

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognozie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Kultury léčivých rostlin *in vitro* – XVII.

Lucie Cinková

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

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

Oponent: PharmDr. Jan Martin, Ph.D.

Počet stran: 71

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne 7. 5. 2015

Lucie Cinková

Poděkování:

Děkuji vedoucí práce paní doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné rady, konzultace a vedení, laborantce Miroslavě Tiché za pomoc v praktické části a PharmDr. Janu Martinovi, Ph.D. za vyhodnocení vzorků metodou HPLC.

Děkuji rodičům za velkou podporu během celého studia, dále prarodičům a manželovi, díky kterým mohla tato práce vzniknout.

Abstrakt

Ostropestřec mariánský, *Silybum marianum* L. Gaertn., je zdrojem flavonoidu taxifolinu a flavonolignanů – silymarinového komplexu (silybin, silydianin, silycristin a isosilybin). Pro získávání těchto sekundárních metabolitů je ostropestřec mariánský pěstován na polích. Alternativním způsobem k polní produkci může být pěstování rostlinných kultur *in vitro*. Oproti intaktní rostlině, však tyto *in vitro* kultury jeví velmi nízké produkce účinných látek. Jedním ze způsobů, jak produkci sekundárních metabolitů zvýšit, je využití metody elicitace.

V této studii byl použit jako elicitor ethephon, v koncentracích 500 $\mu\text{mol/l}$, 400 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ a 50 $\mu\text{mol/l}$. Výsledky jeho působení byly porovnávány s působením inhibitoru ethephonu (AgNO_3), v koncentraci 120 $\mu\text{mol/l}$. Analýza vzorků probíhala pomocí HPLC metody. Vzorky byly odebírány po 24, 48, 72, 96 a 168 hodinách působení. U suspenzních kultur byly odebírány rovněž vzorky média, aby se zjistilo, zda dochází k uvolňování látek do živného média.

Nejvyšší obsah flavonoidu taxifolinu byl nalezen v médiu suspenzní kultury po 48 hodinách působení ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$ (1,97 mg/100 ml, 197krát více než u kontrolního vzorku).

Statisticky významná produkce taxifolinu kalusovou kulturou nastala po 96 hodinách působení ethephonu o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (0,11 mg/g DW).

Ke statisticky významnému zvýšení hladiny silybinu A došlo v živném médiu suspenzní kultury po 72 hodinách působení ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$ (0,51 mg/100 ml).

Statisticky nejvýznamnější pozitivní vliv inhibitoru AgNO_3 byl zaznamenán v případě média suspenzní kultury u taxifolinu, 168 hodin po aplikaci ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$. Inhibitor zvýšil hladinu taxifolinu 58krát (0,58 mg/100 ml).

Statisticky nejvýznamnější negativní vliv inhibitoru AgNO_3 byl zaznamenán v případě média suspenzní kultury u látky silybin A, 168 hodin po aplikaci ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$. Inhibitor snížil hladinu silybinu A až na nulové hodnoty.

Abstract

Milk thistle, *Silybum marianum* L. Gaertn., is a source of flavonoid taxifolin and flavonolignans – silymarin complex (silybin, silydianin, silycristin and isosilybin).

Milk thistle is usually obtained by field cultivation. Alternative way for getting the active components, is the use of *in vitro* cultures. But the production of secondary metabolites by the *in vitro* cultures is low in comparison with plant. One of the possibilities how to increase this production is the method of elicitation.

In this study, ethephon as the elicitor, in the concentrations of 500 $\mu\text{mol/l}$, 400 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ and 50 $\mu\text{mol/l}$ was used with the aim to increase secondary metabolite production in suspension and callus cultures. The effect of ethephon was compared to its inhibitor (AgNO_3 , 120 $\mu\text{mol/l}$). The levels of flavonolignans and taxifolin were measured by the method of HPLC. The samples were taken 24, 48, 72, 96 and 168 hours after the ethephon application and inhibitor treatment. The nutrient medium of suspension culture was also tested for the possibility of secondary metabolites releasing into medium.

The highest content of flavonoid taxifolin was found in the suspension culture medium after 48 h treatment with ethephon in conc. of 400 $\mu\text{mol/l}$. The level of taxifolin was increased by 197-fold to 1,97 mg/100 ml, compared to control sample.

The statistically significant production of taxifolin in the callus culture was reached after 96 hours of treatment with ethephon in conc. of 50 $\mu\text{mol/l}$. (0,11 mg/g DW).

The statistically significant production of silybin A was reached in the nutrient medium 72 h after application of ethephon in conc. of 400 $\mu\text{mol/l}$ (0,51 mg/100 ml).

The statistically significant positive effect of AgNO_3 as inhibitor was found in the case of taxifolin in the medium, 168 hours after application of ethephon in conc. of 400 $\mu\text{mol/l}$. Inhibitor increased taxifolin content by 58-fold to 0,58 mg/100 ml.

The statistically significant negative effect of inhibitor AgNO_3 was on silybin A content in medium, 168 hours after application of ethephon in conc. of 400 $\mu\text{mol/l}$. Inhibitor completely decreased the effect of ethephon.

Obsah

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD | 1 |
| 2 | CÍL PRÁCE | 2 |
| 3 | TEORETICKÁ ČÁST | 3 |
| 3.1 | OSTROPEŠTŘEC MARIÁNSKÝ (SILYBUM MARIANUM) L. GAERTN. | 3 |
| 3.1.1 | <i>Botanický popis rostliny</i> | 4 |
| 3.1.2 | <i>Taxonomické zařazení (8)</i> | 4 |
| 3.1.3 | <i>Silybum marianum L. Gaertn. jako lékopisná droga</i> | 4 |
| 3.1.4 | <i>Obsahové látky</i> | 5 |
| 3.1.5 | <i>Účinky ostropeštrce</i> | 5 |
| 3.2 | EXPLANTÁTOVÉ KULTURY..... | 7 |
| 3.2.1 | <i>Rozdělení explantátových kultur (24)</i> | 7 |
| 3.2.2 | <i>Zrod explantátových kultur - historie</i> | 8 |
| 3.2.3 | <i>Výhody a nevýhody explantátových kultur</i> | 8 |
| 3.2.4 | <i>Využití explantátových kultur</i> | 9 |
| 3.2.5 | <i>Vnější faktory ovlivňující růst explantátových kultur</i> | 10 |
| 3.3 | SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA | 10 |
| 3.3.1 | <i>Makroelementy (25, 30, 31)</i> | 11 |
| 3.3.2 | <i>Mikroelementy (25, 30, 31, 32)</i> | 12 |
| 3.3.3 | <i>Sacharidy jako zdroj energie</i> | 13 |
| 3.3.4 | <i>Vitamíny</i> | 14 |
| 3.3.5 | <i>Dusík v organické podobě</i> | 14 |
| 3.3.6 | <i>Endogenní růstové regulátory</i> | 15 |
| 3.3.7 | <i>Další složky média</i> | 19 |
| 3.3.8 | <i>Tuhá média</i> | 19 |
| 3.4 | METODA ELICITACE | 21 |
| 3.4.1 | <i>Ethephon</i> | 22 |
| 3.4.2 | <i>Mechanismus účinku ethephonu</i> | 22 |
| 3.4.3 | <i>Inhibice ethephonu</i> | 24 |
| 3.4.4 | <i>Dosavadní studie s ethephonem</i> | 25 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 27 |
| 4.1 | POUŽITÉ LABORATORNÍ POMŮCKY, CHEMIKÁLIE A TECHNICKÉ VYBAVENÍ..... | 27 |
| 4.2 | ŽIVNÉ MÉDIUM | 28 |
| 4.3 | PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU | 29 |
| 4.4 | PŘÍPRAVA ELICITORU | 30 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.5 | PŘÍPRAVA INHIBITORU | 30 |
| 4.6 | PŘÍPRAVA NA PROVEDENÍ POKUSU | 30 |
| 4.7 | PROVEDENÍ POKUSU | 31 |
| 4.8 | ÚPRAVA VZORKŮ PRO HPLC ANALÝZU | 32 |
| 4.9 | STANOVENÍ OBSAHU – HPLC METODA | 32 |
| 4.10 | KALIBRAČNÍ KŘIVKY | 34 |
| 4.11 | CHROMATOGRAM STANDARDŮ FLAVONOLIGNANŮ | 38 |
| 4.12 | STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT (52, 53, 54) | 39 |
| 5 | VÝSLEDKY | 41 |
| 6 | DISKUZE | 60 |
| 7 | ZÁVĚR | 64 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ | 65 |
| 9 | SEZNAM OBRÁZKŮ | 69 |
| 10 | SEZNAM TABULEK | 70 |
| 11 | SEZNAM GRAFŮ | 71 |

1 Úvod

Žijeme ve století, kdy věda a výzkum jsou na špičkové úrovni, a přesto kolem sebe sledujeme návrat k neporušené přírodě. Tento trend se ve velké míře objevuje například v oblasti zemědělství, potravinářství či kosmetologii. Propagovány jsou produkty ekologického zemědělství, nebo potraviny bez umělých barviv a jiných chemických přísad. Ani medicína a farmacie nejsou výjimkou. Přírodní léčiva, kterými se zabývá věda zvaná farmakognozie, se opět těší velké pozornosti.

Rostlinné léčivé látky nalezneme nejen v potravinách, ale i v mnoha doplňcích stravy a rovněž v registrovaných léčivých přípravcích, jejichž účinnost byla podložena studii. Nejedná se pouze o léčbu prostého nachlazení, či nezávažných trávicích obtíží. Rostlinná léčiva jsou účinná v léčbě a prevenci rakovinného bujení, různých zánětů, kvasinkových, bakteriálních i virových onemocnění, psychiatrických potíží či v podpoře imunity. Dle průzkumů Světové zdravotnické organizace až 80 % lidí celého světa užívá právě jako součást primární léčby lék rostlinného původu. (1)

Přesto je nutné nezapomínat, že i rostliny s sebou nesou rizika interakcí a kontraindikací a mechanismus účinku některých z nich nebyl dosud objasněn.

Za léčivé účinky rostlin jsou zodpovědné látky, které se nazývají sekundární metabolity. Některé z nich najdeme ve více rostlinách, některé jsou však zcela specifické pro daný druh, například unikátní silymarinový komplex v ostropestřci mariánském.

Sekundární metabolity můžeme získávat z celých rostlin nebo z částí rostlinného těla. Jejich pěstování je někdy náročné z různých důvodů. Alternativou je proto získávání účinných látek z tzv. explantátových kultur, které s sebou nese spoustu výhod. Přestože podmínky růstu rostlinných kultur dokážeme nastavit tak, aby byly téměř ideální, neustále se potýkáme s problémem nízké produkce sekundárních metabolitů. Řešením je metoda zvaná elicítace, neboli vystavení rostlinné kultury stresovým podmínkám, na které existuje reakce v podobě zvýšení produkce žádoucích látek. Otázky jak, kdy a čím nejvhodněji provést metodu elicítace, jsou již dlouhou dobu předmětem rozsáhlého výzkumu.

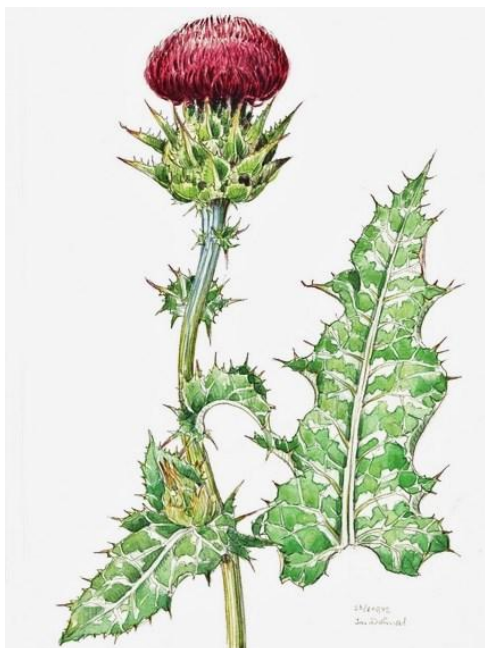
2 Cíl práce

Cílem této práce bylo seznámit se s technikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále zjistit vliv abiotického elicitoru Ethephonu na produkci jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v *in vitro* kultuře odvozené z rostliny *Silybum marianum* L. Gaertn. Na základě stanovení obsahu těchto látek HPLC metodou zjistit, zda vybraný abiotický elicitor je schopen ovlivnit produkci jednotlivých složek silymarinového komplexu.

3 Teoretická část

3.1 Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) L. Gaertn.

Ostropestřec mariánský, je rostlina z čeledi Hvězdnicovité (*Asteraceae*). Původně pochází z teplých krajín. Byl pěstován například na Kanárských ostrovech, ve Středomoří či Asii. Vyžaduje úrodné půdy s dostatkem živin a minerálů, zejména vápníku. Velmi špatně se mu daří na kyselých půdách. Ostropestřec je náročný na dostatek vláhy, světla a tepla. Je ochoten růst v nadmořských výškách až 600 m. n. m. Postupem času byl ostropestřec zavlečen i do Evropy a dnes se pěstuje téměř všude. Zároveň se rozšiřuje jeho planý růst na okraji polí, na kompostech či v rumištích (2, 3)



Obrázek 1: Ostropestřec mariánský (4)

V České republice se ostropestřec pěstuje jako plodina, využívána pro farmaceutické účely. Registrované jako tzv. LAKR (Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny) jsou u nás dva kultivary nesoucí názvy Silyb a Mirel. Kultivar Silyb spadá pod právní ochranu od roku 1988. Majitelem práv je TEVA Cz Industries, Opava-Komárov. Novější odrůda Mirel je právně chráněná od roku 2010 a spadá pod společnost Moravol, spol. s.r.o. CZ. Prostory pro pěstování se nacházejí na výměře až 5000 ha. Spolu

s kmínem, námelem a mákem se ostropestřec nachází mezi čtveřicí nejvýznamnějších velkoplošně pěstovaných léčivých rostlin. (5, 6, 7)

3.1.1 Botanický popis rostliny

Ostropestřec mariánský je rostlina jednoletá až dvouletá. Po celém těle je pokryta drobnými chloupky. Může dosahovat výšky až 2,5 metru. Kořen ostropestřce je kůlovitého tvaru. Lodyha může být rozvětvená a v její horní části nalezneme na povrchu bílé žebrování. Listy se nachází po celé její délce, v přízemní růžici mohou být až 40 cm dlouhé. Okraje listů jsou ostnaté, tvar je chobotnatý či peřenolaločnatý. Žilky na listech jsou doprovázeny výraznými bílými skvrnami. Květy mají velmi nápadnou fialovou barvu. Jsou tvořeny úbory tvaru vejce a bílou trubicí až 4 cm dlouhou, nahoře charakteristicky barevnou, cípatě rozšířenou. Plodem je nepukavá nažka. (2, 8)

3.1.2 Taxonomické zařazení (8)

| | | |
|----------|--------------------------------------|----------------------------|
| Říše | <i>Plantae</i> | rostliny |
| Oddělení | <i>Magnoliophyta</i> | krytosemenné rostliny |
| Třída | <i>Rosopsida</i> | vyšší dvouděložné rostliny |
| Řád | <i>Asterales</i> | hvězdicotvaré |
| Čeleď | <i>Asteraceae</i> | hvězdicovité |
| Rod | <i>Silybum</i> | ostropestřec |
| Druh | <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn. | ostropestřec mariánský |

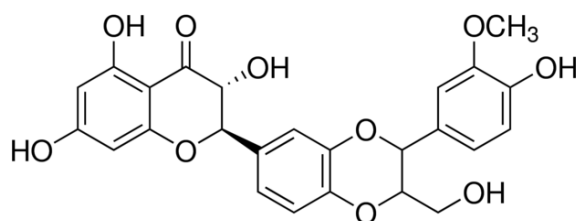
3.1.3 *Silybum marianum* L. Gaertn. jako lékopisná droga

Plod ostropestřce mariánského, *Silybi mariani fructus*, je lékopisnou drogou. Jedná se o zralý plod ostropestřce, zbavený chmýru, s obsahem minimálně 1,5 % silymarinu ve vysušené droze. Svou monografii v Českém lékopisu 2009 má rovněž *Silybi mariani extractum siccum raffīnatum et normatum*. Jedná se o suchý, čištěný a standardizovaný extrakt vyrobený z plodů ostropestřce s obsahem 90 % - 110 % silymarinu. Vyrábí se za použití rozpouštědel ethylacetátu, ethanolu, methanolu, nebo acetonu a to buď samotných, nebo ve směsi s vodou. Procenta silymarinu u obou lékopisných drog jsou vyjádřena jako hlavní obsahová látka silibinin (silybin). (10)

3.1.4 Obsahové látky

Za účinky této rostlinné drogy je zodpovědná skupina flavonolignanů, zvaná silymarin, neboli silymarinový komplex. Flavonolignany jsou aktivní látky flavonoidní povahy, které mají k flavanonovému skeletu připojenou molekulu prekursoru koniferylalkoholu.

