

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakognozie

Mgr. Dagmar Polívková

ABIOTICKÁ ELICITACE KULTURY
ONONIS ARVENSIS L. IN VITRO

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Datum zadání:	5.2.2005
Vedoucí katedry :	Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.
Vedoucí rigorózní práce:	Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.
Termín odevzdání:	5. 1. 2006
Počet stran:	50
Oponent rigorózní práce:	PharmDr. Marie Kaizerová, Ph.D.

180 Katedra
farmakognozie
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci na téma „Abiotická elicitace kultury *Ononis arvensis* L. in vitro“ vypracovala samostatně a s použitím pramenů uvedených v rigorózní práci.

Polláková Dagmar

100
Katedra
farmakognozie
Farmaceutická fakulta
Hradci Králové

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Zároveň děkuji také ostatním pracovníkům katedry farmakognozie za vytvoření podmínek pro experimentální část práce.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Cíl práce	2
3. Teoretická část	3
3.1. Explantátové kultury rostlin.....	3
3.1.1. Kategorie rostlinných explantátů.....	4
3.1.2. Kultivace explantátových kultur.....	4
3.1.3. Využití explantátových kultur.....	5
3.1.4. Výhody explantátových kultur.....	5
3.1.5. Micropropagace.....	6
3.1.6. Kultivační média pro explantátové kultury.....	9
3.2. Fyziologie stresu.....	13
3.2.1. Stres u rostlin – obecně.....	13
3.2.2. Biotické stresy.....	15
3.2.3. Příklady biotických stresových faktorů.....	16
3.2.4. Společné mechanismy stresových reakcí.....	20
3.2.5. Elicitace a elicitory.....	21
3.3. Stříbro a dusičnan stříbrný.....	26
3.4. Flavonoidní glykosidy.....	27
3.5. <i>Ononis arvensis</i> L.....	30
4. Experimentální část	32
4.1. Přístroje.....	32
4.2. Chemikálie.....	32
4.3. Biologický materiál.....	32
4.4. Příprava živného roztoku.....	33
4.5. Kultivace kultur.....	34
4.6. Příprava roztoků elicitoru.....	35
4.7. Elicitace in vitro kultur.....	36
4.8. Stanovení obsahu flavonoidů.....	37
4.9. Stanovení ztráty sušením.....	38
4.10. Statistické zpracování výsledků.....	39
5. Výsledky	40
6. Diskuse	45
7. Závěr	48
8. Seznam literatury	49

1. ÚVOD

V posledních letech stále narůstá význam léčivých rostlin, neboť látky rostlinného původu jsou více žádanější surovinou ve farmaceutickém průmyslu pro výrobu nejen potravinových doplňků, ale i celé řady hromadně vyráběných léčivých přípravků.

Stále více se projevují obtíže při zajišťování přírodních surovin, protože jejich ceny vzrůstají a současně stoupají nároky farmaceutického průmyslu. Sběr planě rostoucích léčivých rostlin i jejich polní pěstování je sezónní záležitost, jejíž výtěžek závisí na mnoha činitelích a nelze jej příliš dále zvyšovat.(1)

Rychlý rozvoj rostlinné biotechnologie nabízí výhodnější metody získávání požadovaných látek. Jedná se o využití explantátových kultur.

V posledním desetiletí se explantátové kultury staly nepostradatelnou součástí celé řady biologických oborů zabývajících se studiem rostlin. Explantátové kultury rostlin se využívají k biochemickým, fyziologickým, morfologickým a genetickým studiím.(2)

Rostliny mají schopnost z živin syntetizovat kromě nepostradatelných složek svého těla i přepestrou paletu nejrozmanitějších látek, jež jsou pravděpodobně pro vlastní růst rostliny postradatelné.

