

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakognozie



Abiotická elicitační explantátové kultury

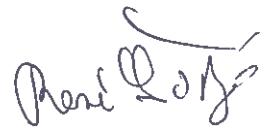
Rheum palmatum L.

René Šostý

- | | | |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| Vedoucí katedry | : | Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc. |
| Vedoucí diplomové práce | : | PharmDr. Marie Kašparová, PhD. |
| Oponent | : | Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc. |

Úvodem své diplomové práce bych chtěl poděkovat vedoucí diplomové práce **PharmDr. Marii Kašparové, PhD.** za odborné vedení, cenné rady a připomínky, ochotu a všeestrannou pomoc při jejím zpracování.

**Prolašuji, že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a použil jen
uvedenou literaturu.**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "René Šoltýs". The signature is fluid and cursive, with a prominent "S" at the beginning.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1. ÚVOD | 3 |
| 2. CÍL PRÁCE | 4 |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST | 5 |
| 3.1. Reveň dlanitá – <i>Rheum palmatum</i> L. | 5 |
| 3.1.1. Botanický popis rostliny | 5 |
| 3.1.2. Původ a výskyt | 5 |
| 3.1.3. Způsob pěstování | 7 |
| 3.1.4. Sběr a úprava drogy | 7 |
| 3.1.5. Charakteristika drogy | 7 |
| 3.1.6. Obsahové látky | 8 |
| 3.1.6.1. Anthracenové deriváty | 8 |
| 3.1.6.2. Třísloviny | 10 |
| 3.1.6.3. Vedlejší a balastní látky | 10 |
| 3.1.7. Farmakologické účinky a použití drogy | 11 |
| 3.1.8. Nežádoucí účinky drogy | 13 |
| 3.2. Rostlinné kultury <i>in vitro</i> | 14 |
| 3.2.1. Základní termíny | 14 |
| 3.2.2. Klasifikace rostlinných explantátů | 15 |
| 3.2.3. Vlastnosti kultur rostlinných explantátů | 16 |
| 3.2.4. Podmínky kultivace rostlinných explantátů | 17 |
| 3.2.4.1. Složení živných médií | 17 |
| 3.2.4.2. Fyzikální podmínky kultivace | 19 |
| 3.2.5. Etapy kultivace explantátových kultur | 20 |
| 3.2.6. Fáze růstu buněčných kultur | 22 |
| 3.2.7. Buněčné suspenzní kultury | 23 |
| 3.2.8. Tvorba sekundárních metabolitů | 24 |
| 3.2.9. Využití explantátových kultur | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3. Elicitace | 25 |
| 3.3.1. Charakteristika elicitačního procesu, stres, fytoalexiny | 25 |
| 3.3.2. Elicitory | 25 |
| 3.3.2.1. Biotické elicitory | 26 |
| 3.3.2.2. Abiotické elicitory | 26 |
| 3.3.3. Podmínky elicitačního procesu | 27 |
| 3.3.4. Mechanismus účinku elicitorů | 28 |
| 3.4. Težké kovy | 30 |
| 3.4.1. Minerální výživa | 30 |
| 3.4.2. Toxicita těžkých kovů | 31 |
| 3.4.3. Železo | 32 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 35 |
| 4.1. Chemikálie | 35 |
| 4.2. Přístroje | 35 |
| 4.3. Rostlinný materiál | 36 |
| 4.4. Stanovení ztráty sušením | 36 |
| 4.5. Kultivace tkáňové kultury | 37 |
| 4.5.1. Kultivační nádoby a nástroje | 37 |
| 4.5.2. Příprava živného média | 37 |
| 4.5.3. Pasážování a kultivace | 39 |
| 4.6. Elicitace | 39 |
| 4.6.1. Příprava roztoků elicitoru | 39 |
| 4.6.2. Elicitace a odběr kultur | 40 |
| 4.7. Stanovení antracenových derivátů | 41 |
| 4.7.1. Princip stanovení | 41 |
| 4.7.2. Postup stanovení | 41 |
| 4.7.3. Sestrojení kalibrační křivky | 42 |
| 4.8. Statistické vyhodnocení | 44 |
| 5. VÝSLEDKY | 46 |
| 5.1. Tabulky | 46 |
| 5.2. Grafy | 48 |
| 6. DISKUSE | 49 |
| 7. ZÁVĚR | 53 |
| 8. SEZNAM LITERATURY | 54 |

1. ÚVOD

Přírodní zdroje, zejména léčivé rostliny, jsou nedílnou součástí léků již od starověku. Lékárníci i lékaři využívali části rostlin k přípravě léčivých čajů, kapek, sirupů a mastí. Během vývoje se lékárníci naučili z rostlin izolovat čisté látky a posléze je připravovat synteticky. Postupně o léčivé rostliny zájem poněkud poklesl. V současné době je obrovský zájem o vše přírodní a také oblast výzkumu a užívání léčivých rostlin zažívá renesanci.

Léčivé rostliny se v dnešním pohledu často používají jako surovina pro průmyslovou izolaci účinných, chemicky čistých látek nebo jejich souhrnů. Je tomu tak u všech obsahových látek, jejichž syntéza není známá, nebo je-li známá, je ekonomicky nevýhodná. Tyto se potom užívají přímo, nebo slouží jako výchozí surovina pro chemické polosyntézy, jimiž se obměňováním struktury vytvářejí látky nové, často s významnějším terapeutickým účinkem.

Rostlinný materiál pro další zpracování se získává sběrem. Bohužel se zhoršuje kvalita životního prostředí, která má vliv na výtěžnost při pěstování léčivých rostlin, ale počet lidí stále roste a tím stoupá poptávka po kvalitních přírodních surovinách pro přípravu kvalitních přírodních léků v dostatečném množství. Proto se uchylujeme k alternativním variantám pěstování léčivých rostlin.

Jednou z těchto variant je biotechnologické pěstování. Jde o kultivaci *in vitro* rostlinných explantátů, kdy metabolity mohou být produkovány a kontrolovány za daných podmínek, bez nežádoucích příměsí a s vysokým stupněm homogenity kontinuálně během celého roku (1,2).

Při kultivaci *in vitro* se také snažíme najít takové postupy, které umožní zvýšit produkci. Jednou z metod je elicitače. Využívá vlastnosti rostlin, či buňek kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty kaskádou obranných reakcí s následným zvýšením produkce sekundárních metabolitů (3). Tato diplomová práce se zabývá aplikací metody abiotické elicitačce na konkrétní rostlině s konkrétním stresorem.

2. CÍL PRÁCE

2.1. Seznámit se s principy a postupy při kultivaci rostlinných tkáňových kultur *in vitro*.

2.2. Pozorovat vliv působení různých koncentrací síranu železnatého na produkci anthracenových derivátů v explantátové kultuře *Rheum palmatum L.* *in vitro* v několika časových rozmezích.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Reveň dlanitá – *Rheum palmatum* L.

3.1.1. Botanický popis rostliny

Rheum palmatum L., je vytrvalá rostlina výšky přes 2 metry, s mohutným, tlustým a řepovitým oddenkem, s dlouhými, rozvětvenými, vedlejšími kořeny a oddenkovými hlízami. *Rheum palmatum* L. patří do čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*). Velké, šťavnaté a hluboce pětilaločnaté listy s peřenoklanými až peřenodílnými úkrojky jsou dlouze řapíkaté a široce srdčité, vytváří přízemní růžici. Lodyha je červenohnědá, proužkovaná, dutá a je zakončena latou nebo spíše chomáčem květů, vyrůstajících z paždí korunovitých listennů. Oboupohlavný květ je bělavé nebo načervenalé barvy, plodem je trojkřídlá nažka, až 10 mm dlouhá a 7 mm široká, hnědé barvy. Kvete v červenci a v srpnu (4,5,6).

3.1.2. Původ a výskyt

Jde o rostlinu domácí ve vysokých horách v Číně a Tibetu. K farmaceutickým účelům se dnes pěstuje v některých evropských zemích i u nás (7).

Rheum palmatum L. - *Polygonaceae*



3.1.3. Způsob pěstování

Rostlinu pěstujeme v hluboké vápnité, přiměřeně vlhké zahradnické výživné půdě, obdělávané až do půlmetrové hloubky a dostačně pohnojené. Volíme mírně zastíněné místo chráněné proti větru. Rozmnožujeme ji semeny nebo dělením trsů. Semena zasíváme zpravidla na jaře do bedýnek nebo do pařeniště, přikryjeme hlínou a udržujeme vlhkost a stín. Jakmile vyrostou první páry listů, rostlinky přesazujeme. Vegetativně je lepší rozmnožovat na podzim. Vysazujeme asi na 150 cm vzdálenost (4,5).

3.1.4. Sběr a úprava drogy

Oddenky s kořeny se zpravidla sbírají ve třetím až pátém roce pěstování na podzim po dozrání semen, případně na jaře před rašením. Sklízí se loupané, neloupané nebo jen kúra. Silnější kousky nařežeme po délce. Sušíme pořezané na kousky asi 10 cm dlouhé, při teplotě do 50 °C. Správně usušená droga je na lomu žlutočervené barvy. Skladuje se v suchu a chráníme ji před hniliobou a škůdci (4,5).

3.1.5. Charakteristika drogy

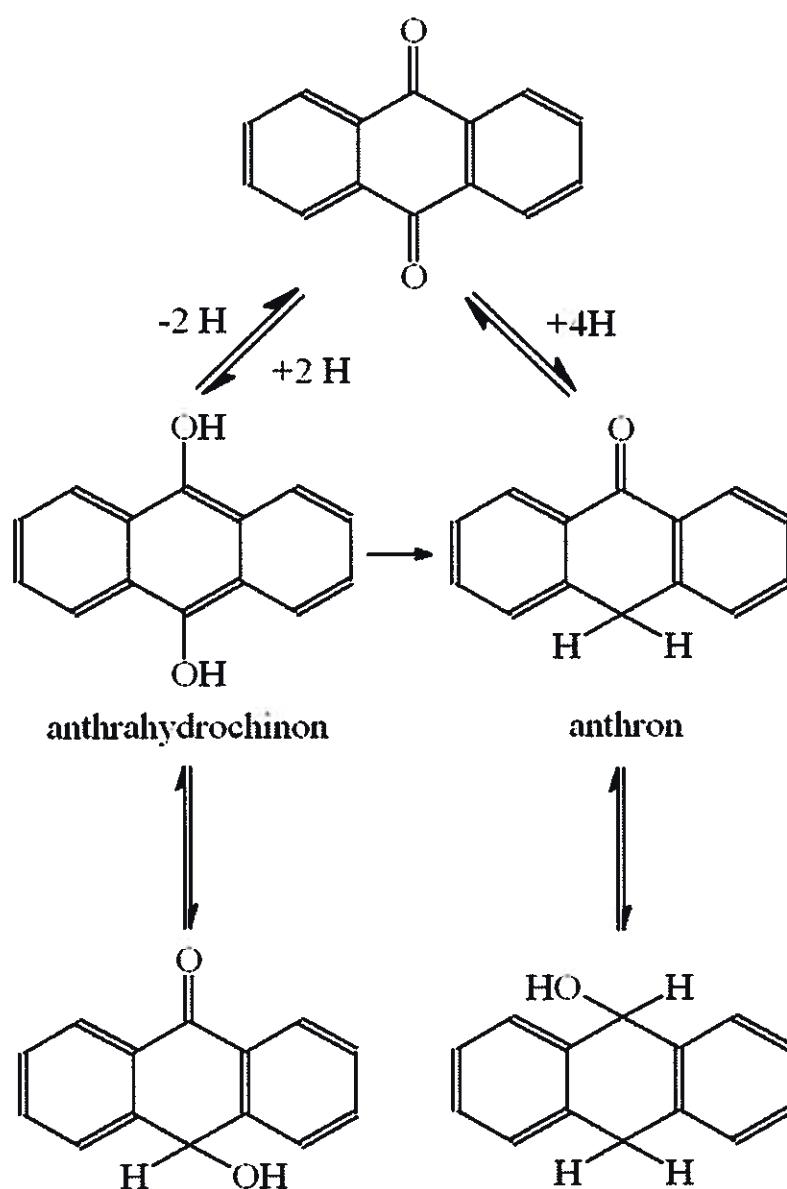
Drogu tvoří usušené celé nebo řezané kořeny a oddenky druhu *Rheum palmatum L.*, *Rheum officinale BAILL.*, kříženců obou druhů nebo jejich směs. Podzemní části jsou většinou rozřezané, zbavené stonků a zevní vrstvy kúry s postranními kořínky. Droga má zvláštní aromatický zápach, hořkou, kořenitě natrpkou chuť. Při žvýkání vrže mezi zuby (8,9).