Hlavní složky silymarinu tvoří diastereoisomerní látky silybin A a silybin B, jejichž směs se nazývá též silibinin, dále silydianin, silychristin, isosilybin A a isosilybin B. Největší část komplexu (50-70 %) zaujímá silybin, který je také hlavním nositelem účinků. Nejvyšší koncentrace silymarinu najdeme v plodech a zejména v semenech ostropestřce, která po usušení obsahují 1-4 % silymarinu. Další obsahové látky, které byly nalezeny jako minoritní součást komplexu, jsou dehydrosilybin, deoxysilychristin, deoxysilydianin, silandrin, silybinom, silyhermin, a neosilyhermin.



Obrázek 2: Struktura hlavní obsahové látky silybinu (9)

Kromě těchto aktivních látek, charakteristických pro ostropestřec, nalezneme v semenech také flavonoidní látky kvercetin a taxifolin (dihydrokvercetin), specifický například pro tis (*Taxus*), dále apigenin, silybinol a kyseliny myristovou, palmitovou, stearovou a olejovou. (11, 12, 13, 14)

3.1.5 Účinky ostropestřce

Silymarinový komplex je neodmyslitelně spojen s léčbou jaterních onemocnění, při kterých se užívá již od nepaměti. Tato rostlina však není pouze tradičním lidovým lékem. Ostropestřec se stal v léčbě jaterních onemocnění nenahraditelným unikátem, jehož účinky byly podloženy mnoha vědeckými studiemi. Kromě toho má však mnoho dalších prokázaných cenných vlastností a stále nové a nové jsou objevovány. Nejen v terapii, ale již v prevenci je ostropestřec hojně užíván, neboť je pacienty velmi dobře

snášen. Kromě mírných zažívacích obtíží a alergických reakcí, nemá žádné prokázané vedlejší účinky, resp. se jedná o nežádoucí účinky srovnatelné s placebem. Silymarin se velmi dobře vstřebává po perorálním podání a vylučován je žlučí jako sulfát nebo glukuronát.

Silymarin chrání hepatocyty v případě nejrůznějších onemocnění jater, ať už se jedná o jaterní cirhózu, otravu muchomůrkou (*Amanita phalloides*), ethanolem, paracetamolem či jinými léčivy. Přestože nemá antivirotické vlastnosti, je s výhodou používán i v případě virové hepatitidy. Mechanismem účinku je zde především podpora tvorby bílkovin a tudíž regenerace jaterní tkáně, podpořená silným protizánětlivým působením. U zánětů jater různé etiologie, hrozí riziko fibrotizace tkáně¹. I zde se ostropestřec uplatňuje svými anitfibrotickými účinky.

Také bylo prokázáno, že silymarin je schopen vylučovat volné radikály, uplatňuje se jako antioxidant, a napomáhá k detoxikaci. (12, 15, 16, 17, 18)

Novější studie dokázaly, že díky schopnosti vyvolávat apoptózu buněk bez nežádoucích vedlejších cytotoxických vlastností, je ostropestřec vhodný pro léčbu rakovinného bujení. Například ve studii z listopadu 2014 zkoumal tým vědců z Univerzity čínské medicíny v Hubei možnosti ostropestřce v léčbě rakoviny vaječníků. Výsledkem bylo, že v závislosti na dávce a čase působení silymarin skutečně zpomaluje růst nádorových buněk a zastavuje tak nežádoucí průběh buněčného cyklu. (20)

V neposlední řadě je nutné zmínit, že ostropestřec mariánský chrání plod v děloze matky před působením alkoholu. V hojné míře se také užívá v kosmetickém průmyslu. Bylo zjištěno, že silibinin je schopen chránit buňky v případě poškození kůže vlivem UV-záření. Lokální podání na kůži dosahovalo srovnatelných výsledků jako systémové perorální podání. Ostropestřec mariánský má tedy vysoký potenciál využití při prevenci rakoviny kůže. (19, 21)

Perspektivní výsledky rovněž přinesl pokus vědců z roku 2014. U laboratorních myší indukovali pomocí streptozocinu² a vysokocholesterolové diety *diabetes mellitus*

¹ Zbytečně nefunkčního vaziva

² Protinádorové léčivo, v ČR dnes není registrováno. Působí cytotoxicky na β -buňky Langerhansových ostrůvků a navozuje tak *diabetes mellitus* u laboratorních myší. (23)

a po dobu 22 týdnů od propuknutí nemoci aplikovali silybin. Díky silybinu u myši nedošlo k rozvoji diabetické retinopatie. (22)

3.2 Explantátové kultury

Jedná se o izolované části rostlin, které jsou pěstovány *in vitro* v přesně definovaných, umělých kultivačních podmínkách. Izolovanými částmi rostlin (tzv. explantátem) jsou například části stonků, listů, kořene, embrya, jednotlivé buňky či protoplasty.

Na rozdíl od živočichů, jsou rostlinné buňky schopné nepohlavního vegetativního rozmnožování. Díky tomu izolované části těla rostliny stále narůstají a za určitých podmínek kultivace vyvolaných rostlinnými hormony z nich dokonce lze vypěstovat intaktní (sterilní) rostlinu. Takové množení rostlin *in vitro* se nazývá mikropropagace a umožňuje její vlastnost zvaná totipotence. Totipotentní buňka má všechny genetické předpoklady pro to, aby se z ní vyvinul kompletní organismus. Jedná se o vlastnost unikátní pro říši rostlin.

Kultury můžeme rozdělit do skupin dle mnoha faktorů, například podle jejich původu na kultury izolovaných semen či embryí, kultury orgánové, kalusové, buněčné či protoplastové.

Rozdělení se však v různých zdrojích poněkud liší. Důvodem může být například to, že se některé kultury mohou odvíjet jedna od druhé. Například buněčnou (suspenzní) kulturu můžeme získat mechanickým rozdrobením kultury tkáňové (kalusové) apod. (24, 25, 26)

3.2.1 Rozdělení explantátových kultur (24)

1. Kultury izolovaných semen
2. Kultury izolovaných embryí
3. Orgánové kultury
4. Kultury vegetativních orgánů nebo jejich částí (kořeny, stonky, listy, meristémy, pupeny)
5. Kultury generativních orgánů (květní pupeny, poupata, květy, pestíky, tyčinky, prašníky, pylová zrna, spory, gametofyty)
6. Kalusové kultury

7. Buněčné kultury
8. Protoplastové kultury

3.2.2 Zrod explantátových kultur - historie

S převratným objevem pěstování explantátových rostlinných kultur *in vitro* za aseptických podmínek přišel jako první Haberlandt v roce 1902. Vycházel z dosavadních znalostí rostlinné buňky. Navazoval například na Vöchtinga, který již v roce 1878 zkoumal růst kalusu z rostliny *Brassica napus*, ovšem za nesterilních podmínek. Haberlandovy jednotlivé buňky v kulturách sice narůstaly, avšak nevydržely déle než 27 dní, z důvodu nedostatku živin v kultivačním médiu. Nebyly schopny se rozmnožovat.

V průběhu let spolu se stále širším poznáním fyziologie rostlin a vnitřních biochemických pochodů, docházelo ke zdokonalování živného média. A nakonec díky explantátovým kulturám byly objeveny látky, které přirozeně stimulují rozmnožování buněk - fytohormony. Do média byly přidány rostlinné hormony auxiny (v roce 1939 Gauthret a White, nezávisle na sobě) a cytokininy v roce 1955 (Miller, Skoog, Okumura, Von Saltza a Strong). K dokonalosti přivedli živné médium pánové Murashige a Skoog. Zjistili, jaký vliv mají určité poměry auxinů a cytokininů na růst kalusů tabáku (*Nicotiana tabacum*). Díky nim dnes známe jedno z nejhojněji užívaných médií, tzv. MS médium. (24, 27)

3.2.3 Výhody a nevýhody explantátových kultur

Explantátové kultury umožňují velmi rychlé a efektivní pěstování rostlin na relativně malém prostoru. Díky práci s explantátovými kulturami můžeme za vhodných podmínek docílit rychlého dělení buněk a nárůstu kultur. Podmínky kultivace je možné měnit a přizpůsobovat aktuálním požadavkům a získat tak co nejvyšší výnos. Pracujeme nezávisle na vnějších vlivech a rovněž nejsme omezeni principy přirozeného rozmnožování rostlin. (25, 27)

Díky práci ve sterilních podmínkách nejsou kultury tolik zatíženy kontaminací z okolí a nedochází tak k jejich úhynu. Jsme schopni připravit čisté kultury bez přítomnosti hub, bakterií i virů. (25)

Přesazování explantátových kultur, popřípadě odvozování zcela nové kultury, je časově náročnější a pracnější. Poté však následuje období nárůstu a dělení buněk v živném médiu, kdy nepotřebují kultury žádnou péči a můžeme je ponechat v klidu. (25)

Nevýhodou obecně všech explantátových kultur je nízká produkce sekundárních metabolitů v porovnání s intaktní rostlinou. U některých dlouho odvozovaných kultur může dokonce produkce zcela vymizet. (14) Cílem bádání je proto zvýšit produkci žádoucích aktivních látek – sekundárních metabolitů – metodou elicitace, kterou se zabývá kapitola 3.4.

V neposlední řadě je nutno zmínit, že práce s explantátovými kulturami je finančně náročná z důvodu speciálního laboratorního vybavení umožňující aseptické podmínky. (25)

3.2.4 Využití explantátových kultur

Díky explantátovým kulturám dokážeme snadněji manipulovat s rostlinami na úrovni jednotlivých buněk a pomocí speciálních laboratorních metod rovněž zasahovat do jejich genetického kódu. Tento obor se nazývá biotechnologie. Principem rostlinné biotechnologie je přenos geneticky kódovaných výhodných vlastností, například z jednoho rostlinného druhu na jiný.

Explantátové kultury se v rámci biotechnologie využívají ve šlechtění rostlin. Šlechtění je spjato s produkcí a šířením okrasných rostlinných druhů, například orchidejí. Ale obrovský význam je v získávání kvalitních zemědělských odrůd plodin, odolných vůči nákazám a jiným nepříznivým podmínkám. Z toho plyne například zvýšení zemědělských výnosů, ale nejen to. Díky zemědělským odrůdám získaným metodou genetického inženýrství, mohou být plodiny pěstovány například bez pesticidů, které narušují životní prostředí.

Dále jsme schopni díky explantátovým kulturám ovlivňovat tvorbu sekundárních metabolitů rostlin. Jedná se o cenné látky, které jsou s výhodou využívány v oblasti medicíny a farmacie pro jejich terapeutické účinky, ale také v potravinářství a kosmetologii. (26, 27, 28, 29, 43, 44)

3.2.5 Vnější faktory ovlivňující růst explantátových kultur

Růst a množení explantátových kultur je závislé na určitých faktorech - na kultivačních podmínkách, které jsme schopni ovlivnit. Mezi ně patří světlo, teplota a vlhkost vzduchu. Každá rostlinná kultura je specifická a může vyžadovat trochu jiné podmínky. Teplota a světlo mají vliv na fyziologické děje uvnitř rostlinné buňky a na metabolické pochody. Mohou negativně ovlivnit růstové regulátory v kultivačním médiu. Některé fytohormony mohou být nesprávně zvolenou teplotou zcela degradovány. U světla můžeme ovlivnit jeho intenzitu, či světelnou periodu. V některých specifických případech se vyžaduje absolutní nepřítomnost světla a to například u klíčení semen. Vysoká vlhkost v kultivační místnosti může být příčinou zvýšené kontaminace kultur plísněmi.

Kromě těchto vnějších podmínek má vliv také způsob kultivace. Například buněčné suspenzní kultury na rozdíl od těch kalusových, vyžadují kultivaci za neustálého protřepávání, a proto se umísťují na laboratorní třepačku či pomaloběžný roler. Dlouhým stáním za nepřístupu kyslíku, dojde k usmrcení buněk. Protřepávání může být různé intenzity, měřeno v otáčkách za minutu.

Obrovský vliv na růst explantátových kultur mají živná média. Díky správné volbě živného média dokážeme zajistit růst a množení explantátových kultur. (24)

3.3 Složení kultivačního média

Existuje více druhů médií, která se od sebe liší konzistencí, obsahem látek či jejich vzájemným poměrem. Základní složení je však vždy velmi podobné. Každé médium obsahuje makro- a mikro elementy, sacharidy jako zdroj energie, některé vitaminy, aminokyseliny, růstové regulátory. (24)

Mnohdy však chceme v kulturách vyvolat popřípadě zvýšit tvorbu sekundárních metabolitů a k tomu základní živiny nestačí. Na řadu pak přichází tzv. elicitory, kterým je věnovaná kapitola 3.4.

3.3.1 Makroelementy (25, 30, 31)

Jedná se o nejdůležitější a nejhojněji zastoupené prvky, které se oproti ostatním složkám média, přidávají ve vysoké koncentraci. Řadí se mezi ně dusík, fosfor, draslík, vápník a síra.

Dusík

Dusík je stavebním kamenem mnoha molekul, nezbytných pro růst rostlin. To platí také pro explantátové kultury. Do média je přidáván ve formě dusičnanů (draselných nebo amonných), v podobě amonných solí anebo v kombinaci, což některým rostlinným druhům prospívá nejlépe. Celkové množství dusíku, dodané do média, by mělo být v rozmezí od 25-60 mmol/l. Samotné amonium pak 2-20 mmol/l. Přestože existuje možnost dodávat dusík do média ve formě organických látek, není tento způsob tolik vhodný a anorganická forma je preferována.

Fosfor

Do média je dodáván ve formě solí hydrogenfosforečnanů (draselných nebo sodných) v množství okolo 1-3 mmol/l. Je součástí mnoha enzymů, fosfolipidů v buněčných membránách, ribonukleové a deoxyribonukleové kyseliny. Podílí se na nezbytném energetickém metabolismu prostřednictvím ATP. Hraje významnou roli ve fotosyntéze, které jsou schopny i některé rostlinné kultury.

Draslík

Draslík je kation podílející se na vyrovnávání iontové rovnováhy. Neutralizuje záporné ionty a řídí osmotické jevy. Kromě toho je ale také součástí mnoha enzymů a podílí se na stavbě makromolekul. Do média je dodáván ve formě anorganických solí v množství 20-30 mmol/l.

Vápník

Vápník, ve formě dvojmocného kationtu, se rovněž podílí na vyrovnávání záporných nábojů v buňce. Je převážně ukotven v buněčných stěnách, popřípadě se nachází jako součást membrán. Slouží jako kofaktor k enzymatickým pochodům, jako

je například hydrolyza ATP a uvolnění energie. Ve formě dusičnanů nebo chloridů se nachází v médiích v množství 1-3 mmol/l.

Hořčík

Funkcí hořčíku v rostlině je kromě vyrovnávání záporného náboje také podíl na průběhu fotosyntézy, je součástí chloroplastů. Velmi významnou roli hraje ve funkci enzymů. V koncentraci 1-3 mmol/l se nachází v médiu nejčastěji jako síran hořečnatý.

Síra

Síra je nejčastěji do média dodávána spolu s hořčíkem v již zmiňovaném síranu hořečnatém. Celková koncentrace síry by měla být kolem 1-3 mmol/l. Má velmi významnou funkci ve stavbě bílkovin, neboť se podílí na tvorbě disulfidických můstků v aminokyselinách cysteinu a metioninu. Kromě toho je součástí koenzymu A a sulfolipidů, má podíl na fotosyntetických dějích. Síra je také zabudována do některých vitaminů a to konkrétně vitamínu B1 (thiamin) a B7 (biotin).

3.3.2 Mikroelementy (25, 30, 31, 32)

Mikroelementy se nacházejí v médiu v mnohem menší koncentraci. Převážně jsou pro růst a množení rostlinné kultury nepostradatelné, zejména hrají svou roli jako katalyzátory biochemických reakcí. Avšak najdeme i takové z nich, například sodík, chlór, kobalt nebo jód, které jsou velmi specifické. V živných médiích tedy mohou a nemusí být.

