámii objevena její schopnost tvořit tvrdé bronzy. Od té doby se stala jedním z nejdůležitějších kovů, který se lidstvo naučilo používat. (17)

Měď se v přírodě vyskytuje hlavně ve formě chalkopyritu CuFeS_2 , kupritu Cu_2O a malachitu $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$. Hlavní surovinou pro výrobu mědi je chalkopyrit. Rudy se koksem redukují na kov a dále se elektrolyticky čistí. (15)

Měď se používá hlavně při výrobě elektrických vodičů, v menší míře slouží jako přísada do mincovních slitin, běžných bronzí a speciálních slitin.

Z biochemického hlediska je měď nezbytná pro život. Je součástí hemocyaninu, což je bílkovina sloužící u některých měkkýšů k přenosu kyslíku v krvi. V lidském těle u dospělého člověka je obsah asi 100 mg mědi převážně vázané na bílkovinu. Zúčastňuje se společně s hemem v cytochromoxidáze na přenosu elektronů, a tím usnadňuje přeměnu kyslíku na vodu. Jakákoliv změna hladiny tohoto prvku vede k závažným poruchám. Nedostatek mědi vyvolává anemii a naopak nadbytek způsobuje Wilsonovu chorobu. Kovová měď vykazuje i antibakteriální vlastnosti.

V rostlinné říši je známa řada bílkovin obsahujících měď, tyto bílkoviny se označují jako modré bílkoviny. Slouží k přenosu elektronu. (17)

Měď je velmi důležitý mikrobiogenní prvek v rostlinných buňkách. Je napojena na oxidoredukční systémy a má vliv na stabilizaci chlorofylů. (1) Vedle toho se podílí i na lignifikaci pletiv. Nedostatek mědi v rostlině může mít vliv na vitalitu pylu. (11)

Měďnaté ionty v koncentraci vyšší než 0,1 mM působí jako stresový faktor, který v suspenzních kulturách *Nicotiana tabacum* L. způsobuje zvýšení H_2O_2 . (18) Ve studii se suspenzními kulturami *Oriza sativa* L. zvýšil chlorid měďnatý produkci sekundárních metabolitů povahy terpenů a těkavých látek. (19)

3.6. Explantátové kultury

Jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. Explantátové kultury se využívají při šlechtění rostlin či produkci rostlinných metabolitů. Umožňují konzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin. 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. Vegetativní množení rostlin v explantátových kulturách je možné díky totipotenci rostlinné buňky, což znamená, že i diferencované rostlinné buňky obsahují veškerý genetický materiál potřebný pro regeneraci celé rostliny.

Explantátová kultura se získává z kterékoli části rostliny, nadzemní nebo podzemní, explantací parenchymatické tkáně, jejím přenesením na tuhou živnou půdu a inkubací. Po nárůstu dostatečného počtu buněk ve formě kalusu je možné je opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat je v aktivním stavu. (20)

3.6.1. Rozdělení rostlinných explantátových kultur

- Kultura orgánová – orgány resp. jejich základy či části pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který zachovává jejich diferenciaci, stavbu a funkci.
- Kultura tkáňová-pletivová – soudržné, morfologicky desorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně (pletiva) pomnožované na polotuhých či pevných nosičích nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě.
- Kultura suspenzní – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, které jsou suspendovány v tekuté živné půdě, jsou promíchávány a provzdušňovány.
- Kultura buněčná resp. kultura volných buněk – volné jednotlivé a identifikované buňky pomnožované v tekuté či polotekuté živné půdě nebo na nosiči nasyceném půdou.

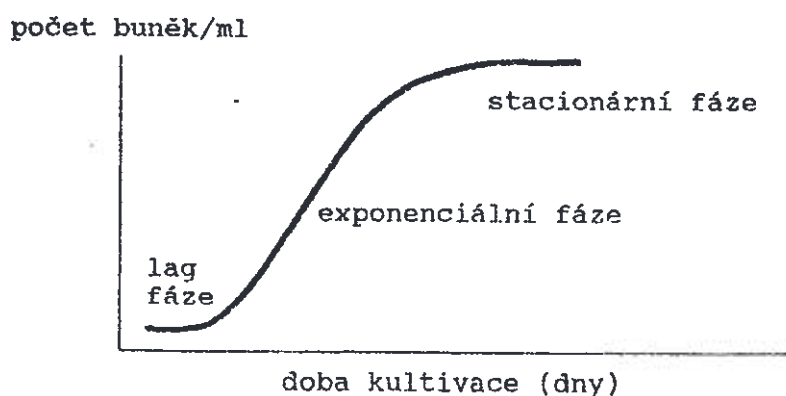
- Kultura protoplastů – kultury buněk, které nemají buněčnou stěnu, obsah buňky je obalen elastickou plasmalemou. (21)

3.6.1.1. Suspenzní kultura

Suspenzní kultury rostlin představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu. Přípravují se z rozpadavého kalusu. Kousky kalusu jsou kultivovány na tekutém médiu na třepačce či rolleru.

