

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognozie

Magdalena Špinlerová
Kultury léčivých rostlin in vitro (II)
(diplomová práce)

Zadáno dne: 15. 11. 2005

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

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

Odevzdáno dne: 15. 5. 2007

Počet stran: 52

Oponent diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, PhD.

Poděkování za odborné vedení a pomoc při práci
Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. a všem, kteří byli jakkoli
nápomocni při dokončení této práce.

Obsah:

1	ÚVOD.....	5
2	CÍL PRÁCE.....	7
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1	EXPLANTÁTOVÉ KULTURY.....	8
3.1.1	Charakteristika explantátových kultur.....	8
3.1.2	Kategorie rostlinných explantátů.....	9
3.1.3	Odvození a kultivace explantátové kultury.....	9
3.1.4	Využití, výhody a nevýhody explantátových kultur.....	11
3.2	ELICITACE.....	13
3.2.1	Charakteristika elicitace, elicitory.....	13
3.2.2	Mechanismus působení elicitorů.....	14
3.3	OXIDAČNÍ STRES.....	16
3.3.1	Fyziologie stresu a stresové faktory.....	16
3.3.1.1	<i>Stresové proteiny.....</i>	18
3.3.1.2	<i>Stresové fytohormony.....</i>	18
3.3.1.3	<i>Osmoregulační sloučeniny.....</i>	20
3.3.2	Aktivní formy kyslíku.....	20
3.3.2.1	<i>Protistresová úloha aktivních forem kyslíku.....</i>	21
3.3.2.2	<i>Neenzymová produkce aktivních forem kyslíku.....</i>	22
3.3.2.3	<i>Enzymová produkce aktivních forem kyslíku.....</i>	26
3.3.3	Peroxid vodíku a jeho tvorba ve strukturách buňky.....	27
3.3.3.1	<i>Endoplazmatické retikulum.....</i>	28
3.3.3.2	<i>Peroxisomy.....</i>	29
3.3.3.3	<i>Apoplast.....</i>	29
3.3.3.4	<i>Buněčná stěna.....</i>	30
3.4	ONONIS ARVENSIS (JEHLICE ROLNÍ).....	31
3.5	FLAVONOIDY.....	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
4.1	PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE.....	36
4.2	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	36
4.3	KULTIVACE ROSTLINNÝCH KULTUR.....	37
4.4	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ ELICITORU.....	38

4.5	KULTIVACE A ELICITACE KULTUR.....	38
4.6	STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ.....	39
4.7	STANOVENÍ ZTRÁTY SUŠENÍM.....	40
4.8	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	41
5	VÝSLEDKY.....	42
6	DISKUSE.....	46
7	ZÁVĚR.....	49
8	SEZNAM LITERATURY.....	50
9	ASTRAKT.....	52

1 ÚVOD

Rostliny mají schopnost z živin syntetizovat kromě nepostradatelných složek svého těla (aminokyselin, vitamínů, nukleových bází atd.) i pestrou paletu rozmanitých látek, jejichž funkce není zřejmá, a jež jsou pravděpodobně pro vlastní růst rostliny postradatelné. Označují se proto na rozdíl od primárních nepostradatelných jako sekundární metabolity.

Velmi dobře známá a komerčně využívaná je produkce sekundárních metabolitů u mikroorganismů (např. produkce antibiotik). (1) Méně už se dostalo do povědomí, že rychlý rozvoj technik explantátových kultur umožnil též průmyslovou produkci sekundárních metabolitů rostlin. (2) Tkáňové kultury rostlin mají oproti tradičním způsobům získávání sekundárních metabolitů podstatné výhody, mezi ně patří, že syntéza probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatu a půdních podmínkách, že produkčním systémem jsou vyloučeny negativní biologické vlivy (mikroorganismy, hmyz) v přírodě měnící produkci sekundárních metabolitů a v neposlední řadě že v tkáňové kultuře je možné selektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů. (1) Řada rostlinných látek je pro člověka nenahraditelná jako farmaka a požadavky na tyto látky stále stoupají. Spolu s rostoucími požadavky se zdokonalují i biotechnologické postupy jejich získávání. (2)

V rostlinách se vyskytují strukturně velmi různorodé fenolové sloučeniny. Vzhledem k jejich hojnému rozšíření a vysoké koncentraci v rostlinách jsou běžnou součástí lidské potravy. Nejběžnějšími rostlinnými polyfenoly jsou flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany. V současnosti roste zájem o studium přírodních látek, protože jejich příjem v potravě je dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných nemocí jako je rakovina a kardiovaskulární choroby.

Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály.

Na celkovém příjmu polyfenolů se flavonoidy podílí asi ze dvou třetin, fenolové kyseliny přibližně jednou třetinou a ostatní polyfenoly (např. lignany a stilbeny) tvoří minoritní podíl. Rostlinné polyfenoly jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčními

účinky v naší stravě. Jejich denní příjem byl odhadnut na 1 g a je tedy výrazně vyšší než je příjem antioxidantních vitamínů, jako jsou tokoferoly, karoteny nebo kyselina askorbová. Rovněž v testech antioxidantní aktivity polyfenoly často předčí vitamíny nebo endogenní antioxidanty jako je např. kyselina močová. Příznivý vliv rostlinných polyfenolů na zdraví člověka, dokumentovaný jak klinickými studiemi, tak pokusy na zvířatech a buněčných kulturách, podnítil zájem o studium biologické dostupnosti těchto látek. (3)

2 CÍL PRÁCE

Katedra farmakognozie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové se dlouhodobě zabývá studiem vlivu abiotických a biotických elicitorů na produkci sekundárních metabolitů.

Cílem mé práce bylo seznámit se s metodikou kultivace rostlinných kultur *in vitro* a sledovat v různých časových intervalech a koncentracích vliv peroxidu vodíku na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Explantátové kultury

3.1.1 Charakteristika explantátových kultur

Explantátové kultury rostlin (kultury rostlinných explantátů) znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek (definovaná kultivační média, teplota, vlhkost, kvalita a kvantita světla). (1) Jinými slovy jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristemických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. (2)

Rostlinné buňky kultivované *in vitro* se vyznačují na rozdíl od buněk živočišných totipotencí – tj. schopností obnovit v průběhu diferenciačních procesů specializované funkce a postupně regenerovat ve fertilní rostlinu. Totipotence umožňuje realizaci genetických změn vyvolaných v jednotlivých buňkách na úrovni celého organismu. I vysoce diferencované a specializované buňky si však uchovávají schopnost za určitých podmínek opět diferencovat a nabýt charakter meristemického pletiva s vysokou dělivostí. (4) Proces diferenciací je totiž založen na tzv. diferenciální genové aktivitě, kdy se specializace buňky vytváří na základě aktivace či inaktivace určitých genů příslušného rostlinného druhu. Změnou podmínek, ve kterých se specializovaná rostlinná buňka nachází, je možné v mnohých případech vyvolat dediferenciaci a neorganizovaný růst. Teoreticky je jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem vhodné pro odvození explantátové kultury. (1)

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. Explantátové kultury umožňují též konzervovat genetickou stabilitu materiálu a využít metod genového inženýrství ve šlechtění rostlin. (2)

3.1.2 Kategorie rostlinných explantátů

Podle morfologických kritérií lze rostlinné explantáty rozdělit na kultury orgánové, tkáňové, suspenzní a buněčné:

Orgánové kultury jsou složeny z orgánových systémů, jednotlivých orgánů nebo jejich částí. Buňky jsou diferencované, stavba a funkce orgánů jsou zachovány.

Tkáňové kultury jsou morfologicky dezorganizované mnohobuněčné částečně soudržné shluky buněk tkáně. Rozmnožují se většinou na polotuhých nebo tuhých živných půdách.

Suspenzní kultury obsahují volné buňky i drobné buněčné shluky suspendované v tekuté živné půdě, jsou provzdušňovány a promíchávány.

Buněčné kultury jsou jednotlivé volné buňky kultivované v tekuté nebo polotekuté půdě, v některých případech na nosiči nasyceném živnou půdou.

Kultury buněčných protoplastů obsahují pouze nahé rostlinné protoplasty. Získávají se enzymatickým štěpením buněčných stěn v hypertonickém prostředí. (4)

3.1.3 Odvození a kultivace explantátové kultury

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

Prvým úkolem je získat stabilní vysokoprodukční explantátové kultury sestávající se z jednotlivých buněk nebo jejich několikačetných agregátů. Explantátová kultura se získá z kterékoli části rostliny, nadzemní nebo podzemní, explantací parenchymatické tkáně, jejím přenesením na tuhou pevnou živnou půdu a inkubací v teplotním rozmezí 23 až 28°C. Po nárůstu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné je opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat tak získanou kulturu v aktivním stavu. Obsah růstových látek a vitamínů v živné půdě má rozhodující význam nejen pro růst kalusové kultury, ale i pro převádění kalusu do suspenzní kultury. Zejména rozpadavý kalus po přenesení do tekuté živné půdy zajišťuje homogenitu suspenzní kultury, která je pro další vývoj postupu nezbytná. (2)

Ke kultivaci buněčných suspenzí se používají různé kultivační systémy. Pro všechny je společné používání tekutých živných médií, která se pohybují. Pohybem média se dosahuje jeho aerace, zajišťuje se lepší přístup živin k jednotlivým buňkám a napomáhá se rozpadu buněčných shluků, které vznikají při dělení buněk. Pohyb média je zajišťován umístěním kultivačních nádob na roller nebo na třepačku (pohyb baněk v horizontální rovině). (1)

Pro kultivaci kalusů se většinou používají média zpevněná agarem, ale i můstky z filtračního papíru částečně ponořené v tekutém médiu. Tyto půdy i půdy tekuté pro suspenzní kultury obsahují směs mnoha makro a mikroelementů v různém poměru. Tím se právě liší jednotlivé receptury, optimalizované jednotlivými autory pro jejich kultury. Nejrozšířenější je médium dle Murashigeho a Skooga. Velmi důležitá je úprava pH, optimální se jeví pH 5,4-5,7. (4)

Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo další zdroje organického dusíku, sacharidy, další nedefinované organické složky, zpevňující látky a růstové regulátory.

Makroelementy dodávané do kultivačních médií zahrnují 6 nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík, síru.

Mezi **mikroelementy** nezbytné pro růst tkáňových kultur rostlin patří železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden.

Vitamíny jsou pro rostlinu, která si je normálně syntetizuje sama, též nezbytné, a to v podobě katalyzátorů řady metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi ty nejčastěji používané v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol.

Přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntetizovat všechny esenciální aminokyseliny, často jsou do živných médií dodávány, a to především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. **Aminokyseliny** slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku, který se v organické formě dodává do živných médií nejčastěji ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát), nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Velmi často se používají též L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin.

Sacharidy se do médií dodávají z důvodu převážně heterotrofní výživy explantátů, jejich schopnost vyživovat se autotrofně je totiž velmi omezena. Jako

nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána sacharóza, v kultivačním médiu v obvyklé koncentraci 2-3%.

Růst explantátové kultury je možné často stimulovat přidáním celé řady **organických extraktů** jako např. kasein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničkového extraktu, sladového extraktu a extraktu z banánů.

Jako **zpevňující látka** pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar.

Růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abcisová. Přičemž o charakteru růstu explantátové kultury nerozhoduje jenom koncentrace jednotlivých hormonů, ale často jejich vzájemný poměr, a to platí především o poměru auxinů a cytokininů.

Jednou ze základních podmínek úspěšné kultivace explantátových kultur je zajištění sterility po celý průběh kultivace. Z tohoto důvodu je nezbytné zabývat se sterilitou rostlinného materiálu používaného jako explantát, sterilitou kultivačních médií a sterilitou prostředí, ve kterém jsou tkáňové kultury realizovány. Při nedodržení sterility v některém stupni kultivace dojde ke kontaminaci kultur plísněmi či bakteriemi. Živná média používaná pro tkáňové kultury rostlin mají totiž vhodné složení pro růst těchto všudypřítomných organismů. (1)

3.1.4 Využití, výhody a nevýhody explantátových kultur

Využití a výhody explantátových kultur spočívají hlavně v alternativní přípravě 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 kvalitní stránce homogenní, prosté kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultur. Další výhodou je získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách a získávání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk. Z explantátových kultur byly izolovány látky, které nebyly zjištěny v mateřských rostlinách, z nichž byly kultury odvozeny. A ještě se explantáty uplatňují jako produkty biotransformací, kdy z poměrně levných a dostupných substrátů lze získat farmaceuticky významné látky, protože příslušné enzymy se u mikroorganismů nevyskytují.