3.1.6. Obsahové látky

3.1.6.1. Anthracenové deriváty

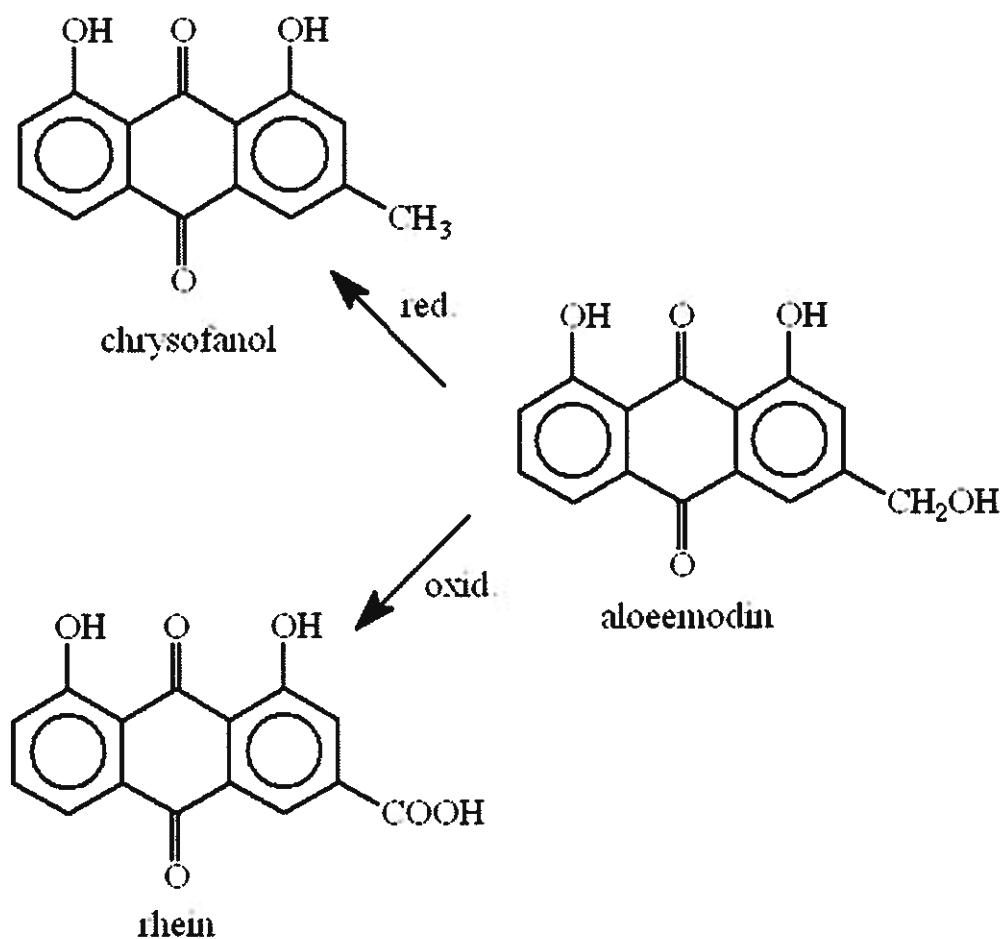
Droga obsahuje 3 -12 % anthracenových derivátů přítomných v oxidovaných (anthrachinony) i redukovaných (anthranoly, anthrony, dianthrony), převážně glykosidně vázaných formách. Poměr oxidovaných i redukovaných forem je přibližně 1 : 1. Při skladování klesá podíl redukovaných forem, které se oxidují na anthrachinony (7).

Schéma oxidačně - redukčních pochodů :



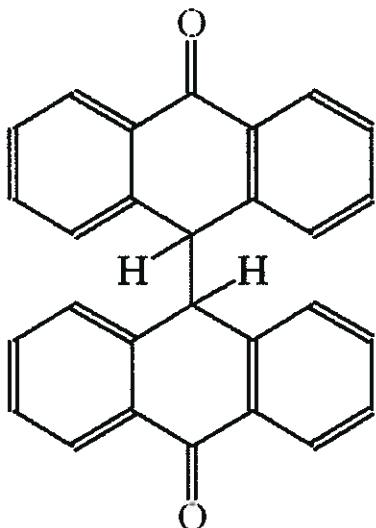
Rozložení anthraglykosidů v droze je nestejnoměrné. Nejvyšší obsah účinných látek bývá ve spodních a vnějších částech oddenku, kde jsou uloženy v buňkách dřeňových paprsků a v okolí kamibia. Mladší části obsahují více volných anthracenových derivátů, ve starších převažují glykosidy. Celkový obsah účinných látek je největší v době květu. Podíl volných derivátů mírně roste během úpravy a skladování v důsledku enzymatické hydrolýzy (7).

Struktury hlavních antrachinonů :



Mezi hlavní volné antrachinony patří : aloemodin, chrysophanol, rhein, (rheum) emodin, fyscion a jejich anthrony a dianthrony (rheidin A, B, C, sennidin A, B, C, aloemodindiantron, difysciondiantron, dichrysofanoldiantron, frangulaemodindiantron). Tyto struktury jsou vázány na cukernou složku (7).

Struktura diantronu :



Hlavní monoglykosidy jsou : aloeemodin-8- β -D-glukosid, chrysophanein, rhein-8-monoglukosid, rheochrysin, rheumemodinmonoglukosid. Hlavní diglykosidy jsou : chrysofanoldiglukosid, aloemodindiglukosid, rheindiglukosid (7).

3.1.6.2. Třísloviny

Významný je i obsah tříslovin. Řadíme je mezi tannoglykosidy ze skupiny hydrolyzovatelných tříslovin, hlavně glukogallin. Jejich obsah v droze se pohybuje okolo 5 – 10 % (7).

3.1.6.3. Vedlejší a balastní látky

Z vedlejších a balastních látek byly v droze nalezeny amorfni pryskyřice, flavonolové glykosidy (rutin), organické kyseliny volné (jablečná, štavelová, jantarová) i ve formě solí , cukry, škrob, pektin, mastný olej, fytosteroly a enzymy (7).

3.1.7. Farmakologické účinky a použití drogy

Pro farmaceutické účely se používá droga pocházející z matečné rostliny *Rheum palmatum* L. a *Rheum officinale* BAILL. nebo jejich kříženců (8). Zcela nepřípustné je použití kořenů a od- denků ze sekce *Rhaponticum* (*Rheum rhabarbarum* L., *Rheum rha- ponticum* L.), které navíc obsahují estrogeně účinný derivát stilbe- nu rhabonticin (7).

Droga vykazuje laxativní, adstringentní a stomachické účinky. Efekt je závislý na dávce. V terapii se využívá především při poru- chách trávicího ústrojí. Nejčastějšími indikacemi jsou průjem, zácpa, nechutenství a dyspeptické stavy.

Pro svou hořkou chuť se používá jako stomachikum v dávce přibližně 0,2 g při poruchách zažívání a nechutenství.

Adstringentní účinek, daný obsahem tříslovin, se projeví v malých dávkách okolo 0,5 g. V těchto malých dávkách lze drogu použít jako antidiarhoikum. Třísloviny srážejí bílkoviny, tvoří s nimi ve vodě nerozpustné sloučeniny rezistentní vůči proteolytickým en- zymům. Ochranný koagulační film na sliznici zabraňuje pronikání vody a škodlivých látek, čímž urychluje hojení. Terapeuticky se třísloviny užívají při léčbě zánětů, hemoroidů, menších spálenin a omrzlin, střevních a žaludečních průjmů. Používají se také jako an- tidota při otravě těžkými kovy (7).

Ve vyšších dávkách kolem 1 g působí droga laxativně vlivem obsahu anthracenových derivátů.

Glykosid je jen transportní formou vlastního účinného aglykonu, jehož spojením s cukry klesá rozpustnost glykosidů v lipidech a tím i resorpce v žaludku a tenkém střevě. Aglykon je v tlustém střevě uvolněn hydrolytickou aktivitou střevní mikroflóry. Směsi různých glykosidů působí silněji než čisté látky v odpovídajících množstvích. Mechanismus účinku spočívá v dráždění sliznice tlustého střeva s následným zvýšením peristaltických pohybů. Účinější (dráždivější) jsou redukované formy – anthrony, avšak pro terapii jsou výhodnější formy oxidované, u nichž je nižší riziko výskytu nežádoucích účinků (krvavé průjmy, dávení, bolesti). Laxativní účinek nastupuje během 6 – 12 hodin (7).

Antraglykosidům a anthrachinonům přírodního původu jsou tradičně připisovány zejména laxativní účinky. Výzkumy zaměřené na nejrůznější biologické účinky však ukazují, že spektrum působení těchto látek je výrazně širší. Některé anthrachinony působí antibakteriálně, antifungálně, mají antivirové a repellentní účinky. Vykazují také působení mutagenní, kancerogenní a antineoplastické, které je velmi často podmíněno dobrou schopností anthrachinonů vázat se na nukleové kyseliny. V některých případech se anthrachinony neváží na již vytvořené nukleové kyseliny, ale přímo inhibují jejich syntézu (10).

3.1.8. Nežádoucí účinky drogy

Redukované formy anthracenových derivátů jsou silně dráždivé, proto mohou způsobit obtíže, které se projevují silnými bolestmi, krvavými průjmy a dávením. Tyto potíže se však objevují jen zřídka. Při chronickém používání vyvolávají anthrachinonová laxativa tmavé zbarvení sliznice tlustého střeva (melanosis coli), které zdraví neohrožuje a po vysazení laxativ obvykle vymizí. Droga také způsobuje přechodné zbarvení moči, které je neškodné.

Pravidelné užívání projímadel vede k vypěstování návyku, neméně závažné je vyhasínání defekačního reflexu, které může vyústit až v úplnou atonii tlustého střeva.

Droga je kontraindikována u zánětlivých onemocnění trávicího traktu, v těhotenství a laktaci (vylučuje se do mateřského mléka) a vzhledem k vysokému obsahu šťavelanů při urolitiáze. Kyselina štavelová se váže s vápníkem v krvi za vzniku nerozpustných vápeno-štavelových krystalů, které se mohou ukládat v ledvinách a způsobovat ledvinové kameny. Nedoporučuje se podávání dětem mladším 12 let (10).

Na základě těchto okoliností je zřejmé, že používání drogy má svá rizika a proto je důležité indikovat ji pouze v oprávněných případech, které nelze zvládnout úpravou režimu či jinými šetrnějšími metodami (11).

