

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakognosie

KULTURY LÉČIVÝCH ROSTLIN IN VITRO - XV

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MAREK SLAVÍK

Datum zadání: 26. 9. 2012

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Počet stran: 63

Oponent: PharmDr. Jan Martin, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, řádně cituji. Práce nebyla využita pro získání jiného nebo stejného kvalifikačního titulu.

V Hradci Králové, 15. 5. 2016

Marek Slavík

Poděkování

Rád bych poděkoval doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a konzultace, které mi poskytla při zpracování této diplomové práce. Děkuji také PharmDr. Janu Martinovi, Ph.D. za pomoc při analytickém zpracování výsledků pomocí HPLC. Zároveň bych chtěl poděkovat celému kolektivu Katedry farmakognosie za vstřícný a trpělivý přístup u vypracování laboratorní části práce.

OBSAH

1	Úvod	6
2	Cíl práce.....	7
3	Teoretická část.....	8
3.1	Třezalka tečkovaná.....	8
3.1.1	Charakterizace a taxonomické zařazení.....	8
3.1.2	Obsahové látky	9
3.1.3	Biologické účinky, použití, klinické studie	11
3.1.4	Lékové interakce.....	13
3.1.5	Nežádoucí účinky	14
3.2	Explantátové kultury	14
3.2.1	Typy explantátových kultur	15
3.2.2	Faktory ovlivňující růst <i>in vitro</i> kultur	16
3.2.3	Růstové regulátory	19
3.3	Stres.....	20
3.4	Produkce obsahových látek a její ovlivnění.....	23
3.4.1	Elicitace	24
3.5	Křemík.....	27
3.5.1	Křemík a člověk.....	28
3.5.2	Křemík v rostlinách	29
4	Experimentální část	32
4.1	Chemikálie	32
4.2	Přístrojové vybavení.....	33
4.3	Rostlinný materiál	34
4.4	Příprava a složení živného média.....	34
4.5	Příprava kalusových kultur	36
4.6	Příprava suspenzních kultur	36
4.7	Příprava elicitoru.....	36
4.8	Elicitace <i>in vitro</i> kultur.....	37
4.9	Stanovení obsahu	37
4.9.1	HPLC analýza	38
4.10	Statistické zpracování dat.....	40
5	Výsledky.....	42

5.1	Tabulky	42
5.2	Grafy	45
6	Diskuze	48
7	Závěr	52
8	Literatura	53
9	Abstrakt, Abstract	62
9.1	Abstrakt	62
9.2	Abstract	63

1 Úvod

Vyšší rostliny jsou bohatým zdrojem bioaktivních sloučenin, které mohou mít uplatnění i ve farmaceutickém průmyslu. Látky přírodního charakteru, nebo od nich odvozené, např. morfin, kodein, kokain, pilokarpin, digoxin, jsou v současnosti stále používány, ale mnoho syntetických analog a molekul nemá patřičnou účinnost a farmakologické vlastnosti jako výše zmíněné látky.

Chemická syntéza sloučenin přírodního charakteru je často ekonomicky nerentabilní. Biotechnologická produkce vhodných sekundárních metabolitů v explantátových kulturách je tak vhodná a atraktivní alternativa. V komerční sféře má však tato metoda jisté limity z důvodu nestability kultur, nedostatečné znalosti průběhu syntetických drah a regulací sekundárních metabolitů. Mnoho rostlinných druhů bylo kultivováno *in vitro*, avšak produkce dostatečného množství požadovaného sekundárního metabolitu nebyla dostatečná. Metodou, která by mohla přispět ke zvýšení výtěžků sekundárních metabolitů je elicitace^{1, 2}.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo seznámení s metodou kultivace kalusových a suspenzních kultur *Hypericum perforatum* L., následně sledování vlivu abiotického elicitoru křemíku na produkci sekundárních metabolitů flavonolových glykosidů (hyperosid, kvercetin), antrachinonových derivátů (hypericin) a zjištění pomocí kapalinové chromatografie, zda elicitor může ovlivňovat produkci metabolitů.

3 Teoretická část

3.1 Třezalka tečkovaná

Tato léčivá rostlina je opředená mnoha mýty a pověrami a jsou jí prisuzovány až magické účinky. Dle legendy údajně vznikla z krve, která stekla z dekapitované hlavy sv. Jana Křtitele na zem. Zmínky o využití třezalky jsou dochovány již z antického období, kde našla využití v léčbě melancholie a hojení ran. Staří Řekové a Římané umisťovali části rostlin do svých obydlí na ochranu proti zlým duchům a démonům. Slavný starověký lékař Hippokratés z Kósu (460 – 377 př. n. l.) jako první významněji zdokumentoval terapeutické využití třezalky. Paracelsus (1493 – 1541) se zmiňuje o bylině roku 1525 jako prostředku k léčbě duševních poruch. S rozmachem a nástupem farmakochemických oborů dochází k lepšímu poznání účinných sekundárních látek a jejich využití v konvenční medicíně³⁻⁸.

Anglosaské pojmenování St. John's wort vychází z faktu, že rostlina krásně vykvétá v období svátku sv. Jana, tj. 24. června. Český název zřejmě pochází ze staroslověnštiny. Slovo trjezati znamená rozdrásat či rozpíchat a odkazuje na přítomnost siličných nádržek v listu, které se mohou jevit jako propíchané^{3,8}.

3.1.1 Charakterizace a taxonomické zařazení

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*, *Hypericaceae*) je vytrvalá bylina se vzpřímenou dvojité rýhovanou lodyhou. Rostlina dorůstá do výšky 50 cm⁹. Vstřícné listy jsou přisedlé, tvarem oválné a podlouhlé¹⁰. Celokrajná čepel obsahuje roztroušené průsvitné schizogenní sekreční dutiny. Na okrajích listů také nalezneme vícebuněčné žlázy obsahující červené barvivo¹¹. Kvete v latách vytvářející vidlany a šroubely¹². Květ se skládá z pětičetného kalichu a koruny. Žluté korunní lístky se nám jeví tečkované, jelikož obsahují žlázy s barvivem. Rozemnutý žlutý květ zbarvuje pokožku tmavě červeně¹⁰. Plodem třezalky je tobolka¹¹. Bylina kvete od června do srpna. Pro příznivý vývoj obsahových látek vyhledává rostlina teplá a slunná stanoviště, nejčastěji roste na dobře osvětlených stráních, sušších loukách, pastvinách, okrajích lesů a v blízkosti cest. Třezalka tečkovaná roste v celé Evropě, západní Asii, severní Africe, ale byla zavlečena i do dalších částí světa⁹.

Lékopis udává rostlinnou nať jako drogu (*Herba hyperici*), která je charakterizována celými nebo řezanými usušenými kvetoucími vrcholky z druhu *Hypericum perforatum* sklizené v době kvetení. Obsahuje alespoň 0,08 % celkových hypericinů (vyjádřeno jako hypericin), počítáno na usušenou drogu¹³.

3.1.2 Obsahové látky^{14, 15}

- flavonoidy (rutin, hyperosid, isoquercetin, quercetin, amentoflavon, biapigenin, kaempferol, luteolin)
- floroglucinoly (hyperforin, adhyperforin)
- naftodiantrony (hypericin, pseudohypericin)
- fenolické kyseliny (kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová)
- třísloviny proanthokyanidiny (katechin, epikatechin)
- xantony (kielcorin, norathyriol)
- aminokyseliny (GABA, cystein, glutamin, leucin, lysin, ornitin) silice (2-methyloktan, undekan, α – pinen, β – pinen, geraniol)
- nasycené mastné kyseliny (kyselina isovalerová, kyselina myristová, kyselina stearová)

3.1.2.1 Floroglucinoly

Velmi významným zástupcem této skupiny je hyperforin. Hyperforin je prenylovaný derivát, který vychází z floroglucinolového skeletu s lipofilními isoprenovými jednotkami. Hyperforin je snadno rozložitelná struktura náchylná k oxidaci vzduchem a ani na světle není stabilní¹⁶. Tato skutečnost dlouho omezovala využití sloučeniny v komerčních produktech. Nakonec se zjistilo, že dicyklohexylamoniová sůl je stabilní nejen při pokojové teplotě, ale i na vzduchu¹⁷. Množství této látky se pohybuje od 2 % v květech, přes 4,5 % v nezralých plodech, až ke 4,4 % ve zralých plodech¹⁸. Ve srovnání s jinými antidepresivy má hyperforin jedinečný farmakologický profil, protože inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu, serotoninu, dopaminu, ale také GABA a glutamátu, tímto mechanismem zvyšuje

hladiny neurotransmiterů v mozku¹⁹. Zvyšuje též vnitrobuněčnou koncentraci Na⁺²⁰. Ukázalo se, že hyperforin je jeden z nejsilnějších, přirozeně se vyskytujících inhibitorů cyklooxygenasy-1 a 5-lipoxygenasy. Zvyšuje pH cytosolu a je schopný regulovat rozdílné parametry tekutosti v neuronální membráně *in vivo* i *in vitro*¹⁶. Po perorální aplikaci obalené tablety, která obsahovala 300 mg extraktu třezalky (odpovídá 14,8 mg hyperforinu) bylo dosaženo maximální plazmatické koncentrace za 3,5 h po podání a eliminační poločas činil 9 h²⁰.

3.1.2.2 Naftodiantrony

Jednou z nejvíce prozkoumaných tříd sloučenin izolovaných z třezalky tečkované jsou naftodiantrony. Nejznámějšími látkami patřící do této skupiny jsou hypericin a pseudohypericin²¹. Hypericin má základní strukturu velice podobnou antrachinonu²². Strukturně hovoříme o polycyklickém chinonu se čtyřmi hydroxylovými skupinami, které jsou umístěny v blízkosti dvou karbonylových skupin²¹. Molekula nemá planární charakter, postranní řetězce aromatického skeletu se navzájem odpuzují a brání molekule získat rovinnou konformaci. Je známo 16 teoretických tautomerů hypericinu²³. Hypericinový kruhový systém je plně aromatický a každý atom uhlíku v kruhu je v hybridizaci sp². Hypericin obsahuje systém konjugovaných dvojných vazeb a absorbuje světlo ve viditelné oblasti spektra, které se jeví jako jasně červené. Nejsilnější absorpce probíhá při 590 nm a tato absorpce je významná pro roli hypericinu jako fotosenzibilizační látky. Hypericin je téměř nerozpustný ve většině organických rozpouštědel, ale snadno se rozpouští v pyridinu²². Byly však popsány draselné soli, které zvyšují rozpustnost a extrahovatelnost z rostliny. Hypericin je labilní látka, speciálně na světle. Dalším faktorem, který způsobuje degradaci naftodiantronů je pH²³. Hypericin, stejně tak i pseudohypericin se vyskytují v kvetoucí části rostliny v koncentracích 0,03 % - 0,3 % v závislosti na vývojovém stadiu rostliny. Množství pseudohypericinu je většinou 2 – 4x větší než hypericinu²⁴. Frakce obsahující hypericin inhibují aktivitu monoaminoxidasy A a B, avšak koncentrace nutné k IC₅₀ jsou 100 – 1000x vyšší než hodnoty, které dosáhne C_{max} hypericinu po perorálním podání extraktu z třezalky²³. Hypericin má inhibiční efekt na proteinkinasy C, indukuje apoptózu – programovanou buněčnou smrt¹⁸ a též bylo prokázáno, že má silnou afinitu k sigma receptorům, které regulují hladinu dopaminu²¹.

3.1.3 Biologické účinky, použití, klinické studie

Signifikantním znakem třezalkových extraktů je antidepresivní účinek. Původně byl tento účinek přiřazen hypericinu, který inhibuje monoaminoxidasu. Později došlo k úpravě poznatků a zodpovědnost za antidepresivní efekt extraktu byl přiznán hyperforinu²². Jak bylo výše uvedeno, hyperforin je silný inhibitor zpětného vychytávání serotoninu, dopaminu, noradrenalinu, GABA a L- glutamátu ze synaptické štěrbinou. Na rozdíl od syntetických antidepresiv, které blokují 5-HT receptory, hyperforin zřejmě inhibuje vychytávání serotoninu zvýšením intracelulární koncentrace sodíku a vápníku. Aktivace iontového kanálu pro vápník TRPC6²⁵ hyperforinem, vede ke zvýšenému příjmu sodíku neuronem, což vede ke snížení sodíkového gradientu mezi neuronem a synaptickou štěrbinou. Ztráta gradientu snižuje zpětné vychytávání monoaminových neurotransmiterů. Tento prokázaný mechanismus hyperforinu se liší od mechanismu známých syntetických antidepresiv a může být klíčem k nové třídě antidepresiv^{7,21}.

Vedle antidepresivních účinků třezalky zůstává možnost dalšího využití v terapii topického ošetření povrchových poranění, jizev, popálenin. Ačkoliv byly protizánětlivé účinky třezalky připisovány inhibičnímu vlivu kvercetinů na prozánětlivé signální transdukční dráhy, nedávný experimentální pokus ukazuje na klíčovou roli hyperforinu²⁶.

Klinické studie ukázaly významný přínos hyperforinu v topické léčbě mírné až středně těžké atopické dermatitidy¹⁶. Hyperforin působí jako duální inhibitor 5-lipoxygenasy a cyklooxygenasy 1, klíčových enzymů v produkci prozánětlivých eikosanoidů z kyseliny arachidonové, což naznačuje jeho potenciál při zánětlivých onemocněních¹⁹. Též může indukovat expresi 8-interleukinu v epitelu střev, primárních hepatocytů a monocytů. Vzhledem k tomu, že 8-interleukin má roli v indukci akutní fáze produkce proteinu v játrech a hlavní roli v zánětu střev, může být škodlivý pro některé pacienty užívající třezalku tečkovanou¹⁶. Hammer a kol. (2008) zjistili, že etanolová frakce extraktu třezalky s obsahem kyseliny chlorogenové, amentoflavonu, kvercetinů a pseudohypericinu snížila zánět způsobený prostaglandinem E2 (PGE2).

Tento čtyřsložkový systém fungoval pouze za přítomnosti světlem aktivovaného pseudohypericinu²¹.

Antibakteriální vlastnosti extraktů třezalky byly hlášeny již v polovině 20. století. Za hlavní antibakteriální složku byl označen hyperforin, který inhibuje růst gram-pozitivních bakterií jako je *Corynebacterium diphtheriae* v koncentracích tak nízkých jako je 0,1 ug/ml¹⁷. Nevykazoval však inhibiční účinek na růst gram-negativních bakterií jako je *Euterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, nebo *Candida albicans*²⁷. Meticilin – rezistentní (MRSA) a penicilin-rezistentní (PRSA) *Staphylococcus aureus* byl obzvláště citlivý na hyperforin²¹.

