

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE

Mgr. Lucie Kunzová

**MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH  
METABOLITŮ U KULTURY *SILYBUM MARIANUM* IN  
*VITRO***

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Datum zadání:	11.11.2008
Vedoucí katedry:	Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.
Vedoucí rigorózní práce:	Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.
Termín odevzdání:	
Počet stran:	73
Oponent rigorózní práce:	

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci na téma „Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů u kultury *Silybum marianum in vitro*“ vypracovala samostatně a veškeré informace a literární prameny, které jsem použila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení v průběhu rigorózní práce. Zároveň děkuji také ostatním pracovníkům katedry farmakognozie za pomoc a vytvoření dobrých pracovních podmínek.

# **OBSAH**

<b>1.</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>3.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
3.1.	Kultury rostlinných explantátů.....	9
3.1.1.	Rozdělení kultur rostlinných explantátů.....	10
3.1.2.	Kultivace explantátových kultur.....	11
3.1.3.	Složení kultivačního média.....	11
3.1.4.	Faktory ovlivňující explantátové kultury.....	14
3.1.5.	Využití explantátových kultur.....	14
3.1.6.	Mikropropagace rostlin.....	16
3.1.7.	Kalusová kultura.....	18
3.1.8.	Suspenzní kultura.....	18
3.2.	Růstové regulátory.....	20
3.2.1.	Auxiny.....	20
3.2.2.	Gibereliny.....	21
3.2.3.	Cytokininy.....	21
3.2.4.	Kyselina abscisová.....	22
3.2.5.	Ethylen.....	22
3.3.	Fyziologie stresu.....	23
3.3.1.	Stresová reakce a stresové faktory.....	23
3.3.2.	Společné mechanismy stresových reakcí.....	25
3.3.3.	Biotické stresy.....	29
3.3.4.	Příklady abiotických stresových faktorů.....	31
3.3.5.	Elicitace a elicitory.....	34
3.4.	Substituované amidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	36
3.5.	Flavonolignany.....	38
3.6.	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.....	40
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>44</b>
4.1.	Přístroje a vybavení.....	44
4.2.	Chemikálie a pomocné látky.....	44
4.3.	Biologický materiál.....	45

4.4.	Složení a příprava živného média.....	46
4.5.	Pasážování a kultivace kultur.....	47
4.6.	Příprava roztoků elicitoru.....	48
4.7.	Elicitace <i>in vitro</i> kultur.....	49
4.8.	Stanovení obsahu flavonolignanů.....	50
4.9.	Statistické zpracování výsledků.....	54
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>70</b>
<b>9.</b>	<b>ABSTRAKT.....</b>	<b>73</b>

## **SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

ATP	adenosin trifosfát
BA	benzyladenin
4-CPA	kyselina chlorfenoxyoctová
2,4-D	kyselina dichlorfenoxyoctová
DMSO	dimethylsulfoxid
GA	kyselina giberelová
HDL	high density lipoproteins
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IAA	kyselina indolyloctová
IBA	kyselina indolymáselná
IL-4	interleukin 4
IL-10	interleukin 10
ISO A	isosilybin A
ISO B	isosilybin B
$\alpha$ -NAA	kyselina naftyloctová
SIL A	silybin A
SIL B	silybin B
SILCHR	silychristin
SILYD	silydianin
2,4,5-T	kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová
TAX	taxifolin
VLDL	very low density lipoproteins

# 1. ÚVOD

Rychlý rozvoj technik explantátových kultur dosáhl takové úrovně, že je možno seriózně hodnotit jejich biotechnologické aplikace pro výrobu farmaceuticky důležitých rostlinných produktů. Řada rostlinných látek je pro člověka nenahraditelná jako farmaka a požadavky na tyto látky rychle stoupají. Proto kromě zemědělské produkce jsou středem zájmu jiné alternativní zdroje. Rostliny musíme stále ještě považovat za dosud málo prozkoumanou zásobárnu farmaceutických látek (1).

V posledních letech se však stále obtížněji zajišťuje přísun těchto přírodních surovin, neboť dochází k drastickému zmenšování rostlinných zdrojů. Ceny surovin vzrůstají a současně stoupají nároky, zejména farmaceutického průmyslu. Sběr divoce rostoucích léčivých rostlin i jejich polní pěstování je značně sezónní záležitostí, jeho výtěžnost závisí na mnoha faktorech. Často se jedná o rostliny, jejichž pěstování může být ohroženo klimatickými vlivy, hmyzem nebo bakteriálními nákazami. Proto bylo v posledních letech věnováno velké úsilí na vypracování biotechnologického postupu výroby žádaných rostlinných látek (2).

Rostlinné tkáňové kultury představují nadějný zdroj látek přírodního původu. Hlavním problémem jejich využití je nízká produkce většiny sekundárních metabolitů. Jednou z metod pro zvýšení tvorby těchto látek je elicitace, protože biosyntéza mnoha sekundárních metabolitů v rostlinných buňkách je součástí obranné reakce vůči biologickým nebo abiotickým stresovým vlivům (4).

Elicitace je metoda využívající obranných mechanismů rostlin ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinách i kulturách *in vitro* (3). Základním předpokladem úspěšné elicitace, která se využívá ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů, je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby působení elicitoru na rostlinnou kulturu *in vitro* (5).

## **2. CÍL PRÁCE**

Cílem mé práce bylo seznámit se s metodikou kultivace kalusových a suspenzních kultur. Testování vlivu pyrazin-karboxylových derivátů na produkci flavonolignanů v kalusových a suspenzních kulturách *Silybum marianum*. Stanovení obsahu flavonolignanů metodou HPLC.



## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1. Kultury rostlinných explantátů**

Kultury rostlinných explantátů znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek (6). Jako explantáty se tedy označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. Explantátové kultury se využívají jak při šlechtění rostlin, tak při produkci rostlinných metabolitů (1).

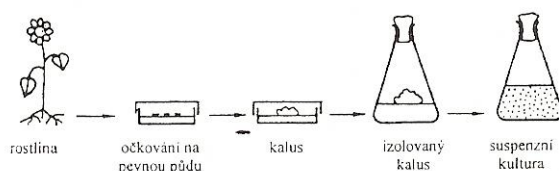
Tkáňové a buněčné kultury vyšších rostlin jsou schopny vytvářet sekundární metabolity v laboratorním měřítku. Naskytá se možnost pěstovat rostlinné buňky v průmyslovém měřítku pro výrobu určitých metabolitů. Výrobně využitelná produkce zatím však nebyla dosažena, kultury nedosahují dosud, až na některé výjimky tak intenzivní biosyntézy jako celý organismus. Překážkou je také velmi pomalý nárůst buněčných kultur vyšších rostlin ve srovnání s kulturami mikroorganismů (29).

Základem rostlinného organismu, vznikajícího pohlavním rozmnožováním, je jedna buňka – zygota, která vznikne oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou. Zygota obsahuje v jádře kompletní genetickou informaci a v cytoplazmě mechanismy umožňující realizaci této informace. Zygota je totipotentní a mitoticky se dělí. Procesem mitotického dělení vznikají dceřiné buňky, které se dále vyvíjejí a dochází k jejich diferenciaci. Stávají se stavebními jednotkami specializovaných pletiv. Možnost vegetativního množení rostlin však ukazuje, že rostlinné buňky touto diferenciací nijak nedegenerují, ale že jsou schopny dediferenciace a opětného dělení. Buňky diferencovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristematických. Proces diferenciaci je totiž založen na tzv. diferenční genové aktivitě, kdy se specializace buňky vytváří na základě aktivace či inaktivace určitých genů příslušného rostlinného druhu. V rostlinném organismu je tedy totipotentní nejen zygota a meristematická buňka, ale i kterákoli jiná rostlinná buňka (6).

Každá buňka obsahuje úplnou genetickou informaci celého organismu. Nedotčeny zůstávají informace určující základní životní pochody, jako je syntéza bílkovin, glykolýza aj. Během růstu a dalšího vývoje pletiv následuje dediferenciace anatomická a morfologická. Na indukci diferenciaci se podílejí

buňky sousedních pletiv nebo vlastního pletiva, fytohormony aj. a buňky diferencovaného pletiva tak získají opět schopnost dělit se (7). Změnou podmínek, ve kterých se specializovaná rostlinná buňka nachází, je možné v mnohých případech vyvolat dediferenciaci a neorganizovaný růst. Teoreticky je jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem vhodné pro odvození explantátové kultury (6).

Kultura rostlinných explantátů se získá z kterékoli části rostliny, nadzemní nebo podzemní, explantací parenchymatické tkáně, jejím přenesením na tuhou živnou půdu a inkubací v teplotním rozmezí 23 až 28°C. Po nárůstu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné je opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat tak získanou kulturu v aktivním stavu. Obsah růstových látek a vitamínů v živné půdě má rozhodující význam nejen pro růst kalusové kultury, ale i pro převádění kalusu do suspenzní kultury. Zejména rozpadavý kalus po přenesení do tekuté živné půdy zajišťuje homogenitu suspenzní kultury, která je pro další vývoj postupu nezbytná. Homogenní kultura v tomto případě znamená, že obsahuje kromě jednotlivých buněk i shluky dvou až několika buněk (1).



Obr. č. 1. Odvození explantátové kultury z rostliny (1).

### **3.1.1. Rozdělení kultur rostlinných explantátů (8)**

Podle morfologické charakteristiky se rozlišují:

- **Kultury orgánové** – orgánové systémy, orgány, resp. jejich základy či části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a vcelku zachovává jejich stavbu a funkci.

- **Kultury tkáňové (resp. pletivové, kalusy)** – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně (pletiva), pomnožované buď na polotuhých, či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě.
- **Kultury suspenzní** – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendované v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.
- **Kultury buněčné (resp. kultury volných buněk)** – volné jednotlivé a identifikované buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotuhé půdě nebo na nosiči nasyceném půdou.
- **Kultury protoplastů** – kultury buněk zbavených buněčných stěn.

### **3.1.2. Kultivace explantátových kultur (1)**

Volba vhodného kultivačního zařízení má pro přípravu explantátových kultur rostlinných buněk značný význam. Při šetrném avšak nedostatečném způsobu promíchávání explantátové kultury mohou být metabolické procesy limitovány kyslíkem a kromě toho vzniká trvalý třífázový systém v důsledku nadměrné sedimentace nebo flotace buněk. Vhodným zařízením jsou pomaloběžné rollery nebo plastické vaky umístěné na pomaloběžném reciprokém třepacím stroji. Nevýhodou je značně dlouhá doba kultivace, buněčný cyklus explantátových kultur se pohybuje od 15 hod výše. Tím jsou zvýšené nároky na udržení sterility procesu.

### **3.1.3. Složení kultivačního média (6)**

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v explantátových kulturách je složení kultivačního média. Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo další

zdroj organického dusíku, sacharidy, nedefinované organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory.

Mezi nejčastěji používaná média patří ta, která popsali White (1963), Murashige a Skoog (MS, 1962), Gamborg et al (B5, 1968), Gautheret (1942), Shenk a Hildebrandt (SH, 1968), Nitsch a Nitsch (1969) a Lloyd a McCown (1981).

#### **a) Makroelementy**

Makroelementy zahrnují: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu. Kultivační médium by mělo obsahovat přinejmenším 25-60 mM anorganického dusíku, nejčastěji ve formě dusičnanu draselného a dusičnanu amonného. Draslík se do médií dodává ve formě dusičnanu nebo chloridu v koncentraci 20-30 mM. Optimální koncentrace fosforu, hořčíku, síry a vápníku se pohybuje v rozsahu 1-3 mM.

#### **b) Mikroelementy**

Mezi mikroelementy patří: železo, mangan, zinek, bor, měď a molybden. Železo a zinek se obvykle dodávají v chelátové formě. Také se někdy přidává kobalt, jód, sodík a chlór. Měď a kobalt se dávají v koncentraci 0,1  $\mu\text{M}$ , železo 100  $\mu\text{M}$ , molybden 1  $\mu\text{M}$ , jód 5  $\mu\text{M}$ , zinek 5-30  $\mu\text{M}$ , mangan 20-90  $\mu\text{M}$  a bor 25-100  $\mu\text{M}$ .

#### **c) Zdroj uhlíku**

Nejčastěji je používána sacharóza, někdy je možné ji nahradit glukózou či fruktózou. Obvykle používaná koncentrace sacharózy je 2-3 %.

#### **d) Vitamíny**

Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Nejčastěji se používají thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. Thiamin se používá v koncentraci 0,1-10,0 mg/l, je součástí většiny médií a je nepostradatelný pro růst tkáňových kultur. Kyselina nikotinová se dodává v koncentraci 0,1-5,0 mg/l, pyridoxin v koncentraci 0,1-10,0 mg/l. Myo-inositol se vyskytuje ve většině živných médiích, nemusí být pro růst explantátu nezbytný, ale může tento růst stimulovat. Předpokládá se jeho účast na tvorbě fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, které hrají roli v buněčném dělení. Myo-inositol se používá

v koncentraci 50-5000 mg/l. Další vitamíny, které se někdy používají, jsou biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin atd.

#### **e) Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku**

Aminokyseliny mohou stimulovat růst explantátů, a to hlavně při kultivaci buněčných suspenzí a protoplastů. Slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být využívány přímo k syntéze proteinů. Dusík se v organické formě dodává hlavně ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát). Také se používá L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin. Nejčastěji se používá koncentrace 1-100 mg/l, při vyšších koncentracích mohou inhibovat růst.

#### **f) Nedefinované organické složky médií**

Do této skupiny patří celá řada organických extraktů jako např. protein hydrolyzát, kokosové mléko, kvasniční extrakt, sladový extrakt, extrakt z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Nejčastěji se používá protein (kasein) hydrolyzát v koncentraci 0,05-0,1 % a kokosové mléko v koncentraci 5-20 %. Také se někdy do médií přidává aktivní uhlí, které má jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů. Aktivní uhlí má v živném médiu tři základní funkce: absorpce látek inhibujících růst, absorpce růstových regulátorů a ztmavnutí média. Inhibiční efekt v přítomnosti aktivního uhlí v médiu je možné vysvětlit absorpcí růstových regulátorů. Stimulační účinek je připisován jeho schopnosti vázat toxické fenolické sloučeniny produkované explantátem. Aktivní uhlí se před použitím propláchně kyselinou a zneutralizuje. Používá se v koncentraci 0,5-1,0 %.

#### **g) Látky používané pro zpevnění média**

Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. K vytvoření gelu, je-li agar smíchán s vodou, dojde při teplotách 60-100°C, který tuhne přibližně při 45°C. Agarové gely jsou tedy stabilní při teplotách používaných ke kultivaci. Agar se obvykle používá v koncentraci 0,8-1,0 %. Je možno také používat agarózu, Phytigel a Gerlite. Phytigel a Gerlite se přidávají v koncentraci 1,25-2,5 g/l, rychle tuhnou a výsledný gel je velmi čistý. V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty fixovat na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě, perforovaném celofánu atd.

#### **h) Růstové regulátory**

Zpracovány v kapitole 3.2.

### **3.1.4. Faktory ovlivňující explantátové kultury (9)**

Na explantáty nemá vliv pouze složení kultivačního média, ale i další faktory:

- světlo (kvalita, intenzita a fotoperiodicita)
- teplota
- plynná složka kultivačního prostředí

Vedle kultivačních podmínek závisí růst také na vlastním explantátu:

- orgán, ze kterého byl explantát izolován
- fyziologické a ontogenetické stádium
- období odběru explantátu
- velikost explantátu
- kvalita donorové rostliny
- genotyp
- orientace explantátu
- předchozí působení na donorovou rostlinu
- inokulační hustota

Uvedené pořadí nepředstavuje v žádném případě pořadí důležitosti. Dnes se považuje za jeden z rozhodujících faktorů genotyp. Právě u explantátových kultur se však velmi názorně ukazuje vzájemná neoddělitelnost genetických a fyziologických zákonitostí.

### **3.1.5. Využití explantátových kultur (1)**

- Alternativní příprava produktů získávaných dosud z rostlin v polní kultuře, předností je určení si vlastních podmínek, bez závislosti na ročním období, bez závislosti na počasí. Tyto produkty jsou homogenní, bez kontaminantů, hmyzu a chemikálií.
- Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách.