3.2. Rostlinné kultury *in vitro*

3.2.1. Základní termíny

- **Rostlinný explantát** - každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů, odebraný buď z intaktní rostliny nebo z již existující kultury s cílem pěstovat jej v podmínkách *in vitro*.
- **Intaktní rostlina** - rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách.
- **Kultura rostlinných explantátů** - rostlinné explantáty pěstované po určitou dobu *in vitro*.
- **Kultivace *in vitro*** - pěstování rostlinného materiálu v podmínkách co nejúplněji definovatelných po stránce chemické i fyzikální a zabraňujících nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organismy a buňkami.
- **Subkultivace, pasážování** - přenos celé kultury nebo její části (očka, inkula) do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat či zesílit růst kultury po další subkultivační interval. Subkultivační interval je doba mezi dvěma pasážováními.
- **Kalus, zával, svalec** - neorganizované pletivo vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny; pletivo proliferující na povrchu nenádorových primárních explantátů a schopné subkultivace.
- **Totipotence** - schopnost rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* obnovit v průběhu diferenciаčních procesů specializované funkce a postupně regenerovat ve fertilní rostlinu; umožňuje realizaci genetických změn vyvolaných v jednotlivých buňkách na úrovni celého organisu.
- **Diferenciace** - chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech spočívající v aktivaci či inaktivaci určitých genů, jimiž se odlišily od tzv. eumeristematického stavu a získaly jinou specializaci. Opačný proces je nazýván dediferenciace.

- **Dediferenciace, embryonizace** - chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech, na jejichž základě získávají již specializované zralé buňky vlastnosti typické pro eumeristematický stav.
- **Rozpadavost kultur** - schopnost kultur se rozpadat na menší shluky buněk či volné buňky a dále růst (1).

3.2.2. Klasifikace rostlinných explantátů

Kultury rostlinných explantátů lze dle morfologické a anatomické charakteristiky rozdělit do následujících kategorií :

- ◆ **Kultura orgánová** – orgánové systémy, orgány či jejich základy a části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a v celku zachovává jejich stavbu a funkci.
- ◆ **Kultura tkáňová, pletivová** – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně (pletiva), pomnožené buď na polotuhých či pevných nosičích, nasycených živným médiem.
- ◆ **Kultura suspenzní** – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované suspendovány v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.
- ◆ **Kultura buněčná, kultura volných buněk** – volné jednotlivé a identifikované buňky pomnožované v tekuté či polotekuté půdě nebo na pevném nosiči nasyceném živnou půdou.
- ◆ **Kultura protoplastů** – kultura buněk zbavených buněčných stěn (1).

3.2.3. Vlastnosti kultur rostlinných explantátů

Základní vlastnosti kultur rostlinných explantátů :

- tkáňovou, suspenzní či buněčnou kulturu lze odvodit, až na velké výjimky, z kterékoliv živé rostlinné části.
- kulturu lze pěstovat *in vitro* za vhodných kultivačních podmínek neomezeně dlouho.
- tkáňová i suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje a ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter, není však homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciace.
- buňky tkáňových ani buněčných kultur nejsou schopny tvořit „jednovrstevnou kulturu“, neuchycují se na tuhé ani polotuhé podklady.
- řada orgánových, tkáňových či buněčných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách, často velmi jednoduchých.
- explantátové orgány, resp. orgánové základy v kultuře *in vitro* mohou dorůstat.
- základní prvky totipotence buněk jsou zachovány.
- orgánové, tkáňové ani buněčné kultury nejsou schopny bez poškození podstoupit konzervaci mrazem.
- suspenzní kultury jsou tvořeny volnými buňkami a jednotlivými buněčnými shluky, poměr volných buněk a buněčných shluků se v průběhu kultivace může měnit.
- rozpadavost suspenzní kultury lze ovlivnit složením živného média a dalšími kultivačními podmínkami (1).

3.2.4. Podmínky kultivace rostlinných explantátů

Optimální růst, ale i produkce sekundárních metabolitů jsou ovlivněny volbou vhodných podmínek.

3.2.4.1. Složení živných médií

Složení kultivačního média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi tkáňových kultur rostlin a je závislé na typu kultivace (1):

- **heterotrofní** buněčné kultury (bezbarvé, sacharid 2%, světlo)
- **fotomixotrofní** buněčné kultury (zelené, sacharid 2%, světlo)
- **fotoautotrofní** buněčné kultury (zelené, oxid uhličitý, světlo)

Složky živných půd se podle množství v půdě resp. svého charakteru či fyziologických účinků rozdělují do následujících skupin :

- ❖ **Makroelementy** - jsou nutné pro kultivaci intaktních rostlin. Po kvalitativní stránce se jedná o dusík, síru, fosfor, magnesium, vápník, chlór a draslik. Ionty se přidávají do živného media ve formě jejich solí.
- ❖ **Mikroelementy** - jsou nezbytné pro růst explantátových kultur a zahrnují železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Železo a zinek se obvykle do médií dodávají v chelátové formě. Do médií se také někdy dodává kobalt, jód, sodík a chlór, ovšem pro růst explantátové kultury nejsou nepostradatelné (12).
- ❖ **Vitaminy a bios faktory** - mohou být pro většinu rostlinných tkáňových kultur limitujícím faktorem jejich růstu. Největší význam mají vitaminy skupiny B. Nepostradatelným je zejména thiamin, používá se i riboflavin a pyridoxin. Významnými jsou také tzv. bios faktory, mezi něž se počítá sacharid myoinositol a biotin, dále vitamin C a kyselina nikotinová.

- ❖ **Zdroje organického uhlíku** - cukry, alkoholy a organické kyseliny. Slouží jako stavební jednotka pro nově vznikající tkáně. Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána sacharóza. V některých případech je možné sacharózu nahradit glukózou či fruktózou. Obvykle používaná koncentrace sacharózy v kultivačnímu médiu je 2-5%. Alkoholy nemají pro tkáňové kultury také význam jako cukry. Jako uspokojující zdroj uhlíku však může sloužit glycerin.
- ❖ **Nedefinované směsi přírodních látek** - nejčastěji se používá hydrolyzát kaseinu a pepton. Růst je možné často stimulovat přidáním celé řady dalších organických extraktů - z kokosového mléka, kořského kaštanu, vlašského ořechu, kukuřice, pšenice, sladu a kvasnic.
- ❖ **Látky používané pro zpevnění media** - pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. Používá se také agaróza. Agar má proti ostatním gelizujícím látkám řadu výhod. Agarové gely jsou stabilní, při teplotách používaných ke kultivaci. Agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhota agarového gelu lze regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. V případě, že není použito pevné médium je možné explantáty „fixovat“ na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě nebo perforovaném celofánu.
- ❖ **Růstové regulátory, fytohormony** - lze pro účely kultivace rozdělit do tří základních skupin: auxiny, cytokininy a gibereliny (1).

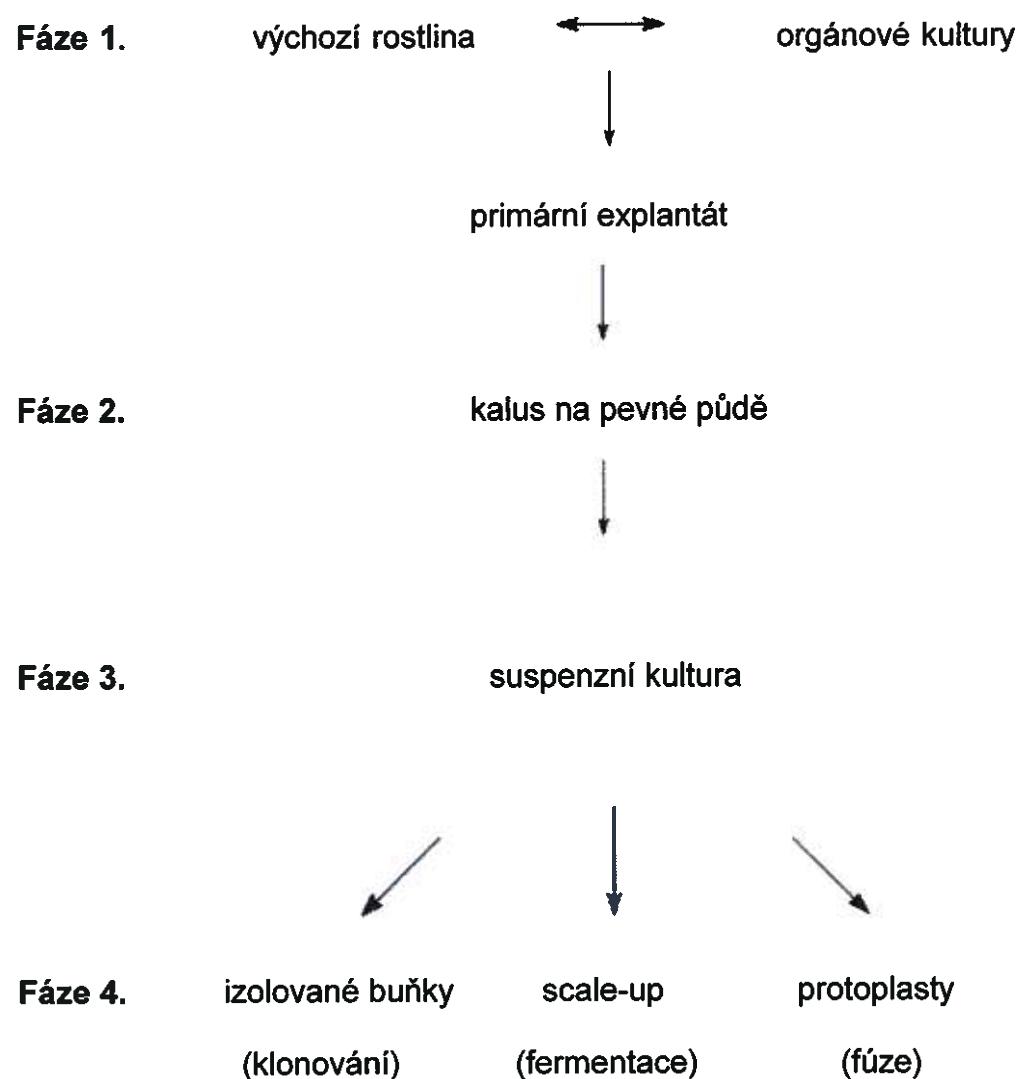
- **auxiny** - používá se především kyselina indolyloctová, kyselina indolylmáselná, kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová a kyselina naftyloctová. V kultivačním médiu jsou používány za účelem stimulace růstu kalusu a buněk. V některých případech indukuje tvorbu prýtů a zejména kořenů.
- **cytokinin** - reprezentují benzylaminopurin, 6 - dimethylaminopurin, furfurylaminopurin a zeatin. Používají se ke stimulaci buněčného dělení, k indukci tvorby prýtů a inhibici tvorby kořenů.
- **gibereliny** - především se jedná o kyselinu giberelovou, která stimuluje růst buněčných kultur a kalusu (12).

3.2.4.2. Fyzikální podmínky kultivace

- ◆ **Světlo** - v intaktních rostlinách i tkáňových kulturách dochází působením světla ke změně intenzity biosyntézy a k akumulaci sekundárních metabolitů. Stejný vliv má i světlo na orgánovou diferenciaci.
- ◆ **Teplota** - většinou je empiricky zvolena v těsném rozmezí okolo 25 °C. Její hodnota ovlivňuje rychlosť metabolismu, dělení buněk a její zvýšení může indukovat organogenezi.
- ◆ **Acidita živného média** - není nezbytně nutné, aby byla při kultivaci rostlinných tkáňových kultur udržována v určitém rozmezí. Roztoky, které se obvykle používají, jsou slabě kyselé, optimální hodnota závisí na typu kultury (1).

3.2.5. Etapy kultivace explantátových kultur

Všechny významné etapy kultivace lze rozdělit do čtyř fází :



Fáze 1.