Hypericin vykazuje aktivitu i vůči obaleným virům zahrnující HIV, chřipku typu A, herpes simplex. Adenoviry a polioviry, které patří mezi neobalené viry, nejsou hypericinem ovlivněny. K plnému využití antivirové aktivity hypericinu je nutné světlo o vlnové délce asi 600 nm. Zpočátku se zdálo, že by terapie hypericinem mohla otevřít cestu k léčbě HIV, avšak klinické studie neprokázaly velký úspěch²².

Hyperforin je také nadějný originální protirakovinný prostředek. Inhibuje růst širokého spektra lidských a krysích nádorových buněčných linií¹⁷. Ve všech testovaných nádorových buňkách hyperforin aktivoval kaspasy-3. V některých také aktivoval kaspasy-9. Hyperforin účinně snižuje stupeň proliferace velkého množství savčích rakovinných buněčných linií zahrnující karcinom prsu, melanom, gliom, fibrosarkom, chronickou myeloidní leukémií a lymfom¹⁶. Jeho antiproliferativní efekt *in vivo* je srovnatelný s paklitaxelem. Nespornou výhodou je absence jakékoliv známky akutní toxicity. Hyperforin brání šíření rakovinného bujení, růstu metastáz a inhibuje angiogenezi *in vivo* a několik klíčových kroků tohoto procesu *in vitro*¹⁷.

Svoji nezanedbatelnou roli v onkologii má i hypericin. Je rozsáhle testován jako fotodynamické činidlo pro léčbu rakoviny. Hypericin jako fotosenzitizér absorbuje světlo a přechází do excitovaného stavu. Excitovaný hypericin může reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku singletového kyslíku, který je velmi reaktivní a může oxidovat jiný substrát. Nejvyšší účinek je dosažen při ozařování hypericinu při vlnové délce asi 600 nm. Reaktivní formy kyslíku mohou oxidovat lipidy a poškozovat buněčné membrány. Tento děj se využívá při léčbě nádorových onemocnění. Při fotodynamické terapii *in vivo* se hypericin vstříkuje do nádoru, který je ozařován

laserem. K poškozování buněk může také docházet z významného poklesu pH, ke kterému dochází při ozáření buněk obsahující hypericin²².

Extrakty z třezalky mohou mírnit fyzické a emoční symptomy premenstruačního syndromu jako jsou křeče, podrážděnost a zvýšená citlivost prsou. Společné užívání s ploštičником pomáhá zlepšit náladu a úzkost během menopauzy²⁸.

3.1.4 Lékové interakce

Bylinné léky jsou v současné době ve vysoké poptávce a jejich popularita neustále roste. Jsou oblíbené pro léčbu řady zdravotních obtíží vzhledem ke své předpokládané účinnosti, menším výskytem nežádoucích účinků a relativně příznivou cenou²⁹. Dramatický nárůst používání bylinných přípravků včetně třezalky však znamená, že mnohem více pacientů užívajících běžné konvenční léky, je ohroženo lékovými interakcemi³⁰.

Klinické důkazy naznačují, že extrakt z třezalky může vyvolat jak farmakokinetické, tak i farmakodynamické interakce. Farmakokinetické interakce vznikají při současném užívání třezalky a léčiv, které jsou substráty cytochromu P450 a P-glykoproteinu. Třezalka je induktorem forem CYP3A4, CYP2E1 a CYP2C19 cytochromu P450, indukuje též aktivitu P-glykoproteinu, střevního efluxního transporteru mnoha xenobiotik^{31, 32}. Konkrétně CYP3A4 je nejrozšířenější formou, podílí se na většině (52%) známých přeměn léčiv, metabolizuje více než 73 molekul účinných látek^{17,33}. Důsledkem tohoto typů interakcí je snížení plazmatických koncentrací léčiv např. warfarinu, digoxinu, amitriptylinu, teofylinu, perorální kontracepce¹⁰ do terapeuticky neúčinných hladin³³. V případě komedikace třezalky s imunosupresivy (cyklosporin) inhibitory HIV proteáz (indinavir) může dojít k životu ohrožujícím následkům a je jasnou kontraindikací¹⁷.

Vliv třezalky na P-glykoprotein a enzymy CYP jsou obvykle pozorovány po delší terapii (10 nebo více dní). Údaje o léčbě po dobu 4-9 dnů nejsou k dispozici. Studie ukazují, že krátkodobé podání (1 – 3 dny) nezpůsobuje žádné významné interakce s ostatními léčivy³¹.

Mezi farmakodynamické interakce můžeme řadit společnou terapii extraktů třezalky a SSRI antidepressiv (blokující zpětné vychytávání serotoninu) nebo triptany.

V obou případech dochází k nebezpečnému zvýšení koncentrace serotoninu. Tato situace může vyústit v tzv. serotoninový syndrom s fatálními následky. Stav je charakterizován zmateností, neklidem, hyperreflexií, pocením, třesem, nevolností, poruchami koordinace³⁰.

3.1.5 Nežádoucí účinky

V porovnání s nežádoucími účinky běžných antidepresiv, jsou vedlejší projevy terapie extraktu třezalkou malé³⁴. Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky jsou gastrointestinální symptomy, alergické reakce, zmatenost, únava, sedace a sucho v ústech³⁰. Frekvence nežádoucích účinků u 6 382 pacientů s mírnou depresí, kteří užívali třezalku po dobu 6 týdnů, byla 0,125 %. Metaanalýza randomizovaných kontrolních studií třezalky u pacientů s mírnou až střední depresí ukázala, že podíl pacientů, kteří hlásili vedlejší účinky, byl ve srovnání s antidepresivy 26,3 % ku 46,7 % v jejich neprospěch²⁷. U extraktů nebyl potvrzen genotoxický potenciál a mutagenní aktivita na základě *in vivo* a *in vitro* studií²⁷. Nemáme však dostatečně kvalitní studie o bezpečnosti užívání třezalky během těhotenství a laktace. Studie na březích zvířatech ukázala, že nedochází k ovlivnění kognitivního vývoje nebo dlouhodobějších defektů v chování, ale může způsobit nižší porodní hmotnost plodu³⁵.

Topická, či systémová aplikace přípravků s obsahem třezalky a následné vystavení slunečním paprskům může způsobit fototoxickou reakci, která se projevuje kožními abnormalitami. Symptomy zahrnující zarudnutí, tvorbu puchýřů a nekróz, pálení a bolestivost kůže jsou klinickou manifestací fototoxicity. Povaha postižení kůže koreluje s koncentrací hypericinu ve tkáni a absorbované dávce dlouhodobého ultrafialového záření. K výše popsaným stavům dochází při čtyřnásobném překročení doporučené denní dávky, která činí 900 mg^{36,37}.

3.2 Explantátové kultury

Explantátové kultury se používají ke kultivaci izolovaných buněk, pletiv a rostlinných orgánů v umělých podmínkách v kultivační nádobě. Části rostlin, které pěstujeme *in vitro*, se nazývají explantáty. Kulturu lze odvodit z asepticky pěstované,

nebo povrchově sterilizované rostliny. Celý proces kultivace musí probíhat za aseptických podmínek na definovaných kultivačních médiích. Nespornou výhodou je minimalizace rizika kontaminace patogenními organismy a možnost optimalizace podmínek kultivace. *In vitro* kultury mohou mít různý stupeň diferenciací. Totipotentní rostlinná buňka umožňuje vypěstování kompletního organismu z jakékoliv buňky s funkčním jádrem, které obsahuje celou genetickou informaci^{38,39}.

3.2.1 Typy explantátových kultur

➤ Kalusová kultura

Kalus je definován jako amorfní, neorganizovaná hmota parenchymatických buněk. Poraněná tkáň produkuje toto tzv. hojivé pletivo jako reakci na poškození. Kalusy jsou malé, pomalu rostoucí a dobře zvládnutelné struktury, a proto jsou vhodným prostředkem pro uchování genofondu⁴⁰.

➤ Suspenzní kultury

Suspenzní kultury nejčastěji získáváme vložení a rozdrobněním kalusu do vhodného média. Důležité je pravidelné míchání a třepání během inkubace na specializovaných přístrojích. V ideálním případě by se měla suspenze skládat z jednotlivých buněk, obvykle však nacházíme agregáty 20-100 buněk⁴⁰.

➤ Protoplasty

Protoplasty jsou rostlinné buňky, kterým byla odstraněna buněčná stěna mechanickou nebo enzymatickou cestou. Mechanické oddělení je náročné na preciznost práce, má často za následek nízké výtěžky a špatnou kvalitu provedení v důsledku látek uvolňovaných z poškozené buňky. Enzymatické odstraňování buněčné stěny se provádí celulasou, či pektinasou⁴¹.

➤ Kořenové kultury

Kořenové kultury mohou být založeny *in vitro* z explantátů kořenové špičky buď z hlavního, nebo z postranních kořenů. Ačkoliv zavedení kořenových kultur bylo jedním z prvních úspěchů moderní rostlinné biotechnologie, dosud nenašly širší uplatnění v rostlinných transformačních studiích⁴¹.

➤ **Prýtové a meristémové kultury**

Kultura vzniklá kultivací apikálních nebo axilárních meristémů prýtu. Nespornou výhodou je genetická stabilita kultury. Vhodnými poměry koncentrací auxinů a cytokininů ovlivňujeme větvení nadzemních částí, nebo růst kořene⁴².

➤ **Embryonální kultury**

Embrya mohou být použita jako explantáty pro získávání kalusových kultur nebo somatických embryí. Nejpopulárnější metoda pro regeneraci jednoděložných rostlin využívá nezralá embrya odvozená z embryogenního kalusu⁴¹.

➤ **Kultury mikrospor a prašníků⁴¹**

3.2.2 Faktory ovlivňující růst *in vitro* kultur

3.2.2.1 Složení živného média

Optimální růst a morfogeneze tkání se může lišit pro různé rostliny dle jejich požadavků na výživu. Kromě toho i tkáně z různých částí rostlin mají také rozdílné požadavky na uspokojivý růst. Tkáňová kultivační média se vyvinula z živných roztoků používaných pro kultivaci celých rostlin, např. kořenové kultivační médium dle Whitea nebo medium kalusových kultur dle Gauthereta. Mezi základní používaná média řadíme média Murashigeho a Skooga (MS), Linsmaiera a Skooga (LS), Gamborgovo médium (B5), dle Nitsche a Nitsche (NN).

Rostlinné tkáňové kultury by obecně měly obsahovat některé, nebo všechny z následujících součástí: mikroprvky, makroprvky, vitamíny, aminokyseliny nebo doplňky dusíku, zdroje uhlíku, nedefinované organické doplňky, růstové regulátory a želírující složky. Podle International Association for Plant Physiology prvky v koncentracích vyšších než 0,5 mM/l jsou definovány jako makroelementy a ty, které se vyskytují v nižších koncentracích než 0,5 mM/l se označují jako mikroelementy⁴³.

➤ **Makroelementy**

Tato skupina zahrnuje dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru pro dostatečný růst a morfogenezi. Nejčastější formou dusíku je směs dusičnanových iontů z dusičnanu draselného a amonných iontů z dusičnanu amonného. Při vyšších koncentracích amonných iontů roste riziko zvýšené toxicity pro rostlinné buněčné kultury. Nadměrné vychytávání amonných iontů způsobuje okyselení prostředí. Kultivační média by měla obsahovat alespoň 25-60 mM anorganického dusíku pro růst rostlinných buněk. Fosfor se přidává ve formě draselné, amonné nebo sodné soli kyseliny fosforečné. Nadměrná koncentrace fosforečnanů může způsobit vysrážení dalších prvků média za vzniku nerozpustných fosfátů. Dusičnanovou nebo chloridovou formu draslíku, který je považován za hlavní anorganický kation a reguluje osmotický potenciál, přidáváme v koncentracích mezi 20 – 30 mM. Vápník se podílí na syntéze buněčné stěny, buněčné signalizaci a funkci membrán. Hořčík je enzymový kofaktor a složka chlorofylu. Síra je součástí významných aminokyselin methioninu a cysteinu^{41,43}.

➤ **Mikroelementy**

Tyto prvky zahrnující mangan, jod, měď, kobalt, bor, molybden, železo a zinek jsou potřebné ve stopovém množství a mají rozličné úlohy pro růst a vývoj rostlin. Za stěžejní prvek této skupiny se považuje železo. Používané citrátové nebo tartarátové soli železa jsou špatně rozpustné a mohou se vysrážet při přípravě media, proto se používá metody chelatace s kyselinou ethylendiamintetraoctovou. Vzniklý komplex usnadňuje uvolňování železa do media. Kobalt a jod může být přidán do některých médií, ale jejich potřeba pro růst nebyla přesněji definována. Sodík a chlor se používá v určitých médiích, a to navzdory zprávám, že nejsou nijak zásadní pro růst^{41,43}.

➤ **Uhlík a zdroje energie**

Jako zdroj uhlíku se v tkáňových rostlinných kulturách často používá sacharosa, která je levná, dostupná a poměrně stabilní. Lze jí nahradit laktosou, galaktosou, maltosou a škrobem, ale byly vyhodnoceny jako méně efektivní než sacharosa. Glukosa byla shledána účinnější než fruktosa s ohledem na možnost přednostního využití buňkami kultur v iniciální fázi. Bylo prokázáno, že autoklávovaná sacharosa je lepší než sacharosa sterilizovaná filtry. Jako vhodná alternativa pro snížení nákladů na médium se jeví přidání melasy, banánového extraktu či kokosové vody do živné půdy⁴³.

➤ **Vitamíny a myo-inositol**

Vitamíny jsou potřebné pro správný růst a vývoj rostlin. Účastní se metabolických procesů jako katalyzátory. Jejich nedostatek při *in vitro* kultivacích může způsobit omezení růstu a diferenciaci buněk. Zcela esenciálním vitamínem pro růst je thiamin. Další vitamíny jako je kyselina nikotinová, pyridoxin, biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina panthothenová, tokoferol, riboflavin se používají jen v některých médiích pro buněčnou kultivaci, avšak nejsou limitujícím faktorem pro růst.

Myo-inositol je sacharid, který se přidává v malém množství ke stimulaci růstu buněk většiny rostlinných druhů. Podílí se na procesu dělení buněk, protože se štěpí na kyselinu askorbovou a pektiny, které tvoří malou část fosfolipidů⁴³.