Použití tekutých médií umožňuje buňkám přímý kontakt s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou jim rychle přístupné. Snadný přísun živin a dobrá výměna dýchacích plynů v pohybujícím se médiu umožňuje velmi rychlý růst buněčné suspenze. Vlivem rychlého růstu buněk dojde za krátkou dobu k odčerpání živin z kultivačního média. Pro zajištění stálého růstu kultury je nutné buněčné suspenze často pasážovat na čerstvé médium. Pasážování je nutno provádět na konci exponenciální fázi růstu, která je charakteristická aktivním dělením a růstem buněk. Aktivně se dělící buňky totiž produkují určité substance, které stimulují růst okolních buněk. (viz schéma č .4) (22)

Schéma č. 4: Růstová křivka suspenzní kultury



Buněčné suspenzní kultury se hojně využívají jako modelový systém při studiu procesů sekundárního metabolismu, indukci enzymů, genové exprese a jako výchozí materiál pro přípravu enzymů. Většina těchto suspenzí neobsahuje karotenoidy a chlorofyl, což je z hlediska izolace enzymů a sekundárních metabolitů velmi výhodné. (22)

3.6.2. Vlastnosti rostlinných explantátových kultur

- Tkáňovou, suspenzní či buněčnou kulturu lze odvodit z buňky či komplexu buněk pletiva kteréhokoli orgánu rostlinného těla. Výjimku tvoří některé velmi specializované buňky, jako jsou sítkovice, tracheidy, sklereidy aj.
- Kulturu lze pěstovat (udržovat rostoucí) *in vitro* za vhodných kultivačních podmínek neomezeně dlouho.
- Tkáňová resp. suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje, ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter. Není však homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciaci.
- Řada orgánových, tkáňových či buněčných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách.
- Vhodnou kombinací růstově aktivních látek a ostatních složek kultivačního média lze v kulturách primárních explantátů i v kulturách tkáňových, suspenzních či buněčných indukovat histogenezi a organogenezi, takto lze odvodit z jedné somatické buňky životaschopnou rostlinu.
- Explantátové orgány resp. orgánové základy v kultuře *in vitro* mohou dorůstat. (21)

3.6.3. Kultivace explantátových kultur

Veškeré potřebné etapy lze podle Pétiarda rozdělit do čtyř fází.

1. Fáze – V této etapě dochází k výběru vhodné matečné rostliny, pokud možno s vysokou produkcí požadovaného metabolitu, a k získání primárního explantátu. Obtíže při zavádění pletiv a buněk do kultury *in vitro* jsou úměrné stupni jejich diferenciaci. Obecně je obtížnější odvodit kulturu z jednoděložných než z dvouděložných rostlin. Z povrchově sterilizované či asepticky pěstované rostliny se odebere fragment některého orgánu a umístí

se *in vitro* na vhodné médium, které musí být sterilní. V této fázi je velmi důležité složení živného média. Obvykle musí být komplexnější než v dalších pasážích. Po několika týdnech se objeví primární kalus, jenž je schopen rozmnožování na novém médiu.

2. Fáze - Získaný kalus je po odstranění zbytku výchozího orgánu po pasážování na vhodné médium schopný proliferace. Během prvního pasážování se často projevují morfologické pigmentace nebo změny, teprve po větším počtu pasáží se získá stabilní a homogenní rostlinný materiál, ovšem pouze za předpokladu přísného dodržování konstantních podmínek kultivace, jako je složení živné půdy, teplota, osvětlení, prostředí a pravidelnost pasáží.
3. Fáze – Suspenzní kulturu rostoucí v tekutém médiu lze z tkáně pěstované na pevné půdě získat buď enzymovým rozvolněním (např. pomocí pektináz), nebo mechanickou cestou. Kalus převedeme do tekutého média a nádobu umístíme na speciální třepačku. Získané kultury jsou dále udržovány pomocí pravidelných pasáží k udržení stupně disociace buněk. Po několika pasážích lze získat suspenze s konstantním stupněm agregace.
4. Fáze – Suspenzní kultury jsou většinou udržovány vsádkově v malých baňkách umístěných na třepačkách či rollerech. Přechod na větší objemy, nutný pro každé biotechnologické využití, je velmi náročný z hlediska udržení dokonalé sterility, zajištění dostatku kyslíku a optimalizace dalších faktorů. Rostlinné buňky mají velikost zhruba 1000× větší než buňky bakterií, a proto z nemíchaného či netřepaného média rychle sedimentují. Jsou křehké a z tohoto důvodu špatně snášejí mechanické míchání, proto se k míchání často používá procházejícího proudu sterilního vzduchu.