Železo

Do média je přidáváno ve formě roztoku chelátových komplexů. Je stěžejní pro tvorbu chlorofylu v rostlině, tvoří základní kámen barviva, zvaného *hem*. Je součástí enzymů a působí jako katalyzátor v mnoha oxidačních a redukčních dějích. Koncentrace v médiích jsou různé, dle toho také železo některé zdroje řadí mezi mikroelementy a některé mezi makroelementy.

Mangan

Mangan je opět nezbytný pro průběh mnoha biochemických reakcí, včetně fotosyntézy, kde má v rámci komplexu fotosystému II za úkol štěpit molekuly vody. Podílí se rovněž na buněčném dýchání. Do média se přidává ve formě síranu.

Zinek

Zinek, ve formě zinečnatých iontů, se do médií přidává buď v roztoku chelátových komplexů, podobně jako železo, nebo ve formě síranu zinečnatého. Stejně jako ostatní mikroelementy je nezbytný pro průběh enzymatických reakcí. Konkrétně má na starosti tvorbu fotosyntetických barviv a syntézu bílkovin.

Bór

Bór, dodávaný do média jako slabá kyselina boritá H_3BO_3 hraje svou roli při syntéze polymeru ligninu, který tvoří nezbytnou součást mnoha buněk. Dále bór řídí metabolismus fenolových kyselin.

Měď

Do média se dodává ve formě síranu měďnatého v celkové koncentraci okolo 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Vysoké koncentrace mohou být pro rostlinnou buňku toxické. Jako ostatní mikroprvky, i měď se podílí na katalýze pro rostlinu životně důležitých reakcí, například přenos elektronů v rámci fotosyntézy na komplexu zvaném fotosystém I. Mimo jiné, nedostatek mědi v rostlině může způsobit nižší pohyblivost pylu.

Molybden

Funkce molybdenu úzce souvisí s metabolismem dusíku. Dusík je primárně rostlinami přijímán ve formě dusičnanů a ty jsou, také například pomocí molybdenu, redukovány a dále zpracovávány rostlinou. Takto z anorganického dusíku vzniká dusík organický. Často se do živného média dodává ve formě molybdenanu sodného Na_2MoO_4 .

3.3.3 Sacharidy jako zdroj energie

Sacharidy jsou nedílnou součástí živného média, neboť jsou zdrojem uhlíku a zároveň tedy energie, která je rostlinám zvnějšku dodávána. Explantátové kultury

téměř nejsou schopny získávat energii autotrofním způsobem, čili z anorganického uhlíku si samy vytvářet uhlík organický, proto jsou na dodávce sacharidů závislé. Nejčastěji se do média přidává osmoticky působící disacharid sacharóza. V některých případech (například v autoklávu) dojde v médiu k hydrolytickému štěpení na základní stavební kameny, fruktózu a glukózu. Sacharózu je v některých případech možné nahradit glukózou. Náhrada fruktózou také přichází v úvahu, avšak bylo potvrzeno, že jako zdroj energie není tak vhodná jako sacharóza či glukóza. (25, 32)

3.3.4 Vitamíny

Každá rostlina je schopná sama si syntetizovat potřebné vitamíny, které jsou nezbytné pro průběh metabolických reakcí. Explantátovým kulturám musíme vitamíny dodávat prostřednictvím živného média. Jediným vitamínem, jehož nedostatek může způsobit zcela zastavení růstu rostlinné kultury, je vitamin B₁ (thiamin). Proto je součástí téměř všech médií. Další vitamíny, které se do médií často přidávají, ale již nejsou životně důležitými, jsou rovněž z komplexu vitaminů B. Jedná se o kyselinu nikotinovou (vitamin B₃, známý též pod názvem niacin), vitamin B₆ neboli pyridoxin, riboflavin (B₂), kyselinu listovou (B₉), kyselinu pantotenovou (B₅) a dále vitamin C (kyselina askorbová). Myo-inositol není vitamin v pravém slova smyslu, ale svými funkcemi se vitaminům velmi blíží. Je to látka sacharidové povahy (cukerný alkohol), která hraje důležitou roli v buněčném dělení. Jako součást fosfatydil-inositolu podporuje dělení buněk, proto je do médií rovněž s výhodou přidáván. (25, 32)

3.3.5 Dusík v organické podobě

Kasein je mléčná bílkovina, která se do média přidává v hydrolyzované podobě, jakožto rychlý zdroj až 18 aminokyselin, resp. organického dusíku. V určitých koncentracích stimuluje buněčné dělení, avšak při koncentraci vysokých může mít efekt opačný. Jako alternativa kaseinu se do médií mohou přidávat také jednotlivé aminokyseliny glycin, adenin, L-glutamin či L-asparagin. Bylo dokázáno, že přidání kaseinu, jako komplexu aminokyselin, je pro rostlinné kultury prospěšnější, než přidání pár stěžejních aminokyselin. Médium dle Murashiga a Skooga například obsahuje kombinaci hydrolyzovaného kaseinu a samotného glycinu. (25, 30, 31)

3.3.6 Endogenní růstové regulátory

Endogenní růstové regulátory, zvané též fytohormony neboli rostlinné hormony jsou látky, které nejenže urychlují růst a dělení buněk, ale rovněž se podílejí na diferenciaci. Na rozdíl od hormonů živočišných jsou méně specifické a netvoří se jen ve specializovaných orgánech. Fytohormony mají často mnoho rozličných účinků a vznikají na různých místech rostlinného těla. Často neplatí pravidlo, že čím více fytohormonu dodáme, tím rychlejšího růstu dosáhneme. Někdy mohou vyšší koncentrace určitého hormonu růst inhibovat. Z toho plyne, že samotné zvýšení koncentrace jednoho hormonu nevede vždy k většímu prospívání kultury. Spíše toho dosáhneme změnou vzájemného poměru endogenních růstových regulátorů.

Základní mechanismus účinku rostlinných hormonů je však podobný tomu, co známe u hormonů živočišných a tím je vazba na receptor, tedy vazebné místo bílkovinné povahy. Takové receptory se mohou nacházet buď přímo uvnitř buňky v cytoplazmě, nebo na povrchu membrány, a následně dochází k aktivaci složitěho systému druhých posílů. Výsledkem působení hormonů přímo v jádře buňky je exprese určitých genů.

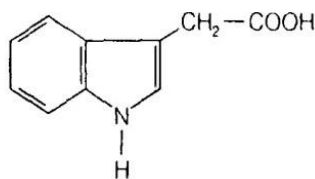
Mezi základní růstové hormony, přidávané do médií, řadíme auxiny, cytokininy, gibbereliny a kyselinu abscisovou. Kromě toho známe ještě další látky například brassinosteroidy a polyaminy, které mohou růst také pozitivně ovlivnit, ovšem mezi rostlinné hormony jako takové je neřadíme. (33)

Pro úplnost je nutné uvést rovněž ethylen, který doplňuje pětici základních růstových hormonů. Do živných médií se však nepřidává. Pozornost mu bude věnována v kapitole 3.4.

Auxiny

Auxin je nejdéle známý rostlinný hormon, jehož objev započal již Charles Darwin. Existuje mnoho cest biosyntézy auxinů v rostlinném těle, které nejčastěji vychází z aminokyseliny tryptofanu. Zásobní podoba auxinů je ve formě reversibilních konjugátů, které se v případě potřeby přemění na volný auxin. Ten je nositelem účinku.

Základním zástupcem skupiny auxinů je kyselina indolyl-3-octová, známá pod zkratkou IAA. Kromě kyseliny IAA se v rostlinách také nachází kyselina fenylloctová (PAA) nebo indolyl-máselná (IBA), které patří rovněž mezi přirozené auxiny.



Obrázek 3: Vzorec kyseliny indolyl-3-octové (IAA) (33)

Od přirozených auxinů byly již dávno odvozeny látky syntetické, například dnes hojně užívaná kyselina α -naftyloctová (NAA) či kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D).

Jedním z hlavních účinků auxinů je tzv. prodlužovací růst buněk a jejich dělení. To je také důvod, proč se syntetizují nejvíce ve vrcholových částech rostliny, tedy tam, kde je dlouhivý růst nejintenzivnější. Od vrcholu rostliny se po její ose distribuují auxiny dál do těla rostliny, takže u země je koncentrace mnohem nižší. Tyto rostlinné hormony jsou zodpovědné za apikální dominanci (vzrostlý vrchol je nápadně dominantní oproti vrcholům postranním). Rovněž podporují tvorbu kořenů a dávají rostlině prvotní signál pro tvorbu plodů. Obecně mají tedy auxiny pozitivní vliv na organogenezi.

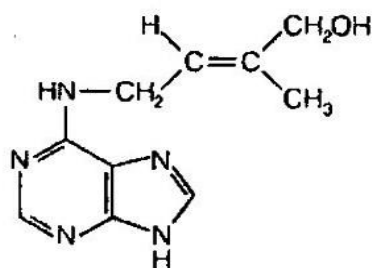
Auxiny mají velký význam při pěstování kultur *in vitro*. Podporují buněčný cyklus a dělení buněk. Stimulují růst kalusů, popřípadě zakořeňování explantátů. (30, 33)

Cytokininy

Tyto rostlinné hormony byly objeveny v průběhu rozvoje tkáňových kultur. S rostoucími nároky a prohlubováním znalostí bylo zjištěno, že použití kokosového mléka jako stimulantu pro dělení buněk (tzv. cytokinezi), je nedostačující.

Objeven byl kinetin, derivát adeninu, izolovaný z DNA rybího spermatu. Tato látka, dodaná z vnějšku, výrazně stimulovala buněčné dělení. Bylo zjištěno, že se přirozeně vyskytuje v rostlinách a stala se tak základem pro skupinu hormonů, nazývanou cytokininy. Později byl objeven zeatin, extrahovaný z endospermu kukuřice (*Zea mays*), dodnes nejčastěji užívaný přirozený cytokinin. Mezi nejhojněji užívaný syntetický cytokinin patří benzyladenin, neboli benzylaminopurin (BAP).

Chemický vzorec cytokininů je velmi různorodý. Základní struktura přirozených cytokininů je však vždy odvozena od adeninu substituovaného na dusíku v poloze 6, mající dvojnou vazbu v postranním řetězci.



Obrázek 4: Vzorec *trans*-zeatinu (33)

Hlavním účinkem cytokininů je již zmiňovaná podpora dělení buněk, a to konkrétně tak, že urychlují transkripci DNA. Proto najdeme vysoké koncentrace v dělivých pletivech, meristémeh. Hlavním místem pro syntézu jsou kořeny, dále pak pupeny a rozvíjející se embrya, či semena. Z vrcholů kořenů se cytokininy šíří dál do rostliny, v pupenech a embryích je jejich působení spíše jen místního charakteru.

Co se týče regenerace rostlin z jejich izolovaných částí, působí cytokininy a auxiny synergicky, společně ji podporují. Naproti tomu u apikální dominance působí cytokininy, oproti auxinům, zcela naopak. Potlačují dominanci vzrostného vrcholu a podporují růst vrcholů bočních a větvení stonků. V neposlední řadě zpomalují stárnutí rostlin, zejména při velmi vysokých koncentracích.

Cytokininy se využívají hojně v tkáňových kulturách, u kterých stimulují dělení buněk. Některé tkáňové kultury jsou schopny se tzv. habituovat. Hormony cytokininy se naučí vytvářet samy a jejich buněčné dělení se stává nezávislé na dodávce z vnější.

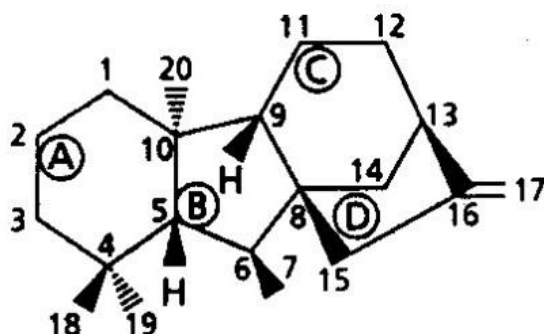
(30, 33)

Gibereliny

Název dostaly gibereliny podle houby *Gibberella fujikuroi*. Touto houbou byla nakažená rostlina rýže a projevil se u ní extrémně urychlený prodlužovací růst, který nakonec vedl k úhynu. Japonští vědci z houby dokázali získat látky giberelin A a giberelin B, ze kterých se pak postupem času získala aktivní substance, kyselina giberelová (GA). Bylo zjištěno, že se nenachází pouze v houbě, ale také ve vyšších rostlinách jako jeden ze základních fytohormonů.

Dnes je známo více než 100 zástupců giberelinů. Značí se číslem v dolním indexu, které udává pořadí, ve kterém byly objeveny. Chemicky se jedná o látky terpenoidní

povahy. Nositelem účinku je tetracyklický skelet a dvě karboxylové skupiny v polohách 7 a 19 (viz. Obrázek 5)



Obrázek 5: Základní struktura giberelinů (33)

Dva nejužívanější zástupci jsou kyselina giberelová (zkratka GA_3) a směs dvou giberelinů GA_{4+7} .

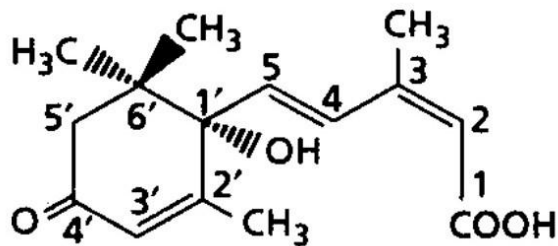
Kromě prodlužování rostlin, jsou gibereliny zodpovědné za vypuknutí kvetení a stimulaci klíčení, tvorbu kořenů pak spíše inhibují. Syntéza je v rostlinném těle zaměřená do míst aktivního růstu, jako jsou semena, pupeny či mladé listy.

Komerční využití giberelinů spočívá ve šlechtitelství okrasných rostlin, kdy se pomocí nich například zastavuje neestetický prodlužovací růst. A dále stimuluje zvětšování ovocných plodů. (30, 33)

Kyselina abscisová (ABA)

Kyselina abscisová je látka terpenoidní povahy, která má oproti předchozím fytohormonům účinky spíše opačné. Zpomaluje prodlužovací růst a jejím vlivem se vytváří síť postranních kořenů. Název kyseliny abscisové vznikl z domněnky, že je zodpovědná za odpad listů, tzv. abscisii. Tato domněnka není zcela správná a byla později vyvrácena. Hlavními aktéry opadu a stárnutí listů jsou totiž auxiny a ethylen. Kyselina abscisová přispívá tím, že zvyšuje biosyntézu hormonu ethylenu.

Dále má vliv na vodní hospodaření v rostlině. Při nedostatku vody uzavírá rostlinné průduchy, které jsou na její přítomnost velmi citlivé, a snižuje tak transpiraci. Celkově napomáhá rostlině odolávat vnějšímu stresu, což může být kromě nedostatku vody také zasolení či extrémní chlad. Proto je pro rostlinu výhodné, mít vždy dostatek kyseliny abscisové v podobě konjugované zásobní formy, která je uložena ve vakuolách.



Obrázek 6: Vzorec kyseliny abscisové ((S)-cis-ABA) (33)

Tento rostlinný hormon má pozitivní vliv na semena, u kterých jednak stimuluje tvorbu zásobních proteinů a jednak předchází jejich dehydrataci. Má tak účast na postupném zrání semena a embryogenezi. Působí inhibicí předčasného klíčení, podporuje stav dormance. (30, 33)

3.3.7 Další složky média

Někdy se do médií mohou přidávat látky jako např. kokosové mléko, pomerančová či rajčatová šťáva, kvasinkový extrakt, sladový extrakt, ovocná dřevina apod. Vesměs se jedná o nutričně hodnotné látky, které však mají obtížně definovaný obsah jednotlivých organických složek a znesnadňují tak přípravu živného média s vyváženým poměrem všech složek. Proto se dnes příliš nepoužívají.

Další přísadou může být aktivní uhlí, které na sebe díky obrovskému povrchu absorbuje toxické látky a tím může urychlit růst kultury. Bohužel není nijak selektivní, a proto na sebe zpravidla váže také látky žádoucí a může tak růst kultury zcela inhibovat. (25, 32)

3.3.8 Tuhá média

Tuhá média jsou využívána například u kalusových kultur, kdy není žádoucí úplné potopení explantátu.

Kapalná a tuhá média mají stejné složení, co se živin týče. Do tuhých médií navíc přidáváme zpevňující látky, jako jsou agar, z něj synteticky získaná agaróza, či tzv. gellanové gummy (Gerlit, Phytigel). Gellanové gummy jsou látky polysacharidové povahy získané z bakterií *Pseudomonas elodea*.