Cílem je získat stabilní primární explantát s vysokou produkcí metabolitu, proto je důležitý i samotný výběr matečné rostliny. Fragment některého orgánu z povrchově sterilní nebo asepticky pěstované rostliny se umístí *in vitro* na vhodné agarové médium. Médium má přesně definované složení, většinou volené tak aby maximálně podporovalo růst a množení buněk. Po několika týdnech kultivace se objeví primární kalus, který je schopen se rozmnožovat na novém médiu.

Fáze 2.

Získaný kalus je schopen neomezené proliferace po odstranění zbytku výchozího orgánu při pasážování na vhodném médiu. V průběhu prvních pasáží se často projevují morfologické (pigmentace) a morfogenetické (regenerace) změny. Stabilní a homogenní rostlinný materiál se získá až po vyšším počtu pasáží, ovšem pouze za předpokladu přísného dodržování konstantních podmínek kultivace (složení živné půdy, pravidelnost pasáží, teplota a osvětlení).

Fáze 3.

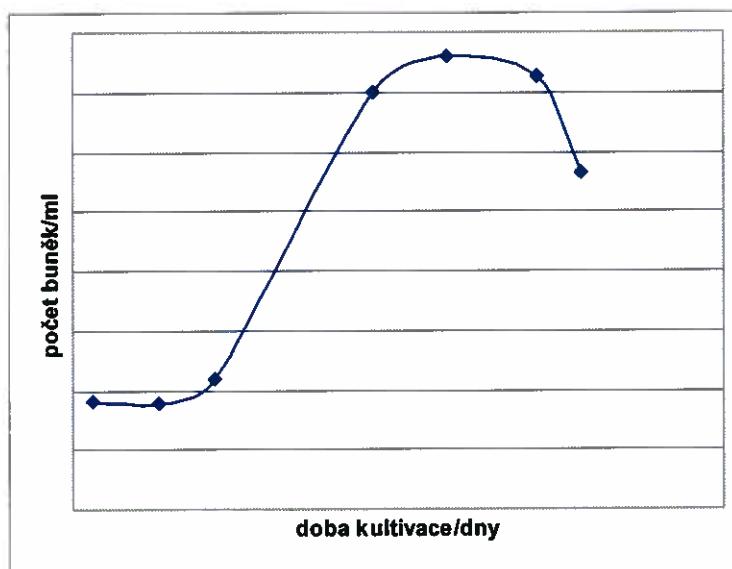
Metodou enzymového (pomocí pektináz) nebo mechanického rozvolnění lze získat suspenzní kultury, a to z tkáně pěstované na pevném nosiči.

Fáze 4.

Nežádoucí kontaminaci získaných suspenzních kultur se předchází pravidelným pasážováním, které je prováděno za aseptických podmínek (1).

3.2.6. Fáze růstu buněčných kultur

Růst buněčné suspenze v uzavřeném systému, kdy se mění podmínky kultivace, lze charakterizovat růstovou křivkou. Růstovou křivku je možné získat tak, že se graficky znázorní závislost růstové charakteristiky suspenze na čase a vyjadřuje se takto závislost koncentrace biomasy na čase (12). Obecně ji lze rozdělit do šesti fází :



- 1. Lag-fáze** : období přizpůsobování naočkovaných buněk novému prostředí; počet živých buněk obvykle klesá; charakteristický je pomalý růst kultury.
- 2. Fáze zrychlení (akcelerační fáze)** : období, kdy všechny důležité enzymové reakce postupně dosahují maximálních konstantních rychlostí a přecházejí do ustáleného stavu.
- 3. Exponenciální fáze** : je charakterizována tím, že buňky rostou stále stejnou, maximální rychlostí. Maximální rychlosť množení tvá tak dlouho, dokud mají buňky k dispozici dostatečné množství živin, dokud není růst kultury inhibován produkty vlastního metabolismu.

- 4. Fáze zpomalení (deklinační fáze)** : je charakterizována snižující se rychlosťí růstu.
- 5. Stacionární fáze** : je období, v němž dosahuje populace maximální po určitou dobu konstantní velikosti. Lze ji charakterizovat rovnovážným stavem mezi počtem dělení a úhynem buněk.
- 6. Fáze odumírání** : pro průběh fáze neexistuje žádné obecné pravidlo, dochází k rychlé či pomalé destrukci buněk, živiny jsou prakticky vyčerpány.

V exponenciální fázi není růst buněk limitován exogenními faktory, proto je nutné provádět pasážování právě na konci exponenciální fáze růstu (1,12).

3.2.7. Buněčné suspenzní kultury

Buněčné suspenzní kultury jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu a reprezentují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů. Tekutá konzistence médií činí jeho složky přístupnější buňkám suspenze. Tato vlastnost umožňuje velmi rychlý růst buněčné suspenze (12).

Získání suspenzní kultury je v první řadě podmíněno odvozením kalusového pletiva. Nejvhodnější je kalus rozpadavý, méně vhodný je kompaktní kalus. Poté jsou kousky kalusu kultivovány v tekutém médiu na třepačce nebo roleru (12).

Pasážování suspenzní kultury probíhá v intervalu asi 4-14 dní. Tento interval je kratší než u kultury kalusové, kde činí asi 3-6 týdnů. Obecně je interval určen rychlosťí růstu a podmínkami kultivace (12).

3.2.8. Tvorba sekundárních metabolitů

Za aspekt diferenciace jevu, který je charakterizován biochemicky, histochemicky a morfologicky, lze považovat syntézu a akumulaci sekundárních metabolitů. Bylo demonstrováno, že v rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se akumuluje malé množství sekundárních metabolitů a že při procesech cytodiferenciace, buněčné agregace a morfologické organizace dochází ke zpomalení růstu, což přímo koreluje se vzestupem syntézy sekundárních metabolitů v tkáňové kultuře. Ukazuje se, že faktory zpomalující růst buněčných kultur působí také často stimulačně na produkci sekundárních metabolitů, především cestou omezení primárního metabolismu. Z těchto jevů vyplývá určitý antagonismus primárního a sekundárního metabolismu (12).

3.2.9. Využití explantátových kultur

Využití explantátových rostlinných kultur poskytuje tyto výhody :

- ◊ Alternativní získávání produktů z rostlin doposud pěstovaných na poli. Velkou předností celého procesu je nezávislost na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech. Současně lze podmínky celého procesu řídit. Získané produkty se po kvalitativní stránce vyznačují homogenností, nejsou kontaminovány zárodky, hmyzem ani chemikáliemi používanými k ochraně rostlin.
- ◊ Získávání nových látek, které se vytvořily díky změně metabolismu explantátových rostlinných buněk a které nebyly v mateřských rostlinách identifikovány.
- ◊ Produkty biotransformací, které jsou farmaceuticky významné a které lze získat z poměrně levných dostupných substrátů.
- ◊ Získávání produktů, které jsou obsaženy v těžko pěstovatelných rostlinách (1).

3.3. Elicitace

3.3.1. Charakteristika elicitačního procesu, stres, fytoalexiny

Proces elicitačního procesu využívá schopnosti rostlin i rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty řadou obranných reakcí, které vedou ke zvýšené akumulaci sekundárních metabolitů. Elicitace je indukční proces, který je založený na signálem (elicitorem) indukované expresi genů, jehož výsledkem je aktivace enzymů nebo vzestup jejich hladin. Elicitory tedy neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkováně pomocí přenašeče signálu.

Za stresové se považují všechny situace, které vznikají odchylkami životního prostředí od fyziologického standardu a také určitým způsobem organismus zatěžují. Ve chvíli, kdy je tkáňová kultura vyplavena stresu, zahájí jako obrannou odpověď syntézu tzv. fytoalexinů. Jsou to nízkomolekulární látky, produkty sekundárního metabolismu, které nejsou ve zdravé rostlině přítomny vůbec nebo ve velmi nízkých koncentracích. Výhodný je jejich lipofilní charakter, který umožňuje průnik přes plazmatickou membránu patogenů. Nejčastějším mechanismem jejich toxicitého působení je poškození membránových funkcí. K fytoalexinům patří například: flavonoidy, terpeny, steroidy (13,14).

3.3.2. Elicitory

Elicitory jsou signální látky, jejichž původ je biologický či nebiologický. Jsou potřebné pro expresi genů nezbytných k syntéze fytoalexinů. Jejich působením jsou v buňkách infikovaných pletiv krátkodobě aktivovány určité enzymy, které katalyzují tvorbu fytoalexinů. Tyto reakce probíhají jak u intaktních rostlin, tak v buněčných kulturách (3).

Elicitory se dělí na dvě primární skupiny :

3.3.2.1. Biotické elicitory

Jsou to organické sloučeniny, které mají signální účinky již v nepatrných koncentracích. Na základě své specifity mohou být biotické elicitory také rozdeleny na elicitory specifické a nespecifické.

Patří k nim :

- + celé intaktní patogenní i nepatogenní organismy nebo jejich části (bakterie, viry, kvasinky, mykoplasmata)
- + organické molekuly parazitických mikroorganismů (oligosacharydy, glykoproteiny, polypeptidy)
- + endogenní konstitutivní elicitory - organické molekuly pocházející z buněk napadené rostliny (chitosan, oligogalakturonidy, kyselina salicylová)(3).

3.3.2.2. Abiotické elicitory

Zahrnují chemické a fyzikální vlivy, které rostlinu stresují a tím spouštějí tvorbu fytoalexinů. Abiotické elicitory, zejména soli těžkých kovů mají oproti většině biotických faktorů tu výhodu, že jsou chemicky zcela definované, lze je tedy přesně v určitých kvantech aplikovat a jsou zpravidla finančně dostupné (3). Náleží k nim :

- + soli těžkých kovů
- + inhibitory látkové výměny (kyselina trichloroctová, 2,4 - dinitrofenol)
- + fyzikální vlivy (UV záření, gama záření, změny pH a osmotického tlaku)
- + detergenty
- + rostlinné ochranné prostředky (pesticidy)(15)

3.3.3. Podmínky elicítace

Aby byla po přidání elicitoru do buněčné kultury indukována tvorba sekundárních metabolitů, musí být splněny určité podmínky pro vzájemnou interakci elicitoru a buněčné kultury :

- * volba vhodného elicitoru
- * doba působení elicitoru na kulturu
- * optimální koncentrace elicitoru
- * volba vhodného rostlinného explantátu pro kultivaci
- * volba vhodného média a jeho složení
- * stáří kultury
- * růstová fáze kultury
- * složení živného média

Volba vhodného elicitoru pro elicítaci určité kultury je nejdůležitější podmínkou úspěšné elicítace. Existují určité případy, kdy lze působením elicitoru iniciovat tvorbu látek, které předtím tato kultura nevytvorila, nebo ztratila schopnost tyto látky tvořit.

Současně se vyskytují případy, kdy elicítace neobnoví biosyntetický materiál buňky a vůbec nedojde ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů.

Následujícím výčtem lze shrnout poznatky o procesu elicítace, který podmiňuje tvorbu a akumulaci sekundárních přírodních látek v rostlinných buněčných kulturách :

- ★ tvorba sekundárních přírodních látek probíhá pod vlivem elicitoru především v buňkách, které jsou na konci růstové fáze
- ★ začíná v průběhu několika hodin po působení elicitoru (12-48 hodin)
- ★ probíhá jak v buňkách suspendovaných v růstovém médiu, tak i v kalusu
- ★ sekundární přírodní látky jsou přítomny v buňkách i v médiu
- ★ proces elicítace je opakovatelný, bez poškození buněk (16).