Volba vhodného způsobu kultivace závisí:

- na vlastnostech kultury
- stupni agregace a diferenciaci
- na hledaném produktu
- na potřebě získat biomasu nebo metabolit uvolněný do média

Buňky jsou obecně pěstovány při teplotách mezi 25–30 °C, v rozmezí 10-200 otáček rolleru za minutu a průměrná vsádková kultivace trvá 10-15 dní. (21) Volba vhodného kultivačního zařízení má pro přípravu explantátových kultur značný význam, protože při kultivacích ve větších objemech se rostlinné buňky liší od mikrobiálních buněk zejména zdánlivě vysokou viskozitou buněčných suspenzí spojenou s citlivostí ke střížným silám v důsledku značného objemu. Při šetrném, avšak nedostatečném způsobu promíchávání explantátové kultury mohou být metabolické procesy limitovány nedostatkem kyslíku a dochází k sedimentaci a flotaci buněk.

Nevýhodou kultivace explantátových kultur je pomalý buněčný cyklus, který se pohybuje od patnácti hodin výše, což vede k tomu, že kultivace trvá značně dlouho a s tím se zvyšují i nároky na udržení sterility procesu. (20)

3.6.4. Podmínky kultivace explantátových kultur

3.6.3.1. Složení kultivačního média

Složení kultivačního média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin. Média používaná pro kultivaci buněk, pletiv či orgánů rostlin obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny, zdroje organického dusíku, sacharidy, nedefinované organické složky, růstové regulátory a zpevňující látku. Existuje řada médií pro různé druhy rostlin a pro různé účely kultivace. Média jsou zpravidla označována jménem badatele, který půdu sestavil, použil a vyzkoušel jako první.

- Makroelementy – v kultivačních médiích zahrnují šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík, síru.

Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu.

Dusík se do médií přidává nejčastěji v nitrátové formě a ve formě amonných solí, neboť rostlinné buňky mohou růst pouze na mediích obsahujících právě tyto formy dusíku. Draslík se do médií dodává ve formě dusičnanu či chloridů. Kvantitativní zastoupení makroprvků je větší než 30 mg/l.

- Mikroelementy – jsou nezbytné pro růst tkáňových kultur rostlin. Patří sem zejména železo, mangan, zinek, bór, měď, molybden aj. Železo a zinek se obvykle dodávají do médií v chelátové formě. Koncentrace mikroelementů v médiu se pohybuje řádově v μM .
- Zdroj uhlíku – nejčastějším představitelem zdroje uhlíku je sacharóza. Lze ji někdy nahradit i fruktózou či glukózou. V kultivačních médiích byly testovány i jiné cukry, ale většinou byly méně efektivní než sacharóza a glukóza. Obvyklá koncentrace v médiu činí 2-3 %. Sacharidy se do médií přidávají z důvodů heterotrofní výživy explantátů, protože jejich schopnost autotrofní výživy je velmi omezena.
- Vitamíny – mohou být pro rostlinné explantáty limitujícím faktorem jejich růstu. Nejčastěji se používají thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin, myo-inositol, biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, riboflavin aj. Thiamin je součástí většiny médií, neboť je pro růst kultur nepostradatelný. Myo-inositol je sacharid, který může stimulovat růst buněk a předpokládá se, že podporuje tvorbu látek, které se podílí na buněčném dělení.
- Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku – slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo jsou přímo využity k syntéze proteinů. Přestože si kultivované rostlinné buňky umí syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny samy, může přítomnost některých aminokyselin v médiu stimulovat růst explantátů, především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Nadbytek aminokyselin v médiu může naopak růst inhibovat.
- Nedefinované organické složky – tvoří řada organických extraktů např. kvasničný extrakt, sladový extrakt, protein hydrolyzát, kokosové mléko, extrakt z banánů, pomerančů či rajčatové šťávy. Do médií se extrakty přidávají, aby stimulovaly růst explantátových kultur.
- Látky používané pro zpevnění média – nejčastěji používaný je agar. Vedle agaru lze použít ke zpevnění média i agarózu či syntetické látky jako Phytigel a Gerlite. V případě kultivace v tekutém médiu je možno explantáty "fixovat" na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě, perforovaném celofánu či polypropylenové membráně.

- Růstové regulátory – jsou látky podněcující rostlinu k růstu. Rostliny jsou pak schopny lépe využívat živiny a asimilační pochody probíhají intenzivněji. Mohou se řadit do čtyř skupin:

- auxiny
- cytokininy
- gibereliny
- kyselina abcisová

O charakteru růstu explantátové kultury rozhoduje koncentrace jednotlivých hormonů a často i jejich vzájemný poměr.