➤ **Aminokyseliny**

Potřebné aminokyseliny pro optimální růst jsou obvykle syntetizovány většinou rostlin, nicméně přídavek určitých aminokyselin nebo směsi aminokyselin je důležitý pro založení kultury buněk a protoplastů. Aminokyseliny poskytují rostlinným buňkám zdroj dusíku, který je snadno asimilován tkáněmi a buňkami rychleji než anorganický zdroj dusíku. Nejčastěji se používá glycin, arginin, asparagin, glutamin. Hydrolyzát kaseinu může být použit jako relativně levný zdroj směsi aminokyselin⁴³.

➤ **Nedefinované organické zdroje**

Některá media se doplňují přírodními látkami nebo extrakty. Za zmínku stojí hydrolyzáty bílkovin, výtažky z kvasnic, pomerančový džus, rajčatová šťáva, nebo aktivní uhlí. Testuje se jejich dopad na posílení růstu⁴³.

➤ **Látky zpevňující medium**

Tuhost kultivačního média značně ovlivňuje růst pěstovaných tkání. Existuje široké spektrum látek pro tvorbu gelu, např. agar, agarosa, guma gellan. Agar je polysacharid získaný z mořských řas a univerzálně se používá jako gelotvorné činidlo pro přípravu polotuhých a pevných médií rostlinných kultur. Mezi jeho nesporné výhody patří mísitelnost s vodou, snadné tání v rozmezí 60 – 100 °C, tuhnutí kolem 45 °C, inertnost vůči složkám media a nemožnost být štěpen enzymy rostlin. Dochází též k vyhledávání levnějších alternativ za účelem redukce nákladů kultivačních médií⁴³.

3.2.3 Růstové regulátory

3.2.3.1 Auxiny

Auxiny podporují buněčné dělení a růst buněk. V explantátech stimulují produkci kalusu, zahájení růstu výhonku/prýtu, tvorbu adventivních kořenu, indukci somatické embryogeneze, stimulaci růstu ze vzrostného vrcholu. Nejdůležitějším přírodně se vyskytujícím auxinem je kyselina indolyl-3-octová (IAA), ale její využití v kultivačních médiích je limitováno její nestabilitou vůči teplu a světlu. Aminokyseliny konjugované s IAA částečně řeší tento problém. Nejběžněji používaným auxinem je kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D). Za zmínku stojí jistě i další auxiny: kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina naftylacetová (NAA), kyselina 4-chlorfenoxycetová (4-CPA)^{41,43,44}.

3.2.3.2 Cytokininy

Cytokininy stimulují buněčné dělení, indukují tvorbu výhonku/prýtu a zpomalují růst kořenů. Přírodně se vyskytující cytokininy jsou rozsáhlá skupina strukturně podobných sloučenin, jedná se o purinové deriváty. Z přírodně se vyskytujících cytokininů se používá převážně zeatin a 2iP (2-isopentyladenin). Použití je omezené z důvodu vysoké ceny a nestability. Syntetická analoga kinetin a BAP (benzylaminopurin) jsou využívána podstatně častěji. V kultivačních médiích naleznou uplatnění i nepurinové sloučeniny, konkrétně substituované fenylmočoviny. Tyto fenylmočoviny mohou také nahradit auxiny v některých kulturách^{41,45}.

3.2.3.3 Gibbereliny

Tato skupina sdružuje přírodně se vyskytující, strukturně příbuzné sloučeniny. Podílejí se na regulaci buněčného prodlužování, zvyšují růst kalusů. Nejběžněji používaný gibberelin je kyselina gibberelová známá jako GA3^{41,46}.

3.2.3.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová inhibuje buněčné dělení, urychluje stárnutí a reguluje dormanci. Nejčastěji je používána v tkáňových kulturách na podporu odlišných vývojových drah jako je somatická embryogeneze^{41,44}.

3.2.3.5 Ethylen

Ethylen je přirozeně se vyskytující plynný růstový regulátor, který je spojován s dozráváním ovoce. Nemá široké uplatnění v rostlinných kulturách. Některé rostlinné buněčné kultury produkují ethylen, a pokud je vytvářen v dostatečné míře, může inhibovat růst a vývoj kultury. Typ kultivační nádoby a uzávěru má vliv na výměnu plynů mezi nádobou a vnější atmosférou, a tím ovlivňuje hladiny ethylenu přítomného v kultuře⁴¹.

3.3 Stres

Během své ontogeneze se rostliny setkávají s rozmanitými podmínkami okolního prostředí, které mohou mít nepříznivý vliv na jejich vývoj, nebo vést k odumření rostlinného organismu. Souborně hovoříme o problematice stresu a stresových faktorů, která je složitější a komplexnější než u živočichů. Přisedlost rostlin jim nedovoluje opustit stresové prostředí, důležitou roli hraje i mezidruhová variabilita a různorodost vnitřního prostředí. V přírodě je poměrně běžné působení několika stresových faktorů najednou. Rostlina může navyknout postupnému vystavení stresovým podmínkám. Takové zvýšení tolerance ke stresu označujeme jako aklimatizaci. Adaptace znamená geneticky podmíněnou hladinu tolerance, kterou rostlina získá selekcí během fylogeneze^{44,47,48}.

Obecně lze rozlišovat dva způsoby ochrany před působením stresorů:

- **Pasivní ochrana**

- vzniká fylogeneticky a je geneticky podmíněná
- vyskytuje se nezávisle na aktuálním působení stresorů
- rostlina se brání průniku stresového faktoru do vnitřního prostředí, např. mechanickou bariérou v podobě kutikuly, trichomů^{47,49,50}.

- **Aktivní ochrana**

- snaha eliminovat stresové faktory po jejich penetraci k vnitřním strukturám buňky.

Rostliny mají proti působení stresových faktorů různou míru rezistence. Stres je taková odchylka od optimálního stavu, která ohrožuje integritu rostlinného organismu. Jakmile hodnoty stresorů vnějšího prostředí nepřekračují limity individuální pro každý rostlinný taxon, není vývoj rostliny významně ovlivněný. V případě jejich překročení nastává stresová odpověď rostliny, která sestává z několika fází⁵¹.

- 1) **Poplachová fáze**

- nastává ihned po začátku působení stresového faktoru
- dochází k narušení buněčných struktur a funkcí

- 2) **Restituční fáze**

- mobilizace kompenzačních mechanismů

- 3) **Rezistenční fáze**

- zvýšení odolnosti rostliny vůči stresovým faktorům

- 4) **Fáze vyčerpání**

- pokles odolnosti po dlouhodobé a intenzivní expozici stresorů⁴⁴

Výsledek a hodnocení působení stresového faktoru závisí zejména na intenzitě, délce expozice, počtu cyklů a kombinaci více stresorů, dále pak na genotypu, stupni vývoje a typu orgánu nebo tkáně rostlinného organismu⁴⁷.

Existuje několik společných mechanismů fyziologické odpovědi rostlin na stres:

- **Tvorba stresových proteinů**

Označujeme tak proteiny nově indukované, nebo syntetizované ve větším množství v důsledku vystavení stresu⁵². Z běžných podmínek jsou v buňce nedetekovatelné⁴⁴. Výrazně se podílí na úpravě buněčného metabolismu.

Stresové proteiny se nazývají a řadí do skupin dle druhu stresu. Při nadměrném suchu hovoříme o DHN (dehydrinech). V pozdní fázi embryogeneze je to skupina LEA (late embryogenesis abundant) proteinů. Při vysoké teplotě HSP (heat shock proteins), při nízké teplotě COR (cold- regulated) proteiny. Při výskytu těžkých kovů se hromadí metalothioneiny a fytochelatiny, patogenní infekce indukuje syntézu PR (patogenesis – related) proteinů⁵².

- **Tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku**

Reakce rostlin na stres vede u rostlin mimo jiné ke zvýšené tvorbě aktivních forem kyslíku. Tyto produkty však nemusí vždy skýtat nebezpečí, ale mohou mít funkci signálů či obrannou při určitém typu stresu, a proto je jistá koncentrace těchto látek v rostlinném organismu žádána. Působení stresových faktorů může způsobit zvýšenou tvorbu těchto aktivních forem dvěma způsoby. Selektivním ovlivněním metabolických reakcí spjatých s redoxními výměnami nebo celkovou destrukcí rostlinného metabolismu, čímž se naruší funkčnost antioxidačního systému obrany.

Aktivní formy kyslíku nejvíce vznikají v chloroplastech. Škodlivé účinky aktivních forem kyslíku se projevují hlavně peroxidací lipidů. Nejvíce podléhají peroxidaci membránové lipidy s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Poškození mohou podléhati i aminokyseliny, proteiny a nukleové kyseliny. Obranu před poškozením aktivní formou kyslíku ve všech částech buňky obstarávají specializované enzymy a antioxidační substráty. Enzym superoxidodismutasa katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku a ten je následně rozkládán katalasou nebo askorbátperoxidasou⁵³.

- **Fytohormony a stres**

Fytohormony jsou využívány rostlinou k šíření signálů na větší vzdálenosti. Fytohormony vykazují účinky na syntézu enzymů stimulační (tvorba stresových proteinů, syntéza hydrolas), ale i inhibiční, což se může projevit zpomalením růstu a zrychleným stárnutím. Kyselina abscisová, ethylen a jasmonáty (kyselina jasmonová, methyljasmonát) jsou fytohormony, jejichž syntéza se po vystavení rostliny stresoru významně zvyšuje. Kyselina abscisová je známá díky zvyšování odolnosti vůči působení sucha a mrazu. Výsledky pozorování o uplatnění fytohormonů při stresových reakcích nejsou však stále dostatečné⁵³.

- **Osmoregulátory**

Rostlina vystavená suchu nebo mrazu reaguje aktivací mechanismu syntézy osmoticky aktivních látek. Např. cukrů – hexózu ze škrobu, aminokyselin – prolinu. Výhoda spočívá v tom, že roztoky obsahující osmoticky aktivní látky mraznou při nižší teplotě než voda. Tzv. osmoprotektanty snižují osmotický potenciál cytoplasmy, a tím se zvyšuje rozdíl vodního potenciálu proti vnějšímu prostředí. Následkem toho může buňka více nasávat vodu z vnějšího prostředí. Schopnost osmotického přizpůsobení udává hodnota osmotického potenciálu buňky. Čím je hodnota osmotického potenciálu při ztrátě turgoru zápornější, tím je mechanismus osmotického přizpůsobení rychlejší a rostlina se dokáže účinněji bránit suchu syntézou osmoticky aktivních látek a jejich hromaděním v cytoplasmě⁵⁴.

3.4 Produkce obsahových látek a její ovlivnění

Rostliny jsou důležitou součástí každodenního života, zdrojem potravy. Rostlinné sloučeniny a jejich výživová hodnota je studována po mnoho desetiletí. Kromě primárních metabolitů, které jsou nezbytné pro správné fungování rostlinného organismu (cukry, lipidy, aminokyseliny), dokážou vyšší rostliny syntetizovat také širokou škálu nízkomolekulárních látek – sekundárních metabolitů. Sekundární metabolity nemají žádnou významnou úlohu při zachování základních životních procesů v rostlinách, které je syntetizují. Mají však důležitý přínos v interakci rostlina – okolní životní prostředí. Produkce těchto látek je velice nízká, udává se kolem 1% sušiny a závisí na fyziologickém a vývojovém stádiu rostliny^{1,2}. Vhodnou, jednoduchou,

ekonomicky a prostorově nenáročnou metodou zvýšení produkce sekundárních metabolitů je elicitace⁵⁵.

3.4.1 Elicitace

Rostliny a *in vitro* kultivované rostlinné buňky vykazují fyziologické a morfologické reakce na elicitory různého původu a povahy. Elicitor je definován jako látka, která v nízkých koncentracích po zavedení do živých buněčných linií způsobí zahájení, nebo zlepšení syntéz specifických sloučenin. Elicitace vyvolá, nebo zvýší syntézu sekundárních metabolitů rostlin za účelem přežití, zlepšení vytrvalosti a konkurenceschopnosti. Elicitace ve správné fázi růstu buněčné kultury, koncentrace elicitoru, vhodná kombinace média a elicitoru patří mezi neopomenutelné aspekty pro posílení produkce sekundárních metabolitů. Elicitace v pozdější exponenciální fázi vede k vyšším výtěžkům biomasy a produkci sekundárních metabolitů. Elicitace v rané fázi růstu kultur zvýší produkci sekundárních metabolitů, ale sníží objem biomasy. Správné zvolení elicatorů závisí i na pochopení signálů zapojených do elicitacího procesu⁵⁶.

3.4.1.1 Elicitory

Dělení dle povahy:¹

➤ Biotické

- přímo uvolněné mikroorganismy nebo z rostlinné buňky (enzymy, fragmenty buněčné stěny)
- vytvořené působením mikroorganismů na buněčnou stěnu rostlin (fragmenty pektinu atd.)
- vytvořené působením rostlinných enzymů mikrobiální buněčné stěny (chitosan, glukany)
- endogenní a konstitutivní sloučeniny vytvořené nebo uvolněné z rostlinné buňky v reakci na různé stimuly

➤ **Abiotické**

- fyzikální nebo chemické povahy působící skrz endogenně vytvářené biotické elicitory
- UV záření
- působení větru
- denaturované bílkoviny (RNase)
- opakované zmrazování a rozmrazování
- nepřírodní složky v médiu
- těžké kovy
- chemikálie
 - s vysokou afinitou k DNA
 - látky se schopností ničit buněčnou membránu
 - fungicidy
 - herbicidy

Dělení dle původu:¹

➤ **Exogenní**

- vznik mimo buňku, včetně bezprostředních reakcí nebo zprostředkované skrz endogenní mediátory
- polysacharidy
 - glukany, chitosan
- peptidy (polykationty)
 - monilicolin, polyaminy, glykoproteiny
- enzymy
 - polygalakturonasa, celulasa
- mastné kyseliny
 - kyselina arachidonová, kyselina eikosapentaenová

➤ **Endogenní**

- vznikají prostřednictvím sekundárních reakcí vyvolaných biotickým nebo abiotickým signálem v buňce
- oligomery alginátů
- hepta - β - glykosidy

3.4.1.2 Faktory ovlivňující elicitaci

- Specifita elicitoru⁵⁷
 - v různých buněčných kulturách může dojít k produkci sekundárních metabolitů v reakci na jeden stejný elicitor
- Koncentrace elicitoru^{1,57}
 - významně ovlivňuje intenzitu odpovědi
 - optimální hladina se stanovuje se experimentálně
 - vysoké dávky elicitoru vedou k buněčné smrti
- Doba trvání expozice elicitoru⁵⁷
 - je charakteristická pro každý rostlinný druh
 - souvisí se zvýšením aktivity metabolických enzymů
- Časový harmonogram přidání elicitoru⁵⁷
 - nejideálnější moment je exponenciální fáze růstu, kdy je enzymatická aktivita maximální
- Přítomnost růstových faktorů⁵⁷
- Složení živného média a kultivační podmínky⁵⁷

3.4.1.3 *Mechanismy elicítace*¹

Existuje několik hypotéz popisujících biochemickou reakci rostlin nebo rostlinných buněk na působení elicitorů, a to např.:

- vazba elicitoru na receptor v plazmatické membráně aktivuje proces elicítace
- pronikání vápenatých iontů Ca^{2+} z extracelulárního prostoru a intracelulárního zásobníku Ca^{2+} do cytoplasmy
- projevem elicítace jsou rychlé změny fosforylace proteinů a aktivace proteinkinasy
- stimulace a aktivace G-proteinu prostřednictvím mitogenem aktivované proteinkinasy
- okyselení cytoplasmy způsobené inaktivací H^+ -ATPasy
- produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), např. H_2O_2

Přesný mechanismus působení elicitorů je předmětem studia. Všechny elicitory nevyvolávají stejný sled reakcí, mají jiný původ, specifitu, působí v různých koncentracích atd, a proto je těžké zjistit, jak opravdu fungují.