Nejhojněji užívanou látkou však zůstává agar. Má spoustu cenných vlastností. Je to přírodní polysacharid, získaný z červených řas. Nikterak s látkami v médiu nereaguje,

pozvolna se rozpouští už při teplotách nad 60°C a tuhý gel tvoří při 45°C. Tuhost média můžeme snadno regulovat přidáním většího či menšího množství agaru. Je potřeba počítat s tím, že agar přirozeně obsahuje prvky jako vápník, hořčík, sodík a draslík. Někdy může být agar méně čistý a koncentrace prvků může být poněkud jiná, než bychom očekávali, čímž se změní také celkové množství daných elementů v médiu.

V případě, že nechceme použít tuhé médium, nabízí se ještě jedna alternativa jak zajistit, že se nám explantát zcela do média neponoří, a tou je využití tzv. můstku z filtračního papíru, které tvoří v podstatě membránu pro přestup živin z média k explantátu. Takový příjem živin je pro explantát jednodušší, rovněž médium si udržuje po celou dobu kultivace všude homogenní složení, nedochází k hromadění škodlivých exudátů na povrchu a nakonec i příprava samotného média je jednodušší.

(25, 32)

3.4 Metoda elicitace

U rostlinných kultur se neustále potýkáme s problémem nízké produkce žádaných metabolitů. Možnosti, jak zvýšit produkci, jsou stále předmětem rozsáhlého výzkumu.

Mezi nejefektivnější způsoby, jak toho dosáhnout, patří metoda elicitace. Elicitor je látka, která vyvolává stres a zároveň spouští obranný mechanismus. Metody elicitace jsou různé, v ideálním případě však vždy vedou ke stejné odpovědi rostlinných kultur a to je zvýšená tvorba sekundárních metabolitů. (34)

Rozdělení elicitorů

Elicitory dělíme na abiotické a biotické.

Abiotické elicitory jsou fyzikálně-chemického původu. Mezi ty chemické patří zejména působení anorganických a organických látek. Dále například nedostatek kyslíku, vody a živin, některé toxické kovy, přesolené a příliš kyselé půdy.

Mezi fyzikální vlivy se řadí extrémní nízká i vysoká teplota, nadměrné záření v oblasti UV či viditelného světla. S výhodou se k elicitaci buněčných kultur *in vitro* využívá elektrického proudu a ultrazvuku.

Mezi biotické faktory řadíme biologické vlivy. Například tzv. alelopatika, což jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin, které na ostatní rostlinné druhy působí elicitálně. Mezi alelopatika mohou patřit také produkty rozkladu odumřelých rostlin, dále i různé patogenní organismy jako bakterie, viry, či některé kmeny hub.

Pro celistvost je nutno zmínit, že v přírodě mohou jako biotické vyvolávače stresu působit také býložraví živočichové či hmyz, kteří mechanicky naruší rostlinu. S těmito se však, v oblasti explantátových kultur pěstovaných *in vitro*, nesetkáváme. (34, 35)

Kromě použití elicitorů existují ještě jiné možnosti, jak zvýšit produkci sekundárních metabolitů. Například přidáním prekursorů daných látek do živného média, využití biotransformace, či změna některých složek média. (34)

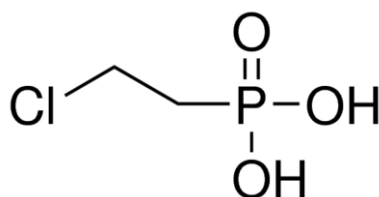
Faktory, které ovlivňují průběh elicitace (34)

- Druh zvoleného elicitoru a jeho koncentrace
- Doba působení elicitoru na kulturu
- Stáří rostlinné kultury
- Přidané růstové regulátory
- Složení živného média

3.4.1 Ethephon

Ethephon (též Ethrel, chlorethephon) je univerzální růstový stimulátor, jehož účinnost byla dokázána v mnoha studiích. Řadí se mezi organofosfáty a chemicky se jedná o 2-chlorethylfosforečnou kyselinu. Je součástí komerčně používaných pesticidů.

(37)



Obrázek 7: Vzorec ethephonu (36)

Dle hodnocení Environmental Protection Agency se řadí ethephon mezi tzv. GUP (General Use Pesticides). Na rozdíl od tzv. RUP (Restricted Use Pesticides), jejichž použití je omezeno pouze pro vlastníky certifikátu pro zacházení s těmito látkami, popřípadě používání pod jejich přísným dohledem, pro ethephon neplatí tak striktní pravidla. (38)

3.4.2 Mechanismus účinku ethephonu

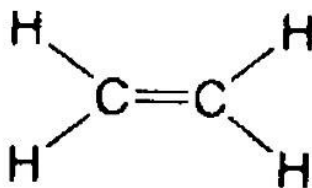
Mechanismem účinku ethephonu je rozklad v rostlinném pletivu na přírodní hormon ethylen, chloridy a fosforečnany. (24)

Rostlinný hormon ethylen

Hormon ethylen je podstatou účinku ethephonu. Je to jediný fytohormon, který známe v plynném stavu.

Na rozdíl od ostatních hormonů (auxiny, cytokininy, gibbereliny a kyselina abscisová), se nepřidává do živných médií, proto také není zařazen do předchozí kapitoly 3.3.6.

Ethylen je plynný uhlovodík, který známe pod chemickým názvem ethen. V rámci rostliny se transportuje v podobě prekursoru ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina), který je ukládán jako konjugát v zásobní formě a v případě potřeby transportu se z konjugátu uvolňuje. Převod ACC na ethylen se děje oxidací.



Obrázek 8: Vzorec ethylenu (33)

Ethylen má molekulu hydrofobní, snadno proniká membránami a váže se na receptory v cytoplazmě buňky. Za normálních podmínek je jeho vnitrobuněčná koncentrace velmi nízká a ethylen pomocí rostlinných průduchů difunduje z rostliny ven do atmosféry. Ethylen se od ostatních hormonů nepodílí tak výrazně na vegetativním růstu. Již dlouho je znám jeho stimulační účinek na dozrávání plodů. Při dozrávání se v rostlině automaticky stimuluje syntéza ethylenu, takže se v podstatě jedná o pozitivní zpětnou vazbu. Dále je tento hormon zodpovědný za opadávání listů, květů a plodů, takže celkové stárnutí rostliny. Rovněž zpomaluje, až téměř zastavuje, prodlužovací růst kořenů a stonků. Stimuluje jejich růst radiální a vede k poruše gravitropismu³. Tyto poslední tři zmíněné účinky, pro ethylen charakteristické, jsou nazývány „trojí reakcí“ neboli „triple response“. (24, 30, 33)

Produkce ethylenu v rostlinách i rostlinných kulturách *in vitro* je žádoucí. Zvýšení koncentrace ethylenu v rostlině je v podstatě prvotní rychlou reakcí rostliny na jakýkoliv stres, ať už vyvolaný mechanickým poškozením, extrémním suchem a teplotami, napadením rostliny patogenem či chemikáliemi – podobně jako je tomu u kyseliny abscisové. (33, 39)

³ Orientace růstu rostliny vlivem gravitačního pole

Nežádoucí účinky ethylenu

Bylo dokázáno, že záměrné dosahování co nejvyšších koncentrací ethylenu je kontraproduktivní. Tohoto poznatku využíváme i při práci s ethephonem u *in vitro* kultur.

Efekt ethylenu je závislý na jeho koncentraci a také na stádiu, ve kterém se rostlinná buňka nachází. Nízké koncentrace v buňce jsou hodnoceny jako žádoucí, zatímco vysoké koncentrace naopak škodlivé, protože inhibují růst buněčných kultur a produkci metabolitů. (24, 34, 45, 47, 48)

Důkaz přinesli vědci z University of Science & Technology v Huazhong a The Hong Kong Polytechnic University v Číně na suspenzních kulturách odvozených od *Taxus chinensis*, *Taxus chinensis var. mairei* a *Taxus yunnanensis*, které elicitovali pomocí houbového kmene. Zjistili, že inhibitory účinku ethylenu a inhibitory jeho biosyntézy, přidané v době elicitace, zvýšili produkci paclitaxelu u rodu *Taxus* až na trojnásobné množství oproti neošetřeným kulturám. U vzorků, ke kterým byl v průběhu elicitace houbami přidán navíc ještě ethrel, došlo k markantnímu poklesu tvorby paclitaxelu z důvodu příliš vysoké koncentrace ethylenu. (51)

3.4.3 Inhibice ethephonu

Antagonistou hormonu ethylenu jsou stříbrné ionty. Působí vytěsnění ethylenu z jeho vazebného místa a znemožní tak jeho účinek. Jako inhibitor ethephonu se tedy využívají stříbrné ionty v roztoku dusičnanu, či thiosíranu. (24, 46)

Důkaz přinesli například vědci S. Goyal a K. G. Ramawat v následující studii. Jejich získané poznatky se staly podkladem pro provedení inhibice elicitoru v experimentální části této diplomové práce.

Působili 0,1mM ethrelem na buněčnou kulturu rostliny *Pueraria tuberosa*. Obsahové látky (isoflavonoidy puerarin, genistin, daidzein a genistein) zvýšily své hladiny po 48 hodinách od přidání ethrelu až čtrnáctinásobně. Přidáním inhibitorů se stříbrnými ionty (thiosíranu a dusičnanu stříbrného v koncentraci 120 μ M) došlo k naprosté inhibici tohoto jevu a isoflavonoidy v buněčných kulturách nebyly vůbec detekovány. (50)

Jako inhibitory ethylenu se dají rovněž použít kyselina α -amino izomáselná, chlorid kobaltnatý a chlorid nikelnatý. Ty však fungují na jiném principu - inhibují jeho biosyntézu. (51)

3.4.4 Dosavadní studie s ethephonem

Ethephon působí jako celkový růstový regulátor. Podporuje vznik květů, dozrávání plodů, zvyšuje odolnost vůči nálezům a to tak, že zprostředkovává expresi specifických pathogenic-related (PR) genů. To dokázal tým vědců Yu-Ying Wanga, kteří zkoumali plod rajčete. Rajčata (*Lycopersicon esculentum*), byla použita v nezralém stádiu, co se týče velikosti již vyvinutá, avšak stále zelená. Na plod rajčete působili kyselinou salicylovou a ethephonem. Oba dva zvýšili odolnost vůči nálezům a produkci PR genů. Jak z mechanismu účinku ethephonu vyplývá, zvýšil u rajčete výskyt hormonu ethylenu a také červeného barviva lykopenu v perikarpu, urychlil tedy jeho zrání. (40)

Ethephon podporuje klíčení. Bylo prokázáno, že u semen laskavce (*Amaranthus*), která nebyla schopna vyklíčit z důvodu období vegetačního klidu (letargie), zvýšil ethrel markantně klíčení z původních 28 % na 95 %. Na semena působil ethrel po dobu 12 hodin, což se jeví jako optimální. (41)

K podobnému závěru došli vědci v následující studii. Semínka cukrové třtiny byly namáčeny v 0,1mM ethephonu a v 1mM chloridu vápenatém po dobu 24 hodin. Cílem této studie bylo urychlení klíčení a založení pupenů u zásob osiva. Ve srovnání se semeny namáčenými pouze ve vodě došlo opravdu ve zvýšené míře ke klíčení, délka výhonků byla větší, zvýšil se počet založených kořenů a také hmotnost čerstvých listů, výhonků a kořenů. Klíčení bylo díky ethephonu a chloridu vápenatému navýšeno o 32-36 % v porovnání s kontrolními vzorky. (37)

Ethephon zvyšuje tvorbu sekundárních metabolitů. Autoři studie z roku 2011 zkoumali výnos a složení silice bazalky (*Ocimum basilicum L.*). Působení ethephonu srovnávali s přirozeným hormonem pro regulaci růstu, kyselinou giberelovou. Po vyhodnocení vzorků metodou plynové chromatografie, došli k závěru, že díky působení ethephonu, bylo množství vonné silice významně vyšší. (42)

Barvíněk růžový (*Catharanthus roseus*) je zdrojem sekundárních metabolitů, tzv. vinca-alkaloidů, a to vinblastinu a vincristinu, a prekursorů vindolinu a catharantinu. Bylo prokázáno, že právě kvetoucí *Catharanthus* ošetřený ethephonem

o koncentraci 0,1 mM, vykazoval vyšší hladiny vindolinu (137 %) a catharantinu (138 %). Tyto hodnoty byly zaznamenány v porovnání s kontrolními vzorky po 72 hodinách od aplikace ethephonu. Také u alkaloidu vinblastinu byla zaznamenáno významné zvýšení produkce o 91 % oproti kontrolnímu vzorku, rovněž po 72 hodinách. Existuje spojitost mezi produkcí vinblastinu a stářím listů. Stárnutí listů, které je způsobeno ethylenem uvolněným z ethephonu, má za důsledek vyšší produkci vinblastinu. (49)

Vysoké hladiny ethephonu mohou působit opačný efekt, než je žádoucí, jak již bylo zmiňováno u fytohormonu ethylenu. Důkaz přinesla například studie v roce 2013. Vědci zkoumali vliv ethephonu na hladinu tetrahydrocannabinolu a cannabidiolu v rostlině *Cannabis sativa*. Produkce těchto látek v samčích květech byla mnohem vyšší při ošetření 1 μM ethephonem, než při použití vyšší koncentrace 10 μM. (39)

Experimentální část této diplomové práce, vychází ze schopnosti ethephonu zvyšovat produkci sekundárních metabolitů u rostlinných kultur *in vitro*.

4 Experimentální část

4.1 Použité laboratorní pomůcky, chemikálie a technické vybavení

Laboratorní pomůcky

Alobalová fólie
Erlenmeyerovy baňky
Injekční stříkačky
Liebigův chladič
Mikrofiltry (0,45 μm)
Mikropipety
Můstky z filtračního papíru
Nálevky
Odměrné baňky
Odměrný válec 30ml
Opařovací keramické misky
Pipety a pipetovací balónky
Sterilní pinzety
Třecí misky s tloučkem
Varné baňky
Vialky

Chemikálie

Ajatin
Destilovaná voda
Dusičnan stříbrný
Ethanol 96%
Methanol 80%

Technické vybavení laboratoře

Analytické váhy Sartorius

Autokláv Chirana
Autosampler AS-2055
Čerpadlo PU-2089
DAD detektor MD-2015
Horkovzdušný sterilizátor Chirana
Kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m) s ochranou předkolonkou
Laboratorní třepačka Unimax
Laminární box Fatran LF
Předkolonový filtr
Vodní lázeň 1042 GFL

4.2 Živné médium

Pro kultivaci explantátových kultur bylo použito živné médium dle Murashiga a Skooga (MS médium). Jako růstový regulátor byla použita kyselina α -naftyloctová (α -NAA) v koncentraci 1g/100 ml.

Složení živného média dle Murashiga a Skooga (55)

Makroelementy v g/l

| | |
|--------------------------------------|--------|
| CaCl ₂ | 0,3325 |
| KNO ₃ | 1,9000 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,3700 |
| NH ₄ NO ₃ | 1,6500 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1700 |

Mikroelementy v mg/l

| | |
|---|---------|
| MnSO ₄ .H ₂ O | 16,9000 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 11,5000 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2000 |
| KI | 0,8300 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,0250 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,2500 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,0250 |

Železnatý komplex v mg/l

| | |
|--------------------------------------|---------|
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27,8400 |
| Na ₂ EDTA | 37,3400 |

Vitaminy v mg/l

| | |
|---------------------|--------|
| Kyselina nikotinová | 0,5000 |
| Pyridoxin | 0,5000 |
| Thiamin | 0,1000 |

Další látky v g/l

| | |
|-------------------|---------|
| Glycin | 0,0020 |
| Myo-inositol | 0,1000 |
| Kasein hydrolyzát | 1,0000 |
| Sacharosa | 30,0000 |

Pevné látky byly naváženy na analytických vahách a rozpuštěny v odměrné baňce (1000,00 ml) v části destilované vody. Zásobní roztoky makro a mikroelementů, železnatého komplexu a vitaminů byly přidány pipetou a nakonec bylo vše doplněno destilovanou vodou po rysku. Takto připravené médium bylo po 30 ml rozplněno do Erlenmeyerových baněk, jejich hrdlo bylo zakryto alobalovou fólií a následně proběhla sterilizace v autoklávu po dobu 20 minut při 121 °C.

4.3 Příprava rostlinného materiálu

K pokusu byla použita kalusová kultura *Silybum marianum* L. (Gaertn.), 25. - 34. pasáž. Suspenzní kultura *Silybum marianum* L. (Gaertn.) byla odvozená od kultury kalusové z pasáže 25. – 29.