Mezi auxiny používané v tkáňových kulturách rostlin patří především kyselina indolyloctová, kyselina indolylmásečná, kyselina dichlorfenoxyoctová a kyselina naftyloctová. Auxiny jsou v médiu používány hlavně za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci somatické embryogeneze, stimulace tvorby a růstu prýtlů, zejména kořenů.

Z cytokininů se běžně v kultivačních médiích používají benzylaminopurin, 6-dimethylaminopurin, furfurylaminopurin a zeatin. Cytokininy se do kultivačních médií přidávají za účelem stimulace buněčného dělení a stimulace tvorby axilárních prýtlů.

Vzájemný poměr auxinu a cytokininu značně ovlivňuje v kultivačním médiu zejména morfogenetickou reakci. Pokud je poměr auxinu k cytokininu vysoký, dochází k iniciaci tvorby kořenů, embryogenezi a iniciaci tvorby kalusu. Je-li koncentrace cytokininu vyšší než auxinů je indukována tvorba axilárních prýtlů.

Gibereliny v kultivačním médiu jsou nezbytné pouze u některých rostlin, u kterých mohou stimulovat růst. Přidávají se do média pro stimulaci růstu kultur při nízké hustotě suspenze a ke stimulaci růstu kalusů a zakrslých rostlin. (22)

3.6.3.2. Fyzikální podmínky kultivace

Mezi fyzikální faktory, které ovlivňují kultivaci, můžeme řadit teplotu, světlo, pH živného média aj. Fytohormony, světlo a teplota patří k faktorům, které mohou ovlivňovat genetickou a enzymovou aktivitu biologického materiálu.

- Světlo – V závislosti na světle dochází často v intaktních rostlinách i explantátových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů. Světlo může být také indukčním faktorem některých biosyntetických pochodů. (21)
- Teplota – Každá metabolická reakce je charakterizovaná teplotním koeficientem, který uvádí o kolik se změní rychlost reakce, změníme-li teplotu. Teplotní optima těchto reakcí leží většinou kolem 28 °C. Teplotní rozmezí pro kultivaci explantátových kultur se pohybuje od 23 °C do 28 °C. (20, 22)
- Acidita živného média – Na rozdíl od kultivace mikroorganismů nebo živočišných tkání není u rostlinných tkáňových kultur bezpodmínečně nutná přesná hodnota pH živného média. Optimální hodnota je závislá na typu kultury, obvykle je pH 5,5 - 6,0, v některých případech 6,0 – 7,0. Příslušná hodnota pH se v případě potřeby upravuje pomocí hydroxidu draselného či kyselinou chlorovodíkovou. (22)

3.6.5. Využití explantátových kultur

Explantátové kultury se uplatňují zejména jako:

- 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.
- Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovaných rostlinách.
- Získávání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk.

- Získání produktů biotransformací, kdy z poměrně levných a dostupných substrátů lze získat farmaceuticky významné látky, protože příslušné enzymy se u mikroorganismů nevyskytují. (20)

3.6.3.1. Mikropropagace rostlin

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

- kultura se odvozuje z velmi malých částí rostlin a nevyžaduje příliš prostoru
- rozmnožování se provádí za sterilních podmínek, čímž se zabrání vzniku mikrobiálních a virových nákaz
- podmínky množení jsou přesně definovány, a tím se zvýší koeficient množení
- možnost produkovat druhy rostlin, které se tradičními metodami vegetativního množení množí pomalu či se nemnoží vůbec
- možnost množení rostlin po celý rok nezávisle na ročním období
- odpadají nároky na velké skleníkové plochy pro uchovávání matečných rostlin
- rostliny *in vitro* nevyžadují prakticky žádnou péči, jako je zalívka, pletí, chemické ošetřování apod.

Nevýhodou je relativně drahé laboratorní vybavení a poměrně vysoká pracnost metody, která neumožňuje mechanizaci. (20)

3.6.3.2. Biotransformace

Explantátové kultury rostlinných buněk mají schopnost transformovat exogenně dodané látky. Některé z reakcí např. hydroxylace či glykosylace mohou mít praktický význam, protože je nelze provést ani chemicky, ani mikrobiologicky. Využití těchto reakcí je však omezeno tím, že explantátové kultury provádějí souběžně několik reakcí, což lze překonat jen přísnou selekcí buněčných linií. Jako příklad úspěšné biotransformace lze uvést 12- β -hydroxylaci digitoxinu na digoxin s vyšlechtěnými explantátovými kulturami *Digitalis lanata* L. (20)

3.6.3.3. Produkce sekundárních metabolitů

Rostliny produkují ve srovnání s mikroorganismy mnohem širší škálu sekundárních metabolitů, z nichž mnohé mají význam ve farmacii, kosmetice, potravinářství atd. Tkáňové kultury se mohou v produkci sekundárních metabolitů uplatnit na několika úrovních. Využívají se k vlastnímu množení rostlin významných z hlediska produkce sekundárních metabolitů nebo k selektování kultivarů s vysokou produkcí těchto látek.