- Získávání nových látek při změně metabolismu explantátových rostlinných buněk. Tyto látky nebyly zjištěny v mateřských rostlinách.
- Produkty biotransformací, získávají se farmaceuticky významné látky.

V explantátových kulturách se dosáhl vyšší obsah příslušné látky ve srovnání s matečnou rostlinou v několika případech (viz. tab. č.1.).

<b>Produkt</b>	<b>Druh rostliny</b>	<b>Tvorba buněk v kultuře buněk (% suché hmotnosti)</b>	<b>Tvorba buněk v rostlině (% suché hmotnosti)</b>
Antrachinony	<i>Morinda citrifolia</i>	18	2,2
Ubichinon-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,04	0,003
Ajmalin	<i>Catharanthus roseus</i>	1,8	0,8
Serpentin	<i>Catharanthus roseus</i>	1,8	0,8
Diosgenin	<i>Discorea deltoides</i>	2,2	2
Rosmarinová kyselina	<i>Coleus blumei</i>	25	3

Tabulka č. 1. Některé produkty hromaděné v explantátových kulturách ve vyšších koncentracích než v matečné rostlině (1).

### **3.1.6. Mikropropagace rostlin**

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

- Kultura se odvozuje z velmi malých částí rostlin a nevyžaduje se příliš prostoru.
- Rozmnožování se provádí ve sterilních podmínkách, a tím je zabráněno virovým a mikrobiálním nákazám.
- Podmínky množení jsou přesně definovány.
- Je možno produkovat druhy nebo klony rostlin, které se tradičními metodami vegetativního množení množí pomalu nebo vůbec.
- Rostliny je možno množit po celý rok bez závislosti na ročním období.
- Vzhledem k malé velikosti výchozího materiálu nejsou nároky na velké skleníkové plochy pro uchovávání matečných rostlin.
- Rostliny *in vitro* mezi pasážemi nevyžadují prakticky žádnou péči (1).
- Mikropropagace umožňuje zkrátit šlechtitelský cyklus a rychlé namnožení nově vyšlechtěných odrůd.

Mezi hlavní nevýhody patří relativně drahé laboratorní vybavení a poměrně vysoká pracnost metody, která zatím neumožňuje využití mechanizace. Další nevýhodou je poměrně drahý provoz laboratoře explantátových kultur (6).

#### **Fáze mikropropagace (6)**

##### **1) Stádium 0 – výběr matečné rostliny a její příprava pro odběr explantátu**

Je důležité znát původ matečné rostliny, která by měla být zdravá a pěstovaná v optimálních podmínkách. Odvození a růst explantátu je ovlivňován ročním obdobím, ve kterém je odebírán. Nejlepších výsledků je dosahováno, je-li explantát odebrán z rostliny v aktivní fázi růstu.

##### **2) Stádium I – odvození aseptické kultury**

Hlavním cílem tohoto stádia je odvodit sterilní primokulturu. To je spojeno s povrchovou dezinfekcí materiálu používaného jako explantát. Tento proces zahrnuje opláchnutí explantátu vodou a jeho povrchovou dezinfekci pomocí



jednoho nebo více dezinfekčních činidel (chloramin B, chlorové vápno). Po dezinfekci je nutné dezinfekční roztok z explantátu odstranit opakovaným vypíráním ve sterilní destilované vodě. Poté se explantáty umístí do kultivační nádoby na povrch média, popř. do média.

### **3) Stádium II – fáze proliferace explantátové kultury**

Hlavním cílem je namnožení explantátu, primokultura je opakovaně pasážována na čerstvé médium. Tento proces trvá do dosažení žádaného počtu explantátů.

### **4) Stádium III – zakořeňování *in vitro***

Tato fáze představuje jednorázovou kultivaci prýtů. K zakořeňování je nutné použít jiné kultivační médium, které má odlišné složení a obsahuje jak cytokininy tak auxiny. U některých druhů se používá médium s nižším obsahem makro a mikroelementů. Kořeny se také lépe tvoří při kultivaci prýtů na můstcích z filtračního papíru. Důležitý vliv hraje i teplo a světlo. Teploty, které obvykle stimulují růst kořenů, se pohybují v rozmezí 25 - 28°C.

### **5) Stádium IV – zakořeňování *in vivo* a aklimatizace**

V tomto stádiu dochází k zakořeňování prýtů v nesterilních podmínkách na substrátech, jiných než jsou kultivační média (např. směsi obsahující písek, rašelinu). Substrát by měl být slabě kyselý až neutrální a měl by mít vysokou vodní kapacitu, proto je někdy nutné používat směsi jednotlivých substrátů. Je také potřeba aklimatizovat rostliny na sníženou vlhkost a přechod na autotrofní způsob výživy.

Jelikož rostliny rostoucí v kultuře nemají vytvořenou dostatečně silnou kutikulu a mají velmi často nefunkční průduchy (tento jev je označován jako vitifikace), je nezbytná aklimatizace na sníženou vzdušnou vlhkost. Je to způsobeno vysokou vlhkostí v kultivačních nádobách a malou intenzitou světla.

Dalším problémem je přechod z heterotrofie na autotrofii. Pokud totiž probíhá v explantátech fotosyntéza, není hlavním zdrojem organického uhlíku, tím je médium. Listy rostlin rostoucích v explantátech mají odlišnou vnitřní stavbu a to jim znemožňuje intenzivní fotosyntézu. Proto jsou listy vzniklé v explantátových kulturách považovány spíše za zásobní orgány, které poskytují organické látky pro růst nových listů. Nově vzniklé listy jsou již schopné fotosyntézy a regulují výdej vody rostlinou.

### **3.1.7. Kalusová kultura**

Kalus představuje soubor nediferencovaných buněk. Kalusové kultury mohou být embryogenní a non-embryogenní. Embryogenní kalusové kultury obsahují diferencované buňky, které mohou regenerovat celé rostliny přes proces zvaný somatická embryogeneze. Non-embryogenní kalusové kultury obsahují více či méně shluků nediferencovaných buněk, jsou používány pro produkci sekundárních metabolitů (10). U většiny dvouděložných rostlin je možné kalus odvodit z různých explantátů jako např. ze segmentu listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, vzrostných vrcholů, embryí atd. U jednoděložných rostlin je možné použít embrya, velmi mladé listy, nodální segmenty stonků či květní základy. Růst kalusu je indukován umístěním explantátu na médium s relativně vysokou koncentrací auxinu (1–10mg/l) v přítomnosti nižší koncentrace cytokininu. Kalus může být použit k odvození suspenzní kultury. Kalusová kultura s opakovanými pasážemi ztrácí morfogenní schopnost a stoupá u ní pravděpodobnost genetických změn (6).

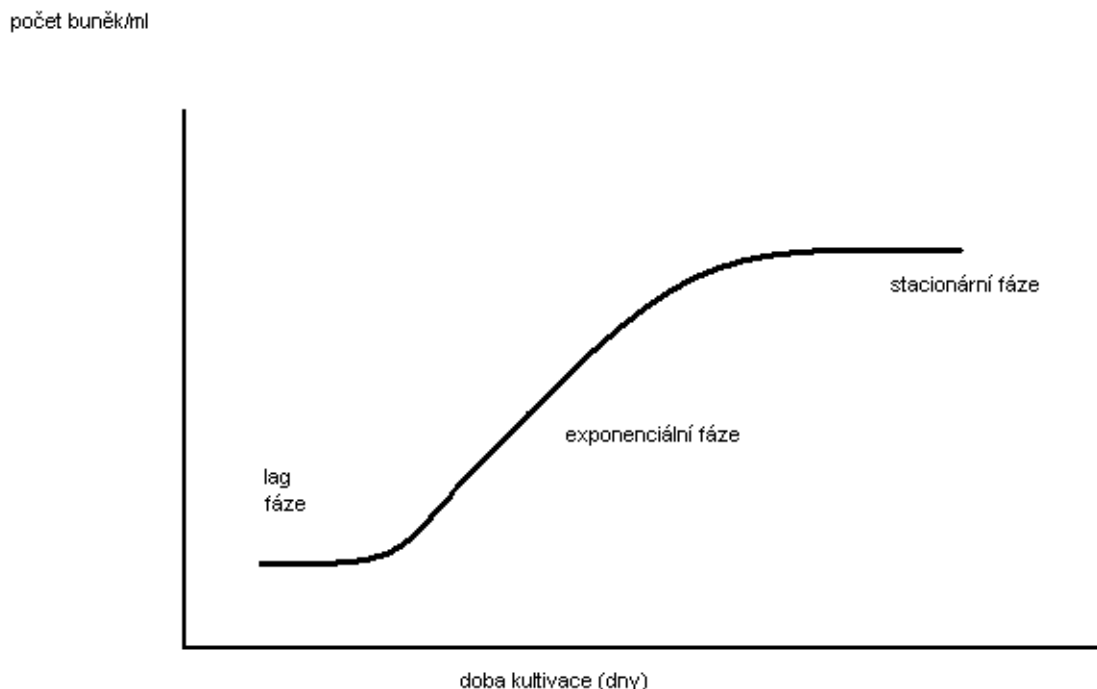
### **3.1.8. Suspenzní kultura (6)**

Suspenzní kultury rostlin představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujiícím se tekutém živném médiu. Buňky suspenze mají díky tomu přímý kontakt s živným médiem, takže jednotlivé složky jsou rychle přístupné. Snadný přístup živin a také dobrá výměna dýchacích plynů v pohybujiícím se médiu umožňuje velmi rychlý růst suspenze. Při dlouhodobé kultivaci se suspenze stává heterogenní směsí, je to způsobeno genetickými změnami.

Pro získání suspenzní kultury je nezbytné nejprve odvodit kalusové pletivo. Suspenze se nejlépe tvoří z rozpadavého kalusu. Poté jsou kousky kalusu kultivovány na tekutém médiu na třepačce nebo rolleru. Při kultivaci na rolleru či třepačce se kultivační nádoby plní pouze z jedné pětiny až jedné čtvrtiny.

Růst buněčné suspenze v uzavřeném systému – mění se podmínky kultivace (složení média, hustota buněčné suspenze atd.) lze charakterizovat

tzv.růstovou křivkou. Růstovou křivku je možné získat tak, že se graficky znázorní závislost některé z růstových charakteristik suspenze (čerstvá hmotnost, počet buněk, sušina atd.) na čase (obr. č. 2.).



Obr. č. 2. Růstová křivka (6).

Růst suspenze je v porovnání s růstem kalusu na pevném médiu mnohem rychlejší. Rychlý růst buněk způsobuje rychlé odčerpávání živin z kultivačního média a k zajištění stálého růstu je proto nutné suspenze poměrně často pasážovat na čerstvé médium.

Pasážování je nutné provádět na konci exponenciální fáze růstu, která je charakteristická aktivním dělením a růstem buněk. V exponenciální fázi není růst buněk limitován exogenními faktory. Exponenciální fáze růstu je jednou z fází růstové křivky.

Průběh křivky je charakteristický pomalým růstem suspenze těsně po naočkování (lag fáze), velmi intenzivním nárůstem v exponenciální fázi a poklesem popř. úplným zastavením růstu ve stacionární fázi. Růst buněk ve stacionární fázi je především limitován nedostatkem živin, které byly vyčerpány z média v průběhu exponenciálního růstu.

## **3.2. Růstové regulátory**

Na základě určitých analogií s působením hormonů živočišných je pět skupin endogenních růstových regulátorů považováno za rostlinné hormony. Jsou to auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová a ethylen. Mimo ně existuje v rostlinách množství látek s růstově regulační aktivitou, které mezi hormony řazeny nejsou, neboť jsou účinné ve vyšších koncentracích či neznáme dostatečně obecnost jejich působení. Jsou to zejména brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová a velká skupina fenolických látek (9).

Fytohormon se váže na receptor (= protein) na membráně a signál do buňky je přenášen systémem „poslů“ (second messenger) anebo fytohormon přímo proniká do buňky a váže se na tzv. vazebné místo v cytoplasmě a vzniklý komplex proniká do buněčného jádra, kde vyvolá změnu exprese některých genů (7).

### **3.2.1. Auxiny**

Dnes je z auxinových fytohormonů nejznámější heteroauxin, který je po chemické stránce kyselinou  $\beta$ -indolyloctovou (IAA). Stimulaci růstu vyvolává IAA v rozmezí  $10^{-7}$  až  $10^{-5}$  mol/l. Vyšší koncentrace růst inhibují často zvýšenou tvorbou ethylenu. Heteroauxin „změkčuje“ stěnu buněčnou aktivací hydrolytických enzymů. Mění kyselost buněčné stěny zřejmě přes protonové pumpy, a tím je pH prostředí vhodné pro aktivitu enzymů potřebných pro její růst. Stimuluje vznik adventivních kořenů a rašení pupenů. Na vzrostném vrcholu, kde heteroauxin dosahuje vyšší koncentrace, plní vlastně funkci nativního inhibitoru tím, že brzdí růst postranních pupenů (7).

K auxinům se řadí především kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolylmásečná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina naftyloctová (NAA). IAA představuje nativní auxin, ostatní jsou látky syntetické. Dalšími syntetickými látkami patřící k této skupině jsou kyselina chlorfenoxyoctová (4-CPA), kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T). Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především za účelem stimulace

růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu prýtů (6).

### **3.2.2. Gibereliny**

Dnes je známo více než 100 giberelinů (= derivátů s giberelanovým skeletem). Jsou to terpenoidní sloučeniny s charakteristickým giberelanovým skeletem. Označujeme je číslicemi GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub> atd. Nejznámější je kyselina giberelová (GA<sub>3</sub>), které se běžně říká giberelin.

Giberelin vzniká v mladých listech především vzrostných vrcholů, v kořenech i v klíčících semenech. Nepůsobí toxicky a proto na rozdíl od auxinů se v rostlinách nevytvářejí žádné mechanismy na odbourávání giberelinů. Giberelin stimuluje mitózu v meristémech, růst internodií i listů, nikoliv však kořenů. Ruší dormanci semen, ovlivňuje aktivitu amylázy, indukuje kvetení u dlouhodobých rostlin. Při tom účinek GA<sub>3</sub> není tak závislý na koncentraci jako je tomu u auxinu (7). GA<sub>3</sub> stimuluje růst buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, dále stimuluje růst kalusu a růst zakrslých rostlin (6).

### **3.2.3. Cytokininy**

Cytokininy indukují v přítomnosti auxinů buněčné dělení čili cytokinezi. Se stimulací dělení buněk je spjata urychlení tvorby DNA. Obecně lze říci, že cytokininy stimuluje metabolismus rostlin, zvláště pak RNA a proteosyntézu. Proto zpomalují stárnutí buněk a zvyšují jejich odolnost proti nepříznivým činitelům prostředí. Nejnápadněji se jeví schopnost cytokininů bránit žloutnutí izolovaných listů (7).

Mezi cytokininy patří benzylaminopurin (BAP, jinak benzyladenin BA), 6-dimethylaminopurin (kinetin) a zeatin. Cytokininy se používají v kultivačních médiích za účelem stimulace buněčného dělení a stimulaci tvorby axilárních prýtů (6). Cytokininy působí na fyziologické procesy v interakci a kooperaci zejména s auxiny. Cytokininy a auxiny umožňují regenerační proces „*in vitro*“ a změnami jejich poměru v médiu lze regenerovat celou rostlinu (vyrovnaný poměr = kalus, nadbytek auxinu = kořeny, nadbytek cytokininu = stonky) (7).

### **3.2.4. Kyselina abscisová**

Kyselina abscisová patří k terpenoidním inhibitorům. Vyskytuje se ve formě několika izomerů a fyziologicky aktivní je její S-izomer. Nejvíce se jí tvoří v dormantních semenech, pupenech, hlízách i cibulích a vlastně určuje dobu dormance. Může vznikat zřejmě ve všech orgánech rostliny, především však za stresových podmínek. Brzdí prodlužovací fázi růstu buněk (působí antagonisticky k působení auxinů a giberelinů). Její obsah ve stárnoucích nebo zavadajících listech prudce stoupá. Urychluje stárnutí listů, jejich opad a vstup do vegetačního klidu (7).