Doposud nevyřešenou otázkou je dlouhá generační (kultivační) doba explantátových kultur. Střední generační doba u mikroorganismů se většinou pohybuje v desítkách minut, u kořenových meristémů rostlin, kde probíhá dělení buněk nejrychleji, trvá jeden buněčný cyklus 10 až 35 hodin. Buněčný cyklus u explantátových kultur je pomalejší a pohybuje se v nejlepším případě od 15 hodin výše. Důsledkem je značně dlouhá doba kultivace, a tím zvýšené nároky na udržení sterility procesu. (2) Navíc jen u malého počtu tkáňových kultur se podařilo dosáhnout produkce sekundárních metabolitů vyšší než v intaktní rostlině. (1)

Hlavním úkolem do budoucna je tedy nalezení takových způsobů kultivace, zejména z hlediska složení živné půdy (nové auxiny), které by urychlily růst a množení buněk. (2)

3.2 Elicitace

3.2.1 Charakteristika elicítace, elicitory

Obranných reakcí rostlin v podmínkách *in vitro* využívá metoda zvaná elicítace.(5) Elicitory jsou látky, které spouští obrannou reakci. (6) Z chemického hlediska se jedná o polysacharidy, lipidy, peptidy a proteiny. Rozeznáváme elicitory exogenní, strukturní složky povrchu patogenu a jeho vyměšované metabolity, a endogenní, sloučeniny uvolňované z rostlin činností patogenu. (7, 6)

Elicitory působí jako jakýsi stresový faktor vyvolávající obrannou odpověď založenou na produkci sekundárních metabolitů. (1) Například existuje studie, která jasně naznačuje, že elicitorová úprava podporuje produkci sekundárních metabolitů v kulturách *Silybum marianum* a že jasmonová kyselina a její funkční analog (methyljasmonát) hraje rozhodující roli při elicítaci.(8) Jako další příklad obranné reakce rostlin založené na produkci sekundárních metabolitů vyvolané elicitory je možné uvést produkci fytoalexinů. Většina rostlin reaguje na napadení patogenem produkcí tzv. fytoalexinů. Tyto látky mají bakteriostatické, fungistatické a cytostatické účinky. (1)

Úspěšnost elicítace je ovlivňována mnoha faktory: druhem elicitoru, jeho koncentrací, dobou elicítace, růstovou fází buněčné kultury, složením živného média. K elicítacím se používají jak elicitory biotické (houby, bakterie, viry, kvasinky, hnědé řasy nebo části těchto organismů), tak abiotické (UV záření, soli těžkých kovů, kyselina trichloroctová, změny osmotického tlaku, změny pH). Výhoda abiotických elicitorů spočívá v jejich definované chemické struktuře, možnosti použití jejich přesné hmotnosti nebo objemu a jejich menší ekonomické náročnosti. (5)

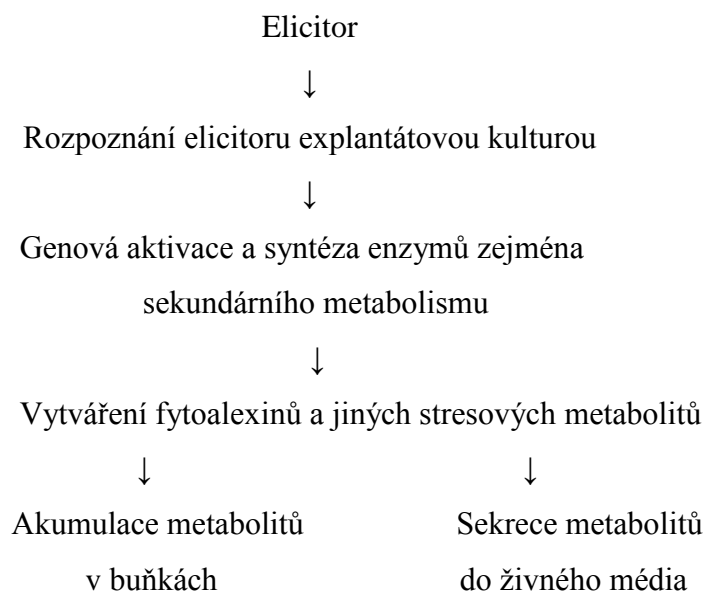


Schéma: Posloupnost kroků elicitace (5)

3.2.2 Mechanismus působení elicitorů

Elicitory obvykle ovlivňují genovou aktivitu zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (tzv. systémy druhých posílů). Byl nashromážděn dostatek důkazů, že signální systémy u rostlin jsou téměř úplně stejné jako u živočichů. (9) Přenos signálu od aktivovaných receptorů (obvykle v plazmatické membráně) k DNA v jádře je možný více systémy:

- 1) **systémem cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP)**, kdy působení elicitoru na specifický receptor v membráně vyvolá navázání GTP na G-protein (guanozintrifosfát-vážíci protein), který se tímto stává aktivním. G-protein aktivuje ATP-ázu (adenylátcyklázu), následkem čehož vzniká cAMP, ten působí změnu aktivity proteinkináz a fosfatáz. Nastává změna stavu fosforylace intracelulárních proteinů (enzymů) a přichází metabolická odpověď ve formě tvorby stresových hormonů. (10)
- 2) **systémem fosfoinositolovým**, kdy fosfolipáza c štěpí membránový lipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na 2 signální molekuly: diacylglycerol (DAG), který jako lipofilní molekula zůstává v membráně, a inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃), který přechází do cytoplazmy. Oba za účasti iontů vápníku aktivují proteinkinázy a posléze i exprese genů. (9)

- 3) **přenosem pomocí vápenatých iontů**, které se v buňce vážou na kalmodulin, čímž vzniká komplex schopný aktivovat proteinkinázy. (10)
- 4) **tvorbou reaktivních forem kyslíku**, kdy kromě přímého účinku peroxidu vodíku na exprese genů existuje ještě nepřímá cesta, při které nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmonová a methyljasmonát, a ty pak teprve ovlivňují transkripci.

Tyto mechanismy se tedy buď přímo nebo nepřímo podílejí na aktivaci proteinkináz, které potom pomocí ATP fosforylují různé enzymy (enzymy mohou být aktivovány fosforylací i defosforylací), a tím spouštějí celou řadu reakcí, které mohou vést až k exprese různých genů, a tím ke změnám fenotypu rostlin. (9)

3.3 Oxidační stres

3.3.1 Fyziologie stresu a stresové faktory

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího života. Ty mohou zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést k jejich uhynutí. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu označujeme jako stresové faktory (stresory).

Termín stres je obvykle používán pro souhrnné označení stavu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů. Jde o dynamický komplex mnoha reakcí. (9) Oxidativní stres je charakteristický prudkou přechodnou tvorbou značného množství aktivních forem kyslíku (ROS). Dochází k porušení rovnováhy mezi produkcí a odbouráváním ROS. (11)

Výzkum vztahů mezi vnějším prostředím a stresem v rostlinách obvykle začíná studiem přenosu podnětů vyvolávajících stres na rozhraní orgánů rostliny s vnějším prostředím a dále pak přenosem signálů uvnitř rostliny. (9) Mechanismy odolnosti proti stresu lze rozdělit do dvou kategorií. První jsou mechanismy zabraňující tomu, aby byla rostlina vystavena stresu („avoidance mechanisms“). (11) Působení stresových faktorů na vnitřní prostředí rostlin různých druhů se výrazně liší, a to především v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur. Tento způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter (např. tlustá kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn, rezervoáry vody a řady organických látek). (9)

Z fyziologického hlediska jsou mnohem zajímavější mechanismy aktivní odolnosti rostlin („tolerance mechanisms“), které omezují negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. (11) V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn, který bývá označován jako stresová reakce. Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a jejich funkcí (poplachová fáze). Pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, dochází záhy k mobilizaci kompenzačních mechanismů (restituční fáze). Ne vždy však má toto zvýšení trvalý charakter. Při dlouhodobém působení a intenzivním stresovém faktoru může být vystřídáno dalším poklesem (fáze vyčerpání). (9)

Průběh stresové reakce a její konečný výsledek závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru na danou rostlinu, tak i na rysech rostliny, jako jsou např.

orgánová a tkáňová identita, stádium vývoje nebo genotyp. Předpoklady genetické odpovědi se souhrnně označují jako adaptační schopnosti. (11) Přejídné zvýšení odolnosti získané pod vlivem stresoru se nazývá aklimace a může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých (tvorba specifických metabolitů), tak i na změnách trvalejších jako je tvorba nových orgánů nebo změna vnitřní struktury.

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

Stres u rostlin může být vyvolán působením stresových faktorů biotické povahy (jedná se o interakci s jinými organismy) nebo abiotické povahy (přebytek či nedostatek fyzikálních či chemických elementů). (9)

ABIOTICKÉ FAKTORY

- FYZIKÁLNÍ → mechanické účinky větru
 - nadměrné záření (UV, viditelné)
 - extrémní teploty (horko, chlad, mráz)
- CHEMICKÉ → nedostatek vody (sucho)
 - nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
 - nedostatek živin v půdě
 - nadbytek iontů solí a vodíku v půdě
 - toxické kovy (Zn, Pb, Cd) a organické látky v půdě
 - toxické plyny ve vzduchu

BIOTICKÉ FAKTORY

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

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

- tvorba stresových proteinů
- tvorba stresových fytohormonů (kyseliny abscisové, ethylenu, kyseliny jasmonové, methyljasmonátu a polyaminů)
- tvorba osmoregulačních sloučenin (cukrů, polyalkoholů a jednoduchých dusíkatých látek)
- tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku

3.3.1.1 Stresové proteiny

Pod vlivem kteréhokoliv ze stresových faktorů dochází často již během několika desítek minut k velmi dramatickým změnám v kvantitativním i kvalitativním zastoupení proteinů v buňkách. Tvorba některých prudce stoupá, u jiných se naopak zastavuje. V hojné míře se však také syntetizují proteiny, které se za normálních okolností vůbec nedají v buňkách zjistit. Z několika desítek proteinů, jejichž syntéza se působením určitého stresoru prudce zvyšuje, se jen jistá část pravidelně vyskytuje i u jiných typů stresů. Indukce zbývající části stresových proteinů je specificky vázána na určitý stresový faktor. Mezi nejdůležitější skupiny stresových proteinů patří proteiny indukované zvýšenou teplotou, chladem, dehydratací, sníženou koncentrací kyslíku či patogeny. (9)

Například byly zkoumány účinky vysoké teploty a oxidačního působení na strukturální vlastnosti jaderně kódovaného chloroplastového Hsp 21, (což je oligomerní heat shock protein (Hsp) patřící do rodiny malých Hsps a α -krystalinů), v purifikovaných rekombinantních a transgenních rostlinách *Arabidopsis thaliana* tak bylo navozeno podstatné přestavění Hsp 21. Transgenní rostliny, které přestavěly Hsp 21, byly více resistantní vůči teplotnímu stresu než divoké rostliny. Výsledky naznačily, že fyziologická role Hsp 21 zahrnuje odpověď na teplotně závislou oxidaci. (12)

3.3.1.2 Stresové fytohormony

Látky, které regulují růstové a vývojové procesy u rostlin, obecně nazýváme růstové regulátory bez rozlišení, zda jde o látky přirozené či synteticky připravené.

Přirozené regulátory růstu lze rozdělit do dvou skupin: rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou. Za rostlinné hormony je považováno 5 skupin endogenních růstových regulátorů: auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová a ethylen. Mimo ně existuje v rostlinách množství látek s růstově regulační aktivitou, které mezi hormony řazeny nejsou, neboť jsou účinné ve vyšších koncentracích či neznáme dostatečně obecnost jejich působení. Jsou to zejména brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová, oligosacharidy a velká skupina fenolických látek.

Hlavním fyziologickým účinkem **auxinů** je stimulace prodlužovacího růstu buněk i jejich dělení. Hlavním účinkem **cytokininů** je stimulace buněčného dělení. Ve všech meristematických, intenzivně se dělících pletivech nacházíme vysoké koncentrace aktivních cytokininů. Vliv na regeneraci orgánů je ve spojení s účinkem auxinů základem regeneračních procesů *in vitro* (*in vivo* po poranění). Poměr koncentrací auxinů a cytokininů rozhoduje o tom, jak bude regenerace probíhat. Nejvýznamnější praktickou aplikací cytokininů (spolu s auxiny) je jejich využití v rostlinných biotechnologiích jako složek kultivačních médií. Perspektivní je rovněž použití cytokininů při zvyšování odolnosti rostlin ke stresovým podmínkám.