Hlavním problémem získávání žádaných látek z intaktních rostlin je to, že velká část druhů takto významných rostlin v současné době přichází o své životní prostředí a s jejich úbytkem a obtížností při pěstování roste i jejich cena. Další nevýhodou je velká závislost obsahu žádaných látek na klimatických podmínkách, na postupu sušení a skladování rostlin. Chemické syntézy jsou často obtížné a drahé a u složitějších látek zatím neuskutečnitelné. Konečný produkt chemických syntéz je také obvykle směsí izomerů, zatímco buňka produkuje jediný stereoizomer.(2)

Produkce sekundárních metabolitů v tkáňových kulturách může být podpořena použitím různých specifických činitelů- elicitorů. Společným znakem pro rostliny je jejich obranná reakce, která je vyvolána elicitem. S obrannou reakcí souvisí ovlivnění produkce sekundárních metabolitů rostlin.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo seznámit se s metodikou kultivace kultur in vitro a sledovat v různých časových intervalech a koncentracích vliv dusičnanu stříbrného na produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. Stanovení flavonoidů bylo provedeno fotometricky.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. EXPLANTÁTOVÉ KULTURY ROSTLIN

Explantátové kultury rostlin znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek.

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.

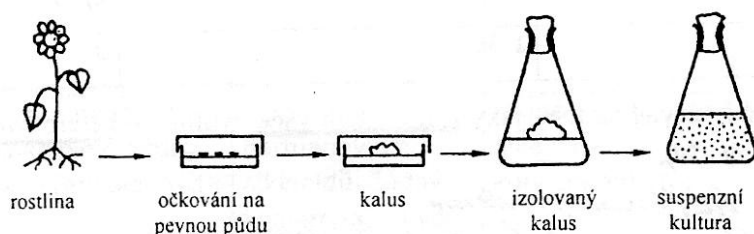
Možnost vegetativního množení rostlin však ukazuje, že rostlinné buňky touto diferenciací nijak nedegenerují, ale že jsou schopny dediferenciace a opětovného dělení. Buňky diferencovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristemických. Proces diferenciace je totiž založen na tzv. diferenciální 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 meristemická buňka, ale i kterákoli jiná rostlinná buňka. 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. Ve svém principu zahrnují explantátové kultury izolaci buněk, pletiv a orgánů a jejich kultivaci ve sterilních podmínkách řízeného prostředí (definovaná kultivační média, teplota, vlhkost, kvalita a kvantita světla).(2)

Prvým úkolem je získat stabilní vysokoprodukční explantátové kultury sestávající z jednotlivých buněk nebo jejich několikačetných agregátů. Explantátová kultura se získá z kterékoli části rostliny, nadzemní nebo podzemní, explantací parenchymatické tkáně, jejím přenesením na tuhou 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.(1)

Obrázek č.1 (1): Odvození explantátové kultury z rostliny



3.1.1. KATEGORIE ROSTLINNÝCH EXPLANTÁTŮ (1)

Podle morfologické charakteristiky se rozlišují:

- a) **Kultury orgánové** - orgánové systémy, orgány, resp. jejich základy či části, pěstované v podmínkách in vitro způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a v celku zachovává jejich stavbu a funkci.
- b) **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.
- c) **Kultury suspenzní** - volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendované v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.
- d) **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.
- e) **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, neboť při kultivacích ve větších objemech se rostlinné buňky liší od mikrobiálních buněk zejména vysokou zdánlivou viskozitou buněčných suspenzí spojenou s citlivostí ke střížným silám v důsledku značného buněčného objemu. 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 recipročním třepacím stroji.

3.1.3. VYUŽITÍ EXPLANTÁTOVÝCH KULTUR(1)

Explantátové rostlinné kultury se uplatní zejména jako:

- a) Alternativní příprava produktů získávaných dosud z rostlin v polní kultuře. Předností je možnost vést proces za řízených podmínek bez závislosti na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech. Výsledné produkty jsou po kvalitativní stránce homogenní, prosté kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultur.
- b) Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách.
- c) Získávání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk. Z explantátových kultur byly izolovány látky, které nebyly zjištěny v mateřských rostlinách, z nichž byly kultury odvozeny.
- d) Produkty biotransformací, kdy z poměrně levných a dostupných substrátů lze získat farmaceuticky významné látky, protože příslušné enzymy se u mikroorganismů nevyskytují.