Kyselina abscisová stimuluje i inhibuje růst kalusu v závislosti na rostlinném druhu, stimuluje proliferaci prýtlů a inhibuje pozdější fáze embryogeneze (6).

### **3.2.5. Ethylen**

Ethylen má v hierarchii fytohormonů zvláštní postavení, protože ve fyziologické koncentraci má tak nejednoznačné účinky, že jej nemůžeme pokládat ani za stimulátor ani za inhibitor.

Po chemické stránce je nejjednodušším růstovým regulátorem. U vyšších rostlin vzniká z methioninu. Rozpouští se v cytoplazmě, kde byla zjištěna specifická vazebná místa pro ethylen. Působí i na expresi genů. Brzdí proteosyntézu, i tvorbu mRNA. Naopak indukuje tvorbu některých mRNA i bílkovin.

Ethylen je snad nejznámější signální molekulou zprostředkující reakci rostliny na poranění (stres). Působí na enzymy a tím reguluje procesy v buňce nebo se váže na membrány a tím zvyšuje jejich permeabilitu. Byl zjištěn synergický účinek především auxinů na tvorbu ethylenu. Auxiny totiž stimulují v pletivech produkci ethylenu a ten ve zvýšené koncentraci inhibuje jejich další tvorbu. Proto bývá ethylen běžně chápán jako antagonisticky působící látka na všechny typy fytohormonů (7).

## **3.3. Fyziologie stresu**

### **3.3.1. Stresová reakce a stresové faktory (9)**

Rostliny jsou během svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Ty mohou nejen zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést i k jejich uhynutí.

Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu označujeme jako stresové faktory (stresory).

Přehled nejdůležitějších stresových faktorů, se kterými se rostliny setkávají v přírodě:

#### **Abiotické faktory**

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

#### **Biotické faktory**

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

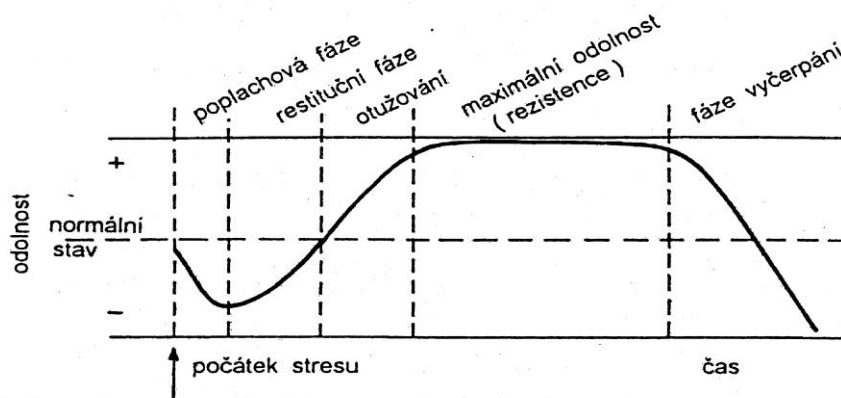
Stresové faktory, ať už fyzikálně-chemické či biotické, mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů nesterjně snadno, a to především v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur. Tento způsob ochrany má

převážně pasivní a dlouhodobý charakter (např. tlustá kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn). Jedná se vlastně o schopnost vyhnout se stresu, ke které přispívají také vhodně načasované životní cykly.

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

Zjednodušeně můžeme popsat průběh stresové reakce:

- **poplachová fáze** – bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí
- **restituční fáze** – intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň a záhy dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů
- **fáze rezistence** – kompenzační mechanismy směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům
- **fáze vyčerpání** – při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru dochází k dalšímu poklesu



Obr. č. 3. Idealizovaný průběh stresové reakce (podle Larchera 1995) (9).

Základní schéma průběhu stresové reakce však nevypovídá vůbec nic o rozmanitosti vlastního působení stresorů ani o koordinaci složitého komplexu reakcí, kterými je podložena odpověď rostliny na jejich působení.

Průběh stresové reakce a její konečný výsledek závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru na danou rostlinu, tak i na geneticky



vázaných předpokladech odpovědi, souhrnně označovaných jako adaptační schopnosti.

Přechodné zvýšení odolnosti získané pod vlivem stresoru a nazývané jako aklimatizace může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých (tvorba specifických metabolitů), tak i na změnách trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře).

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

### **3.3.2. Společné mechanismy stresových reakcí**

Existují jisté výhrady o obecné stresové reakci rostlin, přesto byly nalezeny společné dílčí komplexy reakcí, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresům současně.

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

- tvorba stresových proteinů;
- tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku;
- tvorba „stresových“ fytohormonů (kyseliny abscisové, ethylenu, kyseliny jasmonové, methyljasmonátu a polyamidů);
- tvorba osmoregulačních sloučenin (cukrů, polyalkoholů a jednoduchých dusíkatých látek) (9).

#### **Tvorba stresových proteinů**

Vlivem stresoru se začínají v buňce syntetizovat proteiny, které se za normálních okolností vůbec nedají v buňce zjistit. Tyto proteiny se nazývají stresové proteiny. Jen některé proteiny se vyskytují pravidelně i u jiných typů stresů, většina je specificky vázána na určitý stresový faktor.

Proteiny, jejichž syntéza je indukována nescificky (různými typy stresorů), můžeme rozdělit do tří funkčních skupin: molekulární chaperony, proteázy a ubikvitin. Jejich intenzivní tvorba souvisí se vzrůstem počtu poškozených proteinů v různých buněčných strukturách.

Chaperony slouží nejen k řízení změn konformace proteinů při transpotech přes membrány, ale jsou schopny upravit jejich konformaci i při mírném poškození. Pokud ovšem dojde k velkým, nenapravitelným změnám, je takový protein „označen“ malou molekulou ubikvitinu a rozložen pomocí proteáz na aminokyseliny. Ty jsou pak využity k syntéze nových proteinů.

Nejdůležitější skupiny stresových hormonů jsou:

- proteiny indukované zvýšenou teplotou;
- proteiny indukované chladem;
- proteiny indukované dehydratací;
- proteiny indukované sníženou koncentrací kyslíku;
- proteiny indukované patogeny (9).

### **Tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku**

Aktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species).

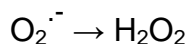
Běžný molekulární kyslík v naší atmosféře je poměrně málo reaktivní, ovšem některými procesy v rostlinách může být přeměněn na mnohem aktivnější formy (singletový kyslík a superoxidový anion) či silně oxidační sloučeniny (hydroxylový radikál, peroxid vodíku).

Úloha těchto látek je rozmanitá. Vznikají jako nebezpečné produkty při působení řady stresových faktorů a rostliny musí mít účinné systémy na jejich deaktivaci. Na druhé straně mohou mít kladnou úlohu jako signály či ochranné látky při některých typech stresů a je tudíž žádoucí jejich koncentraci udržovat na jisté úrovni.

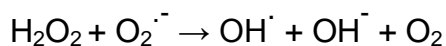
Tvorba aktivních forem kyslíku probíhá na prvním místě v chloroplastech, kde se soustřeďuje velké množství energie při absorpci záření asimilačními pigmenty a současně je v nich zvýšená koncentrace kyslíku z rozkládající se vody ve fotosystému II. K fotoredukci kyslíku může docházet především ve fotosystému I (Mehlerova reakce), produktem při Mehlerově reakci je superoxid, z něhož se mohou dále tvořit nebezpečnější hydroxylové radikály a peroxid

vodíku. Zvýšení tvorby aktivních forem kyslíku je v chloroplastu dáno snížením rychlosti sekundárních procesů fotosyntézy vlivem nejrůznějších stresových faktorů (9).

Superoxid funguje jako oxidační i redukční činidlo. Je schopný reagovat a vytvářet další aktivní formy kyslíku. Enzym superoxidodismutáza, která se nachází v matrix chloroplastů a na tylakoidní membráně, dismutuje superoxid na peroxid vodíku, a to zvláště za mírně kyselého pH.



Když spolu reagují superoxid a peroxid vodíku dochází k reakci, kdy je produkována nejreaktivnější forma kyslíku – hydroxylový radikál. Tato reakce, známá pod jménem Haber-Weiss, však musí být katalyzována přeměnou kovových iontů, zejména železa a mědi (15).



V chloroplastu také může docházet k tvorbě singletového kyslíku za vysoké ozáření přenosem excitační energie z chlorofylu (v excitovaném tripletovém stavu) na kyslík v základním stavu (9). Absorpce dostatečného množství energie způsobí převrácení spinu jednoho z nepárových elektronů kyslíku. Biradikální forma kyslíku v tripletovém základním stavu po absorpci potřebné energie přejde do stavu singletového, ve kterém mají oba elektrony opačný spin. Vzniklý singletový kyslík je ve srovnání s molekulárním kyslíkem velmi reaktivní (15).

V mitochondriích může docházet k tvorbě superoxidu a následně i peroxidu vodíku autooxidací ubichinonu, zejména je-li transport elektronů běžnými cestami z ubichinonu na oxidázové systémy z nějakých důvodů zpomalen. Tvorba superoxidu byla dokázána také na membránách peroxizomů, glyoxyzomů a mikrozomů.

Negativní působení aktivních forem kyslíku spočívá především v peroxidaci lipidů. Nejvíce náchylné jsou membránové lipidy s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Poškozeny mohou být i některé aminokyseliny, proteiny a nukleové kyseliny. K oxidaci je zejména náchylný histidin, metionin, tryptofan a guanin.

Mechanismy ochrany před oxidačním poškozením:

- systémy přímé deaktivace: karotenoidy,  $\alpha$ -tokoferol;
- specializované enzymy a enzymatické systémy:  
superoxiddismutáza, askorbát a glutation.

Protistresová úloha aktivních forem kyslíku je důležitá při napadení rostliny patogenem, regulovaná tvorba má i přímý antimikrobiální účinek, přispívá ke zpevnění buněčné stěny a tím má rostlina větší odolnost vůči stresorům (9).

**Tabulka č. 2. Lokalizace a cílová místa aktivních forem kyslíku (15).**

<b>Aktivní forma kyslíku</b>	<b>Lokalizace</b>	<b>Cílové místo</b>
Singletový kyslík	Chloroplasty	Peroxidace membránových lipidů, destrukce chlorofylu
Superoxid	Chloroplasty, Mitochondrie, Peroxisomy, Buněčná stěna, Endoplazmatické retikulum, Glyoxyzomy, Plazmatická membrána	Destrukce chlorofylu, peroxidace membránových lipidů
Peroxid vodíku	Peroxisomy, Buněčná stěna, Apoplast	Inaktivace enzymů Calvinova cyklu
Hydroxylový radikál	Chloroplasty, Buněčná stěna	Všechna místa v buňce

### **Tvorba stresových fytohormonů**

Působením stresových faktorů se mohou vytvářet některé fytohormony (kyselina abscisová, ethylen, kyselina jasmonová, methyljasmonát a polyaminy).

Kyselina abscisová (dormin) je přirozeným inhibítozem růstu krytosemenných rostlin. Inhibuje klíčení, tvoří oddělovací vrstvy mezi řapíkem a stonkem, což vede k opadávání listů a řapíků. Urychluje stárnutí buněk a také brzdí dělení a růst buněk. Její působení ve stresových situacích je spojeno s indukcí tvorby specifických proteinů, které chrání buňku před působením stresových podmínek.

Ethylen je přírodní regulátor zrání plodů, brzdí syntézu auxinu. Dále inhibuje prodlužovací růst a stimuluje růst radiální. Zvýšení tvorby ethylenu je jednou z prvních reakcí rostlin na působení stresoru.

Kyselina jasmonová a methyljasmonát urychlují stárnutí listových segmentů a důležitou úlohou je jejich funkce jako signál při reakci na dotyk, na patogeny a na poranění. Stoupá tím jejich obsah v buňce, který nese informaci o působení vnějšího faktoru.

Polyaminy stimuluje růst v systémech *in vitro*, ve kterých probíhá intenzivní buněčné dělení. Také stimuluje somatickou embryogenezi a iniciuje kvetení. Hrají významnou úlohu v obraně proti stresům, a to díky jejich ochrannému působení na membrány a na DNA (mohou ovlivnit její konformaci i expresi genů) (9,11).

### **3.3.3. Biotické stresy (9)**

#### **a) alelopatie**

O alelopatii hovoříme tehdy, jestliže dojde k přenosu účinné látky z rostliny a dojde tak k ovlivnění sousední rostliny. Látky mohou na rostlinu působit inhibičně v některých případech až toxicky. Účinné látky musí být z jedné (zdrojové) rostliny vyloučeny a přeneseny na jinou (cílovou) rostlinu v dostatečné koncentraci. Zdrojová rostlina tedy musí být vůči účinné látce mnohem méně citlivá než rostlina cílová.

## **b) interakce s býložravými živočichy**

Rostliny jsou neustále vystaveny nebezpečí poškození svých orgánů mnoha druhy živočichů. Existuje celá řada morfologických a morfogenetických adaptací k omezení tohoto poškození (např. ostré trny či trichomy). Kromě toho se setkáváme i s adaptacemi biochemickými. Mnohé sekundární metabolity syntetizované v rostlinách působí odpudivě či toxicky na živočichy. Tyto látky lze z hlediska množství výskytu rozdělit na kvalitativně významné a kvantitativně významné. Látky kvalitativně významné se v rostlinách vyskytují v malých koncentracích, přesto jsou pro živočichy velmi toxické. Patří sem nejrůznější alkaloidy, glykosidy uvolňující kyanovodík, glukosinoláty a mnoho dalších. Mezi kvantitativně významné metabolity, které nejsou natolik toxické, ale vyskytují se ve větším množství, patří lignin, taniny a fenolické látky. Tyto látky způsobují špatnou stravitelnost, nechutnost až toxicitu.

## **c) reakce na patogenní organizmy**

Rostliny mohou napadat také patogenní mikroorganismy (viry, bakterie, houby). Především patogenní houby disponují celou řadou velmi účinných lytických exoenzymů. Na počátku všech obranných reakcí je podnět k jejich spuštění, kterým bývá specifický metabolit (elicitor) uvolňovaný při počáteční interakci buňky s patogenem a identifikovaný vhodným receptorem hostitelské buňky. Jako elicitory mohou sloužit některé metabolity vylučované patogeny tzv. exogenní elicitory (např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy) a sloučeniny uvolňované z narušených buněčných stěn obou organismů tzv. endogenní elicitory (např. oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteidy uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub).

K obranným reakcím rostlin na patogeny můžeme zařadit tvorbu fytoalexinů, specifických nízkomolekulárních látek, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začínají se vytvářet až po napadení patogenem. Většina těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů a mohou tak poškodit membránové funkce. Působí toxicky hlavně na patogenní houby, méně na bakterie. Další obrannou reakcí je tzv. hypersenzitivní reakce. Při této reakci dochází k rozpadu membránového systému hlavně náhlým zvýšením koncentrace vysoce reaktivních volných radikálů a peroxidu vodíku. Dochází tak

k rychlé zkáze vlastní buňky i houbové hyfy. Postupně odumírají i buňky v blízkém okolí místa infekce. Jiným typem obranné reakce je zvýšená tvorba polysacharidu kalózy, který vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa a je velmi odolný vůči houbovým hydrolyzám.

Navzdory těmto mechanismům existují silně virulentní kmeny hub, které snadno překonají ochranná opatření a to díky tvorbě specifických látek tzv. supresorů, které potlačují vznik ochranných metabolitů.

### **3.3.4. Příklady abiotických stresových faktorů (9)**

#### **a) Reakce na přehřátí**

Při zvýšení teploty nad 40°C dochází u většiny druhů rostlin k zásadním změnám ve fyzikálně-chemických vlastnostech buněčných membrán i proteinů. Lipidová vrstva přechází do lamelárně kapalného (superfluidního) stavu, ve kterém nemůže plnit svoje základní funkce. Stává se propustnou pro ionty a přestává poskytovat dostatečně pevnou oporu pro membránové proteiny. Proteiny za vysoké teploty mění konformaci a dochází ke ztrátě jejich funkcí.

První postiženou membránou je tylakoidní membrána v chloroplastech. Indikátorem vznikajícího stresu je poškození fotosystému II, které lze zjistit měřením fluorescence chlorofylu *in vivo*. Jiná metoda k určení stupně odolnosti je mikroskopické pozorování buněk za postupného zvyšování teploty. Dosažení kritické teploty se projeví zastavením proudění cytoplazmy, a to v důsledku rozpadu cytoskeletu.