Je dobře známo, že vystavování rostlin elicitoru nebo napadení patogenem způsobuje celou řadu obranných reakcí, včetně hromadění mnoha rostlinných sekundárních metabolitů v intaktních rostlinách nebo v explantátových kulturách. I po intenzivním výzkumu vlivu biotických a abiotických elicitorů na produkci sekundárních metabolitů v rostlinách je přesný mechanismus elicítace dosud neobjasněn.

3.5 Křemík

Křemík byl objeven v roce 1824 Jacobem Berzeliem. Jedná se o tmavý, lesklý, velmi tvrdý polokovový prvek. Křemík je po kyslíku druhý nejhojnější prvek přítomný v zemské kůře, jeho procentuální zastoupení se zde pohybuje kolem 30 %. V přírodě však nenajdeme volný křemík, vyskytuje se výhradně ve formě sloučenin. Nejběžněji

se nalézá ve formě křemičitanů a hlinitokřemičitanů. Nejdůležitějším minerálem je křemen, který existuje v různých odrůdách lišící se barvou (ametyst, křišťál, citrín, záhněda, jaspis, opál). Za běžných teplot je značně inertní, odolává většině minerálních kyselin až na kyselinu fluorovodíkovou. Průmyslově je využíván při výrobě slitin železa – ferrosilicium. Čistý křemík nalézá uplatnění při výrobě polovodičových elektrotechnických součástek, jako jsou diody, tranzistory. Některých sloučenin křemíku se využívá pro jejich tvrdost při výrobě brusných materiálů. Křemičitý písek se používá při výrobě skla a porcelánu⁵⁸⁻⁶².

3.5.1 Křemík a člověk

Nebyla stanovena doporučená denní dávka křemíku. Odhadovaný příjem se pravděpodobně pohybuje mezi 20 – 50 mg křemíku za den⁶³. Křemík je hojně přítomen v potravinách rostlinného původu jako obiloviny, kořenová zelenina. Z hlediska významu ho v lidském organismu řadíme mezi stopové prvky. Ovlivňuje fyzikální vlastnosti pojivové tkáně. Významně přispívá kvalitě kožních derivátů – vlasy, vousy, nehty. Preventivní užívání se doporučuje jako ochrana proti neurotoxickým vlastnostem hliníku, který byl označen za možný rizikový faktor Alzheimerovy choroby⁶⁴. Nedostatek křemíku způsobuje zpomalení růstu, zvýšenou lomivost kostí, třepivost vlasů⁶¹. Nadbytečný příjem křemíku se může negativně odrazit u lidí s nedostatečností ledvin, protože sloučeniny křemíku se mohou spolupodílet na tvorbě ledvinových kamenů⁶⁵. Po dlouhodobém vdechování částic prachu oxidu křemičitého může vzniknout choroba plic zvaná silikóza. Projevuje se především u profesionálních pracovníků v rudných dolech, kovárnách a keramickém průmyslu. Onemocnění se často pozvolna rozvíjí několik desítek let. Morfologicky dochází k vazivové přestavbě plicní tkáně. Silikóza se vyznačuje expektorací s pozdějším rozvojem dechové nedostatečnosti⁶⁶.

3.5.2 Křemík v rostlinách

Křemík je v půdě druhým nejrozšířenějším prvkem po kyslíku. Role křemíku na růst a vývoj rostlin však byla dlouho přehlížena a ignorována. Dlouhodobé používání chemických hnojiv na bázi dusíku a fosforu však způsobilo pokles křemíku v půdě. Povědomí o nedostatku křemíku v půdě je v současnosti uznaný limitující faktor pro rostlinnou výrobu⁶⁷.

Křemík je přijímán kořenovým systémem ve formě kyseliny křemičité. Takto je transportován xylémem do prýtu, kde dochází k polymerizaci na amorfní oxid křemičitý a jeho uložení v buliformních buňkách pod kutikulou. Rostliny se velmi liší ve schopnosti kumulovat křemík. Rozpětí sahá od 0,1 % až po 10 % křemíku suché hmotnosti rostliny⁶⁷. Jednoděložné rostliny jsou považovány za typické akumulátory křemíku, na rozdíl od dvouděložných⁶⁸.

Existují pravděpodobně dva mechanismy, kterými křemík zvyšuje rezistenci vůči abiotickým a biotickým faktorům. Mechanická ochrana zahrnuje obtížnější stravitelnost, zvýšenou tvrdost a hrubost tkání, protože křemičité sloučeniny vytváří tvrdé fytolity. Chemická obrana je vyvolávána prostřednictvím zvýšené biosyntézy obranných enzymů. Při vnějším napadení je spuštěna signální kaskáda vedoucí ke vstupu proteinů do jádra, kde reguluje transkripci cílových genů. Tento mechanismus je spuštěn rozpuštěným křemíkem. Křemík ve formě pevného oxidu křemičitého, nebo fytolitu nedokáže ovlivnit rostlinnou biochemii na molekulární úrovni⁶⁹.

Přestože je křemík význačnou složkou rostlin, jeho nezbytnost byla prokázána pouze rostlinám čeledi *Equisetaceae* a *Poaceae*. Dle Epsteina a Blooma lze křemík považovat za „kvazi esenciální“ prvek, protože jeho nedostatek způsobuje různé odchylky růstu, vývoje a reprodukce rostlin. Přídavek křemíku zlepšil vzpřímenost a expozici listů k osvětlení, snížil citlivost k patogenům a kořenovým parazitům⁷⁰.

Studie provedená na Přírodovědecké fakultě UK v Bratislavě sledovala vliv křemíku na aktivitu antioxidantních enzymů kukuřice (*Zea mays L.*), která byla vystavena různým koncentracím kadmia v kultivačním médiu. Kadmium je kumulativní toxický prvek s výrazně negativním vlivem na morfogenetický vývoj rostliny. Výsledkem bylo zjištění, že 5 μM křemíku v roztoku snižovalo specifickou aktivitu antioxidantních enzymů při použití 5 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ v testované kultuře. Při

koncentracích 250 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ nebyla prospěšnost křemíku dostatečně průkazná⁷¹.

Kolektiv autorů z výše uvedeného pracoviště zkoumal dvě různé koncentrace (200 a 400 μM) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ přítomné v Hoeglandově živném roztoku *Zea mays L.* Takto vysoké koncentrace zinku mají neblahý vliv na fyziologický růst rostlin. Ze závěru vyplývá, že křemík výrazně neovlivnil negativní účinky zinku⁷².

Další studie provedená v jihočínském Guangzhou a uveřejněná v roce 2014 na rostlině *Arachis hypogea L.* prokázala pozitivní vliv křemíku na toxicitu způsobenou hlinítovými ionty. Katalasová aktivita v listech a kořenech zesílila v přítomnosti hliníku o 161 % a 149 % v porovnání s 17 % a 19 % v baňkách ošetřených křemíkem. K určení lipidové peroxidace v listech a kořenech se stanovoval malondialdehyd. Jeho obsah se zvýšil o 36 % a 42 % vlivem hliníkového stresu a snížil o 26 % a 28 % s aplikací křemíku⁷³.

Parametry zahrnující výšku rostliny, suchou hmotnost, listovou plochu, absolutní délku kořene byly sledovány na sazenicích *Solanum lycopersicum* Mill., které rostly v zasolené pískové kultuře. Salinita vyvolaná 150 mM NaCl markantně snížila sledované parametry. Přídavek 2 mM křemíku tento stav ovlivnil pozitivně⁷⁴.

Rostliny používají dvě odlišné cesty pro transport živin z kořene do cévního válce. Cesta příjmu se může lišit v závislosti na rostlinném druhu a ekologickém prostředí. Většina živin jako je hořčík, nebo draslík je absorbována symplasticky, zatímco vápník využívá jak apoplastickou, tak symplastickou cestu. Ke zvýšení selektivity bylo objeveno několik bariér, které omezují apoplastický pohyb solutů do kořene. Křemík se ukládá v *exodermis* i *endodermis* a tudíž může být rozvinuta více efektivnější apoplastická cesta. Ukládání křemíku v epidermální buněčné stěně může redukovat apoplastický příjem živin, např. vápníku. Studie zaměřená na tuto problematiku byla publikována v roce 2014. Rostliny *Gossypium hirsutum L.*, *Triticum aestivum L.* a *Brassica napus L.*, měly v přítomnosti 1,5 mmol/L křemíku významně delší kořen než ty samé rostliny neošetřené přídavkem křemíku. Relativní obsah vody byl zvýšen v bavlně a ječmenu, ne však v řepce. Transpirační proud byl snížen ve všech pozorovaných rostlinách s přídavkem křemíku. Dlouhodobé tempo příjmu vápníku klesalo ve všech rostlinách, naopak signifikantně rostl příjem draslíku, hořčíku a železa v elicitovaných kulturách⁷⁵.

Studie provedená na univerzitě v Guangxi testovala vysokou hladinu křemíku v hydroponicky pěstované kultuře rostliny *Oryza sativa* L. za účelem zvýšení odolnosti ke škůdci *Nilaparvata lugens* (BPH). Pokus byl prováděn na dvou liniích rýže (9311 a BPHR96). Přežití a doba usazení *Nilaparvata lugens* na rostlinách ošetřených 240 mg/L SiO₂ klesla z 8 na 4 dny, hmyz byl méně plodný a vylučoval méně medovice ve srovnání s kontrolou⁷⁶.

Také byl zkoumán vliv křemíku ve formě křemičitanu sodného na hydroponicky pěstované rostliny bavlníku *Gossypium hirsutum* L., které byly vystaveny nadměrným koncentracím zinku. Vysoké koncentrace zinku v růstovém médiu podněcovaly buněčné oxidativní poškození, které vycházelo ze zvýšených hodnot peroxidu vodíku, malondialdehydu a elektrolytového úniku. Přítomnost křemíku zmírnila kumulaci zinku v různých rostlinných partiích a zlepšila fyziologické parametry, redukovala produkci markerů oxidativního stresu⁷⁷.

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie

Ajatin plus roztok 10%, Profarma – produkt s.r.o., ČR
Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný monohydrát p.a., Lachema ČR
Dusičnan amonný p.a., Penta, ČR
Dusičnan draselný p.a., Lachema, ČR
Edetan sodno – železnatý p.a., Sigma- Aldrich, USA
Ethanol 96%, Lachema, ČR
Glycin p.a., Penta, ČR
Hydrolyzát kaseinu, Imuna, Slovensko
Chlorid kobaltnatý p.a., Lachema, ČR
Chlorid vápenatý p.a., Penta, ČR
Jodid draselný p.a., Penta, ČR
Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR
Kyselina křemičitá p.a., Sigma-Aldrich, USA
Kyselina nikotinová, Lachema, ČR
Kyselina α -naftyloctová, Sigma-Aldrich, USA
Methanol HPLC grade, Merck, Německo
Methanol p.a., Penta, ČR
Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta, ČR
Myo-inositol, Fluka, Švýcarsko
Pyridoxin puriss, Koch-Light Laboratories, Velká Británie
Sacharosa čistá, Lachema, ČR
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR
Síran manganatý tetrahydrát p.a., Lachema, ČR
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema, ČR
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR
Síran železnatý heptahydrát p.ap., Lachema, ČR
Standardy: hypericin, hyperosid, quercetin p.a
Thiamin, Sigma-Aldrich, USA

4.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Sartorius PRLT A13, Německo

Autokláv PS 20, Chirana, ČR

Autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko

Box s laminárním prouděním, Fatran LF

Čerpadlo Jasco PU-2089 Plus, Japonsko

Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko

Horkovzdušný sterilizátor SVS 9/1, Chirana, ČR

Kolona LiChrospher RP-18 250-4, sorbent Li Chrospher 5um, Merck, Německo

Mikrofiltry (0,20 um), Corning NY 14831, Německo

Pipetovací balonek, Filip, Německo

Předkolona, Merck, Německo

Sušárna HS 61A, Chirana, ČR

Termostat kolony Jetsream 2 Plus, Japonsko

Těsnění na vialky, Labicom s.r.o., ČR

Vialky, Labicom s.r.o., ČR

Vodní lázeň, typ 1042 GFL

Třepačka KS 15 A Control, Edmund Bühler, Německo

4.3 Rostlinný materiál

K pokusu byla použita suspenzní a kalusová kultura třezalky tečkované z pasáže č. 126 – 131.

4.4 Příprava a složení živného média

Pro přípravu kalusové a suspenzní kultury se použila půda dle Murashigeho a Skooga (MS)⁷⁸ s přidáním 1 ml (10 mg/ml) kyseliny naftyloctové (α -NAO) jako růstového regulátoru.