Oproti tradičním způsobům má získávání sekundárních metabolitů z explantátových kultur řadu výhod:

- syntéza probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatu a půdních podmínkách
- produkčním systémem jsou vyloučeny negativní biologické vlivy v přírodě měnící produkci sekundárních metabolitů
- je možno selektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů
- automatizací řízení buněčného růstu a regulací metabolických procesů může klesat výrobní cena a stoupat produkce

Jedním ze základních problémů této metody je relativně pomalý růst rostlinných buněčných kultur a nízká produkce metabolitů. Doposud se jen u malého počtu explantátových kultur podařilo dosáhnout produkce sekundárních metabolitů vyšší než v intaktní rostlině.

Cílem výzkumu v oblasti produkce sekundárních metabolitů explantátovými kulturami je dosažení komplexní syntézy žádaných produktů z dodaných živin. Je snaha dosáhnout zvýšení produkce sekundárních metabolitů v buňkách a zajistit, aby tyto buňky syntetizované látky produkovaly do živného média. (22)

Jako příklad můžeme uvést pokus, ve kterém se kyselina jasmonová projevila jako elicitor schopný zvýšit obsah paclitaxelu v médiu suspenzní kultury rostlin rodu *Taxus* L. (27)

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

Ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100H, Bandelin Electronic, Berlín

Čerpadlo PU-2089, Jasco, Tokyo

Detektor diode array MD-2015, Jasco, Tokyo

Detektor fluorescenční FP-2020, Jasco, Tokyo

Automatický dávkovač AS-2055, Jasco, Tokyo

Box s laminárním prouděním Fatran, Výrobné družstvo Pokrok, Žilina

Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha

4.2. Chemikálie

acetonitril *p. a.*

dihydrogenfosforečnan draselný *p. a.*

dusičnan draselný *p. a.*

dusičnan amonný *p. a.*

chlorid kobaltnatý *p. a.*

chlorid vápenatý *p. a.*

chlorid thiaminia *puriss.*

chlorid pyridoxinia *puriss.*

myoinositol

skopoletin *p. a.*

glycin č.

hydrolyzát kaseinu

sacharóza *p. a.*

jodid draselný *p. a.*

kyselina boritá *p. a.*

kyselina nikotinová č.

kyselina fosforečná *p. a.*

metanol *p. a.*

kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová *p. a.*

benzylaminopurin *p. a.*

molybdenan sodný *p. a.*

síran hořečnatý *p. a.*

síran manganatý *p. a.*

síran měďnatý *p. a.*

síran zinečnatý *p. a.*

síran železnatý *p. a.*

4.3. Tkáňová kultura *Angelica archangelica* L.

4.3.1. Tkáňová kultura

Pro pokusy byla použita desetiletá 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 přidavkem 2 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 0,4 mg/l benzylaminopurinu na roleru ve tmě. Pasážování bylo prováděno ve čtrnáctidenním intervalu.

4.3.2. Kultivace tkáňové kultury

Pro sledování vlivu síranu měďnatého na produkci kumarinů byla kultura přepasážována na živná média podle Murashigeho a Skooga bez síranu měďnatého a s přidavkem síranu měďnatého v koncentraci 0,025; 0,125; 0,25; 1,25; 2,5; 12,5 a 25 mg/l média a kultivována čtrnáct dní ve tmě. 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 skopoletinu.

4.3.3. Živné médium podle Murashigeho a Skooga

Složení živného média vztažené na 1 litr je následující (23):

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 skopoletinu

Stanovení skopoletinu v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí. Podmínky stanovení byly následující: kolona Lichrospher RP18 (250 x 4 mm, velikost částic 5 µm) s předkolonou ze stejného materiálu; lineární gradient mobilní fáze A (acetonitril) ve fázi B (voda s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné) 5-29 % od 0 do 20 minut, následné promytí kolony mobilní fází 5 % acetonitrilu ve vodě s 0,15 % kyseliny fosforečné; rychlost eluce 1,2 ml/min; počáteční tlak na koloně 15,9 MPa; dávkovaný objem vzorku 20 µl; excitační vlnová délka 345 nm, emisní vlnová délka 450 nm.

Stanovení skopoletinu v médiu

V médiích bylo stanovení skopoletinu prováděno přímo bez další úpravy vzorku. Obsah skopoletinu byl počítán z kalibrační křivky a vyjadřován v mg na litr média.

Stanovení skopoletinu v buňkách

Usušené buňky byly rozpráškovány v třecí misce a extrahovány třikrát 15 a jedenkrát 10 minut metanolem v ultrazvukové lázni. Získané výluhy byly spojeny a doplněny v odměrné baňce na 25 ml po rysku metanolem, promíchány, odstředěny (10 minut, 3000 ot./min.) a použity pro stanovení obsahu skopoletinu. Obsah skopoletinu v buňkách byl počítán z kalibrační křivky a vyjadřován v mg na g sušiny.