Suspenzní kultury byly převedeny do Erlenmeyerových baněk s vysterilizovaným MS živným médiem a podrobeny 17 dnům kultivace na třepačce (150 otáček/minutu) v kultivační místnosti. Kalusové kultury byly kultivovány na můstcích z filtračního papíru nasycených MS médiem a umístěných do Erlenmeyerových baněk. Použito bylo rovněž vysterilizované médium. Kultury narůstaly po dobu 25 dní.

4.4 Příprava elicitoru

Zásobní roztok ethephonu o koncentraci 5 mmol/l byl připraven navážením vypočítaného množství látky na analytických váhách. Látka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky (50,0 ml), kde byla za pomoci ethanolu rozpuštěna. Následně bylo rovněž ethanolem doplněno celkové množství 50,0 ml.

Z takto připraveného roztoku byly v čas potřeby naředěny jednotlivé mikromolární koncentrace. Vždy bylo odpipetováno přesné množství zásobního roztoku a doplněno ethanolem po rysku v odměrné baňce na 50,0 ml.

Jako elicitor byl použit roztok ethephonu v následujících koncentracích:

| | |
|----------------|------------|
| C ₁ | 500 μmol/l |
| C ₂ | 400 μmol/l |
| C ₃ | 200 μmol/l |
| C ₄ | 100 μmol/l |
| C ₅ | 50 μmol/l |

4.5 Příprava inhibitoru

Jako inhibitor ethephonu byly použity stříbrné ionty v roztoku dusičnanu AgNO₃. Zásobní roztok o koncentraci 120 mmol/l byl připraven navážením přesného množství dusičnanu stříbrného na analytických vahách, které bylo kvantitativně převedeno a rozpuštěno v destilované vodě.

Pro všechny pokusy byl pak použit roztok o koncentraci 120 μmol/l, která byla zvolena na základě literárních údajů. (50) Potřebné množství zásobního roztoku bylo v čase potřeby mikropipetou převedeno do odměrné baňky (50,0 ml) a doplněno destilovanou vodou.

4.6 Příprava na provedení pokusu

Před zahájením práce s narostlými explantátovými kulturami, bylo vždy nutné každou baňku zvlášť otřít buničinou napuštěnou 60% ethanolem, zejména alobalovou fólií na jejím hrdle, neboť právě ta by mohla být nejčastěji zdrojem kontaminace.

Práce probíhala v boxu s laminárním prouděním, který byl vydezinfikován roztokem Ajatin PLUS 10% a minimálně 30 minut před zahájením práce vysvícen germicidním

UVC zářením. Při provádění pokusu byly použity jednorázové rukavice ošetřené dezinfekčním roztokem Ajatin PLUS 10%. Veškeré použité laboratorní sklo bylo sterilní.

4.7 Provedení pokusu

Pokusy byly prováděny zvlášť na kalusových a zvlášť na suspenzních kulturách. Pro každou koncentraci ethephonu bylo připraveno celkem 45 baněk s narostlou explantátovou kulturou. Do patnácti baněk byl pipetován 1 ml ethephonu příslušné koncentrace, do dalších 15 baněk 1 ml ethephonu a zároveň 1 ml roztoku inhibitoru AgNO_3 o koncentraci $120 \mu\text{mol/l}$. Zbývajících 15 baněk bylo použito jako kontrolních, pipetoval se do nich pouze 1 ml 60% ethanolu.

Odběry byly prováděny po 24, 48, 72, 96 a 168 hodinách od provedení pokusu. Odebrány byly vždy tři baňky s ethephonem, tři baňky s kombinací ethephonu a inhibitoru a tři kontrolní baňky. Pro přehlednost je pokus zaznamenán v následující tabulce (Tabulka 1). Toto schéma je platné vždy pro jednu koncentraci ethephonu.

Tabulka 1: Schéma odběrů provedeného pokusu

| ČASOVÝ INTERVAL | ODEBÍRANÉ KULTURY | | |
|-----------------|-------------------|----------------------------|----------|
| 24 hod. | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| 48 hod. | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| 72 hod. | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| 96 hod. | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| 168 hod. | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |
| | ethephon | ethephon + AgNO_3 | kontrola |

U suspenzních kultur bylo současně odebíráno rovněž živné médium, aby se zjistilo, zda dochází k uvolňování sekundárních metabolitů do média. Odebrané kalusové i suspenzní kultury byly vysušeny včetně filtračního papíru.

4.8 Úprava vzorků pro HPLC analýzu

Vzorky pevných částí

Vysušené pevné kalusové kultury byly rozdrobeny v třence s těrku na drobný prach a následně zváženy na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa.

Takto připravený prášek byl přenesen do varné baňky o objemu 100 ml a přesně 10 minut zahříván na vodní lázni s 80% methanolem. Extrakce probíhala pod Liebigovým zpětným chladičem. Po deseti minutách byl obsah každé baňky přefiltrován přes drobný chomáček vaty. Tekutá složka byla uchována a vata s drogou byla opět podrobena zahřívání a extrahována do 80% methanolu. Po uplynulých 10 minutách byl obsah každé baňky opět přefiltrován. Tekuté složky z obou extrakcí byly spojeny a v odměrné baňce o obsahu 25,0 ml doplněny po rysku 80% methanolem.

Následně bylo z každé odměrné baňky pomocí injekční stříkačky odebráno množství 1,7 ml a přes mikrofiltr (0,45 μm) převedeno do vialky.

Úprava vzorků suspenzních kultur probíhala stejným způsobem.

Vzorky živného média

Každé odebrané médium bylo zvlášť odpařeno na porcelánové misce umístěné na vodní lázni. Takto získaný odparek byl rozpuštěn v přibližně 10 ml methanolu (80%) a převeden do odměrné baňky o objemu 10 ml. Methanolem (80%) bylo doplněno celkové množství po rysku a promíseno.

Z každé baňky bylo odebráno injekční stříkačkou 1,7 ml a přes mikrofiltr převedeno do vialek určených pro HPLC analýzu.

4.9 Stanovení obsahu – HPLC metoda

Stanovení vzorků proběhlo na chromatografické sestavě Jasco. Mobilní fáze se skládala ze dvou eluentů. V průběhu prvních pěti minut analýza probíhala gradientovou elucí, po zbytek doby elucí isokratickou. (Tabulka 2)

Složení mobilní fáze bylo následující:

Eluent A: 0,15% H₃PO₄ v superčisté vodě

Eluent B: 0,15% H₃PO₄ v methanolu

Tabulka 2: Změna mobilní fáze v průběhu analýzy

| ČAS (min) | TYP ELUCE | ELUENT A | ELUENT B |
|-----------|-------------|------------|----------|
| 0 | | 100 % | 0 % |
| 0 - 5 | gradientová | 100 – 50 % | 0 – 50 % |
| 5 - 25 | isokratická | 50 % | 50 % |

Rychlost průtoku mobilní fáze chromatografickou kolonou byla 1,4 ml/min. Celkem analýza trvala 25 minut a probíhala za teploty 25 °C. Objem nástřiku byl 20 µl.

Pro detekci separovaných látek byl použit DAD detektor (Diode Array Detektor, detektor s diodovým polem). Detekce probíhala ve vlnových délkách v rozmezí UV a viditelného záření (200-550 nm).

Výsledné obsahy byly vypočítány z píků při maximu absorpce ve vlnové délce 288 nm. Stanovení obsahu bylo provedeno pomocí metody kalibrační křivky⁴ a normalizace⁵.

⁴ Metoda kalibrační křivky: stanovení obsahu analyzované látky na základě známé závislosti odezvy na koncentraci, tzv. kalibrační křivky standardu proměřené při vlnové délce s maximální absorpcí

⁵ Metoda normalizace: obsah analyzované látky se vyjádří jako procentuální obsah z celkové plochy všech kvantitativně hodnotných píků

4.10 Kalibrační křivky

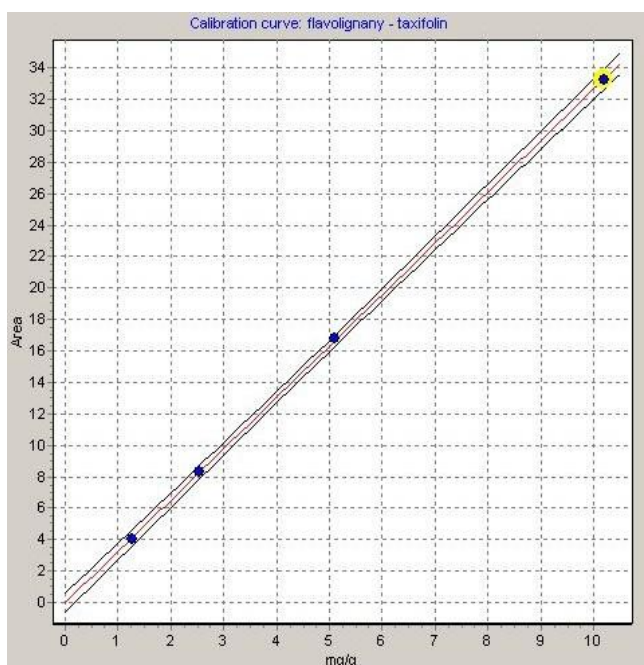
Všechny kalibrační křivky byly stanoveny dle obecné rovnice lineární přímky:

$$y = bx + a$$

kde: x = koncentrace v mg/100 ml

y = plocha

Flavonoidy



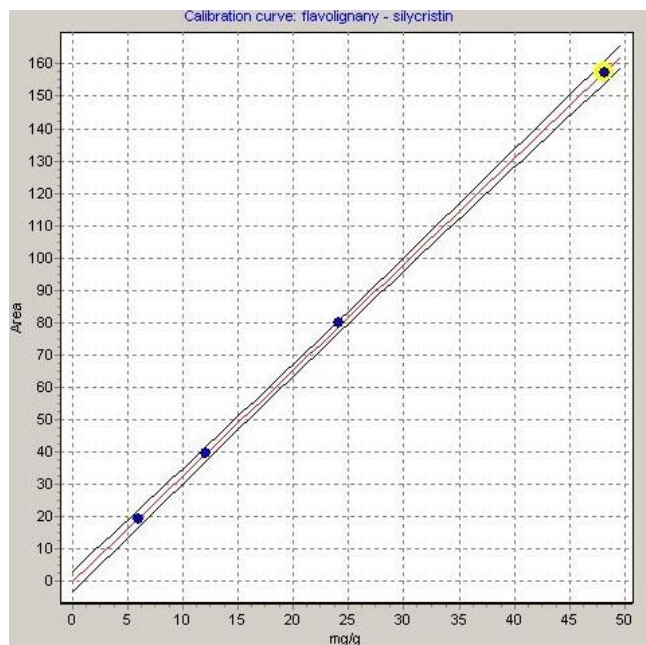
Koeficient regrese: 0,9999

$a = 0$

$b = 3,26361$

Obrázek 9: Kalibrační křivka taxifolinu

Flavonolignany

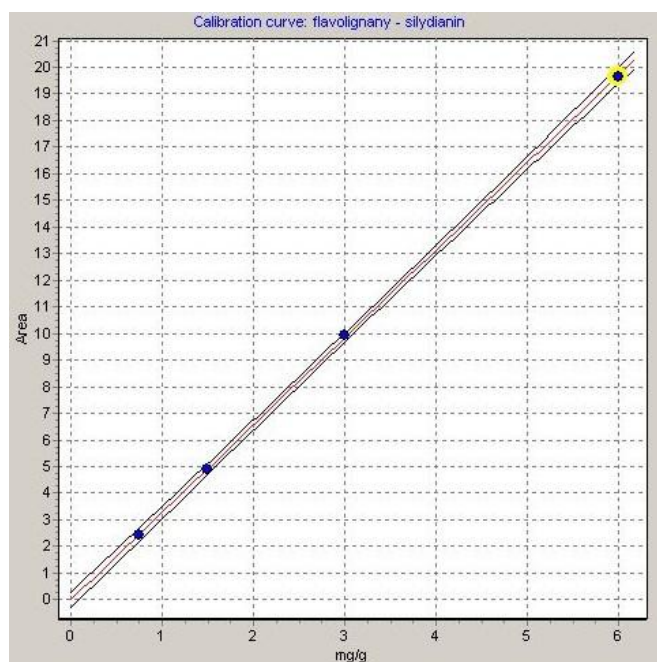


Koeficient regrese: 0,999

$a = 0$

$b = 3,26964$

Obrázek 10: Kalibrační křivka silychristinu

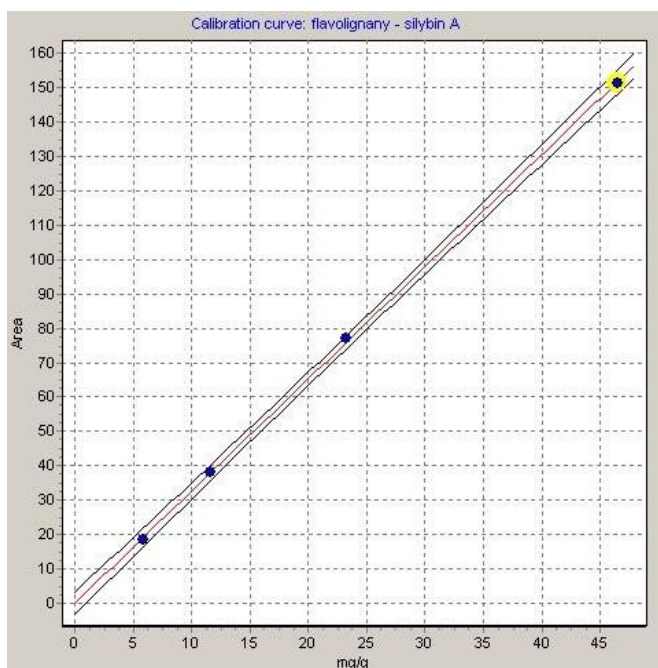


Koeficient regrese: 0,9999

$a = 0$

$b = 3,28186$

Obrázek 11: Kalibrační křivka silydianinu

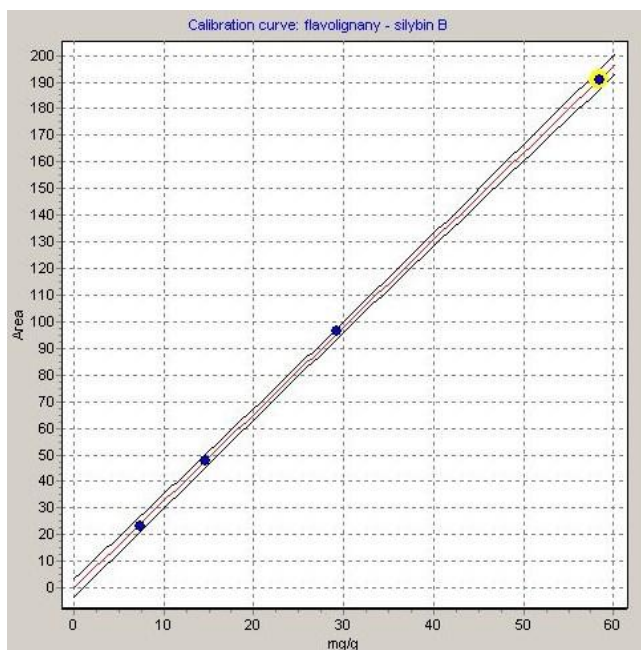


Koeficient regrese: 0,9999

$a = 0$

$b = 3,26609$

Obrázek 12: Kalibrační křivka silybinu A

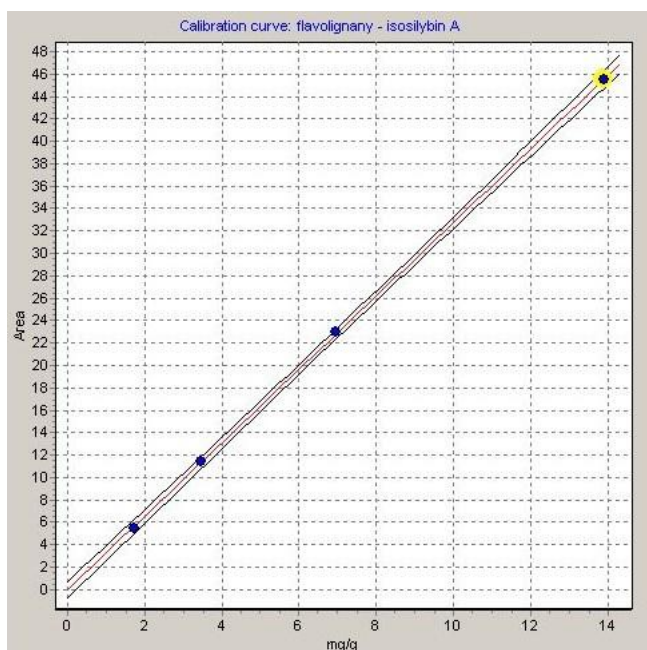


Koeficient regrese: 0,9999

$a = 0$

$b = 3,26957$

Obrázek 13: Kalibrační křivka silybinu B

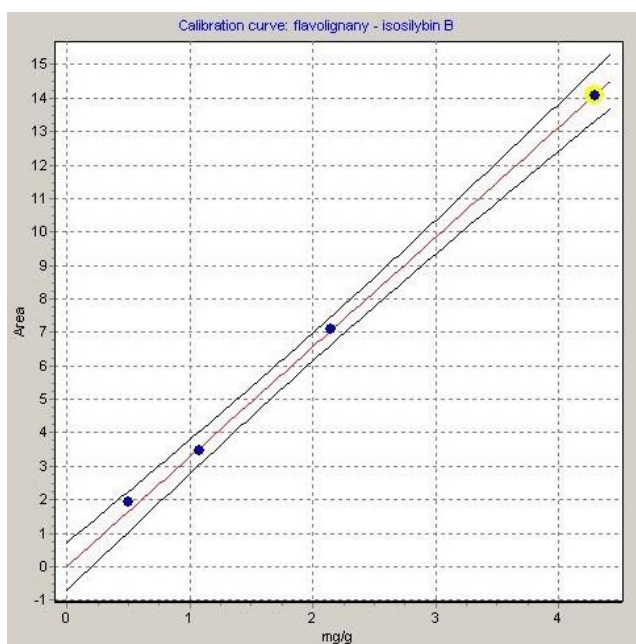


Koeficient regrese: 0,9999

$a = 0$

$b = 3,26609$

Obrázek 14: Kalibrační křivka isosilybinu A



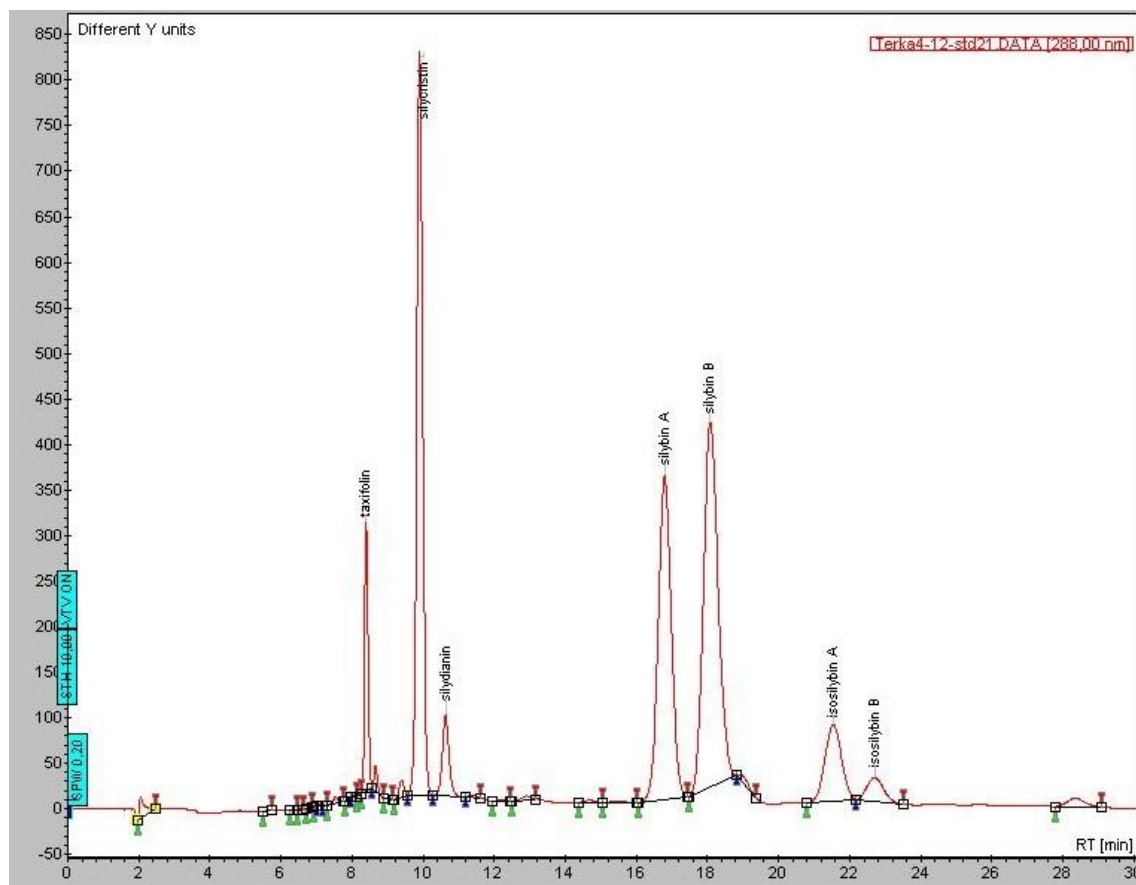
Koeficient regrese: 0,9992

$a = 0$

$b = 3,28158$

Obrázek 15: Kalibrační křivka isosilybinu B

4.11 Chromatogram standardů flavonolignanů



Obrázek 16: Chromatogram standardů

V uvedeném chromatogramu vidíme standardy použité pro HPLC analýzu. Nejnižší retenční čas má flavonoid taxifolin, následují složky silymarinového komplexu silychristin, silydianin, silybin A, silybin B, isosilybin A a isosilybin B.

4.12 Statistické zpracování dat (52, 53, 54)

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí následujících veličin.

Aritmetický průměr

Jedná se o střední hodnotu souboru. Vypočítá se jako součet všech hodnot měření, vydělený jejich počtem. Hodnota aritmetického průměru je blízká skutečně naměřené hodnotě. Vypočítá se dle vzorce:

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

Kde:

\bar{x} = průměr

n = počet hodnot v souboru

x_i = naměřená hodnota

Směrodatná odchylka

Vyjadřuje kolísání jednotlivých hodnot v souboru vzhledem k aritmetickému průměru. Jedná se o odmocninu z druhé mocniny odchylek naměřených hodnot od aritmetického průměru. Vypočítá se dle vzorce:

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

Kde:

S = směrodatná odchylka

n = počet hodnot v souboru

\bar{x} = aritmetický průměr

x_i = naměřená hodnota

T-test

K celkovému zhodnocení výsledků byla použita statistická metoda T-testu, neboli Studentova T-testu. Slouží k ověření významnosti rozdílů mezi vybranými aritmetickými průměry. Vypočítá se dle vzorce:

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

Kde:

\bar{x}_1 = aritmetický průměr pokusného souboru

\bar{x}_2 = aritmetický průměr kontrolního souboru

n_1 = počet členů pokusného souboru

n_2 = počet členů kontrolního souboru

S_1 = směrodatná odchylka pokusného souboru

S_2 = směrodatná odchylka kontrolního souboru

T = testovací kritérium

Zvolená hladina významnosti byla $p = 0,05$. Stupeň volnosti pro testovací kritérium T byl vypočítán podle vzorce: $\nu = n_1 + n_2 - 2$. Počet členů pokusného i kontrolního souboru se vždy rovná $n_1 = n_2 = 3$. Počítáme tedy se stupněm volnosti $\nu = 4$.

Je-li vypočítaná hodnota testovacího kritéria T větší než kritická hodnota $T_p(\nu)$ pro daný stupeň volnosti, je rozdíl hodnot $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ považován za statisticky významný.

V našem případě odpovídá kritická hodnota $T_p(\nu)$ za dané hladiny významnosti $p = 0,05$ (5 %, 97,5 % kvantil), a za daného stupně volnosti $\nu = 4$, hodnotě 2,78.

5 Výsledky

Zkratky použité v tabulkách a grafech:

DW = dry weight, sušina

ISA = isosilybin A

ISB = isosilybin B

K = kontrolní vzorek

SA = silybin A

SB = silybin B

SC = silychristin

SD = silydianin

TAX = taxifolinu

Kvantitativní limit pro hodnocených kalusových a suspenzních kultur je 0,03 mg/g DW. Kvantitativní limit pro hodnocení médií je 0,08 mg/100 ml. Výsledky pod touto hranicí jsou považovány pouze za orientační stopová množství.

Tabulka 3: Vliv ethephonu na produkci taxifolinu a flavonolignanů kalusovou kulturou

| Ethephon (μmol/l) | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/g DW) | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | T-test | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------------|--------------------------|----|----|----|----|-----|---------------------|-----|----|----|----|----|--------|-----|-----|----|----|----|----|-----|-----|---|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | |
| 500 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 168 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 400 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 24 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 168 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | |

| Ethephon ($\mu\text{mol/l}$) | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/g DW) | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | T-test | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------|----|----|----|----|-----|---------------------|------|----|----|----|----|--------|-----|--------|----|----|----|----|-----|-----|---|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | |
| 50 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -12,12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0,07 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0,14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6,12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0,09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0,11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9,53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabulka 4: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu a flavonolignanů kalusovou kulturou

| KOMBINACE | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/g DW) | | | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | | | T-test | | | | | | | |
|--|---------------------|--------------------------|------|------|----|----|-----|-----|-----|---------------------|----|----|----|-----|-----|-----|----|--------|----|----|-----|-----|---|--|--|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | | | |
| 500 μM ethephon + 120 μM AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 96 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 400 μM ethephon + 120 μM AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 72 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 96 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 200 μM ethephon + 120 μM AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 72 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 100 μM ethephon + 120 μM AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 96 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |

| KOMBINACE | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/g DW) | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | T-test | | | | | | | | | |
|---|---------------------|--------------------------|----|----|----|----|-----|---------------------|------|----|----|----|----|--------|-----|-----|-------|----|----|----|-----|-----|---|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | |
| 50 μ M ethephon + 120 μ M AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -2,45 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 5: Vliv ethephonu na produkci taxifolinu a flavonolignanů suspenzní kulturou

| Koncentrace ethephonu (μmol/l) | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/g DW) | | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | | T-test | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------|------|------|----|----|-----|-----|---------------------|------|----|----|----|-----|-----|--------|-------|----|----|----|-----|-----|---|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | |
| 500 | 24 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -4,33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 K | 0 | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -6,93 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0,04 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 168 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 400 | 24 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 K | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -2,60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 168 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | |

| Koncentrace ethephonu ($\mu\text{mol/l}$) | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/g DW) | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | T-test | | | | | | | | | |
|---|---------------------------|--------------------------|------|----|----|----|-----|---------------------|-----|----|----|----|----|--------|-----|-----|----|----|----|----|-----|-----|---|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | |
| 50 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabulka 6: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu a flavonolignanů suspenzní kulturou

| KOMBINACE | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/g DW) | | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | | T-test | | | | | | | |
|--|---------------------|--------------------------|------|----|----|----|-----|-----|---------------------|------|----|----|----|-----|-----|--------|------|----|----|----|-----|-----|---|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | |
| 500 μM ethephon + 120 μM AgNO ₃ | 24 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5,20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 400 μM ethephon + 120 μM AgNO ₃ | 24 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6,93 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 200 μM ethephon + 120 μM AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 μM ethephon + 120 μM AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| KOMBINACE | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/g DW) | | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | | T-test | | | | | | | | |
|---|---------------------|--------------------------|------|----|----|----|-----|-----|---------------------|----|----|----|----|-----|-----|--------|----|----|----|----|-----|-----|---|---|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | | |
| 50 μ M ethephon + 120 μ M AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 72 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 7: Vylučování obsahových látek do média suspenzní kultury po ošetření ethephonem

| Ethephon ($\mu\text{mol/l}$) | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/100 ml) | | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | | T-test | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|------|------|------|------|------|------|---------------------|------|------|------|------|------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|---|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | |
| 500 | 24 | 0,44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0,11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 6,43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 K | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 0,16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13,86 | 0 | 0 | 0 | -10,83 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,08 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 168 K | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 400 | 24 | 0,04 | 0,04 | 0,18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -14,28 | -24,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 K | 0 | 0,38 | 0,46 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,04 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 1,97 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22,58 | 0 | 0 | -13,86 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0,01 | 0 | 0 | 0,24 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0,01 | 0 | 0 | 0,51 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 44,17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -33,78 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0,01 | 0 | 0 | 0,39 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0,09 | 0,01 | 0 | 0,99 | 0,01 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | -2,32 | 0 | 0 | 15,93 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 168 K | 0,12 | 0,02 | 0,02 | 0,53 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | |

| Ethephon ($\mu\text{mol/l}$) | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/100 ml) | | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | | T-test | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|------|------|------|------|-----|------|---------------------|------|----|------|----|-----|-----|--------|------|----|--------|--------|-----|-----|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB |
| 200 | 24 | 0 | 0 | 0,05 | 0,45 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | -27,71 | 0 | 0 | 38,97 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 K | 0,16 | 0,02 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0,08 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7,35 | 0 | 0 | -27,71 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0,02 | 0,01 | 0,04 | 0,16 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -9,86 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0,21 | 0,05 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0,33 | 0,08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,08 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6,87 | 7,35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 168 K | 0,01 | 0,02 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 100 | 24 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 K | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 48 | 0,1 | 0 | 0,01 | 0,28 | 0 | 0 | 0 | 0,04 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 2,94 | 0 | 0 | -10,10 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 K | 0,03 | 0,03 | 0 | 0,75 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0,08 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 72 | 0,01 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 K | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 96 | 0,02 | 0 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 K | 0,07 | 0 | 0,01 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 168 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -13,86 | 0 | 0 |
| 168 K | 0,03 | 0 | 0,2 | 0 | 0,08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | |

Tabulka 8: Vylučování obsahových látek do média suspenzní kultury po ošetření kombinací ethephonu a inhibitoru

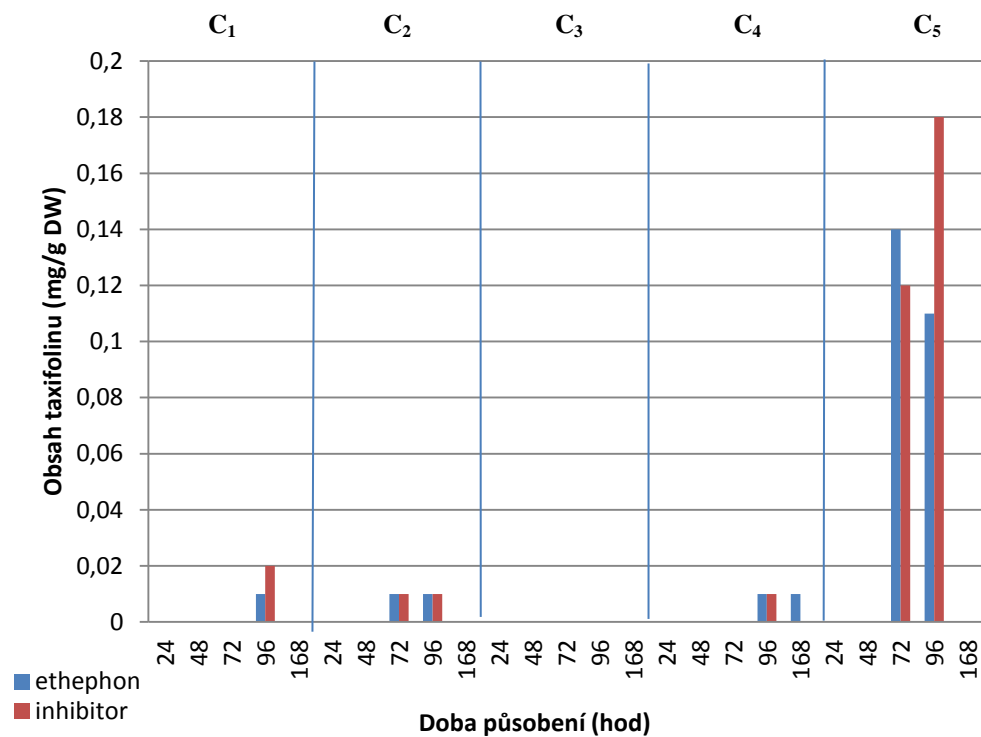
| KOMBINACE | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/100 ml) | | | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | T-test | | | | | | |
|--|---------------------|----------------------------|------|------|------|------|-----|-----|------|---------------------|------|------|------|-----|-----|--------|-------|-------|--------|--------|-----|-----|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB |
| 500 μ M ethephon + 120 μ M AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -6,93 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | -13,86 | 0 | 0 | 0 | 18,19 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0,01 | 0 | 0,17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29,44 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 400 μ M ethephon + 120 μ M AgNO ₃ | 24 | 0,37 | 0,03 | 0,53 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,04 | 0 | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13,86 | 0 | 9,59 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0,67 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | -22,75 | 0 | 0 | 29,01 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,01 | 0,04 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -44,17 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0,58 | 0 | 0,01 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37,96 | 0 | 0 | -57,16 | 0 | 0 |
| 200 μ M ethephon + 120 μ M AgNO ₃ | 24 | 0,01 | 0 | 0,02 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0,51 | 0,01 | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14,72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,42 | 0,14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26,34 | 24,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,21 | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9,86 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0,7 | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7,77 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 μ M ethephon + 120 μ M AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0,02 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -44,81 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,01 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| KOMBINACE | Doba působení (hod) | Průměrný obsah (mg/100 ml) | | | | | | Směrodatná odchylka | | | | | | T-test | | | | | | | | |
|---|---------------------|----------------------------|------|------|------|------|-----|---------------------|------|----|------|------|-------|--------|-----|------|-------|--------|--------|-------|-----|-----|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB |
| 50 μ M ethephon + 120 μ M AgNO ₃ | 24 | 0 | 0 | 0,09 | 0,02 | 0,78 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15,59 | 0 | 22,52 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0,01 | 0,1 | 0,1 | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,04 | 0,04 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,68 | -8,91 | -2,45 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,04 | 0,01 | 0,03 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | -18,37 | -13,86 | -5,77 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,13 | 0 | 0,13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12,25 | 0 | 0,55 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0,09 | 0 | 0,09 | 0,01 | 0,33 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0,02 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 6,92 | 0 | -6,20 | 0 | 23,24 | 0 | 0 |