3.3.4. Mechanismus účinku elicitorů

Na základě dosavadních znalostí se předpokládá, že elicitory indukovaná produkce a akumulace fytoalexinů a jiných stresových metabolitů rostlinnými kulturami *in vitro* je regulována stejnými mechanismy jako v případě intaktní rostliny (3). Většina obranných reakcí je závislá na aktivaci vhodných genů. Podněty jsou vnímány membránovými receptory. Elicitory obvykle neovlivňují expresi přímo, ale zprostředkovaně pomocí druhých poslů (G-proteiny, vápenaté ionty, proteinkinasy). Ti pak přenášejí signály v buňce transdukčními signálními cestami, což vede ke genové expresi a biochemickým změnám. V současné době je popsáno několik mechanismů přenosu extracelulárního signálu do intracelulárního signálního systému a následně k DNA v jádře. Zároveň se vyskytuje několik případů, kdy reakce probíhají rychle a to na membránách (15).

Předpokládá se, že molekuly biotického elicitoru jsou rozpoznány specifickými receptory (obvykle v plazmatické membráně). Obsazení receptoru může vést k aktivaci G - proteinů, otevření vápenatých kanálů a rychlému influxu vápenatých iontů do buňky (17). G-protein leží na vnitřní straně plazmatické membrány. Vazbou signálu na receptor se mění jeho konformace a tím je umožněn jeho kontakt s G - proteinem.

Extracelulární vápník je považován za signál, který přináší informace o poranění dovnitř buňky. Další předpokládaný zdroj vápenatých iontů, který pochází z intracelulárních organel (mitochondrie, endoplazmatické retikulum), přenáší informace v buňce. Jednou z cest, kterou ionty Ca^{2+} vstupují do cytoplasmy, je přesun přes plazmatickou membránu. Napěťově závislý Ca^{2+} – permeabilní kanál, který může být aktivován změnou membránového potenciálu, je schopný přispívat ke zvýšení koncentrace cytosolových vápenatých iontů.

Jakmile dojde ke zvýšení koncentrace intracelulárního kalcia na nejméně $1\mu\text{M}$ (18), váže se kalcium na bílkovinu kalmodulin, která má čtyři vazebná místa pro vápenaté ionty a narůstající komplex kalcium-kalmodulin moduluje mnoho fyziologických procesů. Vzniklý komplex ovlivňuje aktivitu určitých proteinkináz. Kalmodulin je jedním z nejběžnějších intracelulárních receptorů pro kalcium.

Jiný způsob přenosu signálu je zprostředkován pomocí fosfoinositolového systému – hydrolyzou lipidů plazmatické membrány jsou generovány dvě signální molekuly: inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol, které za účasti iontů vápníku také vedou k aktivaci proteinkináz a k exprese genů (15).

Některé pokusy dokazují, že velmi častým a rychlým způsobem přenosu signálu je také tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku (hydroxylové radikály, hydrogrogen peroxid). Zvýšené množství peroxidu je možné zjistit po 5 až 10 minutách působení elicitoru (15). Reaktivní kyslíkové deriváty mohou ovlivňovat exprese genů i nepřímo – způsobují totiž peroxidaci membránových lipidů, což vede ke zvýšení syntézy stresových fytohormonů (kyseliny jasmínové), jejichž signální funkce jsou již dlouho známy (15).

Mechanismus účinku abiotických elicitorů se nedá objasnit vazbou na specifický receptor. Těžké kovy spouštějí peroxidaci lipidů, což jednak vede k prudkému nárůstu koncentrace signálně účinných stresových fytohormonů, jednak dochází ke zvýšení propustnosti plazmatické membrány pro vápenaté ionty, které mají funkci druhého posla. Ionty těžkých kovů vyvolávají aktivaci transkripce několika genů tvorbu fytochelatinů. Jsou to malé peptidy syntetizované z glutathionu, které váží kovy a vznikají tak inaktivní komplexy. Tím se tyto intracelulární těžké kovy detoxikují (19).

Principy a výhody získávání a zvyšování produkce sekundárních metabolitů v rostlinných tkáňových kulturách *in vitro*, jsou výhledově velmi perspektivní oblastí výzkumu proto, že obyvatel na zemi stále přibývá a spotřeba potravy a rozličných produktů z rostlin využívaných v kosmetice či ve farmacii neustále narůstá.

3.4. Těžké kovy

3.4.1. Minerální výživa

Význam minerální výživy pro vývoj rostliny je dán zejména tím, že asimilace iontů – jejich přeměna ve struktury a účast v procesech rostliny, je nezbytným předpokladem všech vývojových procesů.

Kvalitativně odpovídá obsah prvků v rostlinách jejich výskytu v kořenovém substrátu. Je evidentní, že nepřítomnost prvku v půdě a okolní atmosféře znamená i jeho nepřítomnost v rostlině. Obdobně pak se prvky vyskytující se v dosahu kořenů nebo listů rostlin nacházejí i v jejich strukturách. Ovšem množství a poměr jednotlivých prvků v rostlině se však může velmi lišit od množství a poměru těchto prvků v půdě nebo i v živném roztoku.

Rostliny potřebují minerální živiny z mnoha důvodů, především je využívají jako :

- **substráty** v biochemický reakcích
- **kofaktory** enzymů
- **osmotika**
- **posly** v přenášení signálů

Rostliny se vyznačují rozdílným stupněm tolerance a rezistence vůči působení atmosférických a půdních škodlivin. Pozoruhodné jsou tzv. akumulátory těžkých kovů, které se vyznačují schopností hromadit tyto kovy v mimořádně velkém množství (15,20,21,22,23).

3.4.2. Toxicita těžkých kovů

V důsledku okyselování půd se do půdního roztoku stále častěji uvolňují ionty těžkých kovů, zejména Cd, Pb, Cu, Hg, Zn, Ni. Tyto ionty jsou s výjimkou velmi nízkých koncentrací pro rostliny toxické. Ionty těžkých kovů jsou velmi snadno přijímány kořeny, neboť selektivita transportních proteinů je zřejmě nedostatečná pro jejich rozlišení od těch prvků, které jsou pro život rostliny nezbytné.

Tři základní mechanismy toxicity těžkých kovů :

- Produkce reaktivních forem kyslíku autooxidací
- Blokování esenciálních funkčních skupin v biomolekulách – tato reakce byla prokázána u kovů, které se nezapojují do oxidačně-redukčních dějů (kadmium, rtuť)
- Vytlačení základních kovových iontů z biomolekul .

Přechod kovů způsobí oxidativní zranění v rostlinné tkáni, ale nejsou důkazy, že tento druh stresu může být zmírněn zvyšující se hladinou antioxidantů. Důvod může být ten, že přechod kovů iniciuje produkci hydroxylových radikálů, která nemůže být kontrolována antioxidanty.

Způsob adaptace rostlin na zvýšený výskyt těžkých kovů představuje:

tolerance - ionty těžkých kovů hromadící se v buňkách jsou inaktivovány vazbou na nízkomolekulární bílkoviny mající vysoký podíl cysteinu, které se označují jako fytochelatiny nebo metalotioneiny.

rezistence – schopnost rostlin vzdorovat či vůbec omezovat až vylučovat možnost působení těžkých kovů na citlivé složky organismu. Rostliny se můžou chránit již omezením vstupu iontů do buněk, jejich hromaděním ve vakuole, omezením transportu do nadzemních orgánů (11,15,20,21,22,23).

3.4.3. Železo

Železo je prvním prvkem triády železa. Má relativní atomovou hmotnost 55,847 a jeho atomové číslo je 26. Jeho podíl zemské kůže je 51% a je 4. nejrozšířenější prvek. Čisté železo je stříbřitě lesklý, poměrně měkký kov. Jeho nejdůležitější minerály jsou hematit (krevel) Fe_2O_3 , hnědel (limonit) $\text{FeO}(\text{OH})$, magnetit Fe_3O_4 , siderit (ocelek) FeCO_3 a pyrit FeS_2 . Z železnatých solí je nejběžnější heptahydrt síranu železnatého $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - zelená skalice, která je použita k abiotické elicitaci v této práci (24,25,26).

Důležitou vlastností železa je feromagnetismus – nespárované valenční elektrony, mají takové uspořádání, že vnější magnetické pole zesilují a po jeho vymizení působí samy magneticky (24,25,26).

Organicky vázané železo (v porfyrinu, ferritinu, hemosiderinu) je důležitou složkou živočišných i rostlinných organismů. Řadí se mezi makroelementy a v rostlinách se nachází v rozmezí 10 – 0,01 % čerstvé hmotnosti (15,20,21,22,23).

V rostlině železo neexistuje ve volné iontové formě, protože se snadno oxiduje a přechází na nerozpustné sloučeniny. Nejčastěji je vázané na organické kyseliny. Ve sloučeninách vystupuje železo ve dvou oxidačních stupních. Méně stálé jako Fe^{2+} a stálejší Fe^{3+} . Rozpustnou formou je jen zpravidla Fe^{2+} , a je také metabolicky aktivnější. Vysoká afinita Fe^{2+} ke kyslíku je základem jeho biologické funkce. Uplatňuje se buď v přímé vazbě s bílkovinou, jako porfyrinový chelát, nebo jako složka různých flavoproteinových systémů, aktivních v biologických oxidacích. Především nitritreduktáza, významná složka asimilace nitrátů. V přímé vazbě s bílkovinou je ve ferredoxinu, který funguje jako akceptor vodíku ve fotosystému I. Jako porfyrinový chelát se uplatňuje především v komponentech cytochromového systému fungujícího v mitochondriální respiraci i v přechodu elektronů mezi fotosystémem II a I (15,20,21,22,23).

Železo se hlavně ukládá v chloroplastech a zúčastňuje se tvorby fotosyntetického aparátu. V chloroplastech je obsaženo až 90% z celkového železa v listu. Má aktivační funkci při stavbě molekuly chlorofylu. Jeho pohyb do chloroplastů je pravděpodobně kontrolován cytoplazmou. Teprvé po vysycení cytoplazmatických struktur jde železo do chloroplastů. To je přičinou, že nedostatek železa se projeví nejdříve chlorózou – blednutím listů, která je výraznější u mladých listů, protože železo je v rostlině poměrně nemobilní a mladé listy ho nemohou odčerpávat ze starších. A teprvé potom dochází k poruchám v růstu a v cytochromovém systému. Chloróza může být způsobena i nedostatkem Mn nebo Ca (15,20,21,22,23).

Celkové množství železa v lidském organismu kolísá od 2 - 6 g. Erytrocyty obsahují 70%, feritin, hemosiderin 24 % (jsou zásobní formy), myoglobin 4% a enzymy 2% (jsou funkční formy). Denní příjem železa by měl činit 10 - 20 mg. Železo je absorbováno převážně jako dvojmocné. Trojmocné je redukováno na dvojmocné v kyselém prostředí žaludku. Pro železo neexistuje exkreční mechanismus a proto je jeho rovnováha regulována pouze absorpcí. Nedostatek železa tlumí syntézu hemoglobinu a vzniká hypochromní mikrocytárni anémie. Chronická otrava železem, které se nadměrně ukládá v orgánech, se označuje jako hemochromatóza nebo hemosideróza (27).

V jedné studii bylo sledováno, který ze tří zdrojů železa : chlorid železitý, síran železnatý a citronan železitý je nejfektivnější pro regulaci růstu pupenů u *Syzygium cuminii* L. v kombinaci s EDTA. Nejlépe ovlivnil růst pupenů síran železnatý v kombinaci s EDTA a citronan železitý bez kombinace s EDTA (27).

Jiná práce hledala, jaký vliv má přísun železa na snížení toxicity kadmia působícího na *Hordeum vulgare* L. Přísun železa antagonizoval akumulaci kadmia a snižoval tedy jeho toxické působení na rostlinu (28).