3.1.4. VÝHODY EXPLANTÁTOVÝCH KULTUR (2)

K tradičním způsobům vegetativního množení rostlin se v posledních desetiletích řadí metoda tkáňových kultur- tzv. mikropropagace. Mikropropagace má oproti běžněji používaným postupům makropropagace rostlin řadu výhod:

- Kultura se odvozuje z velmi malých částí rostlin (explantátů), na nichž regenerují malé rostliny. Tato metoda vyžaduje tedy málo prostoru k produkci velkého počtu rostlin.
- Rozmnožování se provádí ve sterilních podmínkách. Jakmile je tedy kultura in vitro odvozena, nedochází zde při množení k úhynu rostlin v důsledku onemocnění a odvozené rostliny jsou prosté bakteriálních a houbových nákaz.
- Metoda je aplikovatelná na produkci bezvirózních rostlin. Je-li k založení kultury použit bezvirózní materiál, budou i regenerované rostliny bezvirózní. V kultuře in vitro je také možné úpravou kultivačních podmínek virové částice přítomné v explantátu eliminovat. Produkce viruprostých rostlin a rostlin prostých jiných patogenů usnadňuje mezinárodní výměnu rostlin vzhledem k sanitárním opatřením jednotlivých států.
- Podmínky množení jsou přesně definovány a jednotlivé faktory ovlivňující rozmnožování je možné za účelem zvýšení koeficientu množení přesně regulovat. Rychlost mikropropagace je proto mnohem vyšší, než u tradičních metod.

- Je možné produkovat některé klony či některé druhy rostlin, které se tradičními metodami vegetativního množení množí velmi pomalu nebo vůbec. Cena rostlin produkovaných mikropropagací může být potom srovnatelná (nebo i nižší) s cenou rostlin množených tradičními způsoby.
- V porovnání s klasickými metodami klonového množení je možné klonování in vitro provádět celoročně, bez ohledu na meteorologické podmínky.
- Vzhledem k malé velikosti výchozího rostlinného materiálu nejsou kladeny velké nároky na skleníkové plochy pro uchovávání matečných rostlin.
- Rostliny in vitro v období mezi pasážemi nevyžadují prakticky žádnou péči jako např. zálivku, pletí, chemické ošetření, atd.
- In vitro kultury je možné uchovávat dlouhou dobu při nízké teplotě na minimálních médiích v prostředí prostém patogenů, což je možné využívat k uchovávání výchozího matečného materiálu bez velkých nároků na prostor a pracnost. Kultivace při nízké teplotě umožňuje také rovnoměrně načasovat celý produkční systém na jednotlivá období roku.

Mezi hlavní **nevýhody** mikropropagace patří především relativně drahé laboratorní vybavení a poměrně vysoká pracnost metody, která zatím neumožňuje využití mechanizace v průběhu jednotlivých fází kultivace. Další nevýhodou je poměrně drahý provoz laboratoře explantátových kultur (energie, chemikálie, atd.).

3.1.5. MIKROPROPAGACE(2)

Vývoj rostlin v podmínkách in vitro je možné rozdělit do čtyř základních stádií nebo fází. V prvním stádiu jde o odvození sterilní kultury - primokultury, které spočívá v odebrání vhodného explantátu a jeho sterilizaci a kultivaci v živném médiu. Materiál odvozený v primokultuře je potom využíván ve druhém stádiu, které se označuje jako stádium multiplikační či proliferační. Cílem druhého stádía je dosáhnout vysokého koeficientu množení a získat co největší počet rostlin, resp. nových explantátů. Toto stádium může být opakováno pasážováním na téže proliferační médium nebo může následovat třetí stádium, které je většinou spojeno se zakořeňováním. Poslední čtvrté stádium představuje stádium převodu rostlin z kultury in vitro do podmínek in vivo a je spojeno někdy se zakořeňováním in vivo.

Tato stádia jsou charakteristická určitým vývojem kultury in vitro, který je ovlivněn změnou kultivačních podmínek v těchto jednotlivých stádiích. K těmto stádiím je někdy zařazováno stádium 0, které představuje fázi, kdy je určitým způsobem připravován matečný materiál (rostlina) k odběru explantátu.

1) Stádium 0 - výběr matečné rostliny a její příprava pro odběr explantátu

Při odběru výchozího materiálu pro odvození explantátové kultury je nutné znát přesně původ matečné rostliny- o jakou varietu či kultivar se jedná. Výchozí rostlina by měla být zdravá a pěstovaná v optimálních podmínkách- nejlépe skleníku.