Ve zralých pletivech **kyselina abscisová** urychluje proces stárnutí. Rostoucí pletiva a orgány reagují většinou na aplikaci kyseliny abscisové snížením růstové rychlosti. Společně s **gibereliny** reguluje dormanci, kdy vzájemný koncentrační poměr kyseliny abscisové a giberelinů rozhoduje o tom, kdy semena vyklíčí. Regulace vodního režimu rostlin je asi nejdůležitější funkcí kyseliny abscisové. Přitom abscisová kyselina redukuje nejen negativní vliv nedostatku vláhy, ale i dalších stresů, které nedostatek vody v buňce vyvolávají, jako nízkých teplot či zasolení.

Ethylen je plynný hormon, jehož koncentrace v buňce je velmi nízká, daná rozpustností v cytoplazmě. Nejvýraznějším účinkem ethylenu je stimulace dozrávání některých plodů. Zvýšení tvorby ethylenu je jednou z prvních reakcí rostlin na působení stresorů. Je reakcí téměř univerzální; zvýšenou tvorbu ethylenu vyvolává nedostatek i nadbytek vody, anaerobióza, teplotní výkyvy, zasolení, poranění, napadení patogeny i toxické látky. Pod vlivem zvýšené tvorby ethylenu stoupá tvorba některých fytoalexinů (obranných látek rostlin), zvyšuje se aktivita některých enzymů účastnících se obranných reakcí rostlin a vzrůstá odolnost některých pletiv k působení rozkladných enzymů.

Fyziologickým účinkem **kyseliny jasmonové** je její urychlující účinek na stárnutí listových segmentů, nejvýznamnější úlohou je pak zřejmě její funkce jako signálu při reakci na dotyk, na patogeny nebo jejich elicitory a na poranění. Kyselina jasmonová a její methylester indukují na transkripční úrovni syntézu některých proteinů účastnících se obranných reakcí rostliny.

Polyaminy jsou jednoduché organické látky s více aminoskupinami v molekule, v rostlinách se nejčastěji vyskytuje putrescin, spermin a spermidin. Polyaminy často stimulují růst, a to zejména v systémech *in vitro*, ve kterých probíhá intenzivní buněčné dělení. Též hrají významnou úlohu v obraně rostlin proti stresům.

V průběhu výzkumu auxinů a cytokininů byla nalezena **řada syntetických látek**, které mají podobnou biologickou aktivitu jako přirozené auxiny a cytokiny, i když se více či méně liší strukturou. Ve skupině auxinů je to např. kyselina α -naftyloctová a 2,4-dichlorfenoxyoctová, ve skupině cytokininů kinetin nebo deriváty močoviny. Tyto látky jsou vhodné pro praktické využití, protože jsou v rostlinách jen pomalu metabolizovány.

3.3.1.3 Osmoregulační sloučeniny

Tvorba osmoregulačních sloučenin má význam při přizpůsobování se nedostatku vody (zvýšením osmotického tlaku v buňkách vlivem syntézy cukrů, složitějších alkoholů a betainu), dále při reakci na nízkou teplotu (snížení bodu tuhnutí přítomností osmoticky aktivních látek) či na zasolení (vysoký osmotický tlak vakuolární šťávy vlivem obsahu iontů musí být vyrovnáván zvýšenou koncentrací kompatibilních osmoticky aktivních látek v cytozolu). (9)

3.3.2 Aktivní formy kyslíku

Jako aktivní formy kyslíku označujeme všechny částečně redukované nebo aktivované deriváty kyslíku. Za normálních růstových podmínek je produkce aktivních forem kyslíku v buňce nízká (př. $240 \mu\text{M/s O}_2^{\cdot-}$ v chloroplastu). Působí-li na rostlinu stresové faktory, které ruší její buněčnou homeostázu, dochází k výraznému zvýšení koncentrace ROS v buňce (př. do $720 \mu\text{M/s O}_2^{\cdot-}$ v chloroplastu).

Aktivní formy kyslíku hrají v biologických systémech dvojí roli: a) slouží jako signální molekuly pro expresi genů, b) jako toxické meziprodukty aerobního metabolismu způsobují poškození či zánik buňky. Aktivní formy kyslíku mohou inaktivovat enzymy, oxidovat proteiny a poškozovat DNA a RNA. V důsledku uvedených reakcí nastává buněčná smrt. Zvýšená koncentrace ROS je charakteristická pro hypersenzitivní reakci rostlin s následnou programovanou buněčnou smrtí. Mechanismy produkce ROS jsou v biologických systémech prezentovány jak enzymovými, tak i neenzymovými reakcemi. (11)

3.3.2.1 Protistresová úloha aktivních forem kyslíku

Význam ROS pro fyziologické procesy probíhající u rostlin není uspokojivě prozkoumán ve všech souvislostech, ale je jisté, jak již bylo řečeno výše, že ROS hrají významnou roli v hypersenzitivní reakci při napadení rostliny patogenem. Při počáteční interakci buňky s patogenem bývá uvolňován specifický metabolit – elicitor (jako elicitor mohou sloužit jednak některé metabolity uvolňované patogeny, tzv. exogenní elicitory: polysacharidy, specifické enzymy a peptidy, a jednak sloučeniny, oligomery chitinu, glykoproteiny, oligoglukany, které se uvolňují z narušovaných buněčných stěn organismů, mluvíme o tzv. endogenních elicitech).

Elicitor je identifikován vhodným receptorem hostitelské buňky a slouží jako podnět ke spuštění obranných reakcí. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí specifických receptorů v plazmatické membráně a navazující sítě vnitrobuněčného přenosu signálu.

Kromě „klasické“ signalizace zvýšenou koncentrací iontů vápníku a aktivací proteinkináz bývá velmi často pozorována i tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku vyvolaná elicitory.

Na signalizaci se podílí především **peroxid vodíku**, jehož zvýšené množství je možné zjistit už po 5 až 10 minutách působení elicitoru. Kromě možného přímého účinku peroxidu vodíku na expresi genů existuje ještě nepřímá cesta, při které nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmonová a methyljasmonát, a ty pak ovlivňují transkripci.

Peroxid vodíku rovněž stimuluje otevření vápníkových kanálů a zvýšení koncentrace intracelulárních Ca^{2+} má dalekosáhlé aktivační následky. (13) Vápenaté

kanály slouží hlavně k transdukcí signálu. Jejich otevření je způsobeno právě vzrůstem cytoplazmatické koncentrace Ca^{2+} . Dočasné prostorové změny vápenatých kanálů jsou vyvolány fyziologickou odpovědí na rozmanité biotické a abiotické podněty. Vápník-propustné kanály byly zaznamenány v plazmatické membráně, tonoplastu, endoplazmatickém retikulu, chloroplastu a jaderné membráně rostlinných buněk. (14)

Funkce **peroxidu vodíku** jako přenašeče signálu pro expresi některých genů je velmi významná. (13) Peroxid vodíku je produkován v rostlinách po působení různých biotických i abiotických stresů a byla dokázána indukce řady buněčných odpovědí. Například bylo zjištěno, že peroxid vodíku se tvoří během interakce rostlina-elicitor jako signální molekula indukující expresi obranných genů a zahajuje programovanou buněčnou smrt v suspenzní kultuře *Arabidopsis thaliana*. Byly rozlišeny 4 geny na základě rozdílné struktury RNA, jejichž exprese byla indukována působením peroxidu vodíku. Tyto geny zahrnují homologní úseky s již dříve identifikovanými geny *Arabidopsis*, které kódují v pozdní embryogenezi množství proteinů, protein opravující poškozenou DNA a serin/threonin kinasu. Jejich domnělé role v obranných odpovědích, indukovaných peroxidem vodíku, jsou projednávány. (15)

Regulační působení **peroxidu vodíku** může být i nepřímé, a sice ovlivněním poměru mezi redukovanou a oxidovanou formou glutationu. Peroxid vodíku je nezbytným činidlem při tvorbě ligninu z fenylypropanoidních alkoholů, jednak se podílí na vzniku pevných vazeb mezi proteiny v buněčné stěně a pak na zvýšení jejich nerozpustnosti. (13)

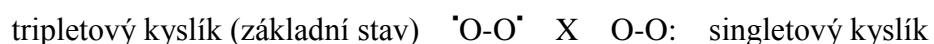
Působením volných radikálů na živý organismus dochází k mnoha poškozením, která mohou vést od narušení buněčných stěn (semipermeabilita), přes vznik různých mutací, až ke smrti buňky, respektive celého organismu. Mezi nejvýznamnější cíle ataku volných radikálů patří proteiny, DNA a membránové lipidy. Reaktivní volné radikály reagující s buňkou mohou oxidovat biomolekuly, což může vést k buněčné smrti nebo zranění tkáně. Negativní působení aktivních forem kyslíku spočívá především v peroxidaci. (16)

3.3.2.2 Neenzymová produkce aktivních forem kyslíku

Atmosferický kyslík v základním stavu se liší od ostatních plyných prvků tím, že je biradikál, jinými slovy obsahuje dva nepárové elektrony. Tato vlastnost způsobuje

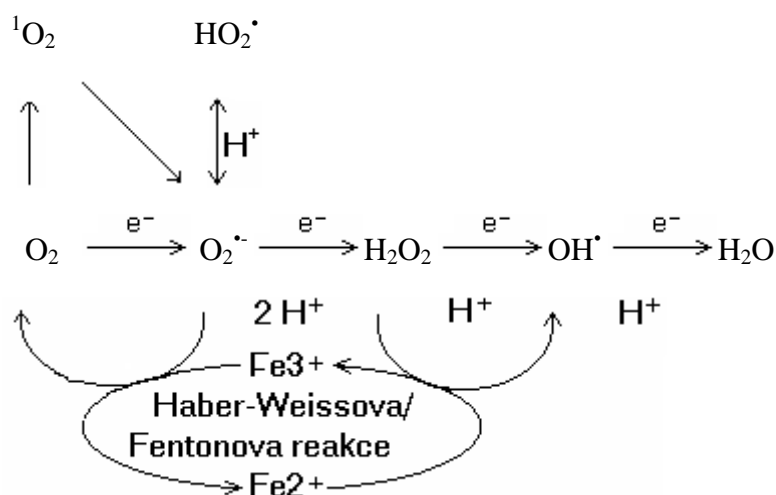
jeho paramagnetismus. Požadavek aktivace hraje významnou roli, neboť nepárové elektrony molekuly kyslíku mají paralelní spin, což podle Pauliho principu zabraňuje reakcím s divalentním reduktantem. Reakce by mohla probíhat pouze za předpokladu, že tento reduktant má také dva nepárové elektrony s paralelním spinem, ale opačné orientace k tomu, který má molekulární kyslík. Tato pravděpodobnost je však velmi malá. To znamená, že molekulární kyslík je poměrně nereaktivní. Jeho aktivace probíhá různými mechanismy.

Prvním z nich je absorpce dostatečné energie potřebné k převrácení spinu jednoho z nepárových elektronů. Hodnota této energie je 22 kJ/mol a je získána ze světelného kvanta cestou přenosných molekul jako je například chlorofyl. Biradikální forma kyslíku v tripletovém základním stavu po absorpci potřebné energie (22 kJ/mol) přejde do stavu singletového, ve kterém mají oba elektrony opačný spin (jsou tedy antiparalelní). (11) Díky této aktivaci se singletový kyslík může účastnit reakcí, ve kterých dochází k samovolnému přenosu dvou elektronů.



Vzniklý singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) je ve srovnání s molekulárním kyslíkem velmi reaktivní a může svou excitační energii přenést buď na jiné molekuly, nebo s nimi může reagovat za vzniku endoperoxidů nebo hydroperoxidů. (17)

Druhým mechanismem je aktivace kyslíku jednoelektronovou redukcí, kdy dochází ke tvorbě superoxidu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2), hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}) a vody podle schématu na obrázku 1. (11)

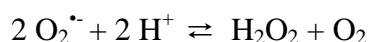
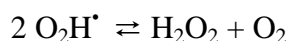


Obr. 1

Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu vyžaduje čtyři elektrony a je vždy doprovázená částečnou jedno až tři elektronovou redukcí, kdy dochází ke tvorbě superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu. (11, 17)

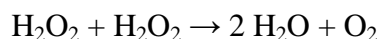
Reakční řetězec vyžaduje iniciaci v prvním kroku, zatímco následné kroky jsou exotermní a mohou tedy probíhat samovolně, buď za přítomnosti katalyzátoru nebo i bez něj.