#### **b) Stresové účinky nízkých teplot**

Citlivost na chlad ( nízké teploty nad bodem mrazu) vykazují zejména některé užitkové rostliny původem z teplejších oblastí, např. okurky, rajčata, papriky a kukuřice. Velmi citlivé na chlad jsou také květní orgány v raném stádiu vývoje a v průběhu gametogeneze, a to i u rostlin, jejichž vegetativní orgány na chlad citlivé nejsou. Vlivem nízkých teplot dochází ke změnám fyzikálně-chemických vlastností membrán. Volná propustnost membrán pro ionty vede ke ztrátě transmembránového potenciálu, k zastavení selektivního

a aktivního transportu a k zastavení osmotických procesů. Po jisté době tohoto stavu dochází k vyčerpání energetických zdrojů a k odumření buňky.

Poškození rostlin mrazem je obvykle spojeno s tvorbou ledu a s mrazovou dehydratací buněk. Led vytvořený uvnitř buněk způsobuje téměř vždy neobnovitelné poškození mnoha struktur a rychlé odumírání. V přírodních podmínkách je pokles teplot pozvolný, proto se led vyskytuje v buňce málokdy. Voda v mezibuněčných prostorech začíná mrznout při teplotách  $-1$  až  $-3^{\circ}\text{C}$ . Avšak ani při teplotách nižších, než je očekávaný bod tuhnutí, nemusí ještě nutně dojít k tvorbě ledu. Pokud nejsou přítomna vhodná krystalizační jádra, voda zůstává v tekutém podchlazeném stavu i do  $-38^{\circ}\text{C}$ .

### **c) Vodní stres**

Ze všech abiotických faktorů, které omezují růst a produktivitu rostlin, stojí na prvním místě nedostatek vody. Voda, na rozdíl od minerálních živin, má velmi rychlý koloběh v ekosystémech a její zásoba v rostlinách i v půdě stačí jen na poměrně krátkou dobu. Vzhledem ke složitým vztahům mezi množstvím vody v rostlině a v okolním prostředí nelze dosti dobře zavést jednoduché kritérium, podle kterého bychom hodnotili, jak velkému stresu z nedostatku vody je rostlina vystavena. Charakteristiky vycházející ze stavu vody v rostlině jsou proto spolehlivější než údaje o vodě v prostředí. Nejvíce postiženým orgánem jsou vždy listy.

Při poklesu vodního potenciálu na hodnotu  $-0,2$  až  $-0,8\text{MPa}$  dochází v buňkách k velmi podstatnému zvýšení koncentrace kyseliny abscisové, zejména v listech, kde má za následek zavírání průduchů. Při větším poklesu vodního potenciálu k hodnotám okolo  $-1,0\text{MPa}$  dochází u mnoha druhů k tvorbě aminokyseliny prolinu. Hlavní význam této látky je zřejmě zvýšení osmotického tlaku v buňkách. Jestliže se vodní potenciál listů dále snižuje dochází k vážným metabolickým změnám. Pokud v této pokročilé fázi vodního stresu dojde k doplnění ztrát vody, všechny buněčné funkce se postupně vracejí do normálního stavu, i když tento návrat není okamžitý. V případě ještě delšího trvání nedostatku vody může silnou dehydratací dojít k tak vážným změnám, že odumření orgánu či celé rostliny je nevyhnutelné.



#### **d) Nedostatek kyslíku v půdě**

K tomuto nedostatku dochází, pokud je málo vzdušných pórů v půdě a navíc jsou úzké, jak tomu bývá u těžkých jílových půd nebo v důsledku zvýšeného obsahu vody v půdě. Jakmile koncentrace kyslíku v intercelulárách klesne pod 2 až 4 %, dochází k inhibici aerobních respiračních procesů. Přechod na anaerobní disimilační procesy má pro rostlinu vážné důsledky. Jednak se získávají těmito procesy pouze 2 molekuly ATP místo 32 molekul, a dalším nebezpečím jsou konečné produkty fermentace (etanol a kyselina mléčná). Na pokrytí normálních energetických potřeb musí rostlina spotřebovat větší množství organických látek, což brzy vede k jejich úplnému vyčerpání.

Kromě přímých účinků na rostliny vyvolává nedostatek kyslíku změny v samotné půdě. Příkladem je nečinnost nitrifikačních bakterií za nedostatku kyslíku. Většina přijatelného dusíku je proto ve formě amonných iontů, které mohou působit ve vyšší koncentraci na některé druhy rostlin inhibičně až toxicky.

#### **e) Zasolené a kyselé půdy**

Problémy, kterým rostliny musí čelit při růstu na zasolených půdách, jsou komplexní povahy. Kromě vlastního toxického vlivu vysoké koncentrace některých iontů (zejména  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ ) to bývá velmi nízký vodní potenciál a zhoršené fyzikální vlastnosti půdy. Dochází tak k zastavení dělivého i plouživého růstu a nakonec k odumření celé rostliny.

V kyselých půdách dochází k poklesu pH půdy jednak vstupem vodíkových iontů do půdy z kyselých srážek a také nevhodným způsobem obhospodařování. Přímé poškození rostlin je poměrně vzácné. Mnohem významnější je nepřímé působení vysokou koncentrací vodíkových iontů. Dochází ke zvýšení rozpustnosti některých sloučenin v půdě, zejména dochází k uvolňování vysoce toxických iontů hliníku, železnatých a manganatých iontů, které v nadbytku působí velice toxicky.

#### **f) Toxické látky v prostředí**

Oxid siřičitý vstupuje do listů hlavně otevřenými průduchy a difúzí v intercelulárách se snadno šíří ke všem buňkám listového mezofylu. Po proniknutí buněčnou stěnou se rychle rozpouští a mění na siřičitanové anionty,

jejichž naprostá většina vstupuje do chloroplastů. Ve vyšších koncentracích blokuje činnost karboxylačního enzymu Rubisko, a tím je inhibován i průběh sekundárních procesů fotosyntézy.

Ozón vstupuje do listů výhradně průduchy a již v intercelulárách v kontaktu s vlhkými buněčnými stěnami se velmi rychle rozkládá. Při rozkladu ozónu vzniká nejen molekulární kyslík, ale jako meziprodukty i vysoce reaktivní superoxid a hydroxylový radikál, které jsou z části zneškodněny již v buněčné stěně přeměnou na peroxid vodíku a pak na vodu. Při vyšších koncentracích ozónu dochází k poškození buněčných součástí, nejvíce je postižena plazmalema a částečně i vnitřní membránový systém buněk a organely, včetně chloroplastů.

Toxické kovy (zejména zinek, olovo a kadmium) jsou velmi snadno přijímány kořeny. Po vstupu do buněk inaktivují některé enzymy a redoxní systémy. Dochází ke zpomalení růstu primárního kořene a k hromadění těžkých kovů v kořenech. Část toxických iontů se dostává i do nadzemních orgánů, kde nejvíce ovlivňuje fyziologické procesy v listech, v první řadě fotosyntézu.

### **3.3.5. Elicitace a elicitory**

Za jednu z možností, jak získávat sekundární metabolity rostlin, je považována produkce pomocí *in vitro* kultur. V těchto kulturách však bývá biosyntéza těchto látek často nedostatečná, nebo je potlačena úplně. Ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů se používá řada metod, jako jsou například optimalizace kultivačního média, genetická manipulace, přidávání prekurzorů do média, a také elicítace (12).

Elicitace je proces, který využívá schopnosti rostlin a rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty celou řadou obranných reakcí. Díky těmto reakcím dochází ke zvýšené biosyntéze a kumulaci sekundárních látek (13).

Elicitor je specifický metabolit, který je podnětem ke spuštění obranných reakcí v postižené buňce. Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale

zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (označovaných také jako druzí poslové).

Velmi častým a neobyčejně rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je tvorba superoxidu. Vzniklý peroxid vodíku má kromě přímého účinku na expresi genů ještě účinek nepřímý, při kterém nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmonová a methyljasmonát a ty pak teprve ovlivňují transkripci. Také zvýšená tvorba ethylenu se podílí na iniciaci genové exprese (9).

K elicítacím se používají jak biotické elicitory (houby, bakterie, viry, kvasinky), tak abiotické elicitory (UV záření, soli těžkých kovů, kyselina trichloroctová, změny pH). Výhoda abiotických elicitorů spočívá v jejich definované chemické struktuře, v možnosti použití jejich přesné hmotnosti nebo objemu a jejich menší ekonomické náročnosti (14).

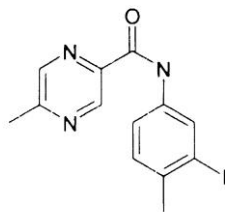
### **3.4. Substituované amidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny**

Pyrazinový kruh je součástí mnoha polycyklických sloučenin mající biologický nebo průmyslový význam. Pyraziny se přirozeně vyskytují ve spoustě jídel, jako například v ohřátém chlebu nebo masu, v pečených bramborách a kávě.

Pyrazinové deriváty jsou používány jako antioxidanty. U těchto sloučenin bylo prokázáno důležité terapeutické užití, například jejich vysoká antimykobakteriální aktivita (25).

Ve své rigorózní práci jsem pro elicitaci kalusových a suspenzních kultur *Silybum marianum* (L.) Gaertn. použila jako abiotický elicitor látku ze skupiny substituovaných amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny:

#### **(3-jod-4-methylfenyl)amid 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny**



Exact Mass =353  
Molecular Formula =C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O

#### **MD 527/II**

Obr. č. 4. Vzorec elicitoru.

Rozpustnost: horká voda, etanol, DMSO

Molekulová hmotnost: 353,16

Substituované amidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny byly v mnoha studiích testovány pro jejich *in vitro* antimykobakteriální, antifungální aktivitu a pro jejich inhibici fotosyntézy a tím pádem také ovlivnění tvorby sekundárních metabolitů (26).

Byl zkoumán efekt dvou nově syntetizovaných sloučenin ze skupiny substituovaných amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny na produkci

flavonolignanů v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Maximální flavonolignanové produkce v suspenzní kultuře *Silybum marianum* sloučeninou 3-methylanilidem 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny v koncentraci  $3,71 \cdot 10^{-7}$  mol/l bylo dosaženo po 72 h elicitaci, zvýšení oproti kontrole bylo 893%. V kalusové kultuře bylo zjištěno zvýšení flavonolignanové produkce oproti kontrole o 1039% a to sloučeninou 5-brom-2-hydroxyfenylamid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny o koncentraci  $2,59 \cdot 10^{-4}$  mol/l po 24 h elicitaci (26).

V další práci byl sledován vliv nově substituovaných sloučenin opět ze skupiny substituovaných amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny na kalusovou kulturu *Ononis arvensis* L. Sloučeniny značně ovlivnily produkci flavonoidů v *in vitro* kultuře. Zvláště po elicitaci sloučeninou 4-hydroxyanilid 6-chlor-5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny o koncentraci  $3,32 \cdot 10^{-7}$  mol/l. Po 48 h elicitaci vzrostl obsah flavonoidů o 976% (27).

Byla také testována herbicidní aktivita a ovlivnění produkce flavonoidů u kultury *Ononis arvensis* L. u vybraných nově syntetizovaných derivátů pyrazin-2-karboxylových kyselin. V práci byly testovány tyto látky:

- 1) 6-chlor-N-(4-chlor-3-methylfenyl)-pyrazin-2-karboxamid o koncentraci  $1,06 \cdot 10^{-3}$  mol/l
- 2) 6-chlor-N-(3-jod-4-methylfenyl)-pyrazin-2-karboxamid o koncentraci  $0,53 \cdot 10^{-3}$  mol/l
- 3) 5-*terc*-butyl-N-(4-chlor-3-methylfenyl)-pyrazin-2-karboxamid o koncentraci  $0,98 \cdot 10^{-3}$  mol/l
- 4) 5-*terc*-butyl-6-chlor-N-(2-fluorfenyl)-pyrazin-2-karboxamid o koncentraci 1,02 mol/l
- 5) 5-*terc*-butyl-6-chlor-N-(4-trifluormethylfenyl)-pyrazin-2-karboxamid o koncentraci 0,84 mol/l

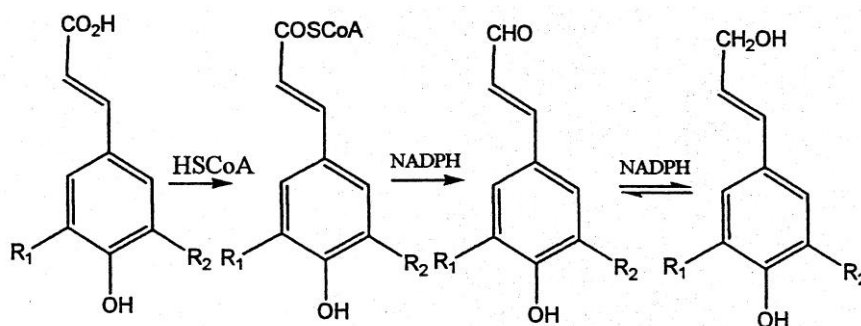
Všechny testované látky ovlivnily produkci flavonoidů u kultury *Ononis arvensis* L. *in vitro*. Nejvyšší nárůst obsahu flavonoidů nastal u kalusové kultury *Ononis arvensis* L. po 12 h elicitaci sloučeninou číslo 2, obsah flavonoidů byl zjištěn 900% oproti kontrole (25).

## 3.5. Flavonolignany

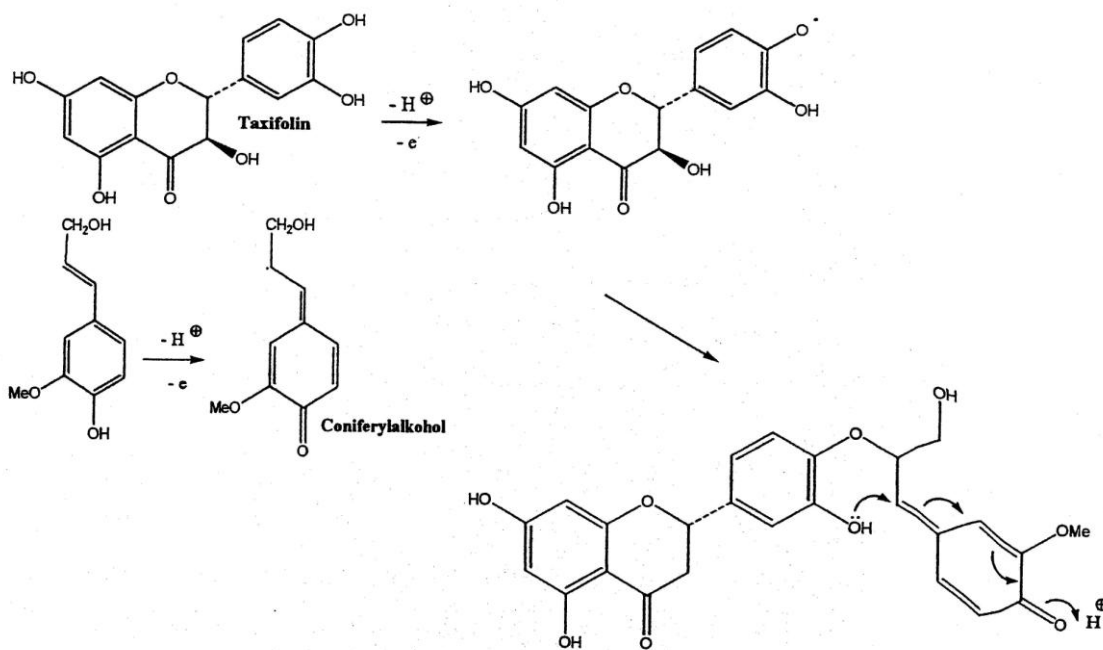
### Flavonolignany

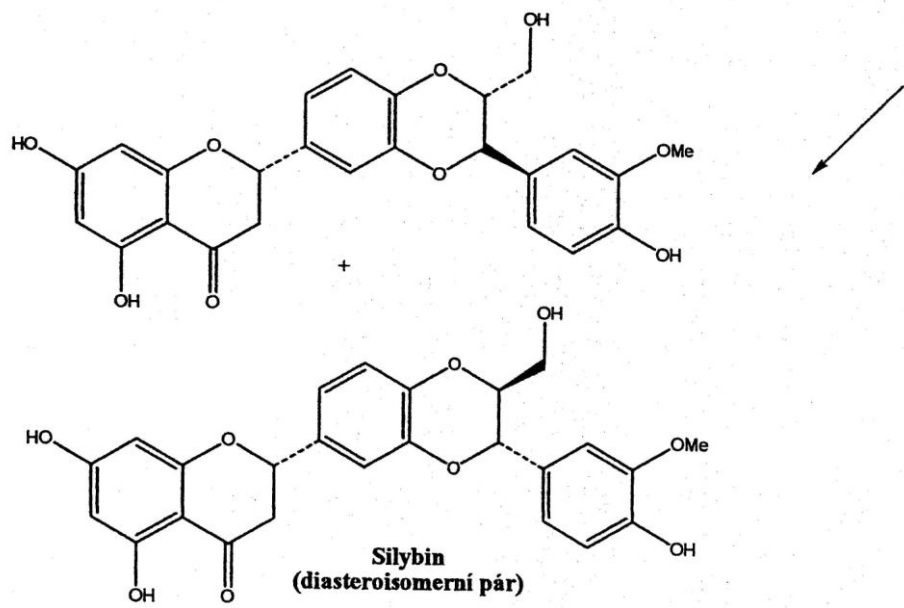
Flavonolignany jsou kombinací struktury flavonoidů a lignanů. Vznikají oxidačními procesy mezi flavonoidy a fenylpropanoidy, obvykle koniferylalkoholu (28).