4.5. Statistické zpracování

Statistické zpracování naměřených hodnot bylo provedeno na základě těchto vzorců (24):

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

Tabulka. č. 1

Vliv síranu měďnatého na obsah kumarinů v médiu suspenzní
kultury *Angelica archangelica* L.

Koncentrace CuSO ₄ (mg/l)	Obsah kumarinů v médiu (mg/l)	Směrodatná odchylka
0,000	0,001	0,000
0,025	0,001	0,001
0,125	0,001	0,001
0,250	0,002	0,001
1,250	0,002	0,000
2,500	0,555	0,179
12,500	0,870	0,057
25,000	0,925	0,019

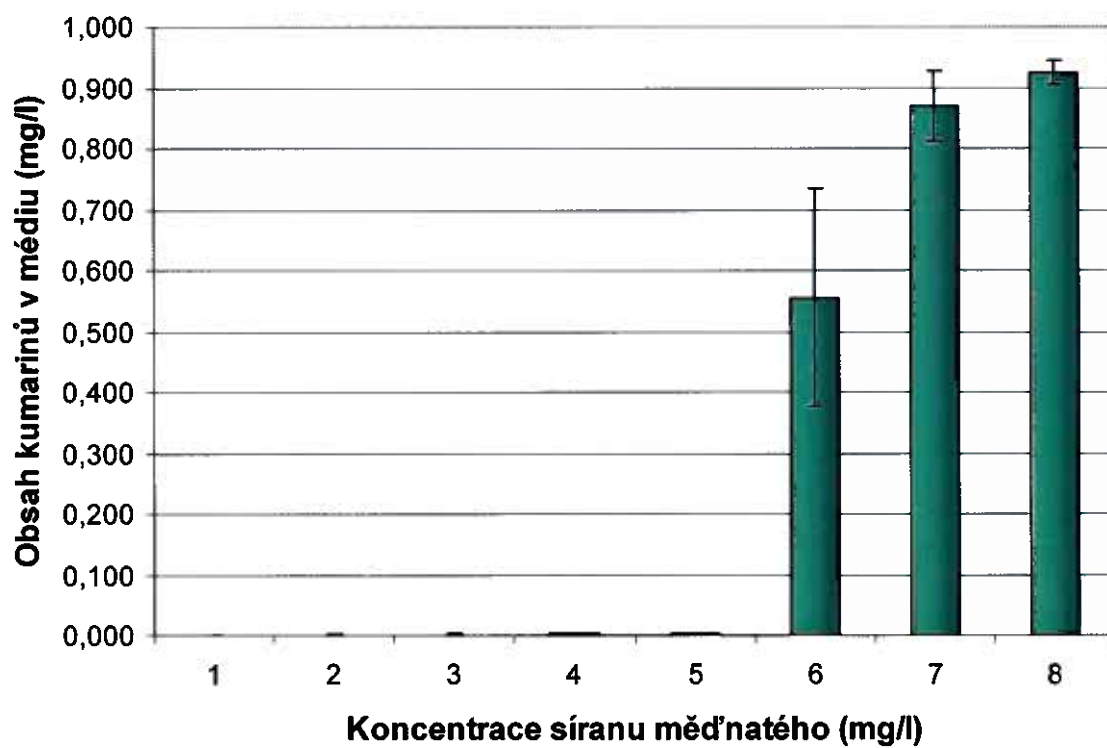
Tabulka. č. 2

**Vliv síranu měďnatého na obsah kumarinů v buňkách suspenzní
kultury *Angelica archangelica* L.**

Koncentrace CuSO₄ (mg/l)	Obsah kumarinů v buňkách (mg/g)	Směrodatná odchylka
0,000	0,204	0,023
0,025	0,207	0,015
0,125	0,184	0,038
0,250	0,195	0,016
1,250	0,135	0,015
2,500	0,261	0,103
12,500	0,409	0,058
25,000	0,330	0,040