První reakce představuje univalentní redukci molekulárního kyslíku vedoucí ke tvorbě superoxidového radikálu (O_2^\bullet). Superoxid je reaktivní, krátce žijící forma kyslíku s poločasem života přibližně 2 – 4 μs . Neprochází přes biologické membrány a funguje jako oxidační i redukční činidlo. Oxiduje např. síru, kyselinu askorbovou, NADPH, některé aminokyseliny (histidin, methionin, tryptofan), redukovaný cytochrom c, chinony a komplexy přechodných kovů, čímž ovlivňuje aktivitu metaloenzymů. (11) V živých buňkách existuje superoxidový radikál v rovnováze s jeho protonovanou formou, perhydroxylovým radikálem (O_2H^\bullet). Ten je více hydrofobní než superoxid a může tedy jednodušeji proniknout lipidovou dvojvrstvou membrán, kde odebírá protony z vícenenasycených mastných kyselin a lipidových hydroperoxidů, čímž zahajuje autooxidaci lipidů. (17) Ve vodném rozpouštědle, v neutrálním nebo mírně kyselém pH, tento radikál v obou formách dismutuje na peroxid vodíku a kyslík. (11) Tato reakce probíhá samovolně nebo za katalýzy enzymem superoxidodismutázou.

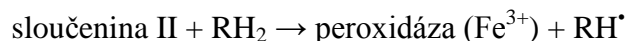
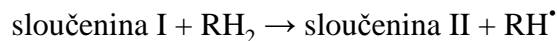
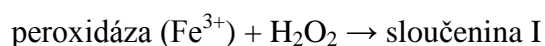


Druhá redukce kyslíku produkuje peroxid vodíku, což je poměrně stabilní molekula s poločasem života 1 ms. (17) Peroxid vodíku je schopen procházet přes buněčnou membránu. Nově vzniklý H_2O_2 v rostlinné buňce může být:

- a) disproportionován samovolně nebo za přítomnosti katalázy na vodu a kyslík,



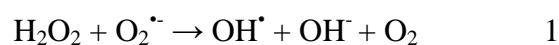
- b) použit jako substrát různých peroxidáz,



- c) detoxifikován askorbátperoxidázou, která působí spolu s dehydroaskorbátreduktázou a glutathionreduktázou v Halliwell-Asadově cestě.(11)

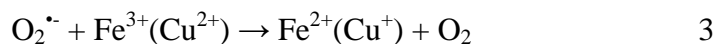
Třetí reakce je velmi důležitá z hlediska oxidativního stresu. Jde o tři elektronovou redukci molekulárního kyslíku, kdy je produkována nejreaktivnější forma kyslíku – hydroxylový radikál, který se může tvořit přímou reakcí (Haber-Weissova reakce) peroxidu vodíku a superoxidu.

Haber-Weissova reakce:



Za normálních podmínek se jedná o pomalou reakci, která není účinná v tvorbě značného množství hydroxylového radikálu. Dostatečné množství se však může tvořit

cyklem reakcí zahrnujících oxidaci přechodných kovů, jako jsou železnaté nebo měďnaté ionty - Fentonova reakce:



Následná regenerace oxidovaných iontů na jejich redukováný stav probíhá cestou reakce se superoxidovým radikálem. Přechodné kovy zde fungují jako katalyzátory. Jejich lokalizace a přístup jsou pravděpodobně hlavními faktory určujícími místo tvorby hydroxylového radikálu. Jedná se o velmi silný oxidant, který může iniciovat radikálové řetězové reakce s řadou organických molekul, což vede k peroxidaci lipidů, inaktivaci enzymů a poškození nukleových kyselin. (11)

3.3.2.3 Enzymová produkce aktivních forem kyslíku

Aktivní formy kyslíku mohou také vznikat cestou enzymových reakcí. Značné množství superoxidového radikálu jako meziprojektu se tvoří reakcemi katalyzovanými enzymy jako je dihydroorotátdehydrogenáza, xanthinoxidáza, diaminoxidáza nebo tryptofandioxygenáza. Nejznámějším z těchto enzymů je xanthinoxidáza, která používá jako donory elektronů xanthin, hypoxanthin či acetaldehyd. (11) Při katalytické oxidaci xanthinu na kyselinu močovou se uvolňuje superoxidový radikál, který podléhá redukcii za tvorby peroxidu vodíku (H_2O_2) a hydroxylového radikálu (OH^\bullet) cestou Haber-Weissovy a Fentonovy reakce. (17) Xanthinoxidázová reakce se obecně používá jako zdroj kyslíkových radikálů pro studie *in vitro*.

Aldehydoxidáza podobně jako xanthinoxidáza obsahuje molybden a katalyzuje oxidaci aldehydu za tvorby superoxidového radikálu.

Dalším možným zdrojem aktivních forem kyslíku je reakce katalyzovaná lipoxygenázou, při které dochází k hydroperoxidaci vícenenasycených mastných kyselin (VMK). Hydroperoxyderiváty VMK podléhají autokatalytické degradaci, při které dochází ke tvorbě radikálů iniciujících řetězovou reakci peroxidace lipidů.

Jiné enzymy redukující molekulární kyslík přímo, bez tvorby superoxidu jako meziprojektu, jsou prostaglandinsyntháza, guanylátcykláza, glukózooxidáza a D- a L-aminokyselinaoxidáza.

Oxalát oxidáza katalyzuje produkci peroxidu vodíku a oxidu uhličitého z oxalátu za přítomnosti kyslíku. Aminoxidáza katalyzuje oxidaci biogenních aminů na příslušný aldehyd za uvolnění amoniaku a peroxidu vodíku. (11)

3.3.3 Peroxid vodíku a jeho tvorba ve strukturách buňky

V rostlinách existuje řada známých zdrojů aktivních forem kyslíku (viz tabulka), které jsou produkovány i v rámci normálního metabolismu, např. v průběhu fotosyntézy a respirace. Na zvýšené tvorbě ROS se podílí, vedle řady dalších systémů, zejména NADPH-oxidáza, aminoxidáza a peroxidáza vázaná na buněčnou stěnu. (11)

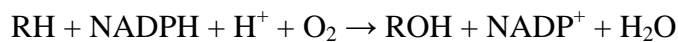
Zdroje aktivních forem kyslíku

Mechanismus	Lokalizace	ROS
Fotosyntetický ETC	chloroplast	$O_2^{\bullet -}$
Respirační ETC	mitochondrie	$O_2^{\bullet -}$
Glykolát oxidáza	peroxizomy	H_2O_2
Excitovaný chlorofyl	chloroplast	$O_2^{\bullet -}$
NADPH-oxidáza	plazmatická membrána	1O_2
β - oxidace mastných kyselin	peroxizomy	H_2O_2
Oxalát oxidáza	apoplast	H_2O_2
Xanthinoxidáza	peroxizomy	$O_2^{\bullet -}$
Peroxidázy (Mn, NADH)	buněčná stěna	$H_2O_2, O_2^{\bullet -}$
Aminoxidáza	apoplast	H_2O_2

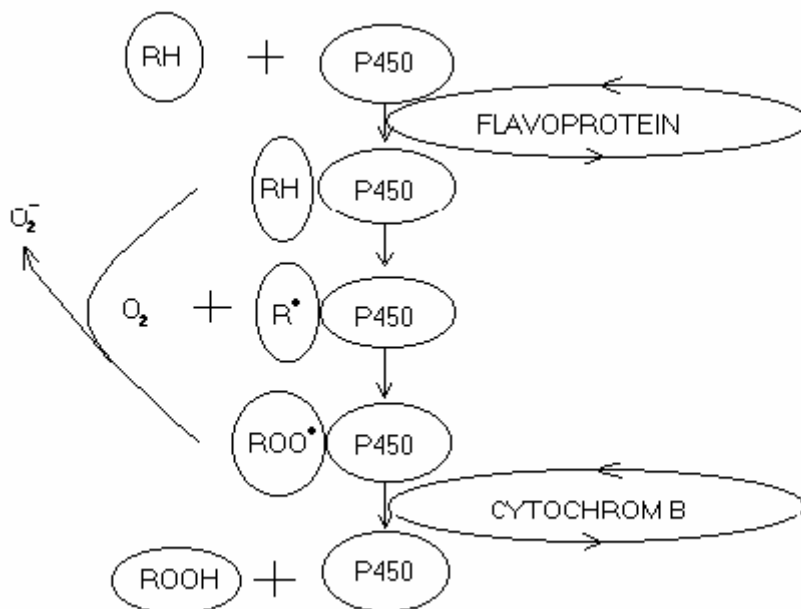
*ETC – elektronový transportní řetězec

3.3.3.1 Endoplazmatické retikulum

Na hladkém endoplazmatickém retikulu probíhají procesy, jako např. oxidace, hydroxylace, dealkylace, deaminace a dehalogenizace. Oxygenázy obsahující hemovou skupinu připojují atom kyslíku na organický substrát, přičemž jako donor elektronů jim slouží NAD(P)H. Nejlépe charakterizovaným enzymem v rostlinách obsahujícím cytochrom P₄₅₀ je cinnamát-4-hydroxyláza, která se účastní biosyntézy flavonoidů a ligninu. Celková reakce katalyzovaná cytochromem P₄₅₀ je následující:



Další enzymy s podobnou funkcí se účastní např. biosyntézy giberelinů a sterolů. Aktivace kyslíku je základním předpokladem reakcí obsažených v syntéze těchto složitých metabolitů. Superoxid je produkován elektronovým transportem závislým na NAD(P)H a zahrnujícím cytochrom P₄₅₀. Po univalentní redukci substrátu (RH) a po přidavku tripletového kyslíku se tvoří komplex P₄₅₀ –ROOH, který se může rozkládat na P₄₅₀ –RH a uvolnit tak superoxid (viz obrázek 2). (11)



Obr. 2

Schematické zobrazení elektronového transportního systému cytochromu P₄₅₀ na endoplazmatickém retikulu naznačující možné místo tvorby superoxidu. (18)

3.3.3.2 Peroxizomy

Jsou to subcelulární organely o průměru 0,1 – 1,7 μm. Skládají se z jednoduché membrány a granulární nebo fibrilární matrix, která může obsahovat beztvaré nebo polykrystalické inkluze.

V rostlinách bylo nalezeno několik typů peroxizomů. Glyoxizomy jsou specializované peroxizomy vyskytující se v zásobních tkáních olejnatých semen, které obsahují enzymy β-oxidace mastných kyselin a glyoxylátového cyklu. Tyto enzymy slouží k přeměně rezervních lipidů semene na cukry potřebné pro klíčení a růst rostlin.

Listové peroxizomy jsou přítomné ve fotosyntetizujících tkáních, kde probíhají hlavní reakce fotorespirace.

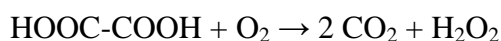
Hlavní metabolické procesy odpovědné za tvorbu peroxidu vodíku v různých typech peroxizomů jsou fotorespirační glykolát oxidázové reakce, β-oxidace mastných kyselin, enzymové reakce flavin oxidáz a dismutace superoxidového radikálu. V průběhu fotorespirace glykolát oxidáza katalyzuje oxidaci glykolátu za tvorby peroxidu vodíku. Enzymy fotorespirační cesty jsou uspořádané v matrix peroxizomu ve formě multienzymového komplexu, který umožňuje přenos metabolitů přes membránu peroxizomu pomocí prolinových kanálků.

V peroxisomech existují dvě místa produkce superoxidového radikálu. Prvním místem je matrix peroxizomu, kde xanthin oxidáza katalyzuje oxidaci xanthinu a hypoxanthinu na kyselinu močovou, přičemž dochází k uvolnění superoxidu. Druhým místem je membrána peroxizomu obsahující malý transportní řetězec, který je tvořen flavoproteinovou NADH: ferrikyanidreduktázou a cytochromem b. Za tvorbu superoxidu v membráně jsou zodpovědné tři nedávno identifikované integrální polypeptidy o molekulové hmotnosti 18, 29 a 32 kDa.

Za působení stresových podmínek bylo pozorováno intenzivnější uvolňování superoxidu produkovaného membránou peroxizomu do cytosolu. Superoxidový radikál rychle přechází na peroxid vodíku a kyslík. (11)

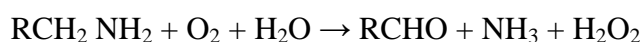
3.3.3.3 Apoplast

Mezi zdroje aktivních forem kyslíku v apoplastu patří enzymy oxalát oxidáza a aminoxidáza. Oxalát oxidáza katalyzuje přeměnu oxalátu na oxid uhličitý a peroxid vodíku podle reakce:



Exprese genů oxalát oxidázy je indukována vlivem vysoké koncentrace solí, salicylátem a methyljasmonátem.