Obr. č. 5. Vznik fenolických alkoholů redukcí skořicových kyselin (28).



Obr. č. 6. Syntéza silybinu z taxifolinu a koniferylalkoholu (28).





### **3.6. *Silybum marianum* (L.) Gaertn.**

#### **Popis**

*Silybum marianum*, Asteraceae, Asterales

*Silybum marianum* (L.) Gaertn. (ostropestřec mariánský) je statná bodlákovitá rostlina se silnou, větvenou lodyhou a chobotnatě vykrajovanými, ostře zubatými listy, které jsou tuhé, světlé, lesklé a na líci často bíle skvrnité. Velké květní úbory spočívají jednotlivě na konci lodyhy a jejich větví. Lůžko úborů je štětinkaté a odstálé. Zákrovní listy mají dlouhé trny. Květy jsou červenofialové, zřídka bílé. Plody (nažky) mají chmýří složené z chloupků. Kveté od července do září.

Je původem ze Středomoří. U nás se pěstuje v zahradách, někdy roste divoce na návších, rumišťích a kamenitých stráních (16).

#### **Droga**

Drogou je plod – *Cardui mariae fructus*.

Drogu tvoří plody zbavené chmýru. Plod uzavírá velké světlé semeno bez endospermu, jehož tenké osemení je srostlé s oplodím. Droga je bez pachu, oplodí má nahořklou a semena olejovitou chuť.

Droga je vedena v Českém farmaceutickém kodexu pod článkem *Cardui mariae fructus* (plod *Silybum marianum* (L.) Gaertn.). Musí obsahovat nejméně 1,0 % silymarinu, počítaného jako silybin ( $C_{25}H_{22}O_{10}$  – Mr 482,4) (17, 18).

#### **Obsahové látky**

Hlavními obsahovými látkami *Silybum marianum* je skupina flavonolignanů komplexně nazývaná silymarin (1,5-3%). Flavonolignany jsou adiční sloučeniny flavanonolů s koniferylalkoholem. Silymarin se skládá ze tří izomerických sloučenin – silybin, silydianin a silychristin. Izomerický poměr silybinu k isosilybinu, silychristinu a k silydianinu je 3:1:1:1.

Další flavonolignany identifikované v *Silybum marianum* jsou 2,3-dehydrosilybin, 2,3-dehydrosilychristin, dále flavonoidy jako např. taxifolin, apigenin a jeho 7-O-glukosid. Mezi další obsahové látky této drogy patří olej

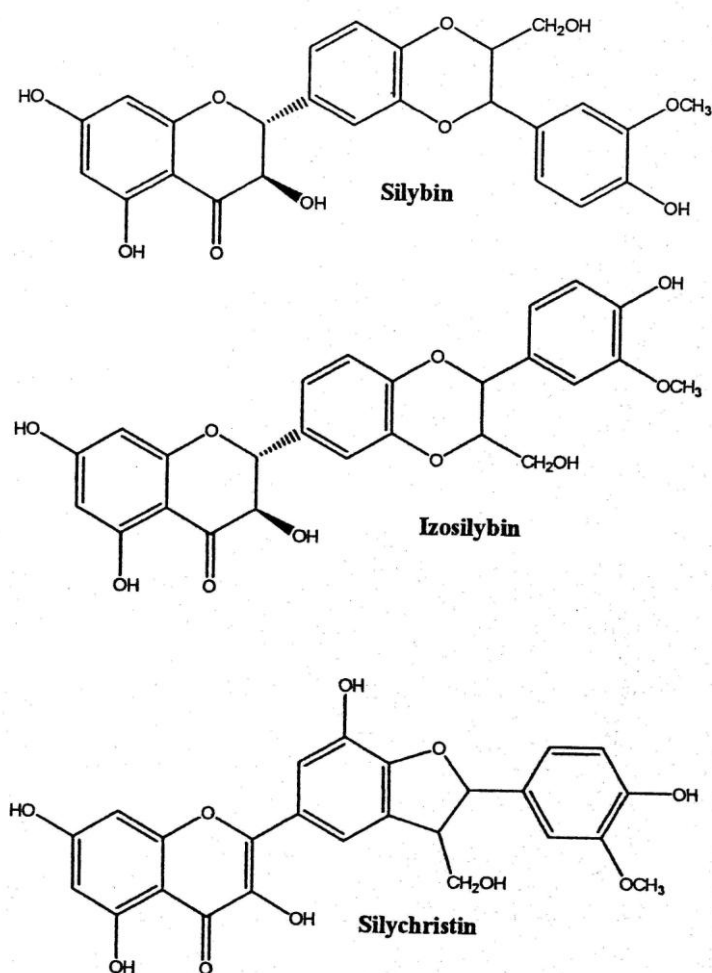


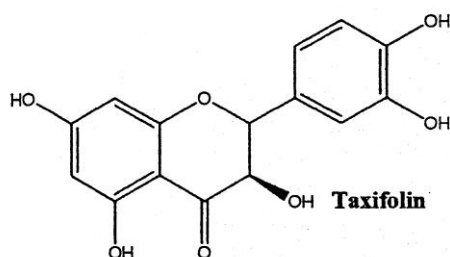
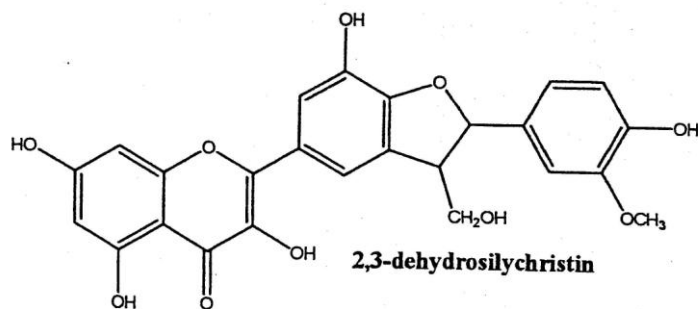
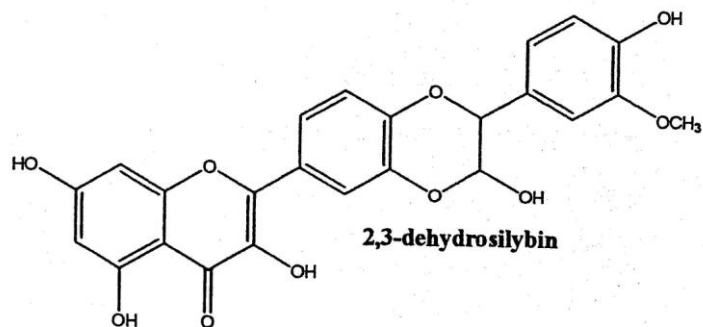
s vysokým podílem nenasycených mastných kyselin, aminokyseliny se značným podílem zástupců obsahujících síru, cukry, hořčiny a silice (18).

Podle ČL 2002 je silymarin směs látek flavonolignanového typu získaná extrakcí plodu ostropestřce mariánského *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Hlavní podíl obsahových látek tvoří silybinin A, silybinin B, isosilybinin A, isosilybinin B, silydianin, silychristin, taxifolin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje nejméně 80% silymarinu vyjádřeného jako silybinin.

Silymarin je hnědožlutý prášek, slabého charakteristického pachu (19).

**Obr. č. 7. Chemická struktura hlavních obsahových látek (19).**





### Použití a farmakologické účinky obsahových látek

Silymarin a jedna z jeho strukturálních komponent silybinin jsou substance s doloženými hepatoprotektivními vlastnostmi (18). Silymarin působí jako antioxidant díky vlivu na snížení produkce volných radikálů a může bránit vazbě různých toxinů na membránové receptory hepatocytů (20).

Jejich mechanismus účinku je nicméně málo jasný. Působí čtyřmi cestami :

- 1) jako antioxidanty, zhášecí a regulátory intracelulárního obsahu glutathionu
- 2) jako stabilizátor buněčné membrány a regulátor permeability, který zabraňuje hepatotoxickému agens vstupovat do hepatocytu
- 3) jako promotor rRNA syntézy, stimuluje jaterní regulaci
- 4) jako inhibitor přeměny hvězdicovitých hepatocytů na myofibroblasty, tj. proces odpovědný za depozici kolagenových vláken, což vede k cirhóze (22).

Používá se jako choleretikum, cholagogum při hepatitidě, při žlučnickových kamenech, při akutních i chronických zánětech jater a cirhózách, při jaterních poškozeních způsobených jak užíváním alkoholu tak psychotropními látkami (fenothiaziny, butyrofenonem). Také byly prokázány účinky antitumorové (16, 18).

Škottová a kol. (21) ve své studii zkoumali účinek silymarinu na antioxidační status a lipoproteinový profil u potkanů krmených experimentálními dietami, které vyvolávají pro-atherogenní změny v lipoproteinovém profilu a oxidační stres. Silymarin podávaný potkanům ve vysokocholesterolové dietě zlepšil antioxidační status v cirkulaci, zabránil vývoji tukových jater a pozitivně modifikoval lipoproteinový profil (snížil VLDL-cholesterol a zvýšil poměr HDL/VLDL-cholesterolu).

Hussain SA a kol. (23) zjišťovali možné anflgistické účinky silymarinu u pacientů s osteoartrózou. Jednak byl pacientům podáván samostatný silymarin, ale také kombinace s piroxikamem a meloxikamem. Bylo zjištěno snížení hladiny interleukinů po podání silymarinu buď samostatně nebo v kombinaci s piroxikamem.

Wilasrusmee Ch. a kol. (24) studovali ve své práci možný imunostimulační účinek *Silybum marianum in vitro*. Bylo zjištěno, že *Silybum marianum* způsobil zvýšení lymfocytů, interferonu gama, interleukinu IL-4 a IL-10, tímto byl zjištěn možný imunostimulační účinek.

*Silybum marianum* je složkou několika hromadně vyráběných léčivých přípravků – Flavobion (70 mg), Simepar (70 mg), Legalon (140 mg) (18). Běžná dávka silymarinu je 200-480 mg za den (20). Sušená droga je součástí čajových směsí. Po perorálním podání silymarinu se nalézají v krvi jen nízké koncentrace jeho hlavní komponenty silybininu, ve žluči se však nalézá asi 20-40% aplikované látky. Jeho renální vylučování je nepatrné, za 24 hodin po aplikaci se objeví v moči jen asi 1 – 7% aplikované látky. Silybinin se vylučuje převážnou měrou žlučí, a to především v konjugované formě. Lze předpokládat, že se silybinin po konjugaci neabsorbuje a dochází tak k enterohepatálnímu oběhu (18).

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1. Přístroje a vybavení**

- Analytické váhy Sartorius PRLT A 1, Německo
- Autokláv P S 20 A, Chirana, ČR
- Autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, Slovensko
- Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko
- Horkovzdušný sterilizátor, Chirana SVS9/1, ČR
- Kolona Li Chrospher RP-18 250-4, sorbent Li Chrospher 5 $\mu$ m
- Mikrofiltry (0,45 $\mu$ m), Tessek, ČR
- Předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5  $\mu$ m
- Pumpa Jasco PU-2089 Plus, Japonsko
- Sušárna HS 61A Chirana, ČR
- Termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko
- Těsnění na vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc, ČR
- Třepačka UNIMAX 2010, Heidolph Instruments, Německo
- Vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc, ČR
- Vodní lázeň, typ 1042, GFL, Německo

### **4.2. Chemikálie a pomocné látky**

- Ajatin, Profarma-Produkt, ČR
- Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, Faf UK HK, ČR
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema, ČR
- Dusičnan amonný p.a., Penta, ČR
- Dusičnan draselný p.a., Lach-Ner, ČR
- Ethanol 96%, Lachema, ČR
- Glycin, Aldrich, USA
- Hydrolyzát kaseinu, Imuna, Slovensko

- Chlorid kobaltnatý p.a., Penta, ČR
- Chlorid vápenatý p.a., Penta, ČR
- Jodid draselný p.a., Lachema, ČR
- Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR
- Kyselina fosforečná, Lachema, ČR
- Kyselina nikotinová, Lachema, ČR
- Methanol HPLC grade, Merk, Německo
- Methanol p.a., Penta, ČR
- Molybdenan sodný, Lachema, ČR
- Myo-inositol, Fluka, Švýcarsko
- Pyridoxin puriss., Koch-Light Laboratories, Velká Británie
- Sacharóza čistá, Lachema, ČR
- Síran hořečnatý p.a., Lachema, ČR
- Síran manganatý p.a., Lachema, ČR
- Síran měďnatý p.a., Lachema, ČR
- Síran zinečnatý, Lachema, ČR
- Síran železnatý, Lachema, ČR
- Thiamin, Koch-Light Laboratories, Velká

### **4.3. Biologický materiál**

K vypracování rigorózní práce jsem použila tkáňovou kulturu odvozenou z kořenové části klíčící rostliny *Silybum marianum* (L.) Gaertn. v 41. – 50. pasáži.

#### **4.4. Složení a příprava živného média**

Ke kultivaci bylo použito živné médium připravené dle Murashigeho a Skooga ve složení (34):

	mg/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,00
KNO <sub>3</sub>	1900,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	170,00
FeSO <sub>4</sub>	27,84
Na <sub>2</sub> EDTA	37,31
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	11,50
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
KI	0,830
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Inozitol	100,00
Hydrolyzát kaseinu	1000,00
Glycin	2,00
Kyselina nikotinová	0,50
Pyridoxin	0,50
Thiamin	0,10
Sacharóza	30000,00

Množství výše uvedených substancí je vyjádřeno v miligramech na litr živné půdy. Substance byly odváženy na analytických vahách, látky používané v malých množstvích se pipetovaly z koncentrovaných zásobních roztoků. Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě v odměrné baňce na 1000,0 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku. Jako stimulant růstu byl použit roztok kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové kyseliny ( $\alpha$ -NAA) v množství 10 mg na litr živného média.

## **4.5. Pasážování a kultivace kultur**

Kalusové kultury byly kultivovány ve 100 ml Erlenmayerových baňkách předem umytých horkou vodou se saponátem, vypláchnutých pitnou a destilovanou vodou a vysušených v horkovzdušném sterilizátoru při 200°C. Živné médium s růstovým regulátorem bylo rozplněno do vysterilizovaných baněk, do každé baňky se odměřilo 30 ml média. Po uzavření hliníkovou folií byly baňky sterilizovány v autoklávu 15 min při 121°C a 100kPa. Takto připravené půdy se mohly použít pro pasážování tkáňových kultur.