V následujícím projektu se zkoumal vliv nedostatku železa na kalusové kultuře *Vitis spp.* Deficit železa vyvolával adaptační mechanismus a inicioval vznik genotypů odolných na tento druh stresu. Následnou selekcí byly získány genotypy resistantní na chlorózu (29).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie

- kyselina octová p.a.
- diethylether p.a.
- hydroxid sodný p.a.
- amoniak koncentrovaný č.
- kyselina chlorovodíková p.a.
- ajatin
- chemikálie použité na přípravu živného média (viz kapitola 4.5.2.)

4.2. Přístroje

- Laboratorní analytické váhy, Sartorius A 200S, Göttingen
- Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
- Autokláv PS 20 A, Chirana, Brno
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, výrobné družstvo Pokrok, Žilina
- Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- Vodní lázeň KL-1, Laboratorní přístroje, Praha
- Horkovzdušný sterilizátor HS 31 AM Chirana, Brno

4.3. Rostlinný materiál

K pokusům uvedeným v této práci byla použita explantátová kultura, odvozená z kořene intaktní rostliny *Rheum palmatum L.* (*Polygonaceae*). Intaktní rostlina byla získána z polní kultury v Osečnici v Orlických horách. Rostliny byly převezeny do skleníku zahrady léčivých rostlin Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Na založení tkáňové kultury byly odebrány kořeny dvouletých rostlin. V diplomové práci byla použita šestiletá kalusová kultura a z ní odvozena suspenzní kultura.

4.4. Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do váženky, předem vysušené 2 hodiny při 105°C , byly odváženy asi 2,000 g kalusu. Váženka s obsahem byla zvážena a sušena 2 hodiny v sušárně při 105°C . Po vysušení a vychladnutí v exsikátoru byla zvážena. Ztráta sušením byla vztažena na navážku kalusu a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením 4,89 % je aritmetickým průměrem ze tří stanovení (8).

4.5. Kultivace tkáňové kultury

4.5.1. Kultivační nádoby a nástroje

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

4.5.2. Příprava živného média

Pro kultivaci tkáňových kultur bylo použito živné médium podle Murashigeho a Skooga. Uvádím zde jeho kompletní složení (31).

| | |
|---|--------------|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ | 440,00 mg/l |
| KNO_3 | 1900,00 mg/l |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 370,00 mg/l |
| NH_4NO_3 | 1650,00 mg/l |
| KH_2PO_4 | 170,00 mg/l |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 27,84 mg/l |
| Na_2EDTA | 37,34 mg/l |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ | 22,30 mg/l |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 11,50 mg/l |

| | |
|--------------------------|-----------------|
| H_3BO_3 | 6,20 mg/l |
| KI | 0,83 mg/l |
| $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ | 0,025 mg/l |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ | 0,25 mg/l |
| $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ | 0,025 mg/l |
| myoinositol | 100,00 mg/l |
| hydrolyzát kaseinu | 1000,00 mg/l |
| glycin | 2,00 mg/l |
| kyselina nikotinová | 0,50 mg/l |
| pyridoxin hydrochlorid | 0,50 mg/l |
| thiamin hydrochlorid | 0,10 mg/l |
| sacharóza | 30 000, 00 mg/l |

Jako stimulátor růstu byla použita kyselina α – naftyloctová (NAA) o koncentraci 10 mg/l živného média.

Půda připravená pro kultivaci byla rozlita po 30 ml do Erlenmeyero-vých baněk s papírovými knoty pro kultivaci kalusových kultur a do varných baněk připravených pro kultury suspenzní. Médium bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

4.5.3. Pasážování a kultivace

Pasážování bylo provedeno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem ajatinu (1:10) a vyzářen minimálně 1 hodinu germicidní zářívkou. Po celou dobu pasážování byly zachovány přísně aseptické podmínky, bylo používáno sterilní sklo a nástroje. Části kalusové kultury (inokula) byly přeneseny pinzetou do baněk s živným médiem a vloženy na knot. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií. Kalusové kultury byly kultivovaly v Erlenmeyerových baňkách při teplotě 21°C a umělém osvětlení s 16 hodinovou periodou. Subkultivační interval byl 35 dní.

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

4.6. Elicitace

4.6.1. Příprava roztoků elicitoru

Byly připraveny čtyři vodné roztoky síranu železnatého o koncentraci :

- ❖ Koncentrace 1000 µM
- ❖ Koncentrace 100 µM
- ❖ Koncentrace 10 µM
- ❖ Koncentrace 1 µM

Z nejsilnější koncentrace síranu železnatého byly naředěním destilovanou vodou připraveny roztoky o nižší koncentraci. Všechny roztoky elicitoru byly sterilizovány v autoklávu 15 minut při 121 °C a tlaku 0,1MPa. Připravené roztoky byly uchovávány v lednici.

Koncentrace 100 µM použitá při elicitaci explantátové kultury *Rheum palmatum* L. odpovídá množství síranu železnatého obsaženému v živném médiu podle Murashigeho a Skooga.

4.6.2. Elicitace a odběr kultur

Elicitace kalusové a suspenzní kultury byla prováděna za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Ve 21. dni kultivace kalusové kultury a 14. dni kultivace suspenzní kultury byla provedena elicitační čtyřmi výše uvedenými koncentracemi síranu železnatého (32).

K experimentu bylo vzato 108 kultivačních baňek s kalusovou kulturou. Soubor 12 baněk bez elicitoru sloužil jako kultura kontrolní. Do zbývajících 96 baněk s kulturou byl napipetován vždy 1,00 ml elicitoru o příslušné koncentraci. Potom byly baňky pečlivě uzavřeny hliníkovou fólií a dále kultivovány za již uvedených podmínek. Vznikly tak 4 soubory šesti baněk s elicitovanou kulturou.

Po 6, 24, 48, 168 hodinách působení elicitoru byly elicitované kultury odebrány. Odběry kontrolních kultur byly provedeny po 24 a 168 hodinách. U kalusových kultur byly pinzetou vyjmuty kalusy na filtrační papír a sušeny při laboratorní teplotě. U suspenzních kultur byly buňky odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a také sušeny při laboratorní teplotě.

U každého vzorku byla provedena dvě paralelní stanovení obsahu anthracenových derivátů dle ČSL 4 a statistické vyhodnocení výsledků.

U suspenzní kultury byl pokus uspořádán stejným způsobem jako u kultury kalusové.

4.7. Stanovení antracenových derivátů

4.7.1. Princip stanovení

Fotometrická metoda podle ČSL 4 je založena na barevné reakci antracenových derivátů s alkalickými hydroxidy po jejich kyselé hydrolyze a jejich oxidaci. Intenzita zbarvení se hodnotí fotometricky (9).

4.7.2. Postup stanovení

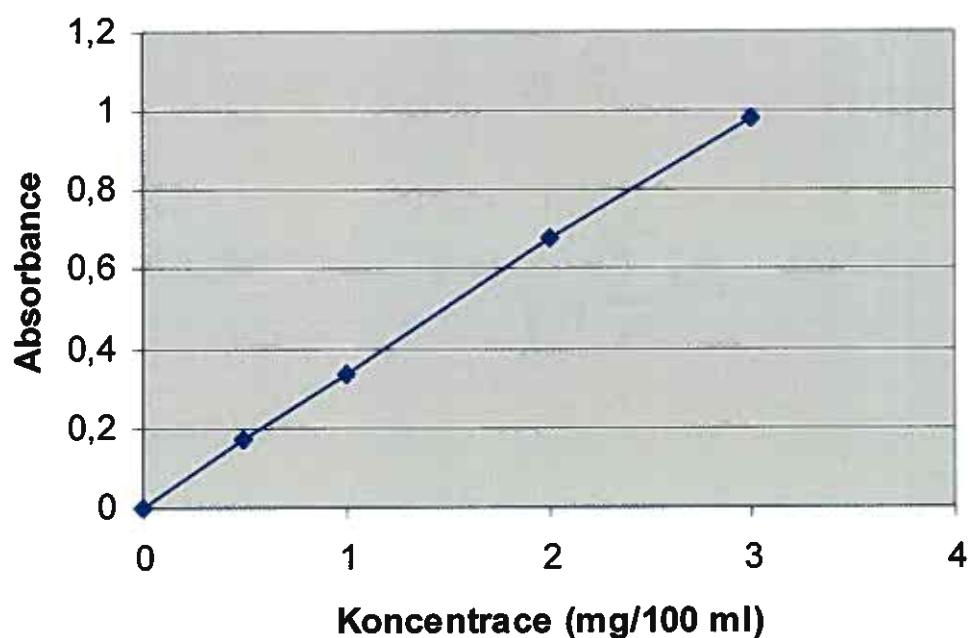
Na analytických vahách bylo odváženo asi 0,2000 g uprásťkovaného usušeného vzorku a v baňce na 100 ml se po dobu 15 minut vařilo pod zpětným chladičem se směsí 7,5 ml koncentrované kyseliny octové a 1,0 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Po ochlazení bylo přidáno 30 ml etheru a vařilo se 15 min na vodní lázni. Etherový výluh se nechal vychladnout a byl zfiltrován přes chomáček vaty do dělící nálevky na 250 ml tak, že vzorek zůstal v baňce. Ke zbytku bylo přidáno opět 30 ml etheru a vařilo se znova 10 minut. Etherový výluh byl po ochlazení zfiltrován stejnou vatou k prvnímu výluhu v dělící nálevce. Po té byla vata promyta malým množstvím etheru. Ke spojeným etherovým výluhům bylo přidáno 12 ml koncentrovaného roztoku hydroxidu sodného a 24 ml amoniakálního roztoku hydroxidu sodného a 5 minut se protřepávalo. Tento postup byl opakován ještě jednou. Spojené alkalické výtřepky byly zahřívány na vodní lázni pod zpětným chladičem 2 hodiny. Po ochlazení byl roztok zfiltrován přes vatu do odměrné baňky, vata byla promyta amoniakálním roztokem hydroxidu sodného. Odměrná baňka na 100 ml byla doplněna amoniakálním roztokem hydroxidu sodného po značku. Ihned poté byla změřena absorbance při 530 nm proti amoniakálnímu roztoku hydroxidu sodného. Obsah volných antracenových derivátů, počítaných jako frangula – emodin, se odečetl z kalibrační křivky a byl vyjádřen v procentech (9).

4.7.3. Sestrojení kalibrační křivky

Odvážené množství 0,0100 g frangula – emodinu (1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthrachinon) se rozpustilo v 10 ml etheru prostého peroxidických láttek. Roztok byl vytřepán čtyřikrát 20 ml amoniakálního roztoku hydroxidu sodného. Spojené alkalické výtřepky byly doplněny v odměrné baňce na 100 ml týmž roztokem. Zředěním amoniakálním roztokem hydroxidu sodného byly připraveny roztoky, které obsahovaly 0,5 – 1,0 – 2,0 a 3,0 mg frangula – emodinu ve 100 ml. Ihned byla změřena jejich absorbance při 530 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena vynesením absorbance proti obsahu frangula – emodinu (9).

| Konzentrace roztoku (mg/100ml) | Absorbance A | Objem odměrného roztoku |
|--------------------------------|--------------|-------------------------|
| 0,0 | 0,000 | 0 |
| 0,5 | 0,171 | 5 |
| 1,0 | 0,339 | 10 |
| 2,0 | 0,680 | 20 |
| 3,0 | 0,982 | 30 |

Kalibrační křivka frangula - emodinu



4.8. Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování naměřených hodnot obsahu anthracenových derivátů v kulturách *Rheum palmatum* L. bylo provedeno na základě T – testu (test významnosti rozdílu dvou průměrů), pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ (33).

aritmetický průměr

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

směrodatná odchylka

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

n rozsah souboru

x_i naměřené hodnoty

\bar{x} aritmetický průměr

s směrodatná odchylka

T - test

n_1počet členů kontrolního souboru

n_2počet členů pokusného souboru

\bar{x}_1aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x}_2aritmetický průměr pokusného souboru

s_1směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2směrodatná odchylka pokusného souboru

t.....testovací kritérium

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

Testovacímu kritériu přísluší t rozdelení se stupněm volnosti (v) vypočítaného podle vztahu : $v = n_1 + n_2 - 2$.