Aminoxidázy jsou enzymy obsahující měď, katalyzující oxidaci široké řady biogenních aminů (mono-, di- a polyaminů) na odpovídající aldehyd za uvolnění amoniaku a peroxidu vodíku podle reakce:

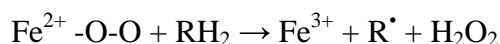


Tyto enzymy jsou homodimery s podjednotkami velikosti 70 – 95 kDa. Každá podjednotka obsahuje Cu (II) a chinonový kofaktor (topachinon, TPQ). Peroxid vodíku vznikající při oxidaci aminů může být přímo využitý peroxidázami buněčné stěny při lignifikaci a zesílení buněčné stěny jak během normálního růstu, tak v reakci na vnější podnět jako je zranění nebo patogenese. (11)

3.3.3.4 Buněčná stěna

Peroxidázy buněčné stěny produkují superoxidový radikál za spotřeby NADH v reakci závislé na manganatých iontech. Tvorba peroxidu vodíku peroxidázami buněčné stěny je závislá na pH. Například elicitor přicházející na buněčný povrch je rozpoznán příslušnou molekulou receptoru, která způsobuje otevření iontových kanálů. Pohyb iontů vyvolává přechodnou alkalizaci exocelulární matrix (ECM), což vede k aktivaci peroxidáz závislých na pH.

Mechanismus produkce peroxidu vodíku zahrnuje redukci sloučeniny obsahující Fe-O-O podle rovnice :



Při dostatečné zásobě reductantu se tvorba peroxidu vodíku udržuje po dlouhou dobu. Tento reductant se nedařilo identifikovat, ale ví se, že to není NADPH, NADH, askorbát, glutathion ani cystein.

Nejčastějšími biosyntetickými reakcemi v buněčné stěně závislými na peroxidu vodíku je tvorba fenylypropanoidních prekurzorů ligninu. (11)

3.4 *Ononis arvensis* (jehlice rolní)

(Fabaceae)

Polokeř, 10 až 80 cm vysoký, s krátkým dřevnatějícím oddenkem a dlouhými pevnými kořeny. Stonek je bohatě větvený, přímý nebo vystoupavý, dvouřadě protistojně chlupatý. Listy jsou střídavé, dolní trojčetné, horní jednoduché, oboje s palisty přirostlými k řapíku. Lístky jsou elipčité až podlouhlé, jemně žlaznaté, v horní polovině pilovité, s koncovým lístkem zřetelně řapíčkatým. Květy jsou jednotlivé, na kolcovitých brachyblastech (zřídka po 2 – 3) a v řídkých listnatých hroznech. Jsou obojaké, souměrné (motýlovité) a kromě pestíku pětičetné. Kalich je srostlolupenný, dvoupyský, pětiklanný, žlaznatý a v ústí krátce chlupatý, koruna volnoplátečná, nachová, sytě růžová až bělavá, s pavézou vně žláznatou, s křídly do poloviny její délky a se zobánkatým člunkem. Tyčinek je 10, jednobratrých. Semeník je svrchní, jednoplodolistový, stopkatý. Plodem je vejcovitý, šídlovitě zobánkatý, měkce chlupatý lusk zděli kalicha a s 1- 3 semeny, z nichž však dospívá jediné. Semeno je kulovité, hnědé a černavě skvrnitě. (19)

Roste po celé Evropě, u nás na suchých, kamenitých stráních, při cestách a na pasekách. (20) Dobře snáší vyšší obsah vápna i extrémy ve vlhkosti půdy. S oblibou roste na slunečných stanovištích. (21) *Ononis arvensis* se pěstuje na dobrých lehčích půdách přímým výsevem, na malých plochách i dělením trsů. (20)

Drogu tvoří sušený krátký oddenek s velmi dlouhým hlavním kořenem. (22) Kořen se může sbírat na jaře (březen, duben), ale zpravidla se sbírá na podzim (říjen). Suší se v sušárnách teplem, které nesní překročit 50 °C tak dlouho, až se dobře láme. Droga má slabý pach, chuť škrablavou, poněkud trpkou a nasládlou. (23) Zřídka bývá předmětem sběru kvetoucí nať – Herba ononidis (červen – září), čerstvá se používá v homeopatii. Sbírají se bylinné vrcholky a suší se běžným způsobem. Kořen je spolehlivé diuretikum. Poddruhy mají mírně rozdílné složení obsahových látek, a tím zčásti i účinnost (i podle lokalit výskytu). (21)

Účinnými látkami drogy jsou kromě **silice** (do 0,2%), obsahující mimo jiné anetol, karvon, mentol a menton, především glykosidicky vázané izoflavony s aglykony **formononetinem** (7-hydroxy-4'-methoxyizoflavon) a onogeninem. Izoflavonový glykosid **ononin** (formononetin-7-β-D-glukosid) má slabě estrogení

účinky. Dalšími obsahovými látkami jsou triterpen **α -onocerin** čili onokol a **ononid**, což je látka podobná glycyrrhizinu lékořice, má i slabé hemolytické účinky, kterými se vyznačují saponiny. Saponiny v pravém smyslu však neobsahuje. Močopudné účinky se připisují především silici, ale i dalším neprchavým látkám (účinný je totiž i odvar z drogy), hlavně flavonoidům (příp. jejich části) a ononidu. (19, 20, 21)

Běžný výklad vědeckého pojmenování jehlice bývá z latinského *onos* = osel, to značilo krmivo pro osly. Antická *ononis* sloužila Římanům a Řekům v léčitelství podobně jako dnešní, měla však i speciální indikace (např. mírnila bolesti zubů) a podle starých pověr chránila dobytek.

Droga nedráždí ledviny (na rozdíl např. od borůvkových plodů). S ohledem na svoje močopudné působení, tedy zasahování do látkové přeměny organismu, se droga lidově používá i proti revmatismu, při chronických kožních onemocněních a vodnatelnosti, dokonce i při vysokém krevním tlaku a jako žlučopudná a pro přítomnost silice a flavonoidů jako dezinficiens (zejména močových cest). Droga nemá vedlejší účinky, nedoporučuje se však užívat vyšší dávky a příliš často, příp. dlouho a samostatně. (21)

Při nemocech močového měchýře se obvykle kombinuje s diuretickými prostředky jako s jalovcem, plody petržele, libečkovým kořenem, violkou trojbarevnou a listy břízy, medvědice a s natí přesličky.

Droga je součástí léčebných čajových směsí *Species diureticae*, *Species cholagogae*, *Species urologicae* a *Betulan*. (23)

Nať má podobné užití i dávkování, uplatňuje se i na zle se hojící rány. V homeopatii se čerstvé bylinné části a kořeny sbírané v čase květu používají na přípravu esence, která se užívá zejména při písku v ledvinách. (21)

Droga *Ononidis radix* je oficiální v platném lékopise – ČL 2005, kde je jako matečná rostlina uvedena *Ononis spinosa* L. (jehlice trnitá). (24) A jak již bylo výše naznačeno, jehlice trnitá i jehlice rolní mají obdobné rozšíření i terapeutické vlastnosti. Jehlice trnitá se liší především přítomností četných tlustých a ostrých kolců na stoncích. (25)

3.5 Flavonoidy

Flavonoidy řadíme, jak už bylo řečeno v úvodu, mezi polyfenoly a můžeme je rozdělit do několika strukturních tříd, v závislosti na oxidačním stavu heterocyklu obsahujícího atom kyslíku. (3)

Přesněji řečeno jsou to deriváty fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný ve třech možných polohách, arylace v poloze 2 odpovídá flavanům, v poloze 3 isoflavanům a v poloze 4 neoflavanům. Vyskytují se jen v rostlinné říši, a to nejčastěji flavany, řidčeji isoflavany. Neoflavany se vyskytují vzácně a nemají terapeutický význam. (22)

Flavonoidy lze podle struktury dále dělit na flavony, flavonoly, flavanony, flavononoly, antokyanidiny, leukoantokyanidiny (hydroxyflavandioly), katechiny, chalkony a aurony. Složitost stavby flavonoidů je v tom, že existuje podle počtu a polohy hydroxylových a methoxylových skupin na obou aromatických kruzích A a B a podle napojení cukerných složek velké množství skutečných i možných obměn. (19)

V rostlinách se flavonoidy vyskytují převážně jako β -glykosidy. Sacharidovou složkou je nejčastěji glukóza nebo rhamnóza, může to být také glukuronová kyselina, galaktóza nebo jiný sacharid. Nejčastěji je připojen jeden glykosyl, někdy však jsou substituovány dva nebo tři hydroxyly polyfenolu. Aglykon nebo sacharidová složka může být dále substituována hydroxykyselinou, např. kyselinou jablečnou nebo gallovou. (3)

Flavonoidy jsou v cévnatých rostlinách obecně rozšířené a nacházejí se v rozmanitých pletivech všech ústrojů. Oxyflavony a oxyflavonoly jsou např. příčinou žlutého zbarvení květů, katechiny jsou v idioblastech, antokyany a flavonolové glykosidy jako ve vodě rozpustné pigmenty v buněčné šťávě vakuol atd. (19)

Methoxylované deriváty jsou lipofilní a vyskytují se v silicích. (22)

Obecně se soudí, že flavonoidy jsou významnou složkou metabolismu ve vztahu k redoxpotenciálu rostliny. (19)

Jen pro zajímavost a doplnění úvodu své diplomové práce uvádím, že z flavonoidů se v potravě nejčastěji vyskytují oligomerní proantokyanidiny a flavanoly (katechiny), průměrný denní příjem každé skupiny převyšuje 100 mg. Oligomerní proantokyanidiny, ve kterých je spojeno 2-11 flavanolových jednotek, nejčastěji vazbou C4-C8, mají výrazné adstringentní vlastnosti a vyskytují se zejména v ovoci, čokoládě a červeném víně. Katechiny přijímáme především v čaji, ovoci a čokoládě. Antokyany

jsou barevné pigmenty ovoce a vína, jejich denní příjem je velmi rozdílný, může dosáhnout až 200 mg. Flavonoly se vyskytují v ovoci, zelenině (cibule) i v nápojích (čaj), avšak v poměrně malém množství a tedy jejich denní příjem byl odhadnut pouze na 20 mg. Přesto patří, především kvercetin a jeho deriváty jako je rutin, k nejčastěji studovaným flavonoidům. Je to dáno jejich komerční dostupností a významnou biologickou aktivitou. Rutin se používá jako venofarmakum. Isoflavony se řadí mezi fytoestrogeny, vyskytují se především v sóji a na celkovém příjmu flavonoidů se podílejí jen z malé části. Flavanony z citrusového ovoce, stejně jako flavony a isoflavony, přispívají k průměrnému dennímu příjmu polyfenolů maximálně několika desítkami miligramů. (3)

Využití flavonoidů (zvaných též pro mnohostranný účinek na lidský organismus bioflavonoidy) je v terapii rozmanité. Jsou však dvě základní indikace, kde se uplatňují především, a to jako léky proti kornatění tepen a jako prostředky proti nepravidelnostem krevního oběhu. Flavonoidy podporují odolnost krevních vlásečnic, postižených např. při vysokém krevním tlaku, cukrovce a dalších nemocech. Jsou to látky upravující příznivě metabolismus starých lidí, a proto bývají součástí většiny geriatrických preparátů. Některé flavonoidy vykazují příznivý močopudný a antiseptický účinek, působí spasmolyticky, regenerují poškozenou jaterní tkáň atd. Flavonoidy se mohou uplatnit také tím, že zvyšují účinnost a dostupnost ostatních látek příslušné drogy. (19) Například potencují účinek vitamínu C. Mají i vlastnosti choleretické a cholagogní.