Úspěch odvození sterilní kultury a růst explantátů je ovlivňován obdobím roku, kdy je explantát odebírán. Změny teploty, délky dne, hladiny osvětlení, dostupnosti vody v průběhu roku ovlivňují obsah sacharidů, proteinů a růstových látek v rostlinách a mají tak vliv i na růst explantátů, z nich odebraných. Nejlepších výsledků je dosahováno, je-li explantát odebrán z rostliny v aktivní fázi růstu. Výjimku v tomto případě představuje odběr explantátů ze zásobních orgánů.

2) Stádium I - odvození aseptické kultury

Teoreticky je k odvození explantátové kultury možné použít jakoukoliv část rostliny (explantát). Hlavním cílem tohoto stádia je odvodit sterilní kulturu (primokulturu) s co největším procentem úspěšnosti. Odvození sterilní primokultury 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. Redukci počtu mikroorganismů na povrchu explantátů také napomáhá jejich omytí v saponátu, následované proplachováním tekoucí vodou. Saponát také zvyšuje účinek dezinfekčních činidel, protože zvyšuje snášivost povrchu explantátu.

Po dezinfekci resp. sterilizaci je nutné dezinfekční roztok z explantátu dokonale odstranit opakovaným vypíráním ve sterilní destilované vodě. Poškozené konce explantátu se odstraní skalpelem a explantát se upraví do požadované velikosti. Explantát se potom umístí do kultivační nádoby na povrch média, popř. do média (tekuté), které by mělo zajistit jeho maximální růst.

3) Stádium II - fáze proliferace explantátové kultury

Hlavním cílem stádia II je namnožení explantátů. Rostlinný materiál ze stádia I (primokultury) je opakovaně pasážován na čerstvé médium, přičemž se v závislosti na dosaženém koeficientu množení zvyšuje počet explantátů v kultuře. Tento proces množení trvá až do dosažení žádaného počtu explantátů.

4) Stádium III - zakořeňování in vitro

Prýty odvozené in vitro mohou tvořit kořeny buď in vitro ve stádiu III nebo in vivo ve stádiu IV. Stádium III představuje většinou jednorázovou kultivaci prýtů odvozených ve stádiu II po dobu 2-4 týdnů. V průběhu této kultivace prýty zakoření. Zakořeňování rostlin

představuje jednu z nejobtížnějších etap mikropropagace celé řady rostlin. V současné době se však, pokud je to možné, více využívá zakořeňování in vivo. Je to způsobeno především velmi vysokou cenou a pracností sterilního zakořeňování. Dalším důvodem je častá nefunkčnost kořenů vytvořených in vitro po přenesení rostlin do půdy.

Pouze malé množství druhů rostlin tvoří kořeny ve stádiu II na médiích s relativně vysokou koncentrací cytokininů, protože tato inhibuje tvorbu kořenů. K zakořeňování je proto nutné používat ve stádiu III jiné kultivační médium. Tvorbu kořenů ovlivňují nejenom růstové regulátory, ale i makroelementy, mikroelementy, organické komponenty atd. U většiny druhů však indukce tvorby kořenů vyžaduje navíc přítomnost auxinu. Druh a koncentrace auxinu nutného pro zakořeňování je velmi závislá na druhu rostliny. Tak jako ostatní procesy morfogeneze in vitro, je i zakořeňování ovlivňováno také světlem a teplotou. Teploty, které stimulují tvorbu kořenů se obecně pohybují v rozmezí 25-28 °C.

5) Stádium IV - zakořeňování in vivo a aklimatizace

Zakořeňováním in vivo se rozumí zakořeňování prýtů odvozených in vitro v nesterilních podmínkách na substrátech, jiných než jsou kultivační média. Jedná se o různé umělé půdy, popř. porézní materiály. Zakořeňování prýtů v nesterilních podmínkách se provádí tak, že se prýty pocházející ze stádia II jednotlivě izolují, ponoří se na několik sekund do roztoku auxinu a poté se zanoří svou bází do vlhkého substrátu. Prýty zakořeněné in vitro se po předchozím důkladném opláchnutí zbytků živného média ulpěného na kořenech opatrně přesadí do vlhkého substrátu (jinak nebezpečí kontaminace). Kontaminaci rostlin po jejich přenosu do nesterilních podmínek je možné zabránit aplikací fungicidů na rostliny, popř. do substrátu.