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

Byla provedena vždy dvě paralelní stanovení obsahu, proto počet členů souboru $n_1 = n_2 = 2$ a počet stupňů volnosti $v = 3$ (33).

Kritická hodnota $t(v)_p$ pro $p(0,05) = 3,182$

5. VÝSLEDKY

5.1. Tabulky

Tabulka 1: Suspenzní kultura *Rheum palmatum* L. ovlivněná elicitací v porovnání s kontrolní kulturou.

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru (hod) | Elicitace | | Kontrola | | T- test |
|----------------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------|
| | | Průměrný obsah(%) | Směrodat. odchylka | Průměrný obsah(%) | Směrodat. odchylka | |
| Koncentrace 1000 µM | 6 | 0,779 | 0,0226 | 0,461 | 0,0130 | 15,415 |
| | 24 | 0,932 | 0,0226 | 0,461 | 0,0130 | 22,830 |
| | 48 | 1,151 | 0,0163 | 0,461 | 0,0130 | 40,562 |
| | 168 | 1,378 | 0,0339 | 0,507 | 0,0041 | 34,095 |
| Koncentrace 100 µM | 6 | 0,652 | 0,0163 | 0,461 | 0,0130 | 11,228 |
| | 24 | 0,972 | 0,0135 | 0,461 | 0,0130 | 32,780 |
| | 48 | 1,094 | 0,0099 | 0,461 | 0,0130 | 45,192 |
| | 168 | 1,533 | 0,0156 | 0,507 | 0,0041 | 84,012 |
| Koncentrace 10 µM | 6 | 1,152 | 0,0170 | 0,461 | 0,0130 | 39,740 |
| | 24 | 0,562 | 0,0127 | 0,461 | 0,0130 | 6,640 |
| | 48 | 0,938 | 0,0127 | 0,461 | 0,0130 | 31,359 |
| | 168 | 1,019 | 0,0191 | 0,507 | 0,0041 | 34,785 |
| Koncentrace 1 µM | 6 | 1,172 | 0,0064 | 0,461 | 0,0130 | 55,438 |
| | 24 | 1,069 | 0,0170 | 0,461 | 0,0130 | 34,967 |
| | 48 | 1,138 | 0,0141 | 0,461 | 0,0130 | 42,629 |
| | 168 | 1,250 | 0,0205 | 0,507 | 0,0041 | 47,232 |

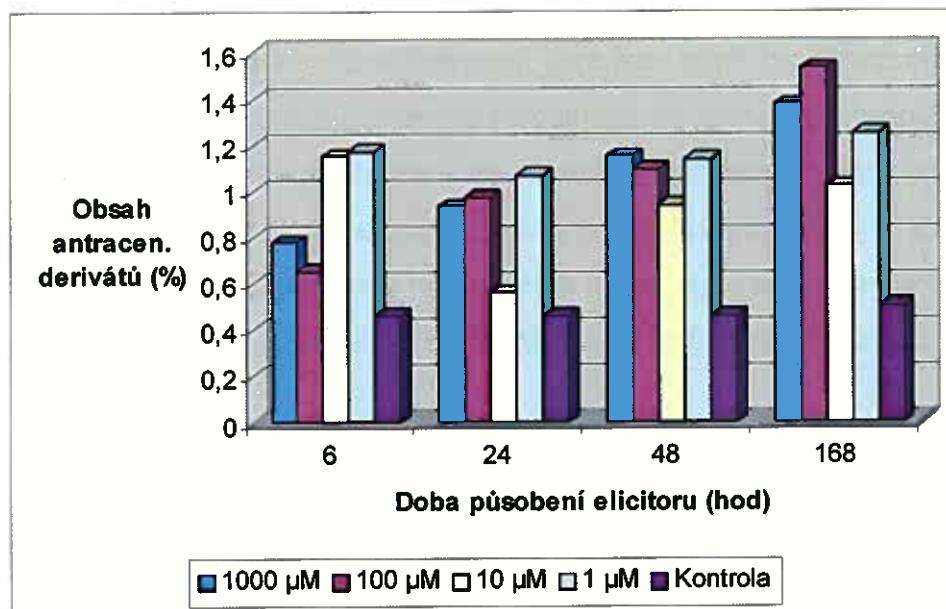
Tabulka 2: Kalusová kultura *Rheum palmatum* L. ovlivněná elicitací v porovnání s kontrolní kulturou.

| Koncentrace elicitoru | Čas odběru (hod) | Elicitace | | Kontrola | | T- test |
|----------------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------|
| | | Průměrný obsah(%) | Směrodat. odchylka | Průměrný obsah(%) | Směrodat. odchylka | |
| Koncentrace 1000 µM | 6 | 0,676 | 0,1860 | 0,363 | 0,0070 | 2,255 |
| | 24 | 0,325 | 0,0042 | 0,363 | 0,0070 | 5,339 |
| | 48 | 0,794 | 0,0163 | 0,363 | 0,0070 | 31,391 |
| | 168 | 0,461 | 0,0184 | 0,405 | 0,0085 | 3,553 |
| Koncentrace 100 µM | 6 | 0,389 | 0,0177 | 0,363 | 0,0070 | 1,773 |
| | 24 | 0,370 | 0,0714 | 0,363 | 0,0070 | 0,131 |
| | 48 | 0,391 | 0,0234 | 0,363 | 0,0070 | 1,507 |
| | 168 | 0,433 | 0,0100 | 0,405 | 0,0085 | 2,601 |
| Koncentrace 10 µM | 6 | 0,313 | 0,0078 | 0,363 | 0,0070 | 5,787 |
| | 24 | 0,437 | 0,0375 | 0,363 | 0,0070 | 2,580 |
| | 48 | 0,767 | 0,0184 | 0,363 | 0,0070 | 26,697 |
| | 168 | 0,379 | 0,0255 | 0,405 | 0,0085 | 1,266 |
| Koncentrace 1 µM | 6 | 0,614 | 0,0191 | 0,363 | 0,0070 | 16,082 |
| | 24 | 0,421 | 0,0679 | 0,363 | 0,0070 | 1,137 |
| | 48 | 0,486 | 0,0198 | 0,363 | 0,0070 | 7,647 |
| | 168 | 0,764 | 0,0262 | 0,405 | 0,0085 | 17,080 |

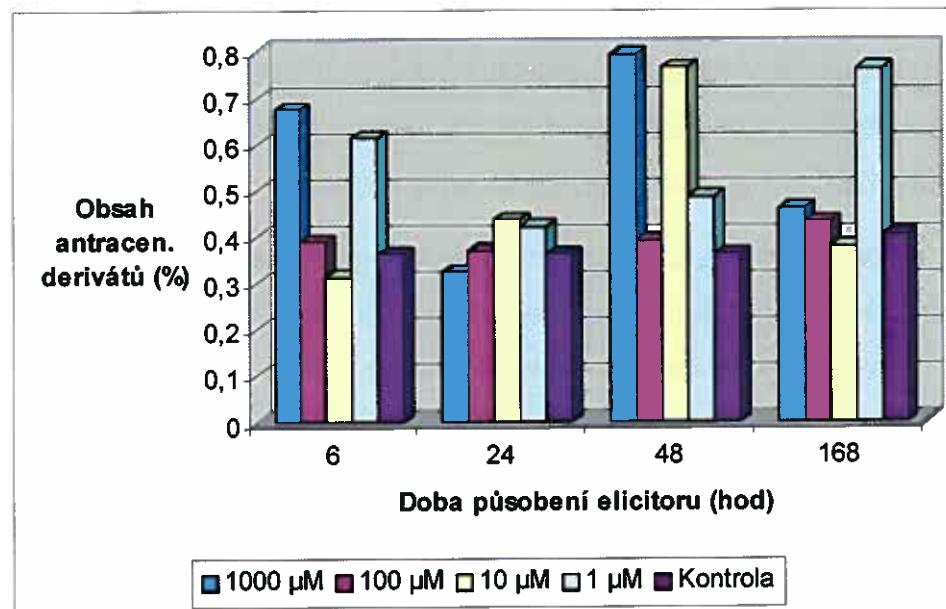
Zvýrazněné hodnoty obsahu antracenových derivátů jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly; $p = 0,05$.

5.2. Grafy

Graf 1: Elicitace suspenzní kultury *Rheum palmatum L.*



Graf 2: Elicitace kalusové kultury *Rheum palmatum L.*



6. DISKUSE

V současné době je věnována velká pozornost biotechnologickému pěstování kultur *in vitro*. Explantátové kultury však nedosahují, až na některé vyjimky, tak intenzívni biosyntézy a jejich produkce je nižší než u intaktní rostliny, proto jsou hledány různé techniky, jako jsou např. biotransformace, imobilizace, elicitač a jejich vzájemné kombinace nebo metody genového inženýrství, kterými by se produkce a akumulace sekundárních látek v těchto kulturách zvýšila. Při procesu elicitač se využívá schopnosti rostlin i rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty celou řadou obranných reakcí, na jejichž konci dochází k zvýšené akumulaci sekundárních metabolitů.

Většina obranných reakcí vedoucích k produkci sekundárních metabolitů, je závislá na aktivaci vhodných genů, přičemž elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkováně pomocí přenašečů signálů. Podle původu rozlišujeme biotické a abiotické elicitory. Mezi abiotické elicitory patří také soli těžkých kovů, které lze vhodným nastavením podmínek (délkou působení a koncentrací) použít k elicitač a tím k prouci sekundárních metabolitů.

Cílem této práce bylo sledovat vliv čtyř koncentrací síranu železnatého na produkci anthracenových derivátů šestiletou explantátovou kulturou *Rheum palmatum L.* Použité vodné roztoky síranu železnatého byly zvoleny v rozmezí koncentrací obvykle používaných při elicitač težkými kovy (34,35,36,37, 38,39). Také sledované doby působení elicitoru (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po aplikaci težkých kovů (38,39,40,41).

Explantátové kultury různých druhů rostlin reagují na elicituaci zcela odlišně. Je proto nutné nalézt pro sledovanou kulturu optimální elicitor, jeho vhodnou koncentraci a dobu aplikace, aby došlo k zvýšené akumulaci sekundárních metabolitů. Kontrolní kultury byly odebírány po 6 a 168 hodinách, neboť jejich produkce se v takto krátkých časových intervalech významně nemění.

Při elicituaci je důležitým faktorem, také stáří kultury, respektive její růstová fáze (42,43).

Z předcházejících pokusů také vyplývá, že z hlediska nejlepšího ovlivnění produkce anthracenových derivátů explantátovou kulturou *Rheum palmatum* L. je pro elicituaci suspenzní kultury nevhodnější 14. den a pro elicituaci kalusové kultury 21. den kultivace. Připravené rozoky elicitoru byly proto ke kultuře přidávány v těchto dnech kultivace.