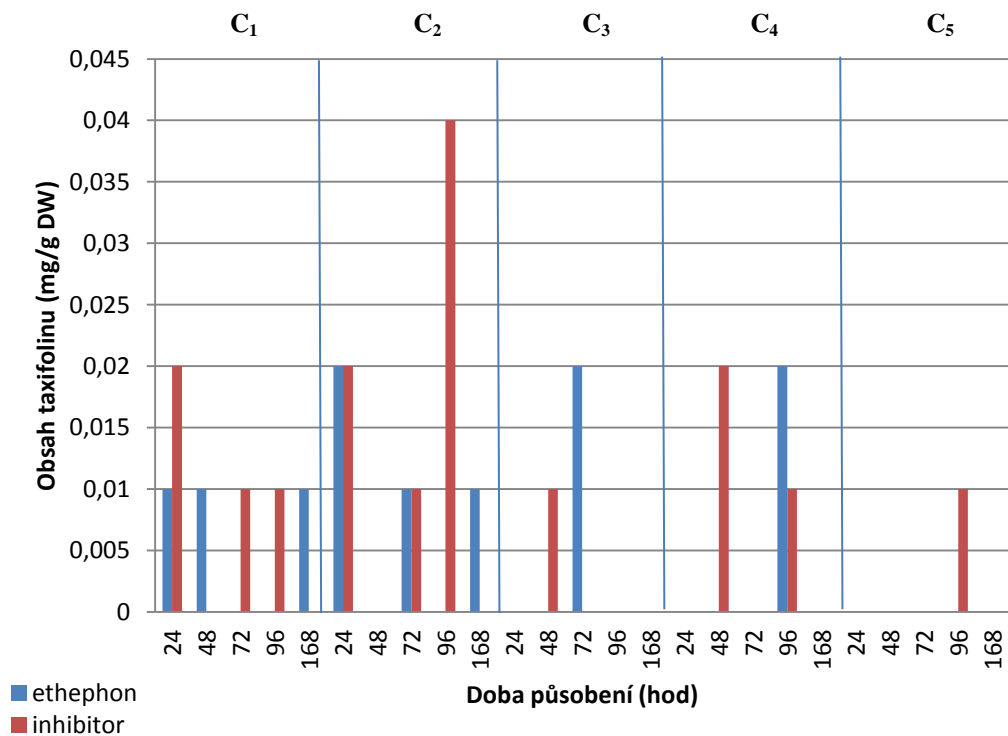
Tabulka 9: Obsah taxifolinu a flavonolignanů v sušině a médiu suspenzní kultury

| Ethephon ($\mu\text{mol/l}$) | Doba působení (hod) | Průměrný obsah v sušině (mg/g DW) | | | | | | | Průměrný obsah v médiu (mg/100ml) | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------|----|----|----|-----|-----|--------------------------------------|------|------|------|------|------|-----|
| | | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB | TAX | SC | SD | SA | SB | ISA | ISB |
| 500 | 24 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0 |
| | 48 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 400 | 24 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,04 | 0,04 | 0,18 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,97 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0,51 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,09 | 0,01 | 0 | 0,99 | 0,01 | 0 | 0 |
| 200 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,05 | 0,45 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,08 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,33 | 0,08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0,01 | 0,28 | 0 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 96 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0,06 | 0,33 | 0,08 | 0 | 0 |
| | 72 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0,01 | 0,18 | 0,08 | 0,11 | 0 | 0 |
| | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0,12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0,01 | 0,25 | 0,02 | 0,03 | 0 | 0 |

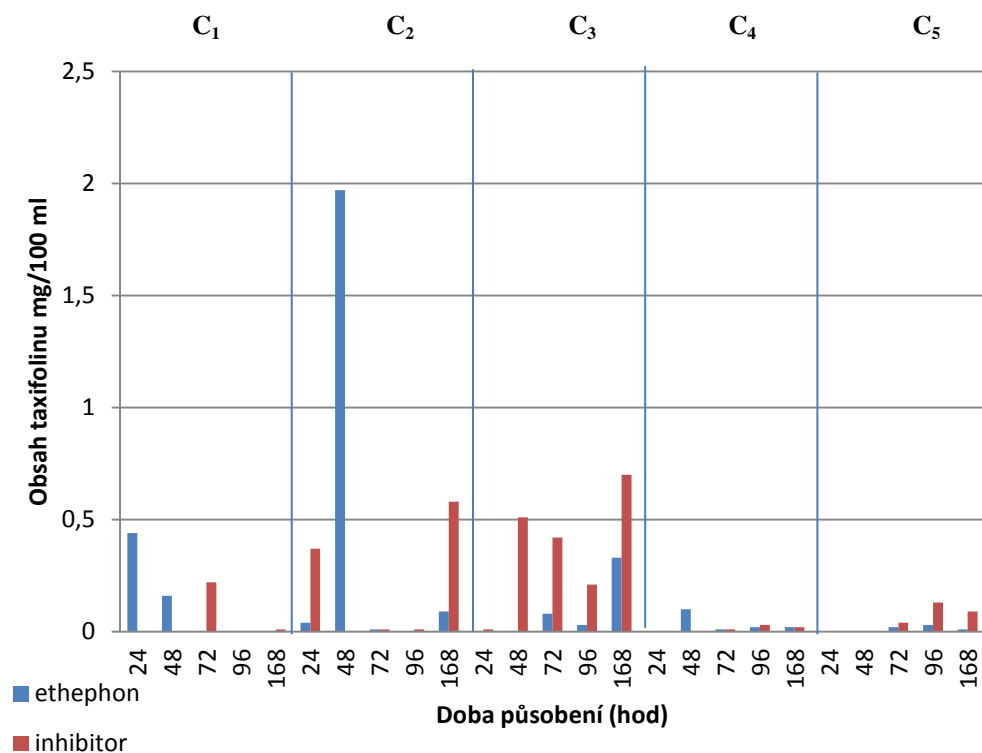
Graf 1: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu kalusovou kulturou



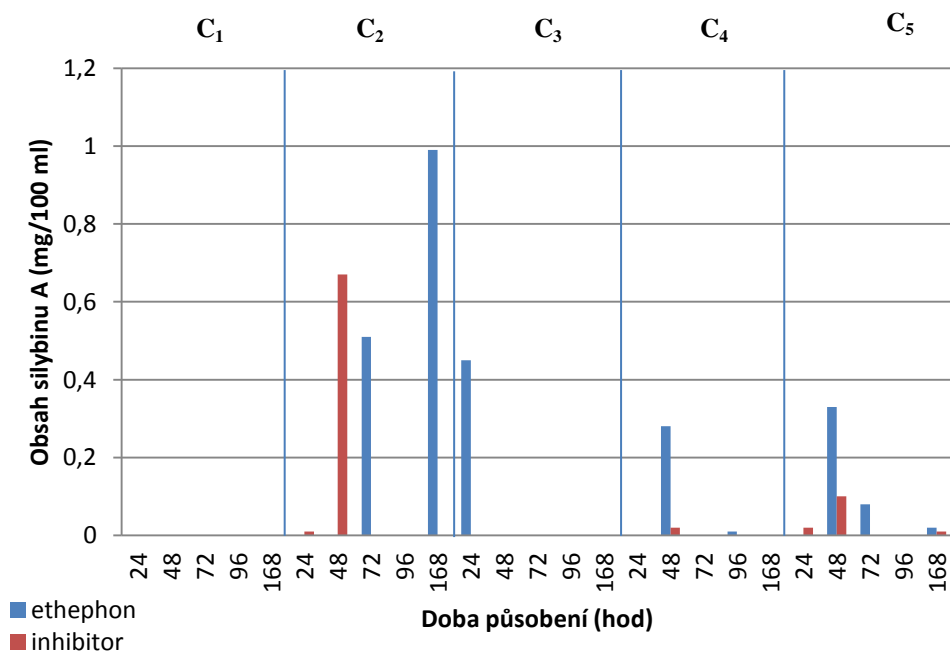
Graf 2: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu suspenzní kulturou



Graf 3: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu do živného média suspenzní kultury



Graf 4: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci silybinu A do živného média suspenzní kultury



6 Diskuze

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) L. Gaertn. je zdrojem terapeuticky cenných látek flavonolignanové povahy a flavonoidu taxifolinu. Vedle polní produkce ostropestřce mariánského existuje alternativní možnost, jak získávat sekundární metabolity - pěstování explantátových kultur *in vitro*. U těchto kultur se však potýkáme s problémem nízké produkce obsahových látek. Řešením může být využití metody elicitace. (12)

V této diplomové práci byl využit jako elicitor ethephon v koncentracích 500 $\mu\text{mol/l}$, 400 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$, který má schopnost ovlivňovat produkci sekundárních metabolitů. (42) Efekt ethephonu je závislý na jeho koncentraci. Některé rostlinné kultury byly ošetřeny rovněž inhibitorem ethephonu, dusičnanem stříbrným, stejně jako například ve studii autorů Zhang Chang-He a Jiang-Yong Wu, provedené na rodu *Taxus*. (51) Koncentrace inhibitoru byla zvolena 120 $\mu\text{mol/l}$, dle literárních zdrojů (50), ve kterých byl prokázán její inhibiční efekt.

Výsledky působení elicitoru v různých koncentracích byly porovnány s odpovídajícími kontrolními vzorky, a rovněž s působením inhibitoru dusičnanu stříbrného. Odběry byly provedeny vždy po 24, 48, 72, 96 a 168 hodinách od přidání látek ke kulturám. U suspenzních kultur bylo odebráno rovněž živné médium.

Vliv na produkci taxifolinu u kalusových kultur

Flavonoid taxifolin byl u kalusové kultury ošetřené ethephonem produkován především ve stopových množstvích, která můžeme sledovat také u kontrolních vzorků. Statistický významný nárůst produkce taxifolinu nastal po ošetření kalusové kultury ethephonem v koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ po 72 hodinách (0,14 mg/g DW, nárůst o 55,6 % oproti kontrolnímu vzorku) a po 96 hodinách, kdy je nárůst statisticky nejvýznamnější (0,11 mg/g DW v porovnání s nulovou produkcí kontrolního vzorku). (Tabulka 3)

Kalusová kultura produkovala po aplikaci ethephonu v koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ ve stejných časech odběrů statisticky významná množství taxifolinu, i po ošetření inhibitorem (AgNO_3). Po 72 hodinách působení kombinace ethephonu a inhibitoru došlo k nevýznamnému snížení produkce taxifolinu, ale po 96 hodinách dokonce ke zvýšené produkci taxifolinu. Inhibitor v tomto případě neměl na produkci jasný vliv. (Tabulka 4, Graf 1)

Vliv na produkci taxifolinu u suspenzních kultur

U suspenzních kultur je zřejmé statisticky významné snížení hladiny taxifolinu (až na nulovou hodnotu) v sušině po ošetření ethephonem o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ po 96 hodinách působení oproti kontrolnímu vzorku. U kontrolních vzorků (bez vlivu ethephonu) je tedy vyšší hladina taxifolinu. (Tabulka 5). Nízké hladiny sekundárních metabolitů po přidání vyšší koncentrace ethephonu byly zaznamenány také u rostliny *Cannabis sativa*, kde se nižší koncentrace ethephonu jeví jako příznivější pro produkci cannabidiolu. (39)

Rovněž u působení kombinace ethephonu a inhibitoru byla v našem pokusu zaznamenána vyšší hladina taxifolinu v sušině suspenzní kultury. Po 96 hodinách působení současně ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$ a inhibitoru nastalo statisticky významné zvýšení hladiny taxifolinu (na 0,04 mg/g DW oproti nulové produkci kontrolního vzorku). (Tabulka 6,

Graf 2). Podobný efekt inhibitoru můžeme sledovat ve studii autorů Zhang Chang-He a Jiang-Yong Wu (51), kde inhibitor AgNO_3 způsobil zvýšení produkce paclitaxelu díky mechanismu inhibice růstového hormonu ethylenu. V této studii došlo po přidání ethephonu ke snížení produkce sekundárního metabolitu, vliv ethephonu se jevil jako nežádoucí.

Vysoké koncentrace ethephonu by tedy mohly mít u suspenzních kultur negativní vliv na hladiny taxifolinu v sušině, což dokazují vyšší hladiny v kontrolních vzorcích a po použití inhibitoru.

Vliv na vyplavování taxifolinu do média suspenzních kultur

Ve většině případů docházelo k vyplavování taxifolinu do média suspenzních kultur. (Tabulka 9).

Ke statisticky významnému nárůstu obsahu taxifolinu v médiu došlo po 24 hodinách působení ethephonu o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ (14,6krát více než u kontrolního vzorku média). Po 48 hodinách od aplikace stejné koncentrace ethephonu bylo dosaženo statisticky významného uvolňování taxifolinu do média (0,16 mg/100 ml) v porovnání s nulovou hladinou v kontrolním vzorku.

Celkově statisticky nejvýznamnější uvolnění taxifolinu do média bylo zaznamenáno po 48 hodinách působení ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$, kdy byla hladina

taxifolinu vyplavená do média dokonce 197krát vyšší než u kontrolního vzorku. Obecně tedy delším působení ethephonu (72 hodin a více) ve vysokých koncentracích - 400 $\mu\text{mol/l}$ a 500 $\mu\text{mol/l}$, vedlo k vyplavení pouze stopových množství taxifolinu. (Tabulka 7)

K významnému zvýšení vyplavování taxifolinu do média suspenzních kultur vedla aplikace ethephonu o koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ po 168 hodinách působení na kulturu (až 33krát větší produkce oproti kontrolnímu vzorku) a po 48 hodinách působení ethephonu o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$, kde však zvýšení bylo již méně výrazné (3,3krát). (Tabulka 7)

Působení inhibitoru AgNO_3 na vyplavení taxifolinu do média vyvolalo statisticky významné snížení hladin taxifolinu a to až na nulové hodnoty oproti vzorkům ošetřeným ethephonem, které nastalo po 24 a 48 hodinách současného působení ethephonu o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ a inhibitoru a po 48 hodinách současného působení ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$ a inhibitoru, kdy bylo snížení nejvýraznější. (Tabulka 8, Graf 3) Stejného efektu bylo dosaženo u rostliny *Pueraria tuberosa*, kde ethephon v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ způsobil po 48 hodinách od aplikace až 14krát vyšší hladiny isoflavonoidů oproti kontrolním vzorkům. Po přidání inhibitoru ethephonu (thiosíranu a dusičnanu stříbrného v koncentraci 120 $\mu\text{mol/l}$), tento efekt zcela vymizel a isoflavonoidy nebyly vůbec detekovány. (50)

Vliv na produkci složek silymarinového komplexu u kalusových kultur

Nebyl zjištěn žádný statisticky významný vliv ethephonu na produkci silymarinového komplexu u kalusových kultur.