Ve stádiu IV je kromě dokonalého zakořenění rostlin nezbytná jejich aklimatizace na změněné podmínky zevního prostředí. Aklimatizace se především týká snížené vzdušné vlhkosti a přechodu na autotrofní způsob výživy. K aklimatizaci je nutné přistoupit až u rostlin s dostatečně vyvinutým kořenovým systémem a listy.

Rostliny v explantátové kultuře rostou na médiu, které poskytuje uhlík již v organické formě (sacharidy) a nemusí tedy vytvářet organické sloučeniny v závislosti na fotosyntéze. Pokud probíhá fotosyntéza v explantátové kultuře, nikdy nepředstavuje hlavní zdroj organického uhlíku. Listy rostlin rostoucích v explantátové kultuře mají odlišnou vnitřní strukturu, což znemožňuje intenzivní fotosyntézu. Rostliny přenesené z in vitro podmínek do nesterilního prostředí vykazují v důsledku nedostatečně rozvinutého fotosyntetického aparátu negativní uhlíkovou bilanci.

3.1.6. KULTIVAČNÍ MÉDIA PRO EXPLANTÁTOVÉ KULTURY (2)

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin 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, sacharid(y), další nedefinované organické složky, zpevňující látku růstové regulátory.

a) Makroelementy

Makroelementy dodávané do kultivačních médií zahrnují šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu. Rostlinné buňky mohou růst na médiu obsahujícím dusík pouze v nitrátové formě, ale mnohem lepšího růstu je většinou dosaženo, je-li dusík do média dodáván společně v nitrátové formě a ve formě amonných solí. Redukovaná forma dusíku je pro některé druhy pro zajištění růstu v explantátové kultuře nezbytná. Redukovaný dusík se může do média dodávat také ve formě organických sloučenin (např. aminokyseliny).

b) Mikroelementy

Mezi mikroelementy nezbytné pro růst tkáňových kultur rostlin patří železo, mangan, zinek, bor, měď a molybden. Železo a zinek se obvykle do médií dodávají v chelátové formě. Do médií se také někdy dodává kobalt, jód, sodík a chlór, ale nemusí být pro růst explantátové kultury nezbytné.

c) Zdroj uhlíku

Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána sacharóza. V některých případech je možné sacharózu nahradit glukózou či fruktózou. V kultivačních médiích byly testovány i jiné sacharidy jako laktóza, galaktóza, rafinóza, maltóza a škrob, ale většinou byly méně efektivní než sacharóza a glukóza. Sacharidy se do médií dodávají z důvodu převážně heterotrofní výživy explantátů. Schopnost explantátů vyživovat se autotrofně je totiž velmi omezena.

d) Vitamíny

Normální rostlina sama syntetizuje vitamíny nezbytné k jejímu růstu a vývoji. Vitamíny jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná in vitro mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi vitamíny nejčastěji používané v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myoinositol. Thiamin je součástí většiny médií a je pro růst tkáňových kultur nepostradatelný. Kyselina nikotinová a pyridoxin se rovněž velmi často dodávají do kultivačních médií, ale jejich přítomnost v kultivačním médiu není tak nezbytná jako u thiaminu. Myoinositol se vyskytuje ve většině živných médií. Jedná se o sacharid, který nemusí být pro růst explantátů nezbytný, ale může tento růst stimulovat. V kultivačních médiích se někdy používají další vitamíny jako biotin, kyselina listová,

kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin atd. Jejich přítomnost v médiích však není většinou nezbytná.

e) Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku

Přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, může přítomnost některých aminokyselin v živném médiu stimulovat růst explantátů. Aminokyseliny se dodávají do živných médií především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Aminokyseliny slouží buňkám jako bezprostřední zdroj uhlíku nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Dusík se v organické formě dodává do živných médií nejčastěji ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát). Velmi často se používá také L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin.

f) Nedefinované organické složky médií

Růst explantátové kultury je možné často stimulovat přidáním celé řady organických extraktů, jako např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Použití těchto nedefinovaných směsí je však lépe pokud možno vynechat právě z důvodů jejich nedefinovaného složení. Nejčastěji se používá protein (kasein) hydrolyzát a kokosové mléko. Do médií se také někdy dodává aktivní uhlí, které může mít jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů. Aktivnímu uhlí se připisují tři základní funkce v živném médiu: absorpce látek inhibujících růst, absorpce růstových regulátorů a ztmavnutí média. Aktivní uhlí se před použitím propláchně kyselinou a zneutralizuje.