Nejprve jsme do 1000 ml odměrné baňky naměřili pomocí pipety požadovaný objem následujících složek:

- 100 ml makroelementů
- 10 ml železnatého komplexu
- 1 ml mikroelementů
- 1 ml glycinu
- 1 ml vitaminů
- 1 ml kyseliny naftyloctové

Tyto látky byly rozpuštěny a zředěny zhruba v 500 ml destilované vody. Na analytických vahách se dále navážilo a přidalo:

- 30,0 g sacharosy
- 0,1000 g myo- inositolu
- 1,000 g hydrolyzátu kaseinu

Veškeré výše uvedené substance se míchaly do vzniku homogenní směsi. Následovalo doplnění destilované vody po rysku značící objem 1000 ml. Odměrným válcem bylo odměřeno zhruba 30 ml tohoto roztoku a distribuováno do Erlenmayerových baněk, které se následně překryly alobalem a sterilizovaly v autoklávu po dobu 20 minut při 121 °C a 100 kPa.

Konkrétní složení média dle Murashige & Skooga (mg/L)⁷⁸

Makroelementy:

KNO ₃	1900,000
NH ₄ NO ₃	1650,000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,000

Mikroelementy:

MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,500
H ₃ BO ₃	6,200
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

Železnatý komplex:

Na ₂ EDTA	37,340
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,840

Vitaminy:

Pyridoxin	0,500
Kyselina nikotinová	0,500
Thiamin	0,100

Další složky:

Sacharosa	30000,000
Hydrolyzát kaseinu	1000,000
Myo-inositol	100,000
Glycin	2,000

4.5 Příprava kalusových kultur

Pomocí sterilní pinzety byly přenášeny drobné části narostlých kalusů z předchozí kultivace do již vysterilizovaných Erlenmeyerových baněk s MS médiem a opatřených můstky z filtračního papíru. Tento děj probíhal za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním, vysvíceným UV-lampou. Takto připravené kultury se umístily do kultivační místnosti s konstantní teplotou 25 °C a frekvencí střídání světelného režimu (16 hodin světlo, 8 hodin tma). Popsaný proces pasážování kalusových kultur se periodicky opakoval každé 4 týdny.

4.6 Příprava suspenzních kultur

Mechanicky rozmělněné části kalusových kultur byly vloženy do Erlenmeyerových baněk s živným médiem. Baňky opatřené ochrannou hliníkovou folií se umístily na třepačku (120 ot. /min) a nechaly se 3 týdny kultivovat.

4.7 Příprava elicitoru

K vlastnímu pokusu byl vybrán jako abiotický elicitor roztok kyseliny křemičité. Připravily se 3 roztoky tohoto elicitoru o různé koncentraci:

První roztok (c_1) se připravil navážením 100 mg substance kyseliny křemičité, který se rozpustil ve 100 ml odměrné baňce v ethanolu.

Roztok o koncentraci c_2 vznikl odebráním 10 ml roztoku c_1 a doplněním ethanolem po rysku ve 100 ml odměrné baňce.

Odebráním 10 ml roztoku c_2 a přidáním ethanolu do 100 ml odměrné baňky vznikl roztok o koncentraci c_3 .

Koncentrace připravených roztoků:

$$c_1 = 100 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 10,4047 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

$$c_2 = 10 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 10,4047 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$c_3 = 1 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 10,4047 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

4.8 Elicitace *in vitro* kultur

Před vlastním pokusem byly baňky se suspenzními a kalusovými kulturami desinfikovány roztokem Ajatinu a přeneseny do laminárního boxu. Sada vzorků čítající cca 35 baněk byla rozdělena na část podléhající elicitaci a část kontrolní.

Do baněk určených k elicitaci byl přidán 1 ml elicitoru o dané koncentraci. Do kontrolních baněk bylo pipetováno 1 ml ethanolu. Takto ošetřené baňky se uchovávaly v kultivační místnosti a po 6, 12, 24, 48, 72, 168 h od vystavení elicitoru se odebíraly k filtraci. Materiál zachycený filtračním papírem se vysušil při laboratorní teplotě a byl uchován pro další zpracování. Filtrát se jímá do lékovek a nechal se zmrazit.

4.9 Stanovení obsahu

Vzorky kalusových a suspenzních kultur se pečlivě upráškávaly v třecí misce a následně byly zváženy na analytických vahách. Vzorky se přenesly do 50 ml varných baněk spolu s 10 ml methanolu. Následně proběhla extrakce na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 10 minut. Poté se roztok za horka zfiltroval přes kousek vaty. Vata se opět vložila do varné baňky a po přidání 10 ml methanolu se celá extrakce zopakovala. Získané filtráty se přelily do 25 ml odměrné baňky, která se doplnila po rysku methanolem. Výsledný roztok byl zfiltrován přes mikrofiltr (0,22 μ m) a získaný vzorek se převedl do vialek a poté se zanalyzoval metodou HPLC.

Rozmražené vzorky uschovaného živného media se odpařily do sucha na vodní lázni. Získaný odparek se rozpustil v 5 ml methanolu a opět zfiltraval přes mikrofiltr. Produkt se přeplnil do vialek a vyhodnotil metodou HPLC.

4.9.1 HPLC analýza

Ke stanovení obsahu sekundárních metabolitů v kulturách byla zvolena analytická metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). K vyhodnocení byla použita HPLC sestava JASCO (čerpadlo Jasco PU-2089, autosampler AS-2055, termostat Jetstream II plus, kolona MERCK LiChrosper RP-18 250x4 (5μm), detektor MD-2015)

Parametry analýzy hypericinu:

- gradientová eluce, 12 minut
- eluent A: 8% acetonitril, 0,15% kyselina fosforečná
- eluent B: 100% acetonitril
- eluční profil:
 - o 0 – 12 min: 45 % eluentu A + 55 % eluentu B
 - o 12 min: 10 % eluentu A + 90 % eluentu B
- detekce v rozmezí vlnových délek při 200 – 650 nm (obsah stanovovaných metabolitů vypočten z píků při 590 nm)

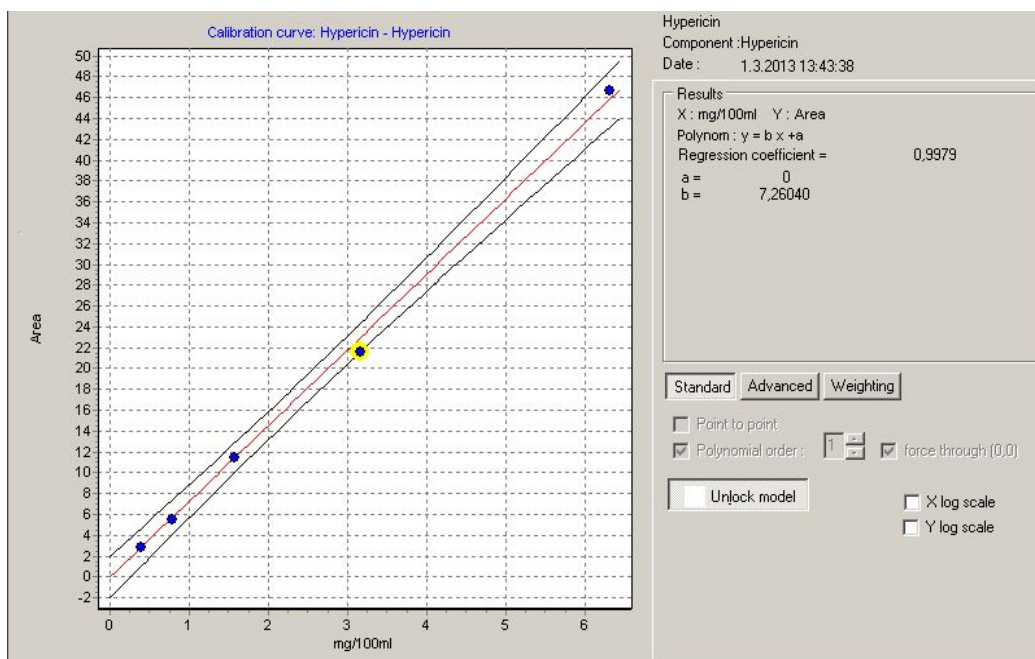
Parametry analýzy hyperosidu a quercetinu

- gradientová eluce, 23 minut
- eluent A: 8% acetonitril, 0,15% kyselina fosforečná
- eluent B: 100% acetonitril
- eluční profil:
 - o 0 – 10 min: 90 % eluentu A + 10 % eluentu B
 - o 10 – 23 min: 80 % eluentu A + 20 % eluentu B
 - o 23 min: 75 % eluentu A + 25 % eluentu B
- rychlost průtoku: 1,5 ml/min
- nástřik: 20 μl
- detekce v rozmezí vlnových délek při 200 – 650 nm (obsah stanovovaných metabolitů vypočten z píků při 254 nm)

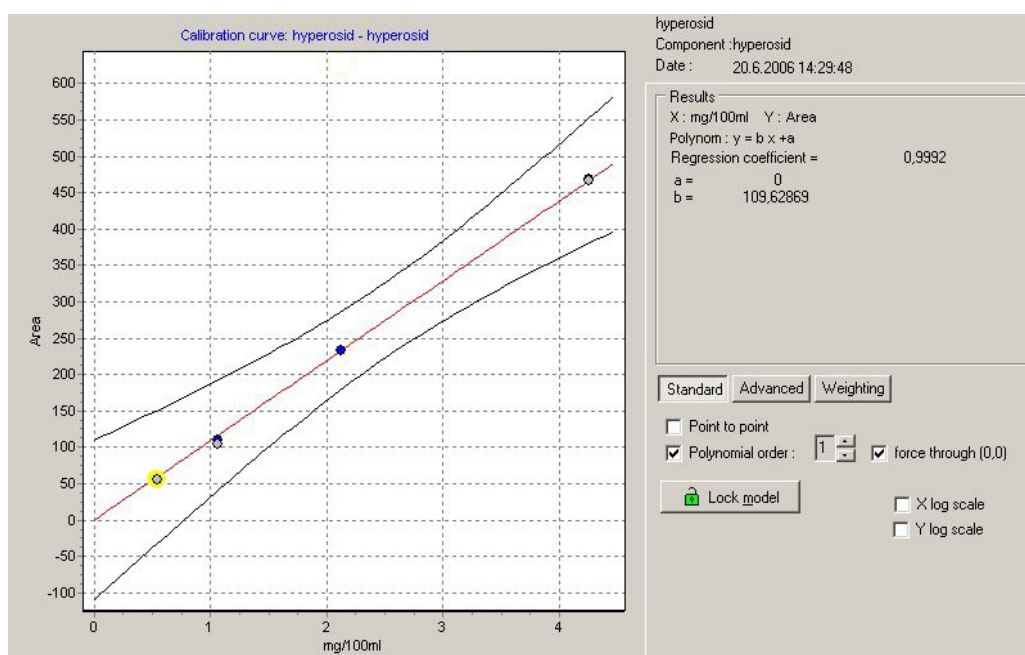
Byly porovnány plochy píků analyzovaných vzorků a standardů a následně byly v programu Jasco software ChromPass vypočteny koncentrace sledovaných sekundárních metabolitů.

4.9.1.1 Kalibrační křivky

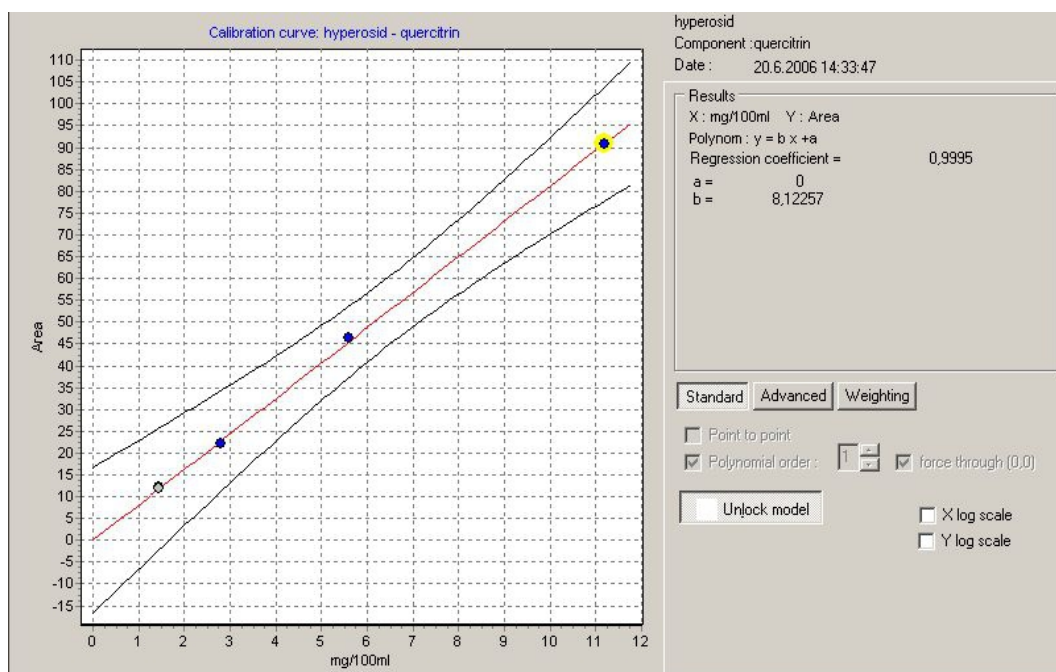
Obrázek č. 1: Kalibrační křivka hypericinu



Obrázek č. 2: Kalibrační křivka hyperosidu



Obrázek č. 3: Kalibrační křivka quercetinu



4.10 Statistické zpracování dat⁷⁹

Směrodatná odchylka vyjadřuje rozdíl naměřených hodnot od průměrné hodnoty.

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

s - směrodatná odchylka

x - hodnota sledované veličiny

\bar{x} - průměrná hodnota sledované veličiny

n - počet členů souboru

Testovací kritérium se využívá ke zhodnocení statistické významnosti měření.

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

t - testovací kritérium

x_1 - aritmetický průměr kontrolního souboru

x_2 - aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 - směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 - směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 - počet členů kontrolního souboru

n_2 - počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu odpovídá t-rozdělení se stupněm volnosti, který se vypočte dle vzorce:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Vypočítaná hodnota testovacího kritéria se porovnává s tabelovanou kritickou hodnotou vztaženou ke stupni volnosti a hladině významnosti. V případě překročení kritické hodnoty se jedná o statisticky významné výsledky.

Pro každý vzorek proběhla analýza vždy 3krát, tzn.:

- počet členů souboru $n_1 = n_2 = 3$
- počet stupňů volnosti $v = 4$

Uvedeným parametrům při zvolené hladině významnosti $p = 0,05$ odpovídá kritická hodnota $t(v)_p = 2,78$. Pro výpočet testovacího kritéria pro odběry po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách byly jako kontrolní hodnoty použity odběry po 6, 24, 72 a 168 hod.