Kromě schopnosti flavonoidů normalizovat permeabilitu kapilár a schopnosti odstraňovat jejich lomivost se využívá terapeuticky též jejich antiedematosní (P-vitaminový účinek) a antihemorragické působení. S ionty Ca^{2+} totiž tvoří komplexní soli, brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Jsou inhibitory hyaluronidázy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi, jsou proto podpůrnými prostředky při léčení infekčních nemocí. (22)

Flavonoidy mají schopnost vylučovat volné radikály, které vznikají za různých okolností (např. anoxie, zánět, oxidace lipidů). Přitom antioxidační schopnost flavonoidů závisí na jejich afinitě k volným radikálům, a tím i na jejich struktuře. U některých se setkáváme s účinkem antialergickým či hepatoprotektivním (flavonolignany). Bylo zjištěno, že mohou snižovat hladinu cholesterolu v krvi, působit antibakteriálně, *in vitro* i antivirově. Některé flavonoidy vykazují antikancerogenní účinek a inhibují růst nádorových buněk *in vitro*. Většina flavonoidů působí *in vitro* též antimutageně. (26)

Účinné jsou glykosidy i aglykony. Používají se v čistém stavu (rutin, hesperidin), častěji jako drogy nebo jejich extrakty.

V rostlinách je hojně rozšířen již zmiňovaný, terapeuticky významný glykosid rutin, který se používá k léčení hemorragií, alergií, hypertenze a jako adjuvans při infekčních onemocněních. V oplodí nezralých citrusových plodů je obsažen hesperidin (vitamin P). Spolu s vitaminem C se používá při lomivosti kapilár, hemorrhagii a hypertenzi. Je asi desetkrát méně účinný než rutin. (22)

Mezi významnější flavonoidní drogy patří *Folium betulae*, *Folium crataegi* – *Flos crataegi* – *Folium crataegi cum flore*, *Radix ononidis*, *Flos stoechados*, *Flos sambuci*, *Flos tiliae*, dále tvoří účinné obsahové složky ve *Flos acaciae*, *Flos calendulae*, *Flos spiraeae*, *Flos lamii albi*, *Fructus cardui mariae*, *Herba violae tricoloris* a *Folium ribis nigri*. (20)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a chemikálie

Přístroje:

Laboratorní analytické váhy Sartorius PRLT A13
Spektrální kolorimetr CECIL 1000 SERIES
Autokláv P S 20A
Box s laminárním prouděním Tatran LF
Třepačka IKA[®] KS 260 basic
Třepačka Certomat[®] MO B.Braun Biotech International
Třepačka Heidolph instruments unimax 2010

Chemikálie:

Aceton R
Ethylester kyseliny octové R (ethylacetát)
Chlorid hlinitý RS1
Kyselina chlorovodíková RS
Kyselina octová ledová R 5% (V/V) v methanolu R
Methenamin R (5 g/l)
Síran sodný bezvodý R
Peroxid vodíku

4.2 Biologický materiál

K vypracování diplomové práce byla použita kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Ononis arvensis* L. v 57. -59. pasáži.

4.3 Kultivace rostlinných kultur

Tkáňové kultury byly kultivovány ve 100 ml Erlenmayerových baňkách, které byly pro kultivaci vymyty horkou vodou se saponátem, důkladně opláchnuty pitnou a destilovanou vodou a vysušeny v horkovzdušné sušárně při teplotě 200°C. Kovové pinzety byly omyty roztokem 96 % lihu denaturovaného benzínem, obaleny hliníkovou fólií a sterilizovány 2,5 hodiny při teplotě 200°C v horkovzdušné sušárně. Pipety obalené hliníkovou fólií byly sterilizovány v autoklávu 15 minut při 121°C.

Příprava živného média

Pro kultivaci byla použita živná půda dle Murashigeho a Skooga. (27)

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,440
KNO ₃	1,990
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,370
NH ₄ NO ₃	1,650
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,170
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02784
Na ₂ EDTA	0,03734
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,0223
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0115
H ₃ BO ₃	0,0062
KI	0,00083
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,000025
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,00025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,000025
Inositol	0,1
Hydrolyzát kaseinu	1,0
Glycin	0,0002
Kyselina nikotinová	0,0005
Pyridoxin	0,0005
Thiamin	0,001
Sacharóza	30,0

Množství jednotlivých komponent jsou uvedena v gramech a vztažena na 1 litr půdy. Stimulátorem růstu byla kyselina α -naftyloctová ve formě lihového roztoku (10 mg.l⁻¹). Připravená půda byla rozlita v množství cca 28 ml do Erlenmayerových baněk, do nichž byly předem umístěny papírové můstky (knoty). V případě suspenzních kultur byla půda rozdělena do baněk bez můstek. Hliníkovou fólií uzavřené baňky byly sterilizovány v autoklávu (t = 121°C po dobu 15 minut).

4.4 Příprava roztoků elicitoru

Byly připraveny tři roztoky peroxidu vodíku (H₂O₂) o různých koncentracích :

c₁ = 10 mmol/l – 2,5724 ml (2,8332 g) 3 % peroxidu vodíku se doplnilo do 100 ml vodou. 1ml tohoto zásobního roztoku se přidal do baňky s 25 ml media.

c₂ = 1,0 mmol/l – 0,25724 ml (0,28332 g) 3 % peroxidu vodíku se doplnilo do 100 ml vodou. 1 ml tohoto zásobního roztoku se přidal do baňky s 25 ml media.

c₃ = 0,1 mmol/l – 0,025724 ml (0,028332) 3 % peroxidu vodíku se doplnilo do 100 ml vodou. 1 ml tohoto zásobního roztoku se přidal do baňky s 25 ml media.

4.5 Kultivace a elicitace kultur

Pasážování, převádění tkáňové kultury do formy suspenzní a přidávání elicitoru k tkáňovým či suspenzním kulturám bylo prováděno v boxu s laminárním prouděním vzduchu, předem vysvíceným germicidní UV lampou, za dodržování podmínek aseptické práce. Byly užity vždy sterilní nástroje a sklo.

Kultivace kalusové kultury probíhala 3 až 4 týdny při teplotě 25°C a 16-ti hodinové světelné periodě. Suspenzní kultura, získaná mechanickým rozmělněním kalusu, byla kultivována po dobu 2 týdnů na třepačce při otáčkách 150 ot./min za stejných světelných a teplotních podmínek.

Elicitace byla prováděna následovně : Do 25 baněk bylo napipetováno po 1 ml příslušného roztoku elicitoru, 10 baněk sloužilo jako kontrola. 6 hod, 12 hod, 24 hod, 48 hod, 72 hod, 168 hod po aplikaci elicitoru bylo odebráno vždy 5 baněk zkušebních.

Baňky kontrolní byly odebrány po 24 hod a po 168 hod bez obsahu elicitoru vždy v počtu 5 baněk. Kalusové kultury byly z baněk vyjmuty a usušeny na filtračním papíře za laboratorních teploty. Usušené kalusy byly upráškovány pomocí třenky s těrkou a použity ke stanovení obsahu flavonoidů. Suspenzní kultury byly při odběru zfiltróvány a zachycené buněčné shluky byly usušeny na filtračním papíře a upráškovány.

4.6 Stanovení obsahu flavonoidů

Princip : (28)

Spektrofotometrické stanovení je založeno na reakci volných fenolických skupin aromatického jádra s chloridem hlinitým za vzniku barevných chelátových komplexů.

Postup stanovení : (29)

Ke stanovení obsahu flavonoidů byla využita metoda uvedená v ČL 97. Navážka upráškované kultury byla smíchána ve 100 ml baňce s 1 ml roztoku methenaminu R (5g/l), 20 ml acetonu R a 2 ml kyseliny chlorovodíkové RS a vařena pod zpětným chladičem 30 minut. Po zchlazení se roztok zfiltróval přes chomáček vaty. Droga i chomáček vaty se vařily ještě dvakrát s 20 ml acetonu R pod zpětným chladičem po dobu 10 minut. Po ochlazení se roztok zfiltróval vždy přes nový chomáček vaty. Spojené acetonové roztoky se zfiltróvaly přes filtrační papír do odměrné baňky a byly zředěny acetonem R, předem použitým k promytí baňky a filtru, na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převedlo do dělicí nálevky, přidalo se 20 ml vody R a protřepávalo se nejprve 15 ml a poté třikrát 10 ml ethylacetátu R. Spojené ethylacetátové vrstvy se pak ještě protřepávaly dvakrát s 50 ml vody R, zfiltróvaly se přes 10 g síranu sodného bezvodého R do odměrné baňky a zředily se ethylacetátem R na 50,0 ml. Takto byl připraven základní roztok.

Zkoušený roztok byl připraven smícháním 10,0 ml základního roztoku s 1 ml chloridu hlinitého RS1 a zředěním roztokem kyseliny octové ledové R 5% (V/V) v methanolu R na 25,0 ml.

Porovnávací roztok byl připraven zředěním 10,0 ml základního roztoku kyselinou octovou ledovou R 5 % (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Po 30 minutách byla změřena absorbance zkoušeného roztoku při maximu 425 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní tekutiny.

Obsah flavonoidů v procentech se vypočítal dle vzorce : $\frac{A \cdot 1,25}{m}$

A.....absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm

m.....navážka drogy v gramech

Byla provedena vždy tři paralelní stanovení. Ze zjištěných hodnot byl vypočten aritmetický průměr.

4.7 Stanovení ztráty sušením

U kultury odvozené z *Ononis arvensis* L. byla již dříve stanovena ztráta sušením lékopisnou metodou (30) a činí 6,5 %.

4.8 Statistické zpracování výsledků

Pro zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah flavonoidů byl použit *t-test* rozdílu dvou průměrů popsany v knize „Metody matematické statistiky“.

(31)

Pro testovací kritérium platí vztah :

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

t.....testovací kritérium

x₁.....aritmetický průměr kontrolního souboru

x₂.....aritmetický průměr pokusného souboru

s₁.....směrodatná odchylka kontrolního souboru

s₂.....směrodatná odchylka pokusného souboru

n₁.....počet členů kontrolního souboru

n₂.....počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení se stupněm volnosti vypočteným dle vzorce $v = n_1 + n_2 - 2$.

Vypočtená hodnota testovacího kritéria se porovná s příslušnou kritickou hodnotou $t(v)_p$ pro vypočtený stupeň volnosti v a zvolenou hladinou významnosti p . Je-li hodnota t větší než hodnota $t(v)_p$, je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti p .

Byla provedena vždy tři paralelní stanovení, pro $n_1 = n_2 = 3$ a $v = 4$. Pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ a pro 4 stupně volnosti je kritická hodnota $t(v)_p$ rovna 2,78. Z toho plyne, že výsledek je statisticky významný, je-li hodnota testovacího kritéria t větší než 2,78.

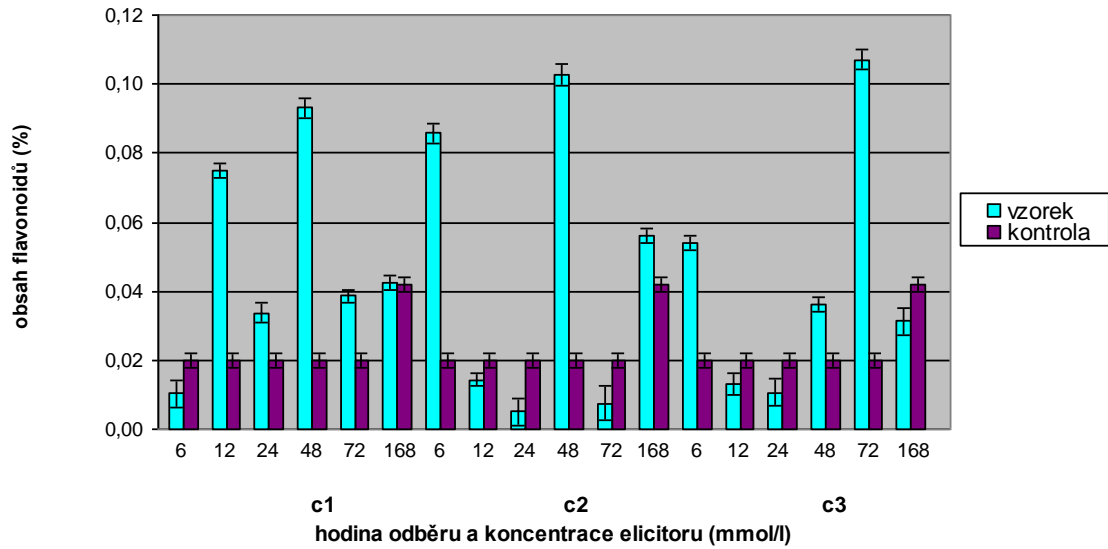
5 VÝSLEDKY

Tabulka č.1: Obsah flavonoidů (%) v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. v závislosti na koncentraci elicitoru a hodině odběru