g) Látky používané pro zpevnění média

Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. Agar má oproti jiným gelizujícím látkám řadu výhod. Agarové gely jsou stabilní při teplotách používaných ke kultivaci. Agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhost agarového gelu je možné regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. Velmi důležitá je čistota používaného agaru. Agar obsahuje vápník, hořčík, draslík a sodík, a tak změna koncentrace agaru v médiu může změnit i koncentraci některých prvků v živném médiu. Vedle agaru je možné používat ke zpevnění média také agarózu, Phytigel a Gerlite, které představují syntetické látky. V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty "fixovat" na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pění, čedičové vatě (rockwool), perforovaném celofánu atd. V poslední době zavedly některé firmy na trh tzv. "rafty". Jedná se o plastové nosiče, do kterých se upevňuje polypropylenová membrána.

h) Růstové regulátory

Růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová. O charakteru růstu explantátové kultury nerozhoduje pouze jenom koncentrace jednotlivých hormonů, ale často jejich vzájemný poměr. Mezi auxiny používané v tkáňových kulturách rostlin patří především kyselina indolyloctová, kyselina indolylmáselná, kyselina dichlorfenoxycetová

a kyselina naftyloctová. Kyselina indolyloctová představuje nativní auxin, ostatní jsou látky syntetické. Různé druhy auxinů mají různou fyziologickou aktivitu, pohybují se různou rychlostí pletivy, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jsou jiným způsobem metabolizovány. Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk.

Mezi cytokininy běžně používané v kultivačních médiích patří především benzylaminopurin, 6-dimethylaminopurin, furfurylaminopurin (kinetin) a zeatin. Cytokininy se používají v kultivačních médiích za účelem stimulace buněčného dělení a stimulace tvorby axilárních prýtů. Morfogenetická reakce v explantátové kultuře je značně závislá na vzájemném poměru auxinu a cytokininu v kultivačním médiu. Iniciace tvorby kořenů, embryogeneze a iniciace tvorby kalusu je stimulována, je-li poměr auxinu a cytokininu vysoký. Je-li tento poměr nízký, je indukována tvorba adventivních, či axilárních prýtů. Koncentrace auxinu a cytokininu je stejně významná jako jejich vzájemný poměr.

Další skupinou růstových regulátorů, které se do kultivačních médií dodávají, jsou gibereliny a kyselina abscisová. Většina explantátů jejich přítomnost pro svůj růst v médiu nevyžaduje, ale u některých druhů mohou stimulovat jejich růst.

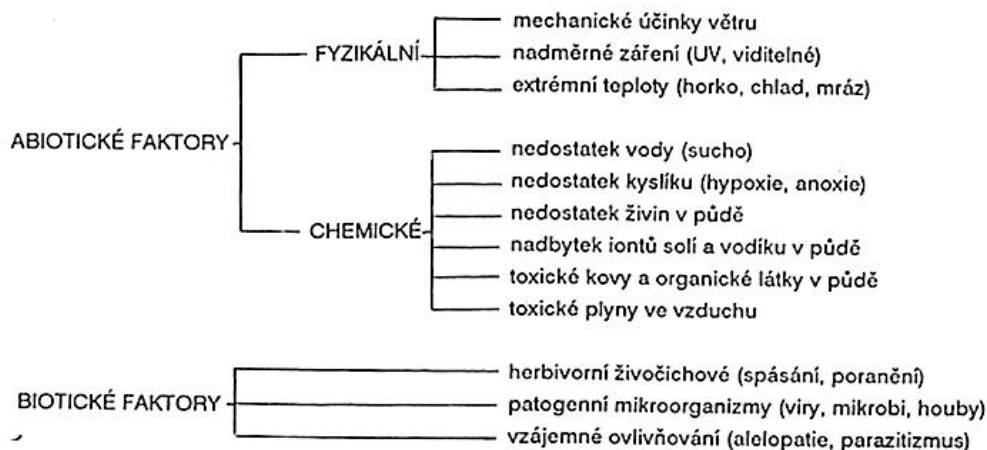
Chemické složení a fyzikální vlastnosti média musí odpovídat požadavkům rostliny v různých fázích rozmnožovacího cyklu.