5 Výsledky

5.1 Tabulky

Tab. č. 1: Obsah hypericinu, hyperosidu a quercetinu [mg/g DW] v kalusové kultuře po působení elicitoru v různých koncentracích

A.

Koncentrace elicitoru c_1 (100 mg/100 ml)									
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin
6	0	0	0	0	0	0	0	1,4162	0
6K	0	0,01	0	0	0,01	0	-	-	-
12	0	0	0	0	0	0	0	1,4162	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0,7081	0
24K	0	0,01	0	0	0,02	0	-	-	-
48	0	0	0	0	0	0	0	0,7081	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72K	0	0	0	0	0	0	-	-	-
168	0	0	0	0	0	0	0	1,4162	0
168K	0	0,01	0	0	0,01	0	-	-	-

B.

Koncentrace elicitoru c_2 (10 mg/100 ml)									
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin
6	0	0	0	0	0	0	0	1,4162	0
6K	0	0,01	0	0	0,01	0	-	-	-
12	0	0	0	0	0	0	0	1,4162	0
24	0	0	0	0	0	0	0	1,4162	0
24K	0	0,01	0	0	0,01	0	-	-	-
48	0	0	0	0	0	0	0	1,4162	0
72	0	0,01	0	0	0,02	0	0	0,7081	0
72K	0	0	0	0	0	0	-	-	-
168	0	0,01	0	0	0,03	0	0	0	0
168K	0	0,01	0	0	0,01	0	-	-	-

C.

Koncentrace elicitoru c ₃ (1 mg/100 ml)									
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6K	0	0	0	0	0	0	-	-	-
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0,7081	0
24K	0	0,01	0	0	0,02	0	-	-	-
48	0	0	0	0	0	0	0	0,7081	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0,7081	0
72K	0	0,01	0	0	0,02	0	-	-	-
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168K	0	0	0	0	0	0	-	-	-

Tab. č. 2: Obsah hypericinu, hyperosidu a quercetinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře po působení elicitoru v různých koncentracích

A.

Koncentrace elicitoru c ₁ (100 mg/100 ml)									
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin
6	0,08	0	0	0,01	0	0	2,0004	0,7081	0
6K	0,10	0,01	0	0,01	0,02	0	-	-	-
12	0,21	0	0	0,02	0	0	6,9585*	0,7081	0
24	0,17	0	0	0,02	0	0	5,0607*	0	0
24K	0,09	0	0	0,01	0	0	-	-	-
48	0,06	0,02	0	0,01	0,02	0	3,0006	1,4145	0
72	0,05	0,04	0	0,01	0,01	0	1,8978	5,6580*	0
72K	0,02	0	0	0,02	0	0	-	-	-
168	0	0,01	0	0	0,01	0	4,2435	1,4162	0
168K	0,03	0	0	0,01	0	0	-	-	-

B.

Koncentrace elicitoru c ₂ (10 mg/100 ml)									
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin
6	0,16	0	0	0,02	0	0	6,9585	0	0
6K	0,27	0	0	0,01	0	0	-	-	-
12	0,07	0	0	0,02	0	0	12,6517	0	0
24	0	0	0	0	0	0	12,7306	0	0
24K	0,09	0	0	0,01	0	0	-	-	-
48	0,05	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	2,5303	1,4145	1,4162
72	0,01	0,01	0	0,02	0,02	0	7,0015	0,7081	0
72K	0,15	0	0	0,02	0	0	-	-	-
168	0,14	0	0	0,01	0	0	13,0027	2,8290	0
168K	0,01	0,02	0	0,01	0,01	0	-	-	-

C.

Koncentrace elicitoru c ₃ (1 mg/100 ml)									
Odběr [hod]	Obsah [mg/g DW]			Směrodatná odchylka			Testovací kritérium		
	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin	Hypericin	Hyperosid	Quercetin
6	0,03	0	0	0,01	0	0	23,0048	1,4162	0
6K	0,26	0,01	0	0,01	0,01	0	-	-	-
12	0,17	0	0	0,01	0	0	9,0019	1,4162	0
24	0,08	0	0	0,02	0	0	2,5005	0	0
24K	0,13	0	0	0,02	0	0	-	-	-
48	0,06	0	0	0,02	0	0	3,5007	0	0
72	0,06	0,01	0	0,01	0,02	0	5,0010	0	0
72K	0,11	0,01	0	0,01	0,01	0	-	-	-
168	0,13	0	0	0,02	0	0	4,5009	0	0
168K	0,22	0	0	0,02	0	0	-	-	-

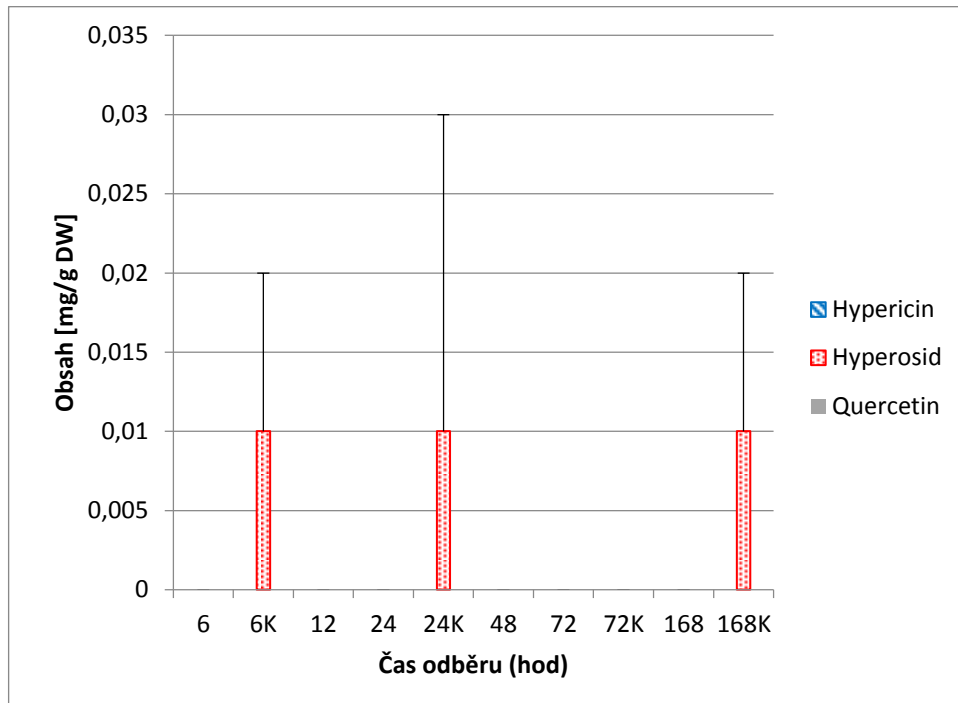
K = kontrolní vzorek (bez vlivu elicitoru)

Statisticky významné výsledky jsou v tabulkách zvýrazněny tučně a hvězdičkou.

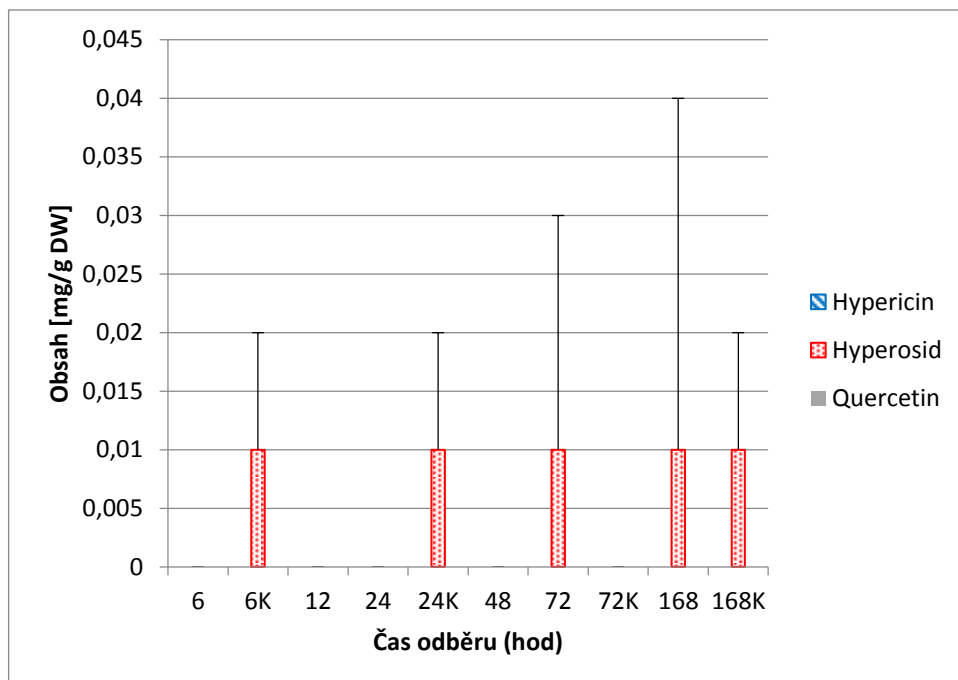
Nedocházelo k uvolňování sledovaných sekundárních metabolitů do živného média, proto nejsou výsledky zpracovány v tabulkách.

5.2 Grafy

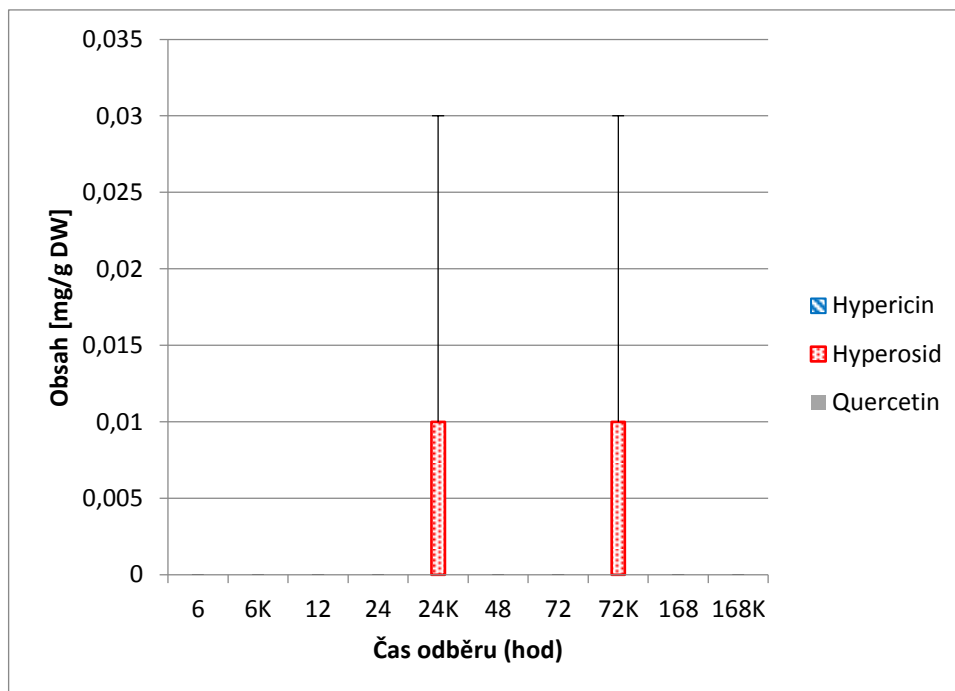
Graf č. 1: Obsah hypericinu, hyperosidu a quercetinu [mg/g DW] v kalusové kultuře po elicitaci kyselinou křemičitou v koncentraci c_1 ($10,4047 \cdot 10^{-3}$ mol/l)



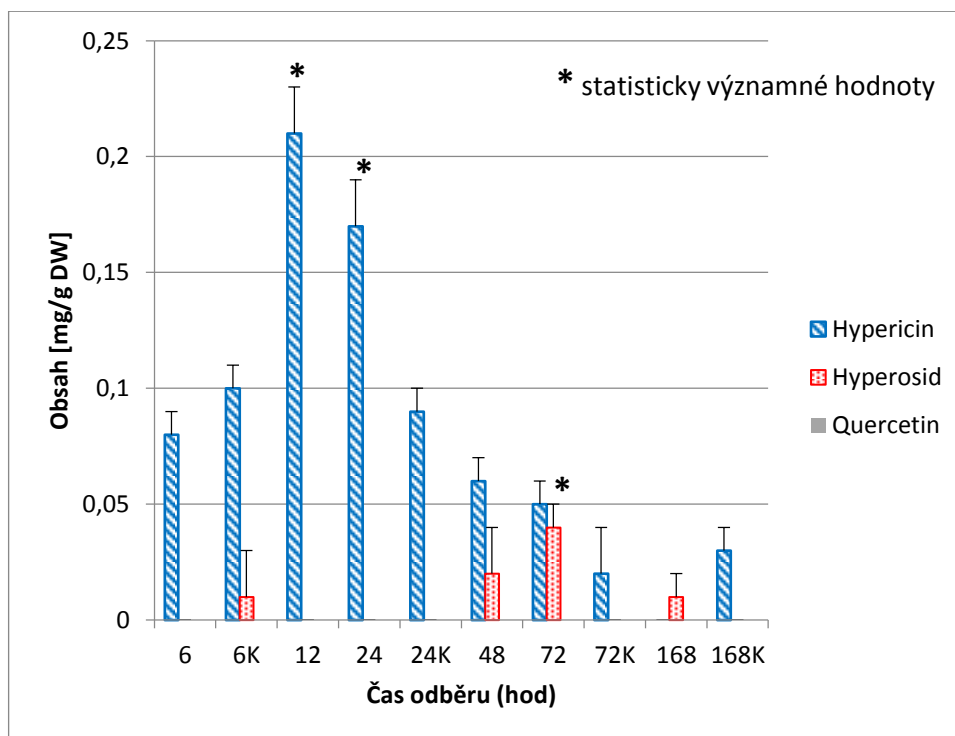
Graf č. 2: Obsah hypericinu, hyperosidu a quercetinu [mg/g DW] v kalusové kultuře po elicitaci kyselinou křemičitou v koncentraci c_2 ($10,4047 \cdot 10^{-4}$ mol/l)