Vliv na produkci složek silymarinového komplexu u suspenzních kultur

U suspenzních kultur bylo zaznamenáno statisticky významné snížení produkce silychristinu pouze po 24 hodinách působení ethephonu o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ oproti kontrole. V dalších případech byla produkována pouze stopová množství silychristinu, ostatní složky silymarinového komplexu nebyly vůbec detekovány. (Tabulka 5)

Inhibitor statisticky významně zvýšil produkci silychristinu po 48 hodinách působení spolu s ethephonem o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ (0,03 mg/g DW). Mohli bychom se domnívat, že inhibitor odstranil nežádoucí vliv vysoké koncentrace

ethephonu. V nižších koncentracích však nebyl silychristin vůbec detekován (popřípadě jen ve stopových množstvích). (Tabulka 6)

Vliv na vyplavování složek silymarinového komplexu do média suspenzních kultur

Statisticky významné uvolnění silychristinu do média vyvolala aplikace ethephonu o koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ po 168 hodinách působení na suspenzní kulturu (0,08 mg/100 ml), což je 4krát vyšší hladina než u kontrolního vzorku média. (Tabulka 7)

Silydianin byl statisticky nejvíce uvolňován do média při ošetření ethephonem o nejnižší koncentraci (50 $\mu\text{mol/l}$), a to ve vzorcích odebraných po 72, 96 a 168 hodinách - maximální produkce po 168 hodinách (0,25 mg/100 ml). (Tabulka 7) Přidáním inhibitoru došlo ke snížení produkce až 2,7krát. (Tabulka 8) Ethephon v této nejnižší koncentraci měl pozitivní vliv na uvolňování silydianinu do média suspenzní kultury. (Tabulka 7, Tabulka 8)

Statisticky nejvýznamnější produkce silybinu A do média byla zaznamenána po 72 hodinách působení ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$ (0,51 mg/100 ml). Dále uvolňování silybinu A do média statisticky vzrostlo po 24 hodinách působení ethephonu o koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ (0,45 mg/100 ml) a po 48 a 72 hodinách působení nejnižší koncentrace ethephonu (50 $\mu\text{mol/l}$). (Tabulka 7)

Inhibitor převážně snižoval vyplavování silybinu A do média. Nejvýraznější snížení hladiny silybinu A v médiu nastalo po 168 hodinách působení kombinace inhibitoru a ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$. Statisticky významné zvýšení hladiny silybinu A v médiu způsobil inhibitor při současném působení s ethephonem o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$, a to po 48 hodinách. (Tabulka 8, Graf 4)

Statisticky významná produkce silybinu B do média nastala pouze po 48 hodinách od aplikace ethephonu o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. Po zbylou dobu byl silybin B produkován pouze ve stopovém množství, popřípadě pouze kontrolní kulturou. Isosilybin B nebyl v rámci pokusu vůbec detekován, isosilybin A pouze ve stopovém množství v médiu po ošetření ethephonem o koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ po 24 hodinách působení. U těchto flavonolignanů neměl ethephon žádný prokazatelný vliv na produkci. (Tabulka 7)

Z těchto výsledků je patrné, že ethephon významně ovlivnil produkci jen některých složek silymarinového komplexu (silychristinu, silydianinu a silybinu A), a ty byly vyplavovány zejména do média suspenzních kultur.

7 Závěr

Z této diplomové práce byly vyvozeny následující závěry:

- Statisticky nejvýznamnější množství taxifolinu bylo uvolněno do média suspenzní kultury po 48 hodinách působení ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$. Hladina taxifolinu dosáhla hodnoty 1,97 mg/100 ml, což je 197krát více než u kontrolního vzorku.
- Statisticky nejvýznamnější hladina silychristinu (0,08 mg/100 ml) byla zaznamenána v médiu suspenzní kultury po 168 hodinách působení ethephonu o koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$.
- V médiu suspenzní kultury byla detekována staticky významná hladina silydianinu po 72 hodinách působení ethephonu o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (0,18 mg/100 ml).
- Statisticky významné hladiny silybinu A bylo dosaženo v médiu po 72 hodinách působení ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$ (0,51 mg/100 ml).
- Statisticky nejvýznamnější hladina silybinu B byla detekována v médiu suspenzní kultury po 48 hodinách působení ethephonu o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$.
- Nejvýraznější pozitivní vliv inhibitoru na produkci taxifolinu byl zaznamenán v médiu suspenzní kultury po 168 hodinách působení inhibitoru a ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$, kde inhibitor zvýšil hladinu taxifolinu na 0,58 mg/100 ml, oproti vzorku ošetřeném pouze ethephonem.
- Nejvýraznější negativní vliv inhibitoru na produkci silybinu A byl zaznamenán v médiu suspenzní kultury po 168 hodinách působení inhibitoru a ethephonu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$, kde inhibitor snížil hladinu silybinu A na nulovou hodnotu.

8 Seznam použitých zdrojů

1. EKOR M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*. 2013, 4, 177.
2. KORBELÁŘ J, ENDRIS Z. Naše rostliny v lékařství. Praha: Avicenum 1974: 308–309.
3. LEIFERTO VÁ I, BALOUN J. Farmaceutická botanika. Praha: SNP 1990: 150.
4. DOHNAL J. *Silybum marianum*. 1972. [cit. 2015-03-28].
http://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?latName=Silybum%20marianum&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species
5. TOŠOVSKÁ M, BUCHTOVÁ I. Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny: Výhledová zpráva. 2012[cit. 2015-02-12].
http://eagri.cz/public/web/file/188525/SVZ_2012_konecna_verze.pdf
6. DRÁPALOVÁ I. Vliv herbicidního ošetření na klíčivost ostropestřce mariánského. [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.]. Brno, 2012. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně.
7. MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. Zemědělství 2013. Praha, 2014[cit. 2015-02-12].
http://eagri.cz/public/web/file/324206/Publikace_Zemedelstvi_2013_web.pdf
8. JAHODÁŘ L. Farmakobotanika: semenné rostliny. Vyd. 2. Praha: Karolinum, 2009, s. 169.
9. Sigma-Aldrich. Silybin. ©2015 [cit. 2015-03-12].
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/02000585?lang=en®ion=CZ>
10. Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1511-1514.
11. WICHTL M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis. Stuttgart: Medpharm, 1994, 107.
12. TŮMOVÁ L, GALLOVÁ K. Terapeutické účinky *Silybum marianum*. *Praktické lékařství*. 2006, 2 (4), 185-187.
13. MACHOLÁN L. Sekundární metabolity. 2., dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2003, 62, 77, 136.
14. TŮMOVÁ L, ŘIMÁKOVÁ J, TŮMA J, DUŠEK J. *Silybum marianum* in vitro: flavonolignan production. *Plant, Soil and Environment*. 2006, 52 (10), 454-458.
15. RAINONE F. Milk Thistle. *American Family Physician*. 2005, 72 (7), 1285-88.
16. GIESE L A. Milk thistle and the treatment of hepatitis. *Gastroenterology Nursing*. 2001, 24 (2), 95-7.

17. ABENAVOLI L, CAPASSO R, MILIĆ N, CAPASSO F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*. 2010, 24 (10), 1423-1432.
18. PRADHAN S. C, GIRISH C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *The Indian journal of medical research*. 2006, 124 (5), 491-504.
19. MILIĆ N, MILOSEVIĆ N, SUVAJDZIĆ L, ZARKOV M, ABENAVOLI L. New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*). *Natural product communications*. 2013, 8 (12), 1801-1810.
20. LI FAN, YALIN MA, YING LIU, DONGPING ZHENG, GUANGRONG HUANG. Silymarin induces cell cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 2014, 743, 79-88.
21. KAUR M, DEEP G, AGARWAL R. Silibinin in Skin Health: Efficacy and Mechanism of Action. *Nutritional Cosmetics*. Denver, USA: Elsevier, 2009, 501.
22. ZHANG HONG-TAO, KAI SHI, ATTIT BASKOTA, FANG-LI ZHOU, YA-XI CHEN, HAO-MING TIAN. Silybin reduces obliterated retinal capillaries in experimental diabetic retinopathy in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2014, 740, 233-239.
23. SZKUDELSKI T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. Czech Republic, 2001, 50, 536-546.
24. PROCHÁZKA S, ŠEBÁNEK J. Regulátory rostlinného růstu. Vyd. 1. Praha: Academia, 1997, 92-101.
25. KOVÁČ J. Explantátové kultury rostlin: Pro výuku fyziol. rostlin a buněčné biol. 1., přeprac. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 1995, 1-3.
26. NOVÁK F J. Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Vyd. 1. Praha: Academia, 1990, 11-13.
27. TAKAYAMA S. Bioreactors for Plant Cell Tissue and Organ Cultures. *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook*. Elsevier, 2014, 25.
28. PASQUAL M, RODRIGUES SOARES JD, RODRIGUES ALMEDAGNA F. Tissue Culture Applications for the Genetic Improvement of Plants. *Biotechnology and Plant Breeding*. Elsevier, 2014, 157.
29. MURANAKA T, SAITO K. Production of Pharmaceuticals by Plant Tissue Cultures. *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier, 2010, 615.
30. PROCHÁZKA S. Fyziologie rostlin. Vyd. 1. Praha: Academia, 1998, s. 102-111.
31. EDWIN G F, HALL M A, DE KLERK G J. Plant propagation by tissue culture [online]. 3rd ed, Dordrecht: Springer, 2007, s. 68 – 123. [cit. 2015-02-20].
http://www.academia.edu/3155503/Plant_Tissue_Culture_by_Edwin_F._George

32. Theories Behind Plant Tissue Culture. Plant & Soil Sciences eLibraryPRO. © 2015 [cit. 2015-02-16].
<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=956783940&topicorder=1&maxto=10&minto=1>
33. ŠETLÍK I, SEIDLOVÁ F, ŠANTRŮČEK J. Regulace růstu. Fyziologie rostlin. 2004 [cit. 2015-03-02]. Učební text Biologické fakulty Jihočeské Univerzity.
<http://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html>
34. PATEL H, KRISHNAMURTHY R. Elicitors in Plant Tissue Culture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2013, 2 (2), 60-65.
35. STRNAD M. Fyziologie stresu. Fyziologie rostlin – výukové materiály. Laboratoř růstových regulátorů: Univerzita Palackého v Olomouci a Ústav experimentální botaniky AV ČR. ©2015 [cit. 2015-03-10].
<http://www.rustreg.upol.cz/cs/pro-studenty/materialy/fyziologie-rostlin-lrr-frp-lrr-fzrsb/>
36. Sigma-Aldrich. Ethephon. ©2015 [cit. 2015-03-12].
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0143?lang=en®ion=CZ>
37. RADHA J, SOLOMON S, SHRIVASTAVA A K., CHANDRA A. Effect of ethephon and calcium chloride on growth and biochemical attributes of sugarcane bud chips. Acta Physiologiae Plantarum. 2011, 33 (3), 905-910.
38. Restricted-Use Pesticides. EPA. United States Environmental Protection Agency. 9.5.2012 [cit. 2015-02-10].
<http://www.epa.gov/pesticides/safety/applicators/restrict.htm>
39. MANSOURI H, SALARI F, ASRAR Z. Ethephon application stimulates cannabinoids and plastidic terpenoids production in Cannabis sativa at flowering stage. Industrial Crops and Products. 2013, 46, 269-273.
40. WANG YU-YING, BO-QIANG LI, GUO-ZHENG QIN, LI LI, SHI-PING TIAN. Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. Scientia Horticulturae. 2011, 129 (2), 183-188.
41. MENAKA C, BALAMURUGAN P, RENGANAYAKI P R. Seed enhancement techniques in amaranthus cv. Co 5. Research on crops. 2008, 9 (3), 700-703.
42. ONO E. O, RODRIGUES J. D, BARREIRO A. P, MARQUES M. O. M. Yield and Composition of the Essential Oil of Basil on Plant Growth Regulators Application. Journal of Essential Oil Research. 2011, 23 (1), 17-22.
43. PRAKASH P. KUMAR, CHIANG SHIONG LOH. Plant tissue culture for biotechnology. Plant Biotechnology and Agriculture. Elsevier, 2012, 131.
44. Plant biotechnology. CropLife Canada [online]. © 2015 [cit. 2015-03-01].
<http://www.croplife.ca/plant-biotechnology>
45. SHIBLI R A, SMITH M A L, KUSHAD M. Headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in Vaccinium pahalae cell culture. Plant Growth Regulation. 1997, 23 (3), 201-205. [cit. 2015-03-11].
<http://link.springer.com/10.1023/A:1005952830019>

46. PITTA-ALVAREZ S I, SPOLLANSKI T C, GIULIETTI A M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microbial Technology*. 2000, 26, (2-4), 252-254.
47. SUNG LIN-SHIANG, SHIH-YOW HUANG. Headspace ethylene accumulation on *Stizolobium hassjoo* hairy root culture producing L-3,4-dihydroxyphenylalanine. *Biotechnology Letters*. 2000, 22 (10), 875-878.
48. LINDEN J C, HAIGH J R, MIRJALILI N, PHISAPHALONG M. Gas concentration effects on secondary metabolite production by plant cell cultures. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2001, 72, 27-62.
49. PAN QIFANG, YU CHEN, QUAN WANG, FANG YUAN, SHIHAI XING, YUESHENG TIAN, JINGYA ZHAO, XIAOFEN SUN, KEXUAN TANG. Effect of plant growth regulators on the biosynthesis of vinblastine, vindoline and catharanthine in *Catharanthus roseus*. *Plant Growth Regulation*. 2010, 60 (2), 133-141.
50. GOYAL S, RAMAWAT K G. Ethrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2008, 30 (6), 849-853.
51. ZHANG CHANG-HE, JIANG-YONG WU. Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus* spp. cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, 32 (1), 71-77.
52. BLATNÁ D. *Statistika a pravděpodobnost*. 3. vyd. Praha: Bankovní institut vysoká škola, 2007, 9-10, 63.
53. KLEMER P, KLEMEROVÁ V. *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 1999, 23-27, 76.
54. ĎOUBAL S, KUČOVÁ D. *Vybrané kapitoly z fyziky a biofyziky*. Praha: Karolinum, 1997, s. 148-150.
55. MURASHIGE T, SKOOG F. *Physiologia Plantarum*. 1962, 15 (3), 473 - 497.

9 Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Ostropestřec mariánský (4) | 3 |
| Obrázek 2: Struktura hlavní obsahové látky silybinu (9) | 5 |
| Obrázek 3: Vzorec kyseliny indolyl-3-octové (IAA) (33)..... | 16 |
| Obrázek 4: Vzorec <i>trans</i> -zeatinu (33)..... | 17 |
| Obrázek 5: Základní struktura giberelinů (33) | 18 |
| Obrázek 6: Vzorec kyseliny abscisové ((S)-cis-ABA) (33) | 19 |
| Obrázek 7: Vzorec ethephonu (36)..... | 22 |
| Obrázek 8: Vzorec ethylenu (33)..... | 23 |
| Obrázek 9: Kalibrační křivka taxifolinu | 34 |
| Obrázek 10: Kalibrační křivka silychristinu | 35 |
| Obrázek 11: Kalibrační křivka silydianinu | 35 |
| Obrázek 12: Kalibrační křivka silybinu A..... | 36 |
| Obrázek 13: Kalibrační křivka silybinu B | 36 |
| Obrázek 14: Kalibrační křivka isosilybinu A | 37 |
| Obrázek 15: Kalibrační křivka isosilybinu B | 37 |
| Obrázek 16: Chromatogram standardů | 38 |

10 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Schéma odběrů provedeného pokusu..... | 31 |
| Tabulka 2: Změna mobilní fáze v průběhu analýzy | 33 |
| Tabulka 3: Vliv ethephonu na produkci taxifolinu a flavonolignanů kalusovou kulturou | 42 |
| Tabulka 4: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu a flavonolignanů kalusovou kulturu | 45 |
| Tabulka 5: Vliv ethephonu na produkci taxifolinu a flavonolignanů suspenzní kulturou | 47 |
| Tabulka 6: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu a flavonolignanů suspenzní kulturou | 50 |
| Tabulka 7: Vylučování obsahových látek do média suspenzní kultury po ošetření ethephonem | 52 |
| Tabulka 8: Vylučování obsahových látek do média suspenzní kultury po ošetření kombinací ethephonu a inhibitoru | 55 |
| Tabulka 9: Obsah taxifolinu a flavonolignanů v suspenzi a suspenzním médiu..... | 57 |

11 Seznam grafů

| | |
|--|----|
| Graf 1: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu kalusovou kulturou | 58 |
| Graf 2: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu suspenzní kulturou | 58 |
| Graf 3: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci taxifolinu do živného média suspenzní kultury | 59 |
| Graf 4: Vliv kombinace ethephonu a inhibitoru na produkci silybinu A do živného média suspenzní kultury | 59 |