3.2. FYZIOLOGIE STRESU

3.2.1. STRES U ROSTLIN – OBECNĚ (3)

Rostliny jsou v průběhu 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). Termín stres je obvykle používán pro souhrnné označení stavu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů. Nejde přitom nikdy o nějaký ustálený a snadno definovatelný stav, ale spíše o dynamický komplex mnoha reakcí.

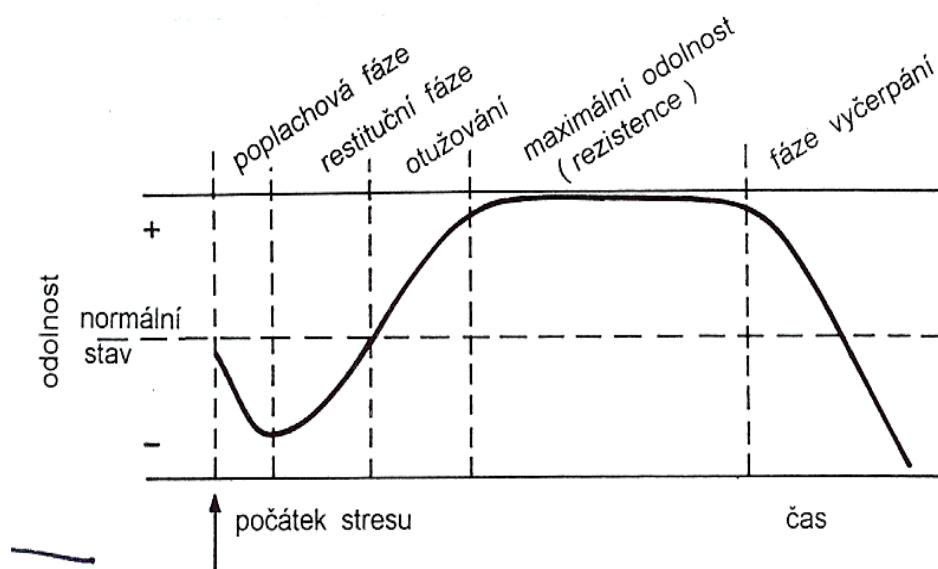
Výzkum vztahů mezi vnějším prostředím a stresem v rostlinách obvykle začíná studiem přenosu podnětů vyvolávajících stres na rozhraní orgánů rostliny s vnějším prostředím a dále pak přenosem signálů uvnitř rostliny. Stresové faktory, ať už fyzikálně-chemické či biotické (viz obrázek č.2), mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů nesterpně snadno, a to především v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur. Tento způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter. Jedná se vlastně o schopnost vyhnout se stresu, ke které přispívají také vhodně načasované životní cykly.



Obrázek č.2 (3)

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. S vědomím značné dávky zjednodušení lze i u rostlin přijmout klasické schéma průběhu stresové reakce známé z humánní fyziologie (viz. obrázek č.3). Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí (**poplachová fáze**). Pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, dochází záhy k mobilizaci kompenzačních mechanismů (**restituční fáze**), které směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům (**fáze rezistence**). Ne vždy však toto zvýšení má trvalý charakter. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídáno dalším poklesem (**fáze vyčerpání**). Základní schéma 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. Tato neobyčejně rozsáhlá problematika je v současné době intenzivně studována na různých organizačních úrovních, od molekulových a genetických základů až po integrující projevy celé rostliny.

Je však potřeba zdůraznit, že 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 aklimace může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých, tak i na změnách trvalejších.



Obrázek č.3 (3)

3.2.2. BIOTICKÉ STRESY (3)

a) Alelopatie

Každá rostlina obsahuje velké množství sekundárních metabolitů, z nichž některé mohou působit inhibičně až toxicky na jiné rostliny vyskytující se v jejich těsné blízkosti. Pokud skutečně dojde k přenosu účinné látky a k ovlivnění sousední rostliny, pak hovoříme o alelopatii. Významnost alelopatie jako příčiny biotických stresů rostlin v přírodních podmínkách stále patří mezi velmi rozporuplnou a málo probádanou oblast rostlinné fyziologie. Účinné látky musí být z jedné (zdrojové) rostliny vyloučeny a přeneseny na jinou (cílovou) rostlinu v dostatečné koncentraci. Zdrojová rostlina musí být vůči účinné látce mnohem méně citlivá než rostlina cílová. Uvolňování a přenos malých koncentrací organických sloučenin je zejména v půdě velmi obtížné sledovat. Poněkud lépe prozkoumané je nepřímé alelopatické působení zprostředkované metabolity uvolněnými mikrobiálním rozkladem z odumřelých částí rostlin.