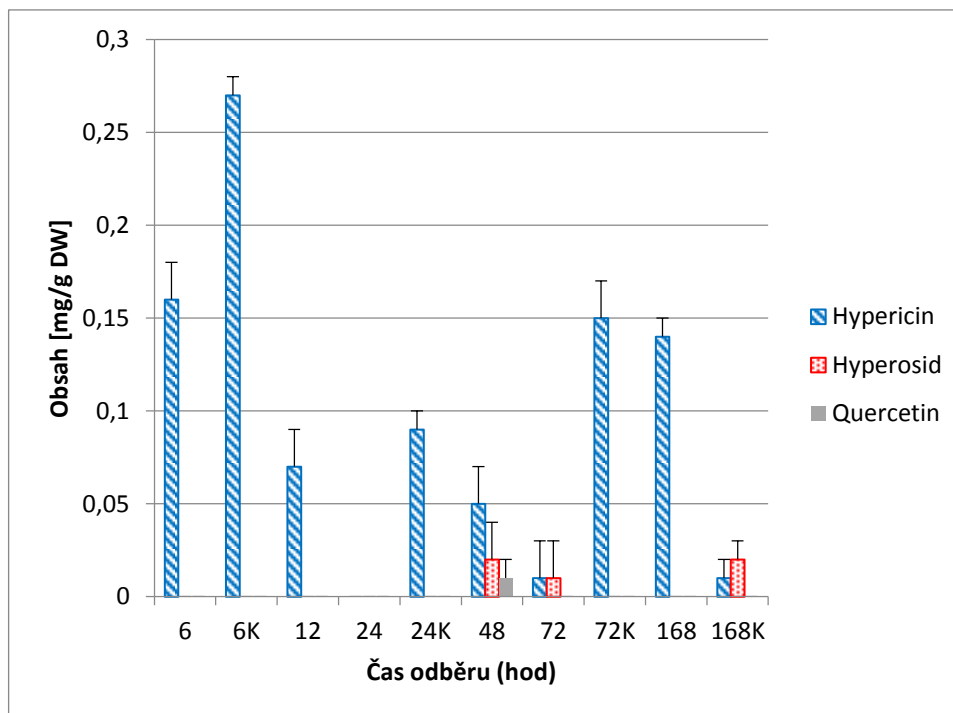
Graf č. 3: Obsah hypericinu, hyperosidu a quercetinu [mg/g DW] v kalusové kultuře po elicitaci kyselinou křemičitou v koncentraci c_3 ($10,4047 \cdot 10^{-5}$ mol/l)



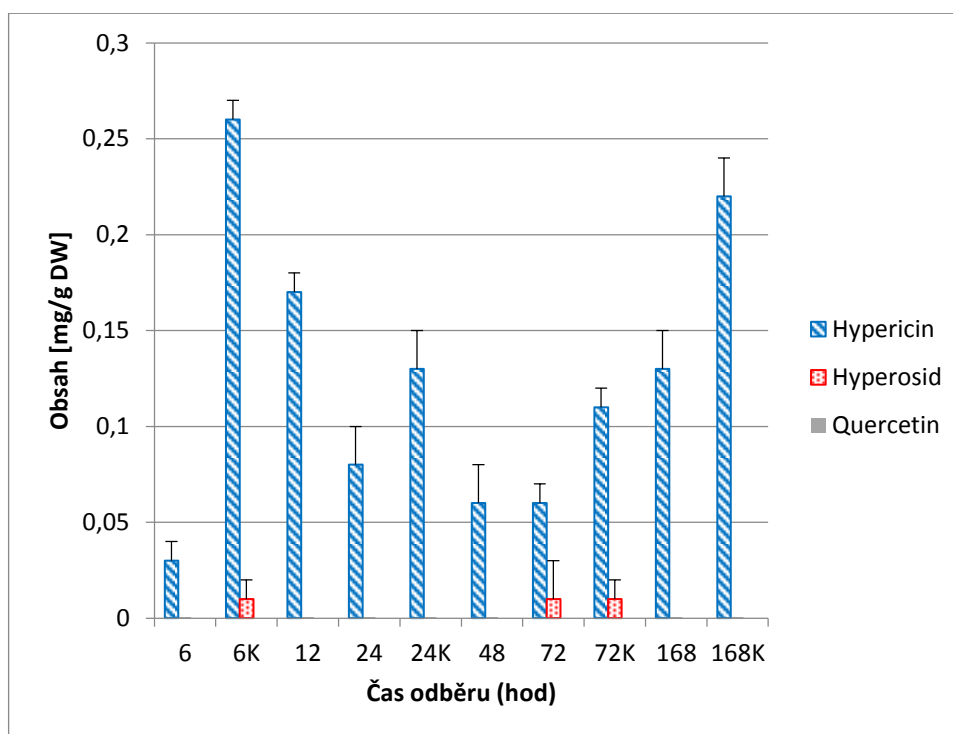
Graf č. 4: Obsah hypericinu, hyperosidu a quercetinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře po elicitaci kyselinou křemičitou v koncentraci c_1 ($10,4047 \cdot 10^{-3}$ mol/l)



Graf č. 5: Obsah hypericinu, hyperosidu a quercetinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře po elicitaci kyselinou křemičitou v koncentraci c_2 ($10,4047 \cdot 10^{-4}$ mol/l)



Graf č. 6: Obsah hypericinu, hyperosidu a quercetinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře po elicitaci kyselinou křemičitou v koncentraci c_3 ($10,4047 \cdot 10^{-5}$ mol/l)



Nebylo pozorováno žádné uvolňování sekundárních metabolitů do živného média, proto nejsou výsledky zpracovány graficky.

6 Diskuze

Rostliny kromě životně nezbytných primárních metabolitů produkují také metabolity sekundární, které nacházejí uplatnění v širokém spektru oborů lidské činnosti. Produkce těchto látek z planě rostoucích rostlin není vysoká a bývá značně ovlivněna mnoha parametry (škůdci, složení půdy, klimatické podmínky apod.) V laboratorních podmínkách existuje možnost zvýšit produkci sekundárních metabolitů pomocí metody elicitace. Sekundární metabolity se často hromadí jako součást obranné odpovědi na působení stresoru. Produkci sekundárních metabolitů lze zvýšit nalezením vhodného elicitoru o správné koncentraci a optimální době působení⁸⁰.

V této experimentální diplomové práci jsem se zaměřil na sledování produkce vybraných sekundárních metabolitů v kalusových a suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* L. v závislosti na koncentraci zvoleného abiotického elicitoru kyseliny křemičité.

Testovaný rostlinný materiál byl získáván z kalusových a suspenzních kultur v pasáži 126 - 131. Elicitor byl přidáván ve 3 koncentracích: $c_1 = 10,4047 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $c_2 = 10,4047 \cdot 10^{-4}$ mol/l a $c_3 = 10,4047 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Kultivace kalusové a suspenzní kultury probíhala na živném médiu dle Murashige a Skooga, které obsahovalo růstový regulátor kyselinu α -naftyloctovou v koncentraci 10 mg/ml. Kultivační místnost s pravidelným střídáním fotoperiody (16 hodin světlo, 8 hodin tma) byla temperována na 25°C .

Vzorky byly odebírány v pravidelných intervalech 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin po expozici elicitoru. Paralelně s elicitovanými vzorky byly odebrány i kontrolní vzorky po 6, 24, 72 a 168 hodinách. Zároveň bylo odebíráno živné médium kalusových a suspenzních kultur pro následnou analýzu k ověření, zda dochází k vylučování sledovaných sekundárních látek do živného média.

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl stanoven obsah sledovaných sekundárních metabolitů hypericinu, hyperosidu a quercetinu v *in vitro* kulturách rostliny *Hypericum perforatum* L.

Kalusová kultura

Koncentrace elicitoru c_1 neovlivnila produkci hypericinu, hyperosidu ani quercetinu v žádném z elicítovaných vzorků. Nepatrné množství hyperosidu bylo detekováno pouze v kontrolních vzorcích po 6, 24 a 168 hodinách. Obsah hyperosidu v těchto kontrolních vzorcích dosahoval hodnot 0,01 mg/g DW (viz. tabulka 1A, graf 1).

Produkce sekundárních metabolitů nebyla také ovlivněna elicitorem o koncentraci c_2 . Přítomnost hypericinu a quercetinu nebyla zaznamenána ani v detekovatelném množství. Obsah hyperosidu byl zaznamenán v kontrolních vzorcích po 6, 24 a 168 hodinách a též ve vzorcích odebraných 72 a 168 hodin po elicítaci. Ve všech zmíněných případech byl obsah hyperosidu 0,01 mg/g DW (tabulka 1B, graf 2).

Ani nejnižší koncentrace elicitoru neovlivnila produkci sledovaných sekundárních metabolitů v kalusové kultuře. Analýza HPLC prokázala přítomnost hyperosidu v kontrolních vzorcích po 24 a 72 hodinách. V obou případech dosahoval jeho obsah shodně hodnot 0,01 mg/g DW. (tabulka 1C, graf 3).

Po zhodnocení uvedených výsledků docházím k závěru, že kyselina křemičitá použitá ve všech 3 koncentracích, není vhodným elicitorem pro produkci sekundárních metabolitů v kalusových kulturách *Hypericum perforatum* L.

Suspenzní kultura

Koncentrace elicitoru c_1 v suspenzní kultuře ovlivnila produkci hypericinu i hyperosidu. Statisticky významný nárůst obsahu hypericinu byl zaznamenán ve 2 případech. Nejvyšší obsah hypericinu byl zaznamenán po 12 hodinách elicítace při koncentraci c_1 a činil 0,21 mg/g DW, tato hodnota je zároveň prokazatelně nejvyšším obsahem hypericinu v elicítovaných vzorcích v porovnání s ostatními testovanými koncentracemi elicitoru v suspenzních kulturách. Další významný obsah hypericinu, a to 0,17 mg/g DW, byl zjištěn po 24 hodinách elicítace. Při dalších odběrech byla pozorována klesající tendence produkce hypericinu. Poslední odběr, který proběhl po 168 hodinách, již nevykazoval přítomnost hypericinu v elicítované kultuře. Statisticky významný obsah hyperosidu byl zaznamenán po 72 hodinách od elicítace

(0,04 mg/g DW). Následně obsah hyperosidu poklesl. Quercetin nebyl zjištěn v elicitovaných, ani v kontrolních vzorcích (tabulka 2A, graf 4).

V porovnání s kontrolními vzorky (bez elicitace) nebyl prokázán vliv elicitoru o koncentraci c_2 na produkci sledovaných sekundárních metabolitů. Za zmínku stojí nevýznamná hodnota 0,01 mg/g DW quercetinu, která byla naměřena 48 hodin po elicitaci. Jedná se o jediný detekovatelný obsah quercetinu v suspenzních kulturách (tabulka 2B, graf 5).

Ve vzorcích vystavených elicitoru o koncentraci c_3 nebyl prokázán nárůst produkce sekundárních metabolitů. Hypericin byl detekován ve všech elicitovaných i kontrolních vzorcích, avšak významné hodnoty obsahu hypericinu vykazovaly pouze kontrolní vzorky odebrané po 6,24, 72 a 168 hodinách. Produkce hyperosidu a quercetinu nebyla pozorována (tabulka 2C, graf 6).

Pro elitaci suspenzní kultury se jeví jako nejvýhodnější použití elicitoru kyseliny křemičité o koncentraci $c_1 = 10,4047 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 12 hodinách od elitace vzrostl obsah hypericinu o 210% (0,21 mg/g DW) oproti kontrolnímu vzorku. Při této koncentraci byl také prokázán nejvyšší nárůst obsahu hyperosidu. Po 72 hodinách od začátku elitace činila hodnota obsahu 0,04 mg/g DW oproti nulové detekci v kontrolním vzorku (tabulka 2A, graf 4).

Média kalusových a suspenzních kultur

Při analýzách živného média nebylo prokázáno uvolňování hypericinu, hyperosidu a quercetinu.

Obecně vyšší hodnoty obsahu sledovaných sekundárních metabolitů nalézáme v suspenzních kulturách. Tuto skutečnost lze vysvětlit větším povrchem rozdrobněných buněk v suspenzi a z toho plynoucí lepší interakci buňka – živné médium. Lze tedy usoudit, že pro produkci sekundárních metabolitů bude vhodnější použití suspenzní kultury. Statisticky nejvýznamnější hodnoty nárůstu obsahu hypericinu a hyperosidu byly prokázány při použití kyseliny křemičité jako elicitoru o koncentraci $c_1 = 10,4047 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ v suspenzní kultuře a době elicitace 12 a 24 hodin v případě hypericinu a 72 hodin v případě hyperosidu.

Sloučeniny křemíku jako elicitor byly zkoumány na semenech okurky inokulovaných padlím (*Podospheera fuliginea*). Výsledkem studie bylo zjištění, že křemík zvýšil produkci flavonoidu rhamnetinu jako obrannou odpověď na působení patogenu⁸¹.

I u ostatních *in vitro* kultur léčivých rostlin studovaných na katedře farmakognosie byla zjištěna vyšší produkce sekundárních metabolitů v suspenzních kulturách než v kalusových kulturách po abiotické elicítaci roztokem oxidu seleničitého a chloridu ceritého^{82,83}.

7 Závěr

Výsledkem sledování působení roztoku kyseliny křemičité v třech různých koncentracích na produkci sekundárních metabolitů v explantátových kulturách třezalky tečkované (*Hypericum perforatum* L.) je zjištění:

- V hodnocených vzorcích byla zjištěna přítomnost naftodiantronu hypericinu a flavonoidů hyperosidu a quercetinu
- Vyšší produkce hyperosidu a hypericinu vlivem elicitoru byla pozorována v suspenzní kultuře
- Nejvyšší obsah hypericinu v elicitovaném vzorku (0,21 mg/g DW) byl zaznamenán v suspenzní kultuře po 12 hodinách působení elicitoru o koncentraci $c_1 = 10,4047 \cdot 10^{-3}$ mol/l
- Maximální produkce hyperosidu činila 0,04 mg/g DW a byla způsobena elicitorem o koncentraci $c_1 = 10,4047 \cdot 10^{-3}$ mol/l po 72 hodinách působení v suspenzní kultuře
- Do živných médií kalusových a suspenzních kultur nedošlo k uvolňování sekundárních metabolitů hypericinu, hyperosidu a quercetinu

Z výsledků je patrné, že kyselina křemičitá jako elicitor může za určitých podmínek zvýšit produkci sekundárních metabolitů v suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* L.