Pasážování se provádělo 30-tý den kultivace kultury v boxu s laminárním prouděním vzduchu, který byl předem vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vysvícen germicidní lampou. V prostředí laminárního boxu byla do vysterilizovaných baněk přenesena část kalusu na můstek z filtračního papíru.

Kultivace kultury probíhala po dobu 4-5 týdnů za teploty 25°C a osvětlení s 16-ti hodinovou světelnou periodou.

Suspenzní kultura se získala z kalusové kultury mechanickým rozmělněním kalusu. Byla kultivována ve stejném médiu po dobu dvou týdnů na třepačce (120 ot/min) za stejné teploty a osvětlení jako kalusová kultura.

## **4.6. Příprava roztoků elicitoru**

Jako elicitor byl použit (3-jod-4-methylfenyl)amid 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny, ve třech koncentracích a to: 100 mg/100ml; 10 mg/100ml; 1 mg/100ml.

Navážka čisté substance dané látky (100,00 mg) byla kvantitativně přenesena do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněna 96% ethanolem po rysku. Takto byla připravena koncentrace  $c_1$ .

Odpipetováním 10 ml tohoto roztoku do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněním rozpouštědlem po rysku byla získána koncentrace  $c_2$ .

10 ml z roztoku  $c_2$  bylo přeneseno do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněno rozpouštědlem po rysku, takto byla získána koncentrace  $c_3$ .

Všechna ředění roztoků elicitoru byla prováděna za podmínek aseptické práce v boxu s laminárním prouděním vzduchu předem vysvíceném germicidní UV lampou. K přípravě roztoků bylo používáno sterilní sklo a nástroje.

Koncentrace připravených roztoků elicitoru:

$$c_1 = 100 \text{ mg/100ml ( } 2,83 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l)}$$

$$c_2 = 10 \text{ mg/100ml ( } 2,83 \cdot 10^{-4} \text{ mol)}$$

$$c_3 = 1 \text{ mg/100ml ( } 2,83 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l)}$$



## **4.7. Elicitace *in vitro* kultur**

Elicitace kalusových kultur byla prováděna po 4 – 5 týdnech kultivace kultury a elicítace suspenzních kultur po 2 týdnech od poslední pasáže. Ke vnášení roztoku elicítoru byly použity sterilní pipety, práce probíhala za aseptických podmínek.

K elicítaci bylo použito celkem 35 baněk pro každou koncentraci elicítoru. Do všech baněk byl přidán 1 ml roztoku elicítoru dané koncentrace. Baňky byly rozděleny do šesti skupin, a to podle doby odběru. Kalusy byly odebírány v šesti časových intervalech od aplikace elicítoru po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách.

Stejný postup byl použit za identických podmínek i u suspenzních kultur.

Jako kontrola byla zvolena kalusová a suspenzní kultura pěstovaná bez přídatku elicítoru.

Kalusy se po vyjmutí z baněk sušily na filtračním papíru za laboratorní teploty. Suspenzní kultury byly přefiltrovány přes filtrační papír. Papír se zachycenými shluky byl sušen opět za laboratorní teploty.

Usušené kalusy a buněčné shluky byly pomocí třenky s těrkou upráškovány a použity ke stanovení obsahu flavonolignanů.

Bylo sledováno i vylučování metabolitů do živného média. Vzorke média nebyly odebírány pravidelně. Odebrané médium (25 ml) bylo odpařeno na vakuové odparce a získaný odparek byl rozpuštěn v 10 ml methanolu a analyzován.

## **4.8. Stanovení obsahu flavonolignanů**

### **Princip stanovení:**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie High – Performance Liquid Chromatography (HPLC) je separační metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi (30).

Tato metoda využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi, z nichž mobilní fází je kapalina, která prostupuje stacionární fází naplněnou do kolony. K separaci tedy dochází na základě různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi. Detekce probíhá až za kolonou vhodným detektorem. Základní kvalitativní charakteristikou je retenční čas, což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Kvantitativní charakteristikou je plocha (event. výška) chromatografického píku (31).

### **Parametry HPLC analýzy:**

HPLC analýza byla prováděna na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonovým filtrem kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5  $\mu$ m) s ochranou předklonkou.

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 190 – 450 nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 288 nm.

Objem nástřiku byl 20  $\mu$ l.

Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově, z 0 % methanolu v čase  $t = 0$  do 50 % methanolu v čase  $t = 5$  min. Následovala isokratická eluce 50 % methanolem do času  $t = 25$  min. Mobilní fáze obsahovala jako pufr vždy 0,15 % kyseliny fosforečné.

Průtok byl 1,4 ml/min.

Standard: Silymarin.

**Postup stanovení:**

Usušené vzorky kalusů a suspenzních kultur byly po rozdrobnění v třecí misce dvakrát extrahovány vždy 10 ml methanolu R 80% po dobu 10 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Oba extrakty byly spojeny a doplněny methanolem R 80% na 20 ml.

Poté byly vzorky filtrovány přes mikrofiltr (0,45 $\mu$ m), asi 1,7 ml roztoku bylo převedeno do vialek a vzorky byly analyzovány metodou HPLC.

Vzorky média byly nejprve vysušeny na vakuové odparce. Poté byly rozpuštěny v 10 ml methanolu R 80% a zfiltrány do vialek a analyzovány metodou HPLC.

### Kalibrační křivky:

1. Kalibrační křivka: taxifolin

x: koncentrace (mg/g)

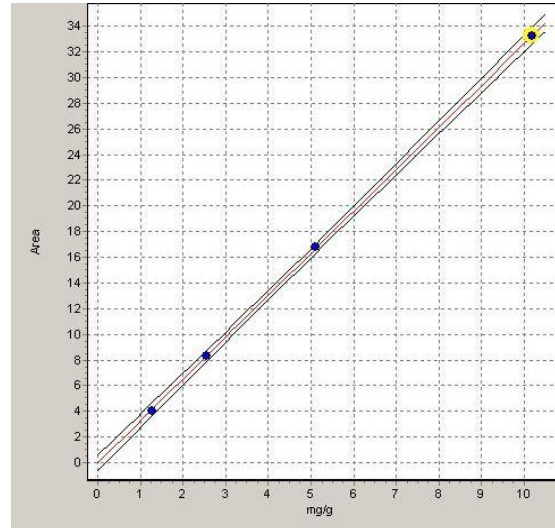
y: plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,26361



2. Kalibrační křivka: silychristin

x: koncentrace (mg/g)

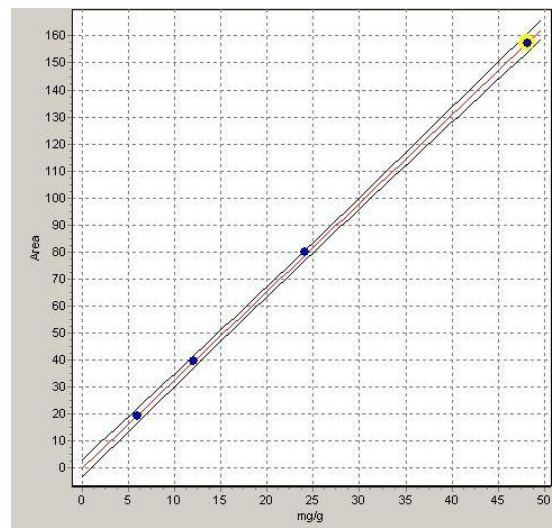
y: plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a: 0

b: 3,26964



### 3. Kalibrační křivka: Silydianin

x: koncentrace (mg/g)

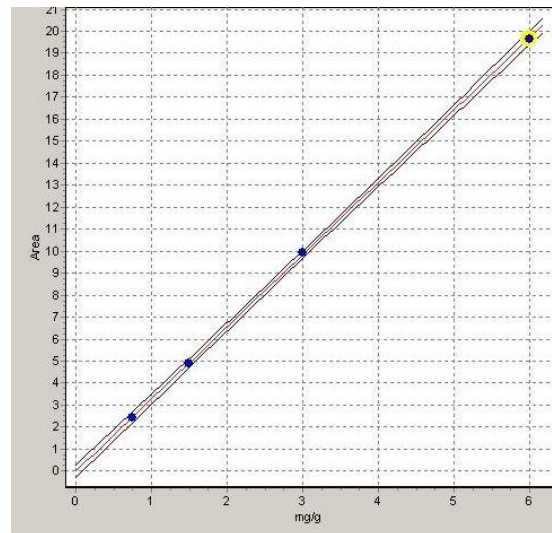
y: plocha

y:  $bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,28186



### 4. Kalibrační křivka: Silybin B

x: koncentrace (mg/g)

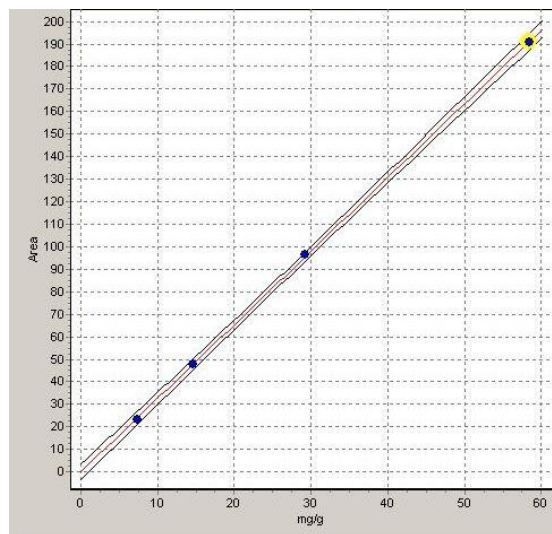
y: plocha

y:  $bx + a$

regresní koeficient: 0,9999

a = 0

b = 3,26957



## **4.9. Statistické zpracování výsledků**

Směrodatná odchylka je veličina, která vyjadřuje, jak se hodnoty liší od průměrné (střední) hodnoty.

Funkce směrodatné odchylky je definovaná vztahem (32):

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

$s$  – směrodatná odchylka

$x$  – hodnota sledované veličiny

$\bar{x}$  – průměrná hodnota sledované veličiny

$n$  – počet členů souboru

Ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah rutinu byl použit t-test rozdílů dvou průměrů.

Pro testovací kritérium platí vztah:

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

$t$  - testovací kritérium

$x_1$  - aritmetický průměr kontrolního souboru

$x_2$  - aritmetický průměr pokusného souboru

$s_1$  - směrodatná odchylka kontrolního souboru

$s_2$  - směrodatná odchylka pokusného souboru

$n_1$  - počet členů kontrolního souboru

$n_2$  - počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení se stupněm volnosti vypočteném podle vzorce:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Vypočtená hodnota testovacího kritéria se porovná s příslušnou kritickou hodnotou **t(v)p** pro vypočtený stupeň volnosti **v** a zvolenou hladinu významnosti **p**. Je-li hodnota **t** větší než hodnota **t(v)p**, je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti **p** (34).

Pro zjištění obsahu rutinu byla provedena vždy 3 paralelní stanovení, proto počet členů souboru je  $n_1 = n_2 = 3$ , počet stupňů volnosti  $v = 4$ . Pro zvolenou hladinu významnosti  $p = 0,05$  a pro 4 stupně volnosti je tato kritická hodnota testovacího kritéria **t(v)p** rovna 2,78. Výsledky jsou statisticky významné je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než kritická hodnota (32,33).

Pro výpočet hodnot testovacího kritéria pro odběry po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hod byla použita kontrolní hodnota odběru po 0 hod u kalusové kultury a u suspenzní kultury byla použita kontrola odebraná po 168 hod.

## 5. VÝSLEDKY

Tabulka č. 3. Obsah flavonolignanů (%) v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. po elicitaci roztokem (3-jod-4-methylfenyl)amidem 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny o různé koncentraci.

Koncentrace elicitoru [ mol/l ]	Hodina odběru	Obsah flavonolignanů [ % ]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C <sub>1</sub>	<b>0k</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	-
	6	0,02	0,001	11,56
	12	0,02	0,001	11,56
	<b>24</b>	<b>0,03</b>	<b>0,001</b>	<b>42,41</b>
	48	0,01	0,002	7,07
	72	0,01	0,002	7,07
	168	0	0	0
C <sub>2</sub>	<b>0k</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	-
	6	0	0	0
	12	0,03	0,003	14,13
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
C <sub>3</sub>	<b>0k</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	-
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0,01	0,002	7,07
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0

Pozn.: k = kontrola

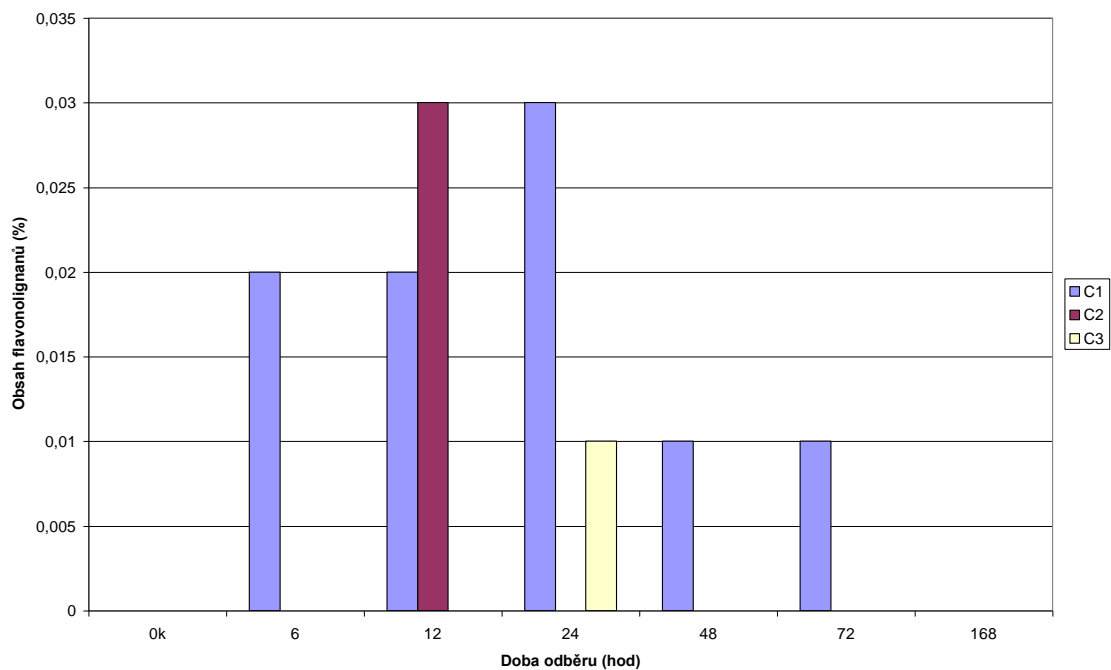


Tabulka č. 4. Obsah flavonolignanů (%) v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. po elicitaci roztokem (3-jod-4-methylfenyl)amidem 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny o různé koncentraci.