Sledujeme-li vliv železnatých iontů na produkci anthracenových derivátů v suspenzní kultuře *Rheum palmatum* L. v závislosti na délce působení a koncentraci elicitoru je zřejmé, že u suspenzní kultury () všechny koncentrace síranu železnatého (1000 µM, 100 µM, 10µM a 1 µM) způsobily ve všech časových intervalech statisticky významné zvýšení produkce anthracenových derivátů v porovnání s kontrolní kulturou. Nejvyšší elicitační účinek se projevil po 168 hodinách od aplikace všech koncentrací s výjimkou koncentrace 10µM, která stimulovala produkci sledovaných metabolitů nejlépe již po 6 hodinách působení. Maximální obsah anthracenových derivátů (1,533 %) byl zjištěn po 168 hodinové aplikaci 100 µM koncentrace síranu železnatého, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 200 % v porovnání s kontrolní kulturou. U elicitorů o koncentraci 1000 µM a 100 µM se elicitační účinek zvyšoval s délkou jejich aplikace.

Ze zjištěných hodnot vyplývá, že všechny koncentrace síranů železnatého pozitivně ovlivňují produkci anthracenových derivátů v suspenzní kultuře *Rheum palmatum* L.

U kalusové kultury bylo také zjištěno statisticky významné zvýšení produkce anthracenových derivátů v závislosti na délce působení a koncentraci použitého elicitoru v porovnání s kontrolní kulturou. Nejlepší interval pro ovlivnění kalusové kultury byl 48 hodin, neboť všechny koncentrace zvýšily obsah anthracenových derivátů oproti kontrole. Maximální obsah anthracenových derivátů (0,794 %) byl zaznamenán po 48 hodinové aplikaci nejsilnější koncentrace 1000 µM síranu železnatého, což představovalo v porovnání s kontrolní kulturou zvýšení o 120%. K pozitivnímu ovlivnění produkce došlo také po 168 hodinové aplikaci nejslabší koncentrace a po 6 hodinovém působení 1000 µM a 1 µM roztoku elicitoru. V ostatních sledovaných časových intervalech se obsah anthracenových derivátů pohyboval na úrovni kontrolních vzorků nebo byl jen nevýznamně snížen.

Na základě všech získaných výsledků lze konstatovat, že pozitivní vliv abiotické elicitační síranem železnatým na produkci anthracenových derivátů explantátovou kulturou *Rheum palmatum* L. se projevil, podobně jako v předcházejících experimentech (41,44,45,46,47,48), zejména u suspenzní kultury.

Buňky suspenze jsou totiž v přímém kontaktu s živným médiem, což zaručuje snadný přístup živin a výměnu dýchacích plynů. Buněčné suspenzní kultury jsou proto nejvíce využívány ke studiu produkce sekundárních metabolitů, indukce enzymů, genovové exprese atd.

Těžké kovy se využívají jako abiotické elicitory k ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v řadě experimentů. Již v předcházejících experimentech (46,49,50,51) byl zjištěn pozitivní elicitační účinek těžkých kovů na produkci sekundárních metabolitů především u suspenzní kultury *Rhem palmatum* L.

Při abiotické elicitační suspenzní kultury *Rheum palmatum* L. elicitem chloridem olovnatým byl zjištěn maximální nárůst produkce po 24 hodinové aplikaci elicitoru o 44% v porovnání s kontrolní kulturou (41).

V dalším experimentu došlo také k pozitivnímu ovlivnění produkce sekundárních metabolitů a to při abiotické elicitaci suspenzní kultury *Rheum palmatum* L. chloridem kademnatým a chloridem hlinitým. Maximální zvýšení obsahu anthracenových derivátů oproti kontrole o 66 % nastalo po 48 hodinovém působení 10 µM koncentrace chloridu kademnatého a o 60 % při elicitaci chloridem hlinitým po 6 hodinové aplikaci 100 µM koncentrace (46).

Také v případě abiotické elicitace suspenzní a kalusové kultury *Ononis arvensis* L. byl zjištěn statisticky významný nárůst produkce flavonoidů při abiotické elicitaci těžkými kovy. Produkci pozitivně ovlivnily roztoky iontů Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cr³⁺ a Al³⁺. Nejvyšší zvýšení hladiny flavonoidů, které bylo až sedminásobně vyšší oproti kontrole, bylo zjištěno po 24 hodinové elicitaci kalusové kultury roztokem NiCl₂ o koncentraci 0,4 µM (39,49,52,53).

V suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. byl zjišťován vliv různých koncentrací Mn²⁺, Co²⁺ a Zn²⁺ iontů na produkci kumarinů při kultivaci kultury za tmy a světla. Produkce sledovaných metabolitů byla stimulována zejména roztokem síranu zinečnatého při kultivaci za tmy (54,55).

Dále také rtuťnaté ionty stimuluji produkci medikarpinu v suspenzních kulturách *Canavalia ensiformis* L. a *Medicago sativa* L. (56), měďnaté ionty tvorbu šikoninu v kultuře *Lithospermum erythrorhizon* (57).

V následujícím experimentu byla sledovaná stimulace syntézy betakyanů v suspenzní buněčné kultuře *Portulaca* L. abiotickou elicitací FeEDTA čtyřmi koncentracemi 25, 50, 100, 200 µM a nejlépe ovlivnila produkci betakyanů koncentrace 100 µM. Obsah betakyanů byl 1,5 větší než v kontrolním vzorku (34).

7. ZÁVĚR

Výsledky této práce lze shrnout do následujících bodů :

1. U suspenzní kultury *Rheum palmatum* L. všechny použité koncentrace síranu železnatého vyvolaly ve všech sledovaných časových intervalech statisticky významné zvýšení produkce oproti kontrolní kultuře.
2. Nejvyšší obsah anthracenových derivátů v suspenzní kultuře *Rheum palmatum* L. způsobila 168 hodinová abiotická elicitační roztokem síranu železnatého o koncentraci 100 µM, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o **202,4 %** v porovnání s kontrolní kulturou.
3. Maximální obsah anthracenových derivátů v kalusové kultuře *Rheum palmatum* L. způsobila 48 hodinová abiotická elicitační roztokem síranu železnatého o koncentraci 1000 µM, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o **118,7%** v porovnání s kontrolní kulturou.
4. Bylo potvrzeno, že abiotická elicitační roztoky více stimuluje produkci anthracenových derivátů v suspenzní kultuře než v kultuře kalusové.

8. LITERATURA

1. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1992; s. 2,9,37,84,94.
2. Hubík, J., et al.: Farmakognosie I, SPN, Praha 1989; s. 11.
3. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie 3, 1989; 188.
4. Thurzová, L., Kresánek, J., Mareček, Š., Mika, K.: Malý atlas liečivých rastlín, Osveta, Martin 1963; s. 254.
5. Janča, J., Zentrich, A. J.: Herbář léčivých rostlin, díl 4, Eminent, Praha 1996; s. 104.
6. Hejný, S., Slavík, B.: Květena ČR, svazek 2, Academia, Praha 1990; s. 339.
7. Hubík, J., Dušek, J., Řezáčová, A., Štarhová, H.: Obecná farmakognosie II, SPN, Praha 1989; s. 42-44, 51-53.
8. Kolektiv autorů: Český lékopis 2002; Grada, Praha 2002, s. 154, 4047.
9. Kolektiv autorů: Československý lékopis, 4. díl, Avicenum, Praha 1987; s. 105, 814.
10. Hroneš, I., Šícha, J.: Českoslov. Farm. 1992; 41, 75.
11. Jahodář, L.: Fytotoxikologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1995; s. 7,12.
12. Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin, Universita Palackého, Olomouc 1995; s. 13-18,50-52,54.
13. Rokem, J. S., Schwarzberg, J., Goldberg, I.: Plant Cell Rep. 1984; 3, 159.
14. Cline, S. D., Coscia, E. J.: Plant Physiol. 1988; 86, 161.
15. Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha 1998; s. 89-92, 110, 114-116, 424.
16. Dušek, J. et al.: Čes. slov. Farm. 1996; 45, 204.

17. Gelli, A., Higgins, V. J., Blumwald, E.: *Plant Physiol.* 1997; 113, 269.
18. Saunders, M. J., Hepler, P. K.: *Dev. Biol.* 1983; 99, 41.
19. Kneer, R., Zenk, M. H.: *Phytochemistry* 1997; 44, 69.
20. Kincl, M., Faustus, L.: *Základy fyziologie rostlin*, SPN, Praha 1977; s . 73.
21. Švihra, J. et al.: *Fyziológia rastlín*, Príroda, Bratislava 1989; s. 199.
22. Pastýrik, L. et al.: *Fyziológia rastlín*, SPN, Bratislava 1979; s. 138.
23. Jamrich, V., Kmeť, J.: *Fyziológia rastlín*, Technická universita, Zvolen 1992; s. 54-55.
24. Krätsmár-Šmogrovič, J. et al.: *Všeobecná a anorganická chémia*, Osveta, Banská Bystrica 1994; s. 374.
25. Gažo, J. et al.: *Všeobecná a anorganická chémia*, Alfa, Bratislava 1974; s. 620-622.
26. Vacík, J. et al.: *Přehled středoškolské chemie*, SPN, Praha 1993; s. 214.
27. Lincová, D., Farghalí, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Praha 2002; s. 254.
28. Neeru, J., Sashi, B.: *J. Plant Physiol.* 2003; 160, 569.
29. Sharma, S. S. et al.: *Plant Science*, 2004; 166, 136.
30. Piagnani, C., De Nisi, P., Espen, L., Zocchi, G.: *J. Plant Physiol.* 2003; 160, 865.
31. Murashige, T., Skoog, I.: *Plant Physiol.* 1962; 15, 473.
32. Kašparová, M., Dušek, J.: *Herba Pol.* 2000; 46, 18.
33. Kleméra, P., Klemerová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*, Karolinum, Praha 1993; s. 30,80.
34. Bhuiyan, N. H., Adachi, T.: *J. Plant Physiol.* 2003; 160, 1117.
35. Tebayashi, S., Ishihara, A., Iwamura, H.: *J. Exp. Bot.*, 2001; 52, 681.

36. Kartosentono, S. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 2002; 24, 687.
37. Zhang, W. H. et al.: *Ann. Bot.*, 1999; 84, 559.
38. Tůmová, L., Pouštková, J., Tůma, J.: *Acta Pharmaceutica*, 2001; 51, 159.
39. Tůmová, L., Blažková, R.: *Čes. slov. Farm.* 2002; 51, 44.
40. Repcak, M., Imrich, J., Franeková, M.: *J. Plant Physiol.*, 2001; 158, 1085.
41. Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.* 2003; 52, 248.
42. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.* 1999; 48, 256.
43. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.* 2002; 51, 177.
44. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.* 2001; 50, 41.
45. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.* 2001; 50, 249.
46. Kašparová, M., Siatka, T.: *Čes. slov. Farm.* 2004; 53, 252.
47. Boudníková, M.: Diplomová práce, UK FaF Hradec Králové 2003.
48. Dubová, A.: Diplomová práce, UK FaF Hradec Králové 2005.
49. Tůmová, L., Bačkovská, M.: *Čes. slov. Farm.* 1998; 47, 110.
50. Tůmová, L., Ostrožlík, P.: *Čes. slov. Farm.* 2002; 51, 173.
51. Tůmová, L., Skálová, R., Dušek, J.: *Čes. slov. Farm.* 2005; 54, 151.
52. Tůmová, L., Rusková, R.: *Čes. slov. Farm.* 1998; 47, 261.
53. Tůmová, L., Tůma, J., Staňková, J.: *Herba Pol.*, 1998; 44, 27.
54. Siatka, T. et al.: *Čes. slov. Farm.* 2005; 54, 47.
55. Skrbková, E.: Diplomová práce, UK FaF Hradec Králové 2002.
56. Gustine, D. L., Moyer, B. G.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1982; 1, 255.
57. Heinstein, P.: *J. Nat. Prod.*, 1985; 48, 1.
58. Kolečkář, V.: Diplomová práce, UK FaF Hradec Králové 2003.