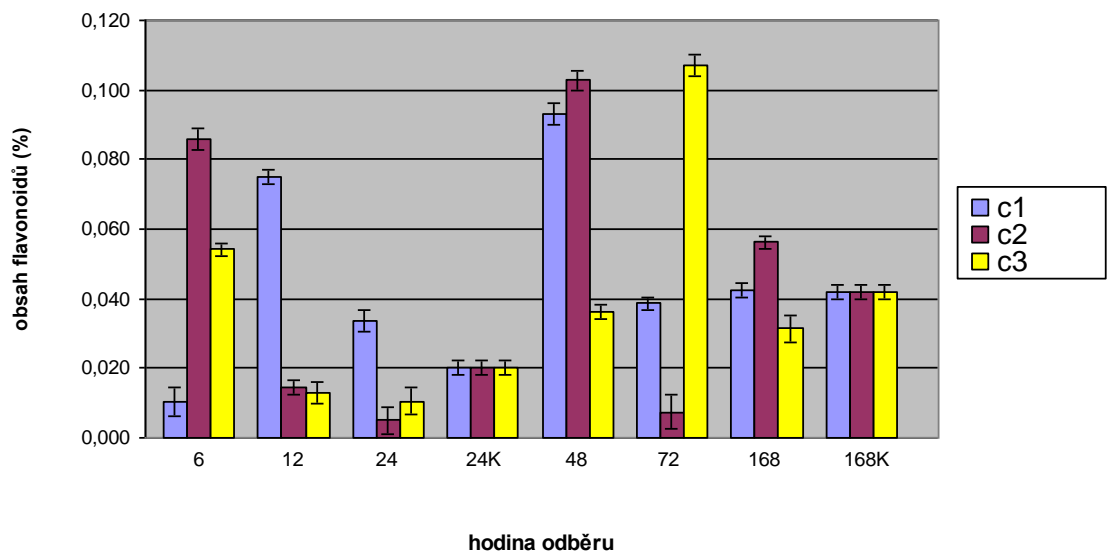
Koncentrace elicitoru (mmol/l)	Hodina odběru	Obsah flavonoidů (%)	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
c ₁ = 10,00	6	0,010	0,004	3,19
	12	0,075	0,002	27,38
	24	0,034	0,003	5,26
	24K	0,020	0,002	-
	48	0,093	0,003	28,57
	72	0,039	0,002	9,11
	168	0,042	0,002	0,36
	168K	0,042	0,002	-
c ₂ = 1,00	6	0,086	0,003	25,67
	12	0,014	0,002	2,97
	24	0,005	0,004	4,84
	24K	0,020	0,002	-
	48	0,103	0,003	32,32
	72	0,007	0,005	3,40
	168	0,056	0,002	7,19
	168K	0,042	0,002	-
c ₃ = 0,10	6	0,054	0,002	16,90
	12	0,013	0,003	2,86
	24	0,011	0,004	3,07
	24K	0,020	0,002	-
	48	0,036	0,002	7,87
	72	0,107	0,003	34,01
	168	0,031	0,004	3,29
	168K	0,042	0,002	-

Pozn.: K.....kontrola

Graf č. 1: Obsah flavonoidů (%) v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. v závislosti na čase u jednotlivých koncentrací elicitoru



Graf č.2: Porovnání obsahu flavonoidů (%) v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. po aplikaci různých koncentrací elicitoru v jednotlivých časových intervalech

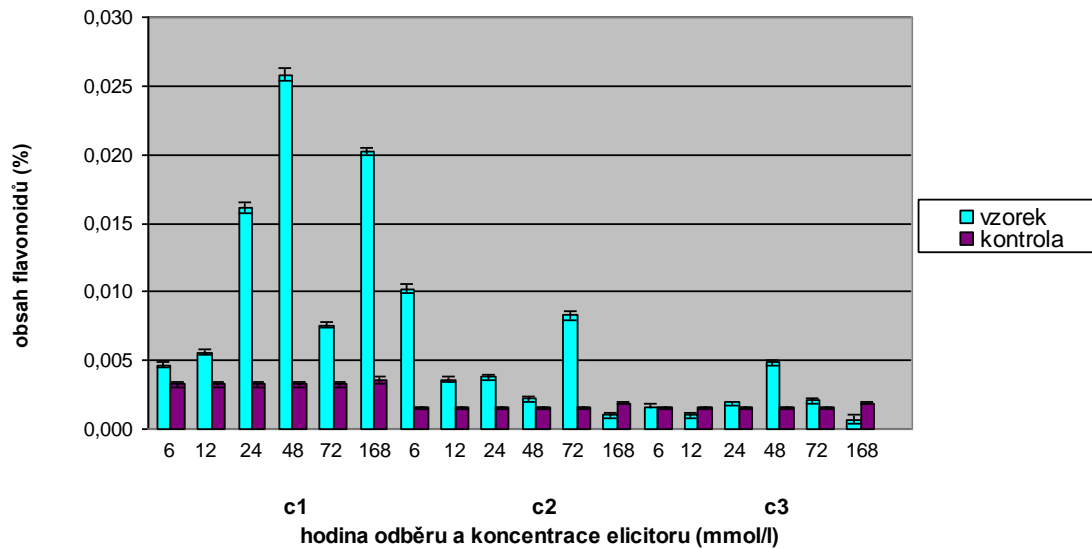


Tabulka č.2: Obsah flavonoidů (%) v suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. v závislosti na koncentraci elicitoru a hodině odběru

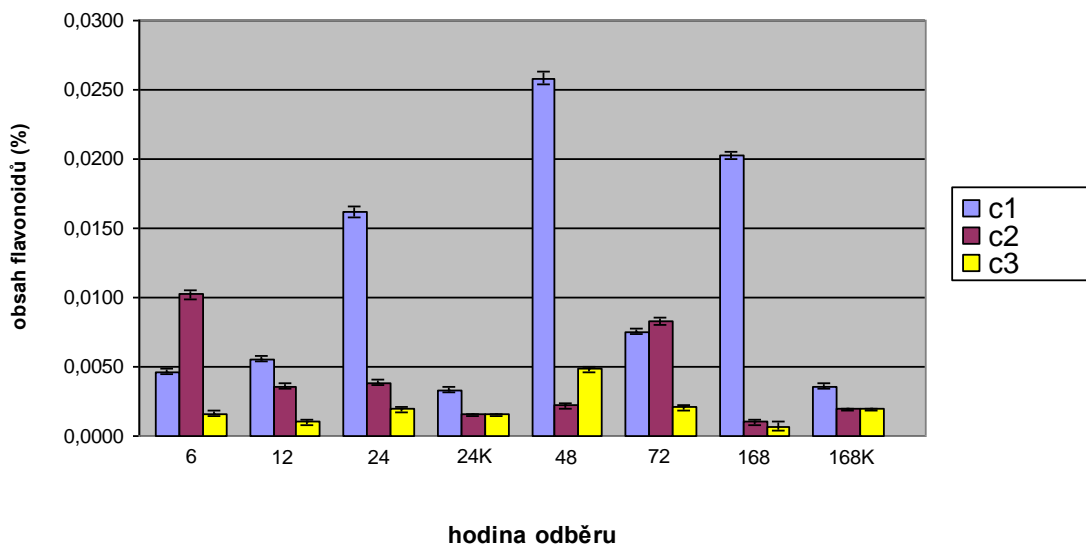
Koncentrace elicitoru (mmol/l)	Hodina odběru	Obsah flavonoidů (%)	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
c ₁ = 10,00	6	0,0046	0,0002	6,6
	12	0,0056	0,0002	11,3
	24	0,0162	0,0004	40,6
	24K	0,0033	0,0002	-
	48	0,0258	0,0005	59,1
	72	0,0076	0,0002	21,2
	168	0,0203	0,0003	65,4
	168K	0,0036	0,0002	-
c ₂ = 1,00	6	0,0102	0,0003	38,8
	12	0,0036	0,0002	13,0
	24	0,0038	0,0002	14,5
	24K	0,0015	0,0001	-
	48	0,0022	0,0002	4,2
	72	0,0083	0,0003	30,1
	168	0,0010	0,0002	5,6
	168K	0,0019	0,0001	-
c ₃ = 0,10	6	0,0016	0,0002	0,3
	12	0,0010	0,0002	3,2
	24	0,0020	0,0002	2,6
	24K	0,0015	0,0001	-
	48	0,0048	0,0002	20,8
	72	0,0021	0,0002	3,6
	168	0,0007	0,0003	5,3
	168K	0,0019	0,0001	-

Pozn.: K.....kontrola

Graf č.3: Obsah flavonoidů (%) v suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. v závislosti na čase u jednotlivých koncentrací elicitoru



Graf č.4: Porovnání obsahu flavonoidů (%) v suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. po aplikaci různých koncentrací elicitoru v jednotlivých časových intervalech



6 DISKUSE

Elicitace rostlinných kultur za účelem zvýšení produkce sekundárních metabolitů je v současné době dosti používaná metoda, zejména pro svoji jednoduchost.

Cílem této práce bylo zjistit vliv potenciálního elicitoru, peroxidu vodíku, na produkci flavonoidů kalusovou a suspenzní kulturou *Ononis arvensis* L.

Tkáňové kultury *Ononis arvensis* L. byly kultivovány na MS (Murashige a Skoog) médiu s přidavkem růstového regulátoru α -NAA (konc. 10 mg/l). Pokus byl prováděn na kalusových kulturách a kulturách suspenzních, získaných mechanickým rozmělněním kalusů. Ke kalusovým i suspenzním kulturám byl přidán 1 ml roztoku elicitoru o třech různých koncentracích: $c_1 = 10,00$ mmol/l, $c_2 = 1,00$ mmol/l a $c_3 = 0,10$ mmol/l. Elicitace probíhala 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Po uplynutí této doby byly kultury odebrány a usušeny za laboratorní teploty. Kontrolní vzorky byly odebrány po 24 a 168 hodinách. Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometriky dle ČL 97. (29)

V **kalusové kultuře** *Ononis arvensis* L. došlo ke statisticky významnému nárůstu obsahu flavonoidů u všech tří koncentrací testované látky, ale pokaždé jen v určitých hodinách odběru. V rámci koncentrace c_1 byl statisticky významně zvýšen obsah flavonoidů ve všech časových intervalech elicitace s výjimkou prvního a posledního odběru (tedy po 6 a 168 hod), nejvyšší nárůst byl pozorován po 48 hodinové elicitaci, a to o 365% (viz tab. č. 1, graf č. 1, 2). V případě koncentrace c_2 byl zaznamenán statisticky významný nárůst obsahu flavonoidů oproti kontrole pouze po 6, 48 a 168 hodinách elicitace, po 12, 24, 72 hod elicitace došlo dokonce ke statisticky významnému poklesu obsahu flavonoidů oproti kontrole. Nejvyšší nárůst produkce flavonoidů byl opět zjištěn po 48 hodinách, a to o 415%. Po aplikaci roztoku testované látky o koncentraci c_3 došlo ke statisticky významnému nárůstu obsahu flavonoidů opět pouze po 6, 48 a 72 hodinách elicitace. Po 72 hodinové elicitaci došlo k největšímu navýšení, a to o 435%. V ostatních hodinách elicitace došlo znovu ke statisticky významnému poklesu obsahu flavonoidů oproti kontrole. K maximálnímu nárůstu obsahu flavonoidů u kalusové kultury tedy došlo po 72 hodinové elicitaci roztokem látky o koncentraci c_3 (o 435%) (viz tab. č. 1, graf č. 1,2).

V **suspenzní kultuře** *Ononis arvensis* L. došlo ke statisticky významnému nárůstu obsahu flavonoidů u všech tří koncentrací testované látky. V rámci koncentrace

c_1 byl statisticky významně zvýšen obsah flavonoidů ve všech časových intervalech elicítace, a to o celkově vyšší hodnoty v porovnání s dalšími dvěma koncentracemi c_2 a c_3 . Po 24 hodinové elicítaci došlo k nárůstu obsahu flavonoidů o 391%, po 48 hodinách dokonce o 682% a ani po 168 hodinách elicítace nebyl nárůst zanedbatelný, produkce flavonoidů stoupla o 464%. V případě druhé koncentrace (c_2) byl zaznamenán statistický nárůst též ve všech časových intervalech elicítace, kromě elicítace po 168 hodinách, kdy byl naopak zjištěn statisticky významný pokles oproti kontrole. Nejvyšší nárůst obsahu flavonoidů byl naměřen hned po 6 hodinové elicítaci, a to o 580%, ale i po 72 hodinách elicítace byl nárůst dost vysoký, o 453% oproti kontrole. U koncentrace c_3 došlo ke statistickému nárůstu pouze po 48 a 72 hodinách elicítace, přičemž po 48 hodinách byl nárůst nejvyšší, a to o 220%. Naopak po 12 a 168 hodinách elicítace došlo ke statisticky významnému poklesu obsahu flavonoidů oproti kontrole. K maximálnímu nárůstu obsahu flavonoidů u suspenzní kultury tedy došlo po 48 hodinové elicítaci roztokem látky o koncentraci c_1 (o 682%) (viz tab. č. 2, graf č. 3,4).