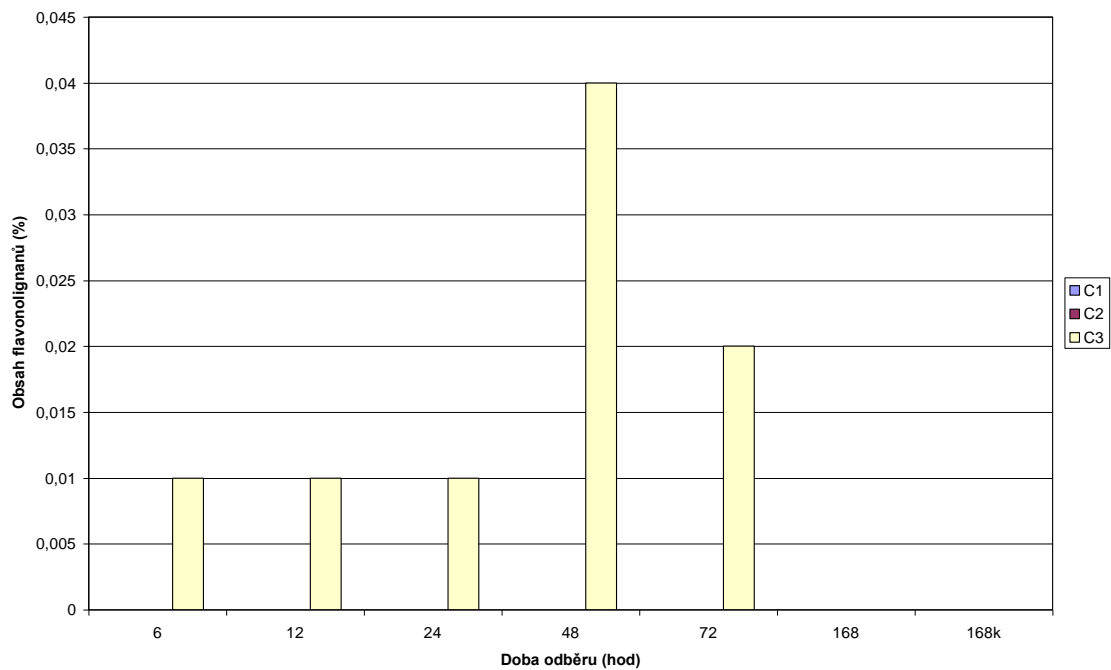
Koncentrace elicitoru [ mol/l ]	Hodina odběru	Obsah flavonolignanů [ % ]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C <sub>1</sub>	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	<b>168k</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	-
C <sub>2</sub>	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	<b>168k</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	-
C <sub>3</sub>	6	0,01	0,002	7,07
	12	0,01	0,003	4,71
	24	0,01	0,002	7,07
	<b>48</b>	<b>0,04</b>	<b>0,001</b>	<b>56,56</b>
	72	0,02	0,001	11,56
	168	0	0	0
	<b>168k</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	-

Pozn.: k = kontrola

**Graf č. 1. Obsah flavonolignanů (%) v závislosti na době odběru v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn.**



**Graf č. 2. Obsah flavonolignanů (%) v závislosti na době odběru v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn.**



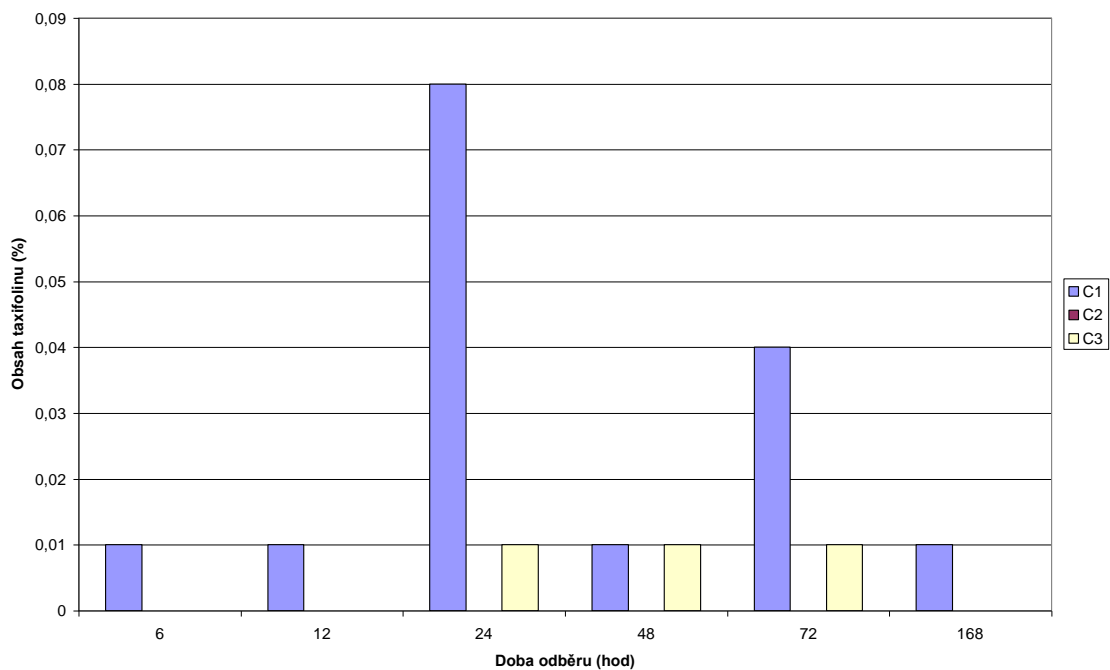
**Tabulka č. 5. Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. při použití různých koncentrací elicitoru.**

Koncentrace elicitoru [ mol/l ]	Hodina odběru	TAX [%]	SILCHR [%]	SILYD [%]	SIL A [%]	SIL B [%]	ISO A [%]	ISO B [%]	Sil. Komplex [%]
C <sub>1</sub>	6	0,01	0,02	0	0	0	0	0	0,02
	12	0,01	0,02	0	0	0	0	0	0,02
	24	0,08	0	0,03	0	0	0	0	0,03
	48	0,01	0	0,01	0	0	0	0	0,01
	72	0,04	0	0,01	0	0	0	0	0,01
	168	0,01	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>2</sub>	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0,03	0	0	0	0	0	0,03
	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub>	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	0,01	0,01	0	0	0	0	0	0,01
	48	0,01	0	0	0	0	0	0	0
	72	0,01	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0	0

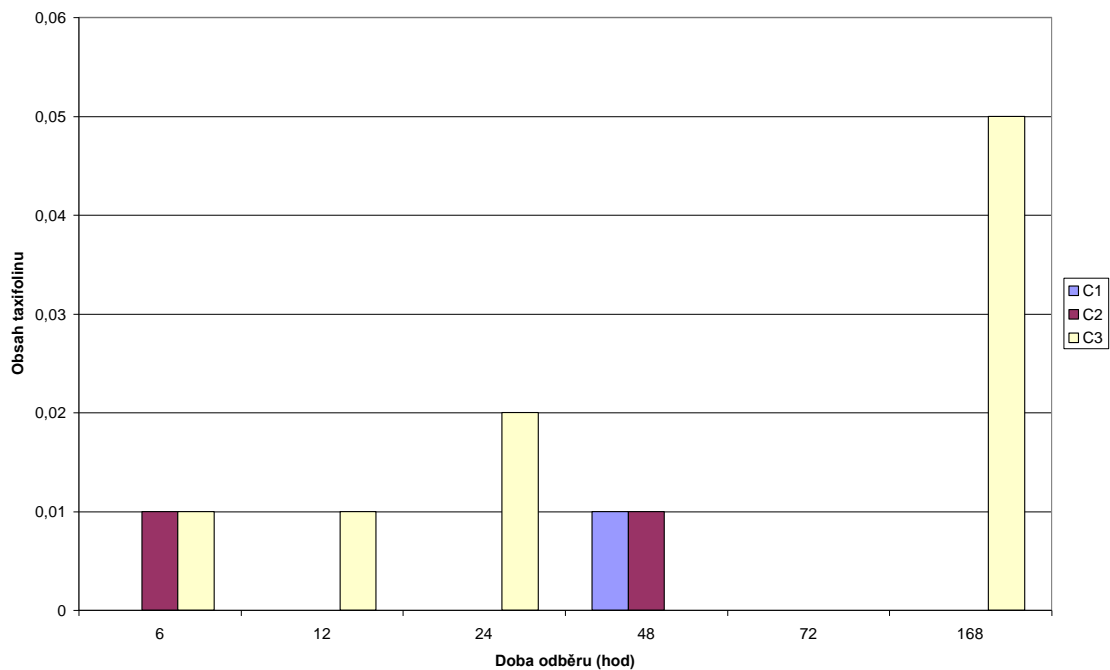
**Tabulka č. 6. Obsah jednotlivých složek silymarinového komplexu a taxifolinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. při použití různých koncentrací elicitoru.**

Koncentrace elicitoru [ mol/l ]	Hodina odběru	TAX [%]	SILCHR [%]	SILYD [%]	SIL A [%]	SIL B [%]	ISO A [%]	ISO B [%]	Sil. Komplex [%]
C <sub>1</sub>	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0,01	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>2</sub>	6	0,01	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0,01	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0
	168	0	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub>	6	0,01	0,01	0	0	0	0	0	0,01
	12	0,01	0,01	0	0	0	0	0	0,01
	24	0,02	0,01	0	0	0	0	0	0,01
	48	0	0,04	0	0	0	0	0	0,04
	72	0	0,02	0	0	0	0	0	0,02
	168	0,05	0	0	0	0	0	0	0

**Graf č. 3. Obsah taxifolinu (%) v závislosti na době odběru v kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn.**



**Graf č. 4. Obsah taxifolinu (%) v závislosti na době odběru v suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn.**



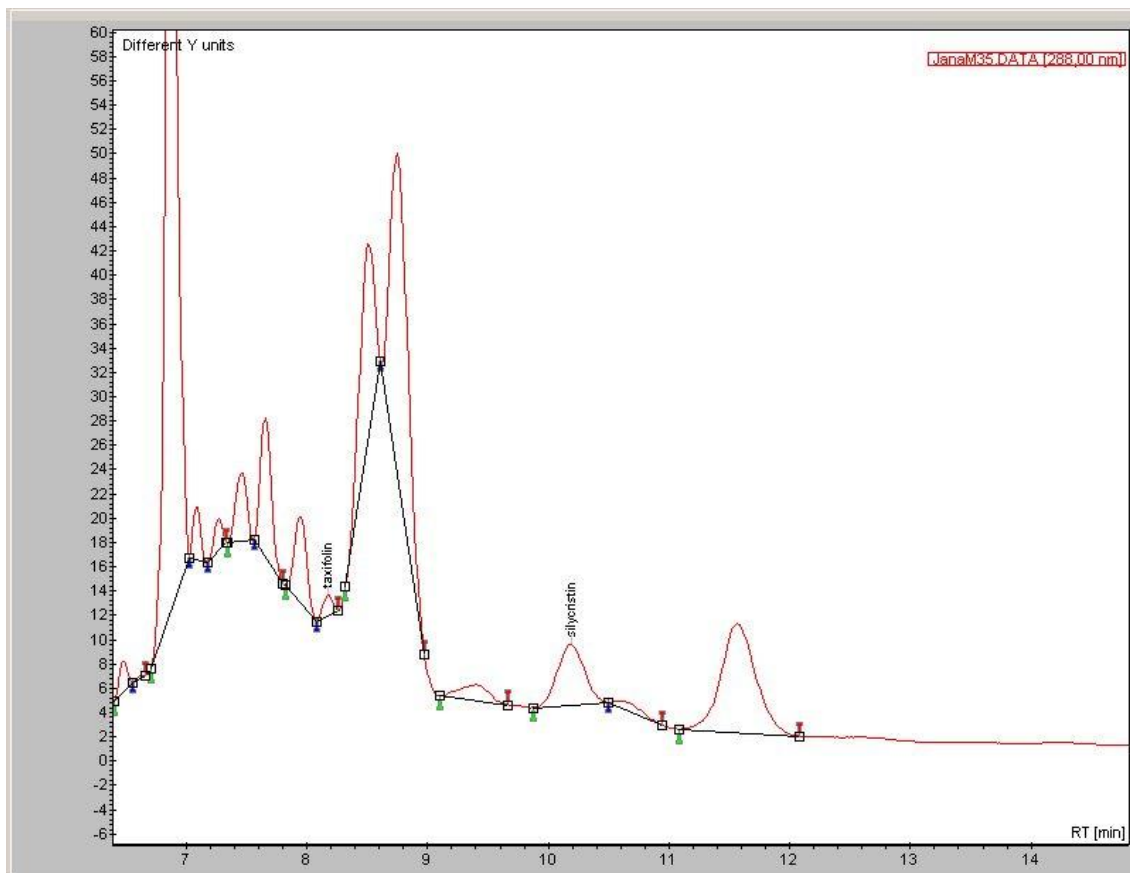
**Tabulka č. 7. Obsah flavonolignanů a taxifolinu v médiu u kalusové kultury *Silybum marianum* (L.) Gaertn. po 24 hod. působení elicitoru o různých koncentracích.**

Koncentrace elicitoru [ mol/l ]	TAX [%]	SILCHR [%]	SILYD [%]	SIL A [%]	SIL B [%]	ISO A [%]	ISO B [%]
C <sub>1</sub>	0,12	0,03	0	0	0,01	0	0
C <sub>2</sub>	0,02	0,06	0,01	0	0	0	0
C <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	0	0

**Tabulka č. 8. Obsah flavonolignanů a taxifolinu v médiu u suspenzní kultury *Silybum marianum* (L.) Gaertn. po 24 hod. působení elicitoru o různých koncentracích.**

Koncentrace elicitoru [ mol/l ]	TAX [%]	SILCHR [%]	SILYD [%]	SIL A [%]	SIL B [%]	ISO A [%]	ISO B [%]
C <sub>1</sub>	0,02	0	0,01	0	0,04	0	0
C <sub>2</sub>	0	0,01	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	0	0

Obr. č. 8. Příklad HPLC chromatogramu kultury *Silybum marianum*



## **6. DISKUZE**

Proces elicitace využívá schopnosti rostlin i rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* reagovat na různé stresové podněty řadou obranných reakcí, které vedou ke zvýšené akumulaci sekundárních metabolitů (35).

Základním předpokladem úspěšné elicitace, která se využívá ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů, je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby působení elicitoru na rostlinnou kulturu *in vitro* (5).

Cílem mé práce bylo stanovit obsah sekundárních metabolitů – flavonolignanů, produkovaných kulturou *Silybum marianum* (L.) Gaertn. , která byla kultivována na médiu podle Murashigeho a Skooga s přidavkem 10 mg/l kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové po působení abiotického elicitoru. Jako elicitor byla použita látka ze skupiny substituovaných amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny - (3-jod-4-methylfenyl)amid 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny. Elicitor jsem dodávala ke kalusové kultuře kultivované na papírových můstcích sycených živným médiem a k suspenzní kultuře kultivované na třepačce, ve třech různých koncentracích:

$$c_1 = 100 \text{ mg}/100\text{ml} \left( 2,83 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} \right)$$

$$c_2 = 10 \text{ mg}/100\text{ml} \left( 2,83 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \right)$$

$$c_3 = 1 \text{ mg}/100\text{ml} \left( 2,83 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l} \right)$$

Vliv elicitoru byl sledován v šesti časových intervalech: 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Pro stanovení obsahu flavonolignanů v kalusové a suspenzní kultuře byla zvolena metoda HPLC.

### **Kalusová kultura**

Ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonolignanů došlo po aplikaci roztoku elicitoru v koncentraci  $c_1$  po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách; v koncentraci  $c_2$  po 12 hodinách; v koncentraci  $c_3$  po 24 hodinách (viz. tab. č. 3, graf č. 1.).



Kalusová kultura bez přídavku elicitoru flavonolignany neprodukovala. Působením elicitoru tedy došlo k ovlivnění a zvýšení tvorby flavonolignanů kalusovou kulturou.

Nejvyšší nárůst obsahu flavonolignanů (0,03 %) nastal po působení roztoku elicitoru o koncentraci  $c_1$  po 24 hodinách, kde produkce flavonolignanů vzrostla 3x oproti hodnotám získaným po aplikaci roztoku elicitoru v koncentraci  $c_1$  po 48 a 72 hodinách; v koncentraci  $c_3$  po 24 hodinách, v těchto koncentracích byl zjištěn obsah flavonolignanů 0,01 %. V koncentraci  $c_2$  po 12 hodinovém působení elicitoru byl zjištěn obsah flavonolignanů 0,03 %, ten však není tolik statisticky významný jako obsah flavonolignanů v koncentraci  $c_1$  po 24 hodinách aplikace elicitoru.

V kalusové kultuře byly detekovány tyto složky silymarinového komplexu: silychristin a silydianin. Nejvyšší obsah silychristinu (0,03 %) byl zjištěn po 12 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $c_2$ . Nejvyšší obsah silydianinu (0,03 %) nastal po aplikaci roztoku elicitoru o koncentraci  $c_1$  po 24 hodinách (viz. tab. č. 5.).

V kalusové kultuře byl také zjištěn obsah flavonoidu taxifolinu, v koncentraci  $c_1$  ve všech časových intervalech; v koncentraci  $c_3$  po 24, 48 a 72 hodinách působení elicitoru. Nejvyšší obsah taxifolinu (0,08 %) byl zjištěn po 24 hodinové aplikaci roztoku elicitoru o koncentraci  $c_1$  (viz. tab. č. 5, graf č. 3.).