8 Literatura

1. NAMDEO, A. G., et al. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 2007, 1(1), 69-79.
2. RAO, S. R., RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 2002, 20(2), 101-153.
3. <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/trezalka-teckovana-kviti-svateho-jana-271471> [Online] [citováno 25. 10. 2015]
4. <http://www.altmedrev.com/publications/3/1/18.pdf> [Online] [citováno 25. 10. 2015]
5. <http://abc.herbalgram.org/site/DocServer/SJW.pdf?docID=168> [Online] [citováno 25. 10. 2015]
6. GUPTA, R. K., MÖLLER, H.-J. St. John's Wort. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 2003, 253(3), 140-148.
7. VACEK, J., KLEJDUS, B., KUBAN, V. Hypericin and hyperforin: bioactive components of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). Their isolation, analysis and study of physiological effect. *Ceska a Slovenska farmacie*, 2007, 56(2), 62-66.
8. <http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=958> [Online] [citováno 23. 10. 2015]
9. TŘÍŠKA, J., a kol. Evropská flóra, Artia, Praha, 1979, 112-113. ISBN 37-002-79.
10. PATOČKA, J. Standardizovaný extrakt třezalky tečkované: nové rostlinné antidepresivum. *Vojenské zdravotnické listy*, 2003; 72(3), 114–118.

11. JAHODÁŘ, L. Farmakobotanika, Praha, Karolinum, 2006, 65-66. ISBN 80-246-1225-9.
12. KORBELÁŘ, J., ENDRIS, Z. Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha, 1981, 434. ISBN 735 21-08/31.
13. KOLEKTIV AUTORŮ. Český lékopis 2009, Grada publishing, Praha, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
14. <https://web.archive.org/web/20041018165136/http://www.thorne.com/pdf/journal/3-1/hypericum.pdf> [Online] [citováno 1. 11. 2015]
15. GREESON, J. M., SANFORD, B., MONTI, D. A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, 2001, 153(4), 402-414.
16. MEDINA, M. A., et al. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound?. *Life sciences*, 2006, 79(2), 105-111.
17. BEERHUES, L. Hyperforin. *Phytochemistry*, 2006, 67(20), 2201-2207.
18. NAHRSTEDT, A., BUTTERWECK, V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 1997, 30, 129-134.
19. ZANOLI, P., et al. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS drug reviews*, 2004, 10, 203-218.
20. DI CARLO, G., et al. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2001, 22(6), 292-297.

21. KLEMOW, KM., BARTLOW, A., CRAWFORD, J., et al. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), In: Benzie, IFF., Wachtel-Galor, S., editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011, 211-237. ISBN 978-1-4398-0819-1.
22. VOLLMER, J. J., ROSENSON, J. Chemistry of St. John's Wort: Hypericin and hyperforin. *Journal of chemical education*, 2004, 81(10), 1450-1456.
23. KARIOTI, A., BILIA, A. R. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 2010, 11(2), 562-594.
24. BUTTERWECK, V. St. John's Wort: Quality Issues and Active Compounds, *Botanical Medicine*, 2009, 69-91.
25. SILBERNAGL, S., LANG, F. Atlas patofyziologie člověka. GradaPublishing, Praha, 2001, 114. ISBN 80-7169-968-3.
26. WÖLFLE, U., SEELINGER, G., SCHEMPP, Ch. M. Topical application of St. John's wort. *Planta Medica*, 2014, 80, 109-120.
27. BARNES, J., ANDERSON, L. A., PHILLIPSON, J. D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2001, 53(5), 583-600.
28. JAT, LALA RAM. Hyperforin: A potent anti-depressant natural drug. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2013, 5(3), 9-14.
29. OGA, E. F., et al. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions: Insight into Mechanisms and Consequences. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 2015, 41(2), 1-16.

30. HENDERSON, L., et al. St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes. *British journal of clinical pharmacology*, 2002, 54(4), 349-356.
31. BORRELLI, F., IZZO, A. A. Herb–drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *American association of pharmaceutical scientists*, 2009, 11(4), 710-727.
32. MADABUSHI, R., et al. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *European journal of clinical pharmacology*, 2006, 62(3), 225-233.
33. KOUSALOVÁ, L., BARANOVÁ, J., ANZENBACHER, P. Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2003, 17, 151-157.
34. STEVINSON, C., ERNST, E. *Hypericum* for depression: an update of the clinical evidence. *European Neuropsychopharmacology*, 1999, 9(6), 501-505.
35. <http://patient.info/doctor/st-johns-wort> [Online] [citováno 23. 11. 2015]
36. DITRICHOVÁ, D. Fotosenzitivní potenciál léčiv pro zevní i celkové použití. *Medicína Pro Praxi*, 2008, 5(10), 385-387.
37. MARTIN, J., MARTINOVÁ, D. Léčivé rostliny s hypnotickým a sedativním účinkem. *Praktické lékařství*, 2014, 10(6), 226-228.
38. http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130c14/navody/11_invi tro.pdf [Online] [citováno 5. 12. 2015]
39. http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/zelen/U3V_fr/prezentace/2013/rostlinne_exlan taty.pdf [Online] [citováno 5. 12. 2015]
40. LOYOLA-VARGAS, V. M., et al. Plant tissue culture. *Molecular Biomechanics Handbook*, 2008, 875-904.

41. <http://www.shahroodut.ac.ir/fa/download.php?id=1111115559> [Online] [citováno 8. 12. 2015]
42. <http://www.darwiniana.cz/chramst/www.darwiniana.cz/chramst/viewa130.html?cislocclanku=2005021101> [Online] [citováno 08. 12. 2015]
43. SAAD, A. IM, ELSHAHED, Ahmed M. *Plant tissue culture media*. INTECH Open Access Publisher, 2012.
44. PROCHÁZKA, S., et al. *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha, 1998, 243-253. ISBN 80-200-0586-2.
45. http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130c74/navody/10_fyt_ohormony.pdf [Online] [citováno 14. 12. 2015]
46. www.sci.muni.cz/explantaty/tisk/hormony.doc [Online] [citováno 15. 12. 2015]
47. HÁJEK, T. *Rostlina a abiotický stres – výukový materiál*, Jihočeská univerzita, 2015. kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KEBR562/KEBR562_10-2015.ppt [Online] [citováno 16. 12. 2015]
48. http://aix-slx.upol.cz/~fellner/doc/RVR_10a-e.pdf [Online] [citováno 16. 12. 2015]
49. KLEMŠ, M. *Fyziologie stresu – výukový materiál*, Mendelova univerzita v Brně, 2012. <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:gMNMQjiZLbsJ:www.primat.cz/moje-materialy/detail/165047%3FseoId%3Dmendelu-zf%26do%3Ddownload+%&cd=2&hl=cs&ct=clnk&gl=cz> [Online] [citováno 17. 12. 2015]
50. http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/u3v/opat_stres1.pdf [Online] [citováno 22. 12. 2015]

51. https://katedry.czu.cz/storage/2791_Sbornik_stresy_2013.pdf [Online] [citováno 22. 12. 2015]
52. <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-87011-91-1.pdf> [Online] [citováno 26. 12. 2015]
53. http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/part_04.pdf [Online] [citováno 26. 12. 2015]
54. http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KEBR220/KEBR220_U02-Tlakova_bomba-2014.pdf [Online] [citováno 26. 12. 2015]
55. TŮMOVÁ, L., TŮMA, J. Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidávkem elicitoru paraquat. *Chemické Listy*, 2009, 103, 503-510.
56. CHANDRA, S., CHANDRA, R. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Reviews*, 2011, 10(3), 371-395.
57. VASCONSUELO, A., BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 2007, 172(5), 861-875.
58. <http://www.tabulka.cz/prvky/ukaz.asp?id=14> [Online] [citováno 10. 1. 2016]
59. PERTLOVÁ, J. Křemík a jeho sloučeniny – výukový materiál. <http://knostr.cz/kremik-a-jeho-slouceniny.html> [Online] [citováno 10. 1. 2016]
60. JURKÍČ, L. M., et al. Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: new perspectives for therapy. *Nutrition & metabolism*, 2013, 10(1), 1.
61. <http://www.prvky.com/14.html> [Online] [citováno 20. 1. 2016]

62. <http://www.chemickeprvky.cz/prvek/si/> [Online] [citováno 20. 1. 2016]
63. <http://www.bezpecnostpotravin.cz/vyjadreni-efsa-k-hornimu-tolerovatelnemu-prijmu-kremiku.aspx> [Online] [citováno 20. 1. 2016]
64. <http://www.celostnimedicina.cz/kremik.htm> [Online] [citováno 20. 1. 2016]
65. <http://www.lekarweb.cz/vitaminy-a-mineraly/kremik--jeho-ucinky-vyznam-a-rizika-pro-lidsky-organismus> [Online] [citováno 20. 1. 2016]
66. <http://www.anamneza.cz/nemoc/Pneumokoniozy-268> [Online] [citováno 20. 1. 2016]
67. MA, J. F., YAMAJI, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in plant science*, 2006, 11(8), 392-397.
68. DA SILVA LOBATO, A. K., et al. Silicon: a benefic element to improve tolerance in plants exposed to water deficiency. *INTECH Open Access Publisher*, 2013, 95-113.
69. EPSTEIN, E. Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology*, 2009, 155(2), 155-160.
70. PILON-SMITS, E., et al. Physiological functions of beneficial elements. *Current opinion in plant biology*, 2009, 12(3), 267-274.
71. VACULÍK, M., et al. Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 67(1), 52-58.
72. BOKOR, B., VACULÍK, M., PAVLOVIČ, A., LUX, A. Zmierňuje kremík dosledky zvýšenej koncentrácie zinku pri kukurici?, sborník Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, 2011, 186-189. ISBN 978-80-7427-068-0.

73. SHEN, X., et al. Silicon effects on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of peanut under aluminum stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(11), 3063-3069.
74. LI, H., et al. Beneficial effects of silicon in alleviating salinity stress of tomato seedlings grown under sand culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, 37(4), 1-9.
75. MEHRABANJOUBANI, P., et al. Silicon affects transcellular and apoplastic uptake of some nutrients in plants. *Pedosphere*, 2015, 25(2), 192-201.
76. HE, W., et al. High levels of silicon provided as a nutrient in hydroponic culture enhances rice plant resistance to brown planthopper. *Crop Protection*, 2015, 67, 20-25.
77. ANWAAR, S. A., et al. Silicon (Si) alleviates cotton (*Gossypium hirsutum* L.) from zinc (Zn) toxicity stress by limiting Zn uptake and oxidative damage. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(5), 3441-3450.
78. MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962, 15(3), 473-497.
79. KLEMERA, P., KLEMEROVÁ, V. Základy aplikované statistiky pro studující farmacie. Karolinum, 1993, 22-27. ISBN 80-7066-507-6.
80. SIATKA, T., et al. Vliv chloridu rtuťnatého na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Chemické Listy*, 2011, 105, 367-370.
81. FAWE, A., et al. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology*, 1998, 88(5), 396-401.

82. SOJKOVÁ, K., Možnosti ovlivnění produkce sekundárních látek v in vitro kulturách léčivých rostlin. Rigorózní práce, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2014.
83. MAJEROVÁ, V., *Hypericum perforatum* in vitro – abiotická elicitace. Rigorózní práce, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015.

9 Abstrakt, Abstract

9.1 Abstrakt

Předmětem této práce je hodnocení produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách *Hypericum perforatum* L. po ošetření elicitorem. Cílem bylo zjistit, zda kyselina křemičitá jako abiotický elicitor zvyšuje produkci flavonoidů a hypericinu v *in vitro* kulturách *Hypericum perforatum* L. Pokus byl proveden na kalusových a suspenzních kulturách *Hypericum perforatum* L. za použití živného média dle Murashige-Skoog s přidávkem $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ naftyloctové kyseliny jako růstového regulátoru. Elicitor byl přidáván ve formě roztoku a o třech různých koncentracích ($C_1 = 10.4047 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $C_2 = 10.4047 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $C_3 = 10.4047 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) a nechal se působit 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Obsah flavonoidů a hypericinu byl stanoven HPLC analýzou. Uvolňování sekundárních metabolitů do živného média bylo také předmětem studia.

Zvýšení produkce flavonoidů a hypericinu v kalusových kulturách po elicitaci nebylo pozorováno v žádné koncentraci. Maximální obsah flavonoidů v suspenzní kultuře byl detekován po 72 hodinách elicitace u koncentrace elicitoru c_1 , kde byl pozorován hyperosid. Nejvyšší produkce hypericinu v suspenzní kultuře byla detekována po 12 hodinách od začátku elicitace v koncentraci c_1 . Významné zvýšení hypericinu v suspenzní kultuře bylo i po 24 hodinách působení elicitoru o koncentraci c_1 . Uvolňování flavonoidů a hypericinu do živného média nebylo zjištěno. Elicitor kyselina křemičitá je schopna zvýšit produkci flavonoidů a hypericinu v *in vitro* kulturách *Hypericum perforatum* L.

Tento projekt vznikl v rámci projektu specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260264.

9.2 Abstract

The subject of this study is the evaluation of secondary metabolites production in *Hypericum perforatum* L. cultures *in vitro* after elicitor treatment. The aim was to find if orthosilicic acid as abiotic elicitor increases the flavonoid and hypericin production in *Hypericum perforatum* L. cultures *in vitro*. Experiment was carried out in callus and suspension cultures of *H. perforatum* using Murashige - Skoog nutrient medium⁷⁸ supplemented with 10 mg. ml⁻¹ α -naphthylacetic acid as growth regulator. The elicitor was added in the form of solution in 3 different concentrations ($C_1 = 10.4047 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹, $C_2 = 10.4047 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹, $C_3 = 10.4047 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹), it was affecting 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours. The content of flavonoids and hypericin was determined by HPLC. Secondary metabolites release into nutrient medium was also a part of this study.

The increasing flavonoid and hypericin production in callus cultures after elicitor application at any concentrations was not observed. The maximum flavonoid content (0.04 mg g⁻¹ DW) in suspension culture was detected after 72 h of elicitor treatment in concentration of C_1 where the maximum hyperoside production was observed. The maximum hypericin production (0.21 mg g⁻¹ DW) in suspension culture was detected after 12 h of elicitor application in concentration of C_1 ($10.4047 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹). The second significant increase in hypericin production (0.17 mg g⁻¹ DW) in suspension culture after 24 h of elicitor treatment in the same concentration was reached. Flavonoid and hypericin release into nutrient medium was not detected. The elicitor orthosilicic acid is able to increase the flavonoids and hypericin production in *Hypericum perforatum* cultures *in vitro*.

The study was supported by SVV 260294.