Při porovnání získaných výsledků u **kalusové a suspenzní kultury *Ononis arvensis* L.** jsem došla k závěru, že ačkoliv po elicítaci kalusová kultura produkuje řádově vyšší obsah flavonoidů než kultura suspenzní, v suspenzní kultuře dochází k vyššímu nárůstu obsahu flavonoidů vůči kontrole. Což potvrzuje i to, že nejvyšší hodnota nárůstu obsahu flavonoidů, a to o 682%, byla pozorována právě u suspenzní kultury po působení elicitoru o koncentraci c_1 , po 48 hodinách elicítace. Navíc u suspenzní kultury je na první pohled viditelné, že nejvyšší produkci flavonoidů stimuluje oxidační působení peroxidu vodíku právě o koncentraci c_1 (tedy nejvyšší zkoušené, odpovídající 10 mmol/l), která zaznamenala jak statisticky významný nárůst obsahu flavonoidů ve všech hodinách elicítace, tak i celkově nejvyšší průměrnou hodnotu nárůstu obsahu flavonoidů v porovnání s ostatními koncentracemi. I u koncentrace c_2 je znatelný celkový nárůst obsahu flavonoidů ve všech hodinách elicítace s výjimkou poslední (po 168), ale průměr nedosahuje takového nárůstu jako v případě koncentrace c_1 . V případě koncentrace c_3 je nárůst omezen už jen na určité hodiny elicítace a není zdaleka tak vysoký jako u prvních dvou koncentrací (c_1 a c_2). Naproti tomu z naměřených hodnot u kalusové kultury by se sice dalo na první pohled odhadovat, že i zde má největší vliv na produkci flavonoidů stále koncentrace c_1 , ale hodnoty obsahu flavonoidů, jak už bylo řečeno, jsou celkově nižší oproti kontrole než hodnoty u suspenzní kultury, k nárůstu nedochází ve všech hodinách elicítace bez výjimek, a hlavně nejvyšší hodnotu nárůstu produkce flavonoidů (o 435%) v kalusové

kultuře nenajdeme překvapivě při této koncentraci, ale až u koncentrace c_3 . To mě přirozeně přinutilo k zamyšlení a při bližším zkoumání a porovnávání s koncentracemi c_2 a c_3 jsem nutně došla k závěru, že nárůst produkce flavonoidů u kalusové kultury při zvolených koncentracích nezávisí ani tak na výši koncentrace peroxidu vodíku jako spíše na hodině elicitace.

Peroxid vodíku samotný a zároveň v kombinaci s buthionin sulfoximinem (BSO) jako elicitory potenciálně ovlivňující produkci tropanových alkaloidů u nově založených kalusových kultur odvozených od rostliny *Datura meteloides* DC. ex Dunal (*Solanaceae*) testovala již P. Šimonová ve své diplomové práci. Její kultury byly pěstovány na základním médiu podle Murashigeho a Skooga (MS), zpevněném agarem (9,0 g/l) a s přidavkem růstových regulátorů, kterými byly kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) (1mg/l) a N^6 -benzyladenin (BA) (1 mg/l). K takto připraveným kulturám přidávala elicitory, peroxid vodíku a L-buthionin sulfoximin v různých koncentracích, na dobu 24, 72 a 168 hodin. Co se týče peroxidu vodíku zvolila stejné koncentrace tedy - 10 mmol/l, 1 mmol/l a 0,1 mmol/l. Hodnotila však přítomnost tropanových alkaloidů – atropinu, skopolaminu, i jejich prekurzorů tropinu a kyseliny tropové pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) a stejným způsobem byla analyzována i média, ve kterých byly kultury pěstovány. Cílem její práce bylo zjistit, zda iniciované oxidační působení peroxidu vodíku a zprostředkovaně i buthionin sulfoximinu vede ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů, v případě *Datura meteloides* k produkci tropanových alkaloidů. Tento vliv se jí však nepodařilo prokázat a musela konstatovat, že elicitory peroxid vodíku a buthionin sulfoximin nevyvolávají tvorbu sekundárních metabolitů a že kalusové kultury rostliny *Datura meteloides* DC. ex Dunal nejsou schopny produkovat tropanové alkaloidy jako obranné látky. (32) Narozdíl od P. Šimonové mohu konstatovat, že kalusové i suspenzní kultury rostliny *Ononis arvensis* L. dokáží na oxidační stres vyvolaný peroxidem vodíku reagovat zvýšenou tvorbou sekundárních metabolitů (flavonoidů).

Na závěr tedy shrnuji, že v této práci byla prokázána elicitacní aktivita peroxidu vodíku na produkci flavonoidů kalusovou a suspenzní kulturou *Ononis arvensis* L. Nejvyššího obsahu v kalusové kultuře bylo dosaženo po 72 hodinové elitaci testovanou látkou o koncentraci c_3 (o 435%). V suspenzní kultuře byl zaznamenán největší nárůst obsahu flavonoidů po 48 hodinové elitaci při použití koncentrace c_1 (o 682%).

Ovšem pro reprodukovatelnost výsledků by bylo třeba pokus zopakovat.

7 ZÁVĚR

Výsledky práce lze shrnout následovně:

- 1) Statisticky významný nárůst obsahu flavonoidů v **kalusové kultuře** *Ononis arvensis* L. po aplikaci peroxidu vodíku byl zjištěn u:

c₁ (10,00 mmol/l).....po 12, 24, 48 a 72 hodinách

c₂ (1,00 mmol/l).....po 6, 48 a 168 hodinách

c₃ (0,10 mmol/l).....po 6, 48 a 72 hodinách

- 2) Statisticky významné zvýšení obsahu flavonoidů v **suspenzní kultuře** *Ononis arvensis* L. po aplikaci testované látky bylo zjištěno u:

c₁ (10,00 mmol/l).....po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách

c₂ (1,00 mmol/l).....po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách

c₃ (0,10 mmol/l).....po 48 a 72 hodinách

- 3) Ke statisticky významnému snížení obsahu flavonoidů došlo v **kalusové kultuře** *Ononis arvensis* L. po aplikaci peroxidu vodíku u:

c₁ (10,00 mmol/l).....po 6 hodinách

c₂ (1,00 mmol/l).....po 12, 24 a 72 hodinách

c₃ (0,10 mmol/l).....po 12, 24 a 168 hodinách

- 4) Ke statisticky významnému poklesu obsahu flavonoidů došlo v **suspenzní kultuře** *Ononis arvensis* L. po aplikaci testované látky u:

c₂ (1,00 mmol/l).....po 168 hodinách

c₃ (0,10 mmol/l).....po 12 a 168 hodinách

- 5) U kalusové kultury *Ononis arvensis* L. *in vitro* bylo dosaženo maximálního zvýšení produkce flavonoidů po 72 hodinové elicitaci u koncentrace c₃ (o 435%), u suspenzní kultury po 48 hod. elicitace u konc. c₁ (o 682%).

8 SEZNAM LITERATURY

- 1) Kováč J.: Explantátové kultury rostlin. Univerzita Palackého, Olomouc, 1995, 1, 8, 13-17, 23, 51-52, 79-82
- 2) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty. Karolinum, Praha, 2001, 75-80
- 3) Slanina J., Táborská E.: Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. Chemické listy 98, 2004, 239-245
- 4) Tůma J., Tůmová L.: Fyziologie rostlin. Gaudeamus, Hradec Králové, 1998, 242-244
- 5) Beiderbeck R., Reichling J.: Pflanzenzellkulturen in Forschung und Praxis, Teil V/2. Biologie, 5, 1989, 453-464
- 6) Strnad M., Peč P., Beck E.: Advances in regulation of plant growth and development. Peres Publishers, Praha, 1999, 251-258
- 7) Montesano M., Brader G., Pavla E. T.: Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. Molecular Plant Pathology, 4, 2003, 73-79
- 8) Sanches-Sampedro M. A., Fernandez-Tarrago J., Corchete P.: Yeast extract and methyljasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Journal of Biotechnology, 119 (1), 2005, 60-69
- 9) Procházka S., Macháčková I., Krekule J. a kol.: Fyziologie rostlin. Academia, Praha, 1998, 226, 239-284, 412-430
- 10) Ledvina M.: Biochemie. Karolinum, Praha, 1993, 256
- 11) Piterková J., Tománková K., Luhová L. a kol.: Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. Chemické listy 99, 2005, 455-466
- 12) Härndahl U., Hall R. B., Osteryoung K. W. et al.: The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. Cell Stress & Chaperones, 2, 1999, 129-138
- 13) Gloser J.: Fyziologie rostlin. Masarykova univerzita, Brno, 1998, 72-73
- 14) White P. J.: Calcium channels in higher plants. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes, 1465 (1-2), 2000, 171-189

- 15) Desikan R., Neill S. J., Hancock J. T.: Hydrogen peroxide- induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free radical biology and medicine*, 28 (5), 2000, 773-778
- 16) Grinna L. S.: Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney. *Mechanisms of Ageing and Development*, 6, 1977, 197-205
- 17) Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F.: Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53, 2002, 1227-1236
- 18) <http://www.cropsoil.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm> - staženo 27. 11. 2006
- 19) Jirásek V., Starý F.: Atlas léčivých rostlin. SPN, Praha, 1989, 21, 29
- 20) Tomko J. a kol.: Farmakognózia, učebnica pre farmaceutické fakulty. Osveta, Martin, 1999, 185-186
- 21) Kresánek J., Krejča J.: Atlas liečivých rastlín a lesných plodov. Osveta, Martin, 1982, 248-249
- 22) Hubík J., Dušek J., Spilková J. a kol.: Obecná farmakognosie II, Sekundární látky. SPN, Praha, 1989, 31-34, 36
- 23) Korbelař J., Endris Z.: Naše rostliny v lékařství. Avicenum, Praha, 1981, 172-173
- 24) Kolektiv autorů: Český lékopis 2005. 1.vydání, sv. 3, Grada Publishing a. s., Praha, 2005, 2042
- 25) Jirásek V., Starý F.: Kapesní atlas léčivých rostlin. SPN, Praha, 1989, 140
- 26) Bruneton J.: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medical Plants. Lavoisier Publishing, New York, 1999, 322-325
- 27) Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Journal of Plant Physiology*, 15, 1962, 473
- 28) Dušek J. a kol.: Praktická cvičení z farmakognosie. Karolinum, Praha, 2002, 22
- 29) Kolektiv autorů: Český lékopis 1997. 1. vydání, sv. 3, Grada Publishing, spol. s. r. o., Praha, 1997, 2698-2699
- 30) Kolektiv autorů: Československý lékopis. 4. vydání, sv. 1,2, Avicenum, Praha, 1987, 76, 100, 807-809
- 31) Reisenauer R.: Metody matematické statistiky. SNTL, Praha, 1970, 78-81
- 32) Šimonová P.: Explantátové kultury vyšších rostlin 24 (Diplomová práce). FaF UK, Hradec Králové, 2005

9 ABSTRAKT

Magdalena Špinlerová

Kultury léčivých rostlin *in vitro* (II)

Abstrakt

V diplomové práci jsem se zabývala kultivací rostlinných kultur *in vitro*. Sledovala jsem vliv oxidačního stresu, navozeného působením peroxidu vodíku (v koncentracích 10 mmol/l, 1 mmol/l a 0,1 mmol/l), na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. Obsah flavonoidů jsem stanovovala pomocí fotometrické metody. Byla prokázána elicitální aktivita všech použitých koncentrací peroxidu vodíku na produkci flavonoidů kalusovou a suspenzní kulturou *Ononis arvensis* L.

Magdalena Špinlerová

Cultures of medicinal plants *in vitro* (II)

Abstract

This thesis deals with the plant cultivation *in vitro*. I studied the influence of oxidative stress, which was caused by the action of hydrogen peroxide (in concentrations 10 mmol/l, 1 mmol/l and 0,1 mmol/l), on the production of flavonoids in the callus and suspension cultures of *Ononis arvensis* L. The assay of flavonoids was determined by means of the photometric method. I proved the eliciting effect of hydrogen peroxide in all used concentrations on the production of flavonoids by the callus and suspension cultures of *Ononis arvensis* L.