### **Suspenní kultura**

Po aplikaci roztoku elicitoru byl obsah flavonolignanů statisticky významně zvýšen u koncentrace  $c_3$  po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách (viz. tab. č. 4, graf č. 2.).

Suspenní kultura bez přídavku elicitoru opět neprodukovala flavonolignany. Působením elicitoru opět došlo k ovlivnění a zvýšení produkce flavonolignanů suspenní kulturou.

Maximální produkci flavonolignanů (0,04 %) způsobil roztok elicitoru o koncentraci  $c_3$  po 48 hodinách, kde produkce flavonolignanů vzrostla 4x oproti hodnotám získaným po aplikaci roztoku elicitoru v dané koncentraci po 6, 12 a 24 hodinách, v těchto koncentracích byl zjištěn obsah flavonolignanů 0,01 %.

V suspenzní kultuře byl detekován pouze silychristin jako složka silymarinového komplexu. Nejvyšší obsah silychristinu (0,04 %) byl zjištěn po 48 hodinové aplikaci roztoku elicitoru o koncentraci  $c_3$  (viz. tab. č. 6.).

V suspenzní kultuře byl také zjištěn obsah flavonoidu taxifolinu, v koncentraci  $c_1$  po 48 hodinách; v koncentraci  $c_2$  po 6 a 48 hodinách; v koncentraci  $c_3$  po 6, 12, 24 a 168 hodinách působení elicitoru. Nejvyšší obsah taxifolinu (0,05 %) byl detekován po 168 hodinové aplikaci roztoku elicitoru o koncentraci  $c_3$  (viz. tab. č. 6, graf č. 4.).

Kalusová ani suspenzní kultura (bez přídavku elicitoru) neprodukovala flavonolignany ani flavonoid taxifolin. Pokud porovnááme produkci flavonolignanů u kalusových a suspenzních kultur po aplikaci roztoku elicitoru, vyšší tvorba flavonolignanů byla zaznamenána u suspenzní kultury. Nejvyšší obsah flavonolignanů (0,04 %) byl tedy naměřen v suspenzní kultuře po aplikaci elicitoru v koncentraci  $c_3$  po 48 hodinách. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena tím, že je buňka kultury v kontaktu s elicitem celým svým povrchem.

Bylo sledováno i vylučování flavonolignanů a flavonoidu taxifolinu do živného média. Vzorky média kalusových i suspenzních kultur byly odebrány vždy po 24 hodinovém působení roztoku elicitoru ve všech koncentracích. V médiu kalusových a suspenzních kultur byly detekovány taxifolin, silychristin, silydianin a silybin B. Nejvyšší obsah v médiu kalusové kultury byl zjištěn u taxifolinu (0,12 %) po aplikaci elicitoru o koncentraci  $c_1$  (viz. tab. č. 7.). V médiu suspenzní kultury byl zjištěn nejvyšší obsah silybinu B (0,04 %) po aplikaci elicitoru o koncentraci  $c_1$  (viz. tab. č. 8.)

Důvodů nízké produkce flavonolignanů v kultuře *Silybum marianum* může být několik.

Jedním z nich mohlo být stáří kultury. V této práci byly použity kalusové a suspenzní kultury v 41. – 50. pasáži. Stáří kultury mohlo být důvodem nulové produkce flavonolignanů v kalusové a suspenzní kultuře pěstované bez přídavku elicitoru.

Dalším důvodem mohl být nevhodně zvolený elicitor. Předpokladem úspěšné elicítace je použití vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doba působení (5).

Substituované amidy pyrazin-2-karboxylových kyselin byly již použity v řadě prací za účelem ovlivnění produkce sekundárních metabolitů.

Byl zkoumán efekt dvou nově syntetizovaných sloučenin ze skupiny substituovaných amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny na produkci flavonolignanů v kalusové a suspenzní kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Maximální flavonolignanové produkce v suspenzní kultuře *Silybum marianum* sloučeninou 3-methylanilid 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny v koncentraci  $3,71 \cdot 10^{-7}$  mol/l bylo dosaženo po 72 h elicitaci, zvýšení oproti kontrole bylo 893%. V kalusové kultuře bylo zjištěno zvýšení flavonolignanové produkce oproti kontrole o 1039% a to sloučeninou 5-brom-2-hydroxyfenylamid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny o koncentraci  $2,59 \cdot 10^{-4}$  mol/l po 24 h elicitaci (26).

V další práci byl sledován vliv nově substituovaných sloučenin opět ze skupiny substituovaných amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny na kalusovou kulturu *Ononis arvensis* L. Sloučeniny značně ovlivnily produkci flavonoidů v *in vitro* kultuře. Zvláště po elicitaci sloučeninou 4-hydroxyanilidem 6-chlor-5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny o koncentraci  $3,32 \cdot 10^{-7}$  mol/l. Po 48 h elicitaci vzrostl obsah flavonoidů o 976% (27).

Při sledování ovlivnění produkce flavonolignanů u kultury *Silybum marianum* byly použity různé elicitory.

V jedné studii bylo sledováno ovlivnění tvorby flavonolignanů u suspenzní kultury *Silybum marianum* po přidání koniferylalkoholu, prekurzoru flavonolignanové syntézy. Byl detekován silydianin v kontrolních vzorcích i v živném médiu. K žádnému dalšímu výraznému ovlivnění tvorby flavonolignanů nedošlo (36).

V další studii byla sledována produkce silymarinu použitím methyljasmonátu jako elicitoru. Největší produkce silymarinu bylo dosaženo použitím methyljasmonátu o koncentraci 100  $\mu$ M, kdy produkce se zvedla oproti kontrole o 600 % (37).

Bylo také sledováno ovlivnění produkce silymarinu v suspenzní kultuře *Silybum marianum* použitím kyseliny jasmonové a pikloramu. Aplikací 3 mg/l pikloramu a 2 mg/l kyseliny jasmonové došlo k výraznému zvýšení produkce silymarinu. Práce ukazuje na to, že je možno tyto dvě látky použít k ovlivnění produkce flavonolignanů (38).

## 7. ZÁVĚR

Výsledky práce lze shrnout následovně:

- V kalusové kultuře *Silybum marianum* po elicitaci (3-jod-4-methylfenyl)amidem 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny byly detekovány tyto flavonolignany a flavonoidy: silychristin, silydianin a taxifolin.
- V suspenzní kultuře *Silybum marianum* po elicitaci (3-jod-4-methylfenyl)amidem 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny byly detekovány tyto flavonolignany a flavonoidy: silychristin a taxifolin.
- Maximální produkce taxifolinu v kalusové kultuře nastala po 24 hodinovém působení elicitoru o koncentraci  $c_1 = 2,83 \cdot 10^{-3}$  mol/l (obsah taxifolinu 0,08 %).  
Maximální produkce silychristinu v kalusové kultuře byla zjištěna po 12 hodinovém působení elicitoru o koncentraci  $c_2 = 2,83 \cdot 10^{-4}$  mol/l (obsah silychristinu 0,03 %).  
Maximální produkce silydianinu v kalusové kultuře byla pozorována po 24 hodinovém působení elicitoru o koncentraci  $c_1 = 2,83 \cdot 10^{-3}$  mol/l (obsah silydianinu 0,03 %).  
U kontroly kalusové kultury (bez elicitace) nebyl zjištěn žádný obsah flavonolignanů a flavonoidů.
- Maximální produkce taxifolinu v suspenzní kultuře byla zjištěna po 168 hodinovém působení elicitoru o koncentraci  $c_3 = 2,83 \cdot 10^{-5}$  mol/l (obsah taxifolinu 0,05 %).  
Maximální produkce silychristinu v suspenzní kultuře byla pozorována po 48 hodinovém působení elicitoru o koncentraci  $c_3 = 2,83 \cdot 10^{-5}$  mol/l (obsah silychristinu 0,04 %).  
U kontroly suspenzní kultury nebyly detekovány flavonolignany a flavonoidy.
- Maximální zvýšení produkce silymarinového komplexu (0,03 %) nastalo v kalusové kultuře po 24 hodinovém působení elicitoru o koncentraci  $c_1 = 2,83 \cdot 10^{-3}$  mol/l

- Maximální zvýšení produkce silymarinového komplexu (0,04 %) v suspenzní kultuře bylo zjištěno po 48 hodinovém působení elicitoru o koncentraci  $c_3 = 2,83 \cdot 10^{-5}$  mol/l.
- Nejvyšší obsah flavonolignanů byl tedy naměřen v suspenzní kultuře po aplikaci elicitoru v koncentraci  $c_3$  po 48 hodinách.
- V živném médiu kalusové a suspenzní kultury byl detekován taxifolin, silychristin, silydianin a silybin B.

## **8. SEZNAM LITERATURY**

- 1) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum Praha 2.vydání, 75-81 (2001)
- 2) Vodrážka Z.: Biotechnologie, Academia Praha, 63,69 (1992)
- 3) Kašparová M., Siatka T.: Vliv kyseliny salicylové na produkci anthracenových derivátů v kultuře *Rheum palmatum* L. *in vitro*, Česká a slovenská farmacie, 51 (4), 177-181 (2002)
- 4) Siatka T., Kašparová M.: Vliv sloučenin vanadu na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L., 56, 230-234 (2007)
- 5) Kašparová M., Dušek J.: Vliv biotické elicitace na produkci anthraglykosidů tkáňovou kulturou *Rheum palmatum* L., Česká a slovenská farmacie, 48 (3), 132-135 (1999)
- 6) Kováč J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství Univerzity Palackého Olomouc, 1-56 (1995)
- 7) Kincl M., Krpeš V.: Základy fyziologie rostlin, Ostravská Univerzita Ostrava, Montanex, 90, 138-149 (2000)
- 8) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty 1.vydání, Karolinum Praha, 84-86 (1994)
- 9) Procházka S., Macháčková I., Krekule J.: Fyziologie rostlin, Academia Praha, 265-279, 328-329, 412-431 (1998)
- 10) Jedinák A., Faragó J., Pšenáková I., Maliar T.: Biologia, Bratislava 59 (6), 698 (2004)
- 11) Jahodář L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Karolinum Praha, 35-40 (2000)
- 12) Martin J., Dušek J.: Nárůst obsahu flavonoidů v *in vitro* kulturách *Scutellaria baicalensis* Georgii po přidání skořičnanu sodného, Česká a slovenská farmacie, 56, 280-283 (2007)
- 13) Kašparová M., Siatka T.: Abiotická elicitace explantátové kultury *Rheum palmatum* L. těžkými kovy, Česká a slovenská farmacie, 53, 252-255 (2004)

- 14) Tůmová L., Rusková R.: Vliv  $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CuSO}_4$  na produkci flavonoidů kulturou *Ononis arvensis* L. *in vitro*, Česká a slovenská farmacie, 47 (6), 261-263 (1998)
- 15) Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Jadardhan Reddy K.: Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, Springer, 157-186 (2006)
- 16) Korbelař E.: Naše rostliny v lékařství, Avicenum Praha, 306 (1985)
- 17) Kolektiv autorů: Český farmaceutický kodex (1994)
- 18) Tůmová L., Gallová K.: Terapeutické účinky *Silybum marianum*, Praktické lékařství, 4, 185-186 (2006)
- 19) Kolektiv autorů: Český lékopis 2002, Grada Praha (2002)
- 20) Brůha R.: Hepatoprotektiva, Klinická farmakologie a farmacie, 3, 154-156 (2006)
- 21) Škottová N., a kol.: Účinky fenolických rostlinných extraktů u dietně vyvolaného oxidačního stresu a poruch lipoproteinového profilu, Sborník přednášek, Univerzita Palackého Olomouc, 98-99 (2003)
- 22) Fraschini F., Departini G., Esposti D.: Pharmacology of silymarin, Clinical Drug Investigation, 22(1), 51-65 (2002)
- 23) Hussain SA, et al.: Anti-inflammatory activity of silymarin in patients with knee osteoarthritis. A comparative study with piroxicam and meloxicam, Saudi Medical Journal, 30(1), 98-103 (2009)
- 24) Wilasrusmee Ch., et al.: Immunostimulatory effect of *Silybum marianum* extract, Medical Science Monitor, 8(11), 439-443 (2002)
- 25) Doležal M., et al.: Substituted N-phenylpyrazine-2-carboxamides, their synthesis and evaluation as herbicides and abiotic elicitor, Molecules, 12, 2589-2598 (2007)
- 26) Tůmová L., et al.: The effect of substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids on flavonolignan production in *Silybum marianum* culture *in vitro*, Acta physiologiae plantarum, 27, 357-362 (2005)
- 27) Tůmová L., Ostrožlík P.: *Ononis arvensis in vitro* – abiotic elicitation, Česká a slovenská farmacie, 53(3), 135-140 (2004)
- 28) Dewick P.M.: Medicinal natural products, 120-140, Chichester:Wiley (1999)

- 29) Hubík J., Dušek J., Spilková J.: *Obecná farmakognosie I*, SPN Praha, 14 (1989)
- 30) Kolektiv autorů: *Český lékopis 2005, svazek 1.,3.*, Grada Praha (2005)
- 31) Klimeš J.: *Kontrola léčiv I.*, Karolinum Praha, 22-40 (2002)
- 32) Klemra P., Klemrová V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*, Karolinum Praha, 23, 27 (1997)
- 33) Reisenauer R.: *Metody matematické statistiky*, SNTL Praha, 78-81 (1970)
- 34) Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Journal of Plant Physiology*, 15, 473 (1962)
- 35) Kašparová M., Siatka T., Dušek J.: Vliv kyseliny jasmínové na produkci anthracenových derivátů kultuře *Rheum palmatum L. in vitro*, *Česká a slovenská farmacie*, 52 (3), 148-151 (2003)
- 36) Tůmová L., Řimáková J., Tůma J., Dušek J.: *Silybum marianum in vitro* – flavonolignan production, *Plant soil environment*, 52 (10), 454-458 (2006)
- 37) Sánchez-Sampedro M.A., Fernández-Tárrago J., Corchete P.: Trast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn., *Journal of biotechnology*, 119 (1), 60-69 (2005)
- 38) Hasanloo T., et al.: Flavonolignan production in cell suspension culture of *Silybum marianum*, *Pharmaceutical Biology*, 46 (12), 876-882 (2008)



## **9. ABSTRAKT**

### **Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů u kultury *Silybum marianum in vitro***

Elicítace je metoda využívající obranných mechanismů rostlin ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinách i kulturách *in vitro*. V této práci byl sledován vliv 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hod působení tří koncentrací abiotického elicitoru (3-jod-4-methylfenyl)amidu 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny na produkci flavonolignanů kalusovou a suspenzní kulturou *Silybum marianum*. Kultura byla kultivována na médiu podle Murashigeho a Skooga s přídavkem 10 mg/l kyseliny  $\alpha$ -naftyloctové ( $\alpha$ -NAA). Pro stanovení obsahu flavonolignanů v kalusové i suspenzní kultuře byla zvolena metoda HPLC. Maximální obsah flavonolignanů (0,03 %) v kalusové kultuře byl prokázán po 24 hod působení elicitoru o koncentraci  $c_1 = 2,83 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Maximální obsah flavonolignanů (0,04 %) v suspenzní kultuře byl zjištěn po 48 hodinovém působení elicitoru o koncentraci  $c_3 = 2,83 \cdot 10^{-5}$  mol/l.

### **Possibilities of affecting of secondary metabolites production in culture *Silybum marianum in vitro***

Elicitation is the method making use defensive mechanism of plants to increasing production of secondary metabolites in plants and cultures *in vitro*. The effect of 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours influence by three concentrations of the abiotic elicitor (3-jodo-4-methylfenyl)amide 5-methylpyrazine-2-karboxylic acid on the flavonolignans production in *Silybum marianum* callus and suspension culture was monitored in this study. The *in vitro* culture was cultivated on Murashige-Skoog medium with the addition of 10 mg/l of  $\alpha$ -naphthylacetic acid as a growth regulator. The content of flavonolignans was determined by HPLC. The maximum content of flavonolignans (0,03 %) in callus culture was demonstrated after 24 hours of elicitation ( $c_1 = 2,83 \cdot 10^{-3}$  mol/l). The maximum content of flavonolignans (0,04 %) in suspension culture was demonstrated after 48 hours of elicitation ( $c_3 = 2,83 \cdot 10^{-5}$  mol/l).