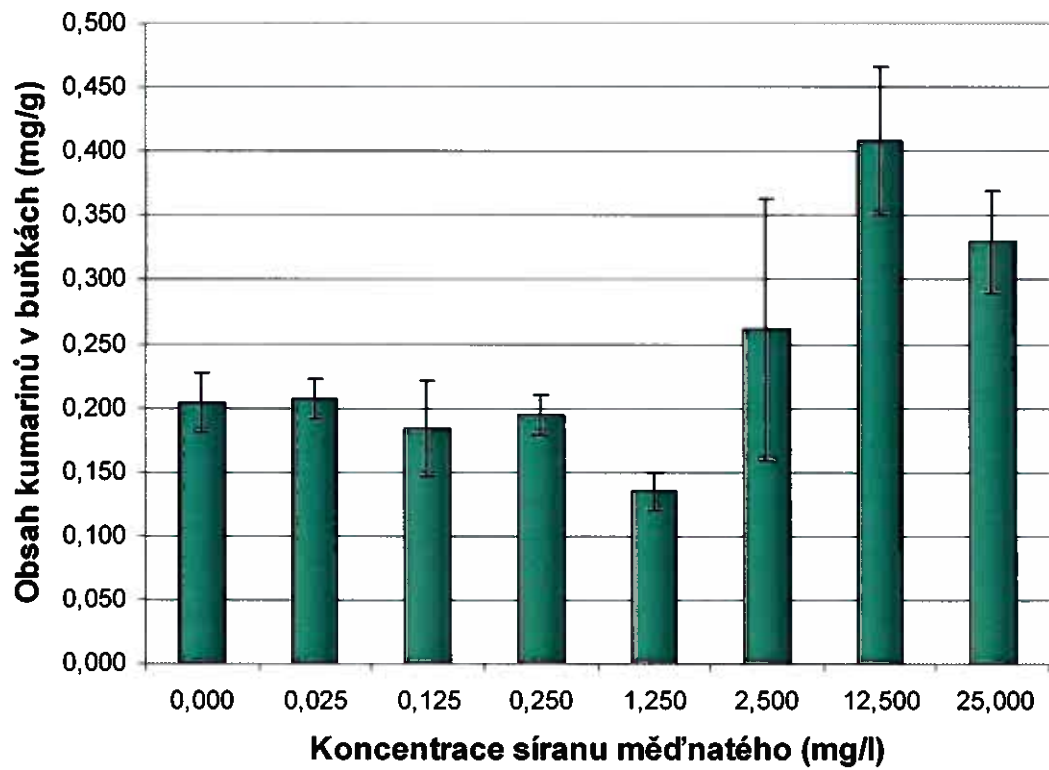
Graf č. 1

Vliv síranu měďnatého na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L.



Graf č. 2

Vliv síranu měďnatého na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L.



6. DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo sledovat, jak ovlivní abiotický elicitor síran měďnatý přidávaný do média suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. produkci kumarinů jako sekundárních metabolitů.

Při pokusu jsme vycházeli z předpokladu, že rostlinné buňky jsou schopné zvyšovat produkci některých sekundárních metabolitů působením různých faktorů z vnějšího prostředí. Faktory, jež vyvolávají tyto obranné reakce rostlin spojené s produkcí sekundárních metabolitů, se označují jako elicitory.

Elicitace se řadí mezi biotechnologické metody. Přesné mechanismy působení elicitorů nejsou dosud zcela objasněny. Bylo však zjištěno, že většina obranných reakcí rostlin i kultur *in vitro* závisí na aktivaci vhodných genů. Geny ovšem nejsou aktivovány přímo elicitory, ale jejich aktivace probíhá přes řadu přenašečů signálu.

Za elicitory jsou považovány jak biotické faktory, které jsou představovány různými mikroorganismy či patogenními houbami, tak i faktory abiotické, jako jsou těžké kovy.

Těžké kovy mohou v rostlinách ovlivňovat pozitivně či negativně řadu biosyntetických dějů. Při vhodné optimalizaci podmínek lze využít elicitačních účinků iontů těžkých kovů k cílené produkci sekundárních metabolitů danou kulturou. Z důvodů, že každý elicitor působí na produkci sekundárních metabolitů odlišně, je nutné vždy zvážit a splnit určité podmínky pro vzájemnou interakci daného elicitoru a buněčné kultury. Mezi tyto podmínky řadíme např. volbu vhodného elicitoru, jeho optimální koncentraci a dobu působení na kulturu, optimální složení vhodného média, volbu vhodné rostlinné kultury, její stáří a růstovou fázi.

Těžké kovy jako elicitory mají výhodu v tom, že jsou chemicky zcela definované a můžeme je tedy v určitých kvantech aplikovat do suspenzních kultur. Řada z nich je i finančně dostupná.

Při pokusu jsme sledovali produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L., jež byla pěstována na živném médiu, do kterého se přidávali různé koncentrace síranu měďnatého jako elicitoru. Koncentrace síranu měďnatého byly 0,025; 0,125; 0,25; 1,25; 2,5; 12,5; 25 mg/l média. Kultura se nechala kultivovat po dobu čtrnácti dnů ve tmě.

Po uplynutí dané doby kultivace s přidavkem výše uvedených koncentrací síranu měďnatého jsme porovnávali množství kumarinů v médiích a v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. s obsahem kumarinů v kontrolních suspenzních kulturách *Angelica archangelica* L.

Ze získaných hodnot jsme zjistili, že médium kontrolní kultury neobsahovalo žádné kumariny a ani nízké koncentrace síranu měďnatého neměly na obsah kumarinů vliv. Teprve při koncentraci síranu měďnatého 2,5 mg/l vzrostl obsah kumarinů v médiu na hodnotu 0,555 mg/l. Též bylo pozitivní i další zvyšování koncentrace elicitoru, neboť množství kumarinů v médiu stále rostlo. Při maximální koncentraci síranu měďnatého 25,0 mg/l byl stanoven obsah kumarinů 0,925 mg/l.

Též bylo patrné zvýšení množství kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. Kultura s nulovou koncentrací měďnatých iontů obsahovala 0,204 mg/g kumarinů v buňkách. Při zvyšování koncentrace síranu měďnatého do živného média jsme pozorovaly nárůst obsahu kumarinů při koncentraci síranu měďnatého 2,5 mg/l o 22 %. Maximální hodnoty dosahovalo množství kumarinů při koncentraci elicitoru 12,5 mg/l a to 0,409 mg/g kumarinů, což je o 100 % více než v kontrolní kultuře.

Při sledování vlivu abiotického elicitoru (síranu měďnatého) na produkci sekundárních metabolitů suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. kultivované za tmy bylo zjištěno, že rostoucí koncentrace síranu měďnatého pozitivně ovlivňuje produkci kumarinů. Produkce kumarinů se od určité koncentrace elicitoru postupně zvyšovala jak v médiu, tak i v buňkách.

V suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. byl zjišťován vliv různých koncentrací hlinitých iontů, kde se zjistilo, že se produkce kumarinů zvýšila o 29 % v médiu a o 20 % v buňkách kultivovaných ve tmě. Naopak u kultur, které se kultivovaly za světla obsah kumarinů klesal. (25)

7. ZÁVĚR

Síran měďnatý jako elicitor pozitivně ovlivnil produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. Nárůst obsahu kumarinů byl markantní jak v médiu, tak i v buňkách. Vhodné se ukázaly až koncentrace nad 2,5 mg/l síranu měďnatého.

Výsledky ukazují, že měďnaté ionty se jeví jako vhodný elicitor pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L.

8. LITERATURA

1. Procházka, S. et al.: Botanika – Morfologie a fyziologie rostlin, MZLU, Brno 2002, s.7, 132
2. Korbelář, J.; Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha 1981, s.11, 12, 16, 78
3. Tomko, J. et al.: Farmakognózia, Osveta, Martin 1999, s. 19-21, 86, 176, 177
4. Vodrážka, Z.: Biotechnologie, VŠCHT, Praha 1991, s. 59, 60
5. Slavík, B.: Květena České republiky, díl 5., Academia, Praha 1997, s. 399-403
6. Dugas, D.: Zdravý život s babiččínými bylinkami, Knižní expres, Ostrava 2004, s. 40, 41
7. <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/sturm/flora/high/sturm12026html>
8. Macholán, L.: Sekundární metabolity, Masarykova Univerzita, Brno 1998, s. 7, 58-61
9. Luštinec, J.; Žárský, V.: Úvod do fyziologie vyšších rostlin, Karolinum, Praha 2003, s.140, 239
10. Jirasek, V.; Starý, F.: Atlas léčivých rostlin, SNP, Praha 1989, s. 20
11. Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha 1998, s. 110, 412-430
12. Procházka, S. et al.: Regulátory rostlinného růstu, Academia, Praha 1997, s. 87, 99, 110
13. Beiderbeck, R.; Reichling, J.: Biologie 5, 453 (1989)
14. Bruneton, J.: Pharmacognosy Intercept, Paris 1999, s. 263-276
15. Lukeš, I.; Mička, Z.: Anorganická chemie, Karolinum, Praha 1998, s. 191, 192
16. Šmogrovič, J. et al.: Všeobecná a anorganická chémia, Osveta, Martin 1994, s. 381, 382
17. Greenwood, N.N.; Earnshaw, A.: Chemie prvků, Infirmatorium, Praha 1993, s. 1455, 1457, 1484, 1485
18. Raeymaekers, T. et al.: Protoplasma 221, 93 (2003)
19. Obara, N. et al.: Biosci.Biotechnol.Biochem. 66 , 2549 (2002)

20. Sikyta, B.; Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001, s. 75-81
21. Sikyta, B.; Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1992, s. 85-94
22. Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství univerzity Palackého, Olomouc 1995
23. Murashige, T., Skoog, F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962)
24. Klemmerová, V.: Základy aplikované statistiky, SPN, Praha 1993, s. 30, 31
25. Harantová, T.: Diplomová práce, UK FaF, Hradec králové 2005
26. Hess, D.: *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha 1983, s.133-135
27. Baebler, Š. et al.: *Planta Medica* 68, 475 (2002)