Mechanismus působení látek s potenciálním alelopatickým účinkem je dosud znám velmi nedostatečně. Inhibice membránových funkcí, včetně příjmu iontů minerálních živin, inhibice dělivého i dlouhivého růstu buněk a inhibice klíčení patří k nejčastěji pozorovaným účinkům. Citlivost různých druhů rostlin je vůči zmíněným sloučeninám značně rozdílná a lze proto předpokládat existenci rozdílně účinných detoxikačních schopností.

b) Interakce s býložravými živočichy

Rostliny jsou vystaveny stálému nebezpečí poškození svých orgánů mnoha druhy živočichů zejména z početných skupin fytofágního hmyzu, ale i pastvou evolučně vyspělejších býložravců. Kromě mnoha morfologických a morfogenetických adaptací k omezení herbivorie jsou také velmi časté i rozmanité biochemické adaptace.

Z velkého množství sekundárních metabolitů, které se syntetizují v rostlinách, mnohé působí odpudivě až toxicky na herbivorní živočichy. Z hlediska množství, v jakém se

vyskytují, lze je rozdělit do dvou kategorií. První z nich zahrnuje látky kvalitativně významné, které se sice vyskytují jen v malých koncentracích, ale zato jsou pro živočichy velmi toxické. Patří sem nejrůznější alkaloidy, glykosidy uvolňující kyanovodík, glukozinoláty a mnoho dalších. Do druhé kategorie řadíme kvantitativně významné metabolity, které sice nejsou tak toxické, ale ve větším množství (často tvoří více než 10% sušiny) způsobují špatnou stravitelnost, nechutnost až toxicitu (např. lignin, taniny a fenolické látky).

c) Reakce na patogenní organizmy

Kromě živočichů ohrožují rostliny i patogenní mikroorganizmy (viry, bakterie, houby). Jejich průnik do buněk je sice ztížen pevnou buněčnou stěnou, avšak ani ta není pro řadu z nich nepřekonatelnou překážkou. Nejen průnik, ale často již kontakt patogenního organismu s buňkou vyvolává celou řadu koordinovaných vnitrobuněčných procesů, jejichž cílem je omezit či zcela eliminovat jeho působení a šíření do dalších buněk. Jen málo z těchto procesů má zcela obecný charakter, spíše lze pozorovat velkou rozmanitost u jednotlivých skupin rostlinných druhů i u jednotlivých orgánů.

Na počátku všech obranných reakcí musí ovšem být podnět k jejich spuštění, kterým obvykle bývá specifický metabolit (elicitor) uvolňovaný při počáteční interakci buňky s patogenem a identifikovaný vhodným receptorem hostitelské rostliny. Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory většinou neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu. Přenos od aktivovaných receptorů elicitorů k DNA v jádře je možný více systémy. Velmi častým a neobyčejně rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku vyvolaná elicitory. Při napadení rostliny patogeny se též rychle zvyšuje tvorba etylenu, který se podílí na iniciaci genové exprese. Vlastní obranné reakce zahrnují jednak tvorbu specifických stresových proteinů, jednak syntézu a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem. Zvláštní skupinu specifických nízkomolekulárních obranných látek tvoří fytoalexiny, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začnou se vytvářet až po napadení patogenem. Poměrně častá a překvapivě účinná reakce na průnik patogenů je řízená tvorba ochranných nekrot.

3.2.3. PŘÍKLADY ABIOTICKÝCH STRESOVÝCH FAKTORŮ (3)

a) Reakce na přehřátí

Při zvýšení teploty zhruba nad 40°C dochází u většiny druhů rostlin k zásadním změnám ve fyzikálně-chemických vlastnostech buněčných membrán i proteinů. Lipidová vrstva membrán 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. U proteinů dochází navíc za vysoké teploty ke změnám konformace, a tím i ke ztrátě jejich funkce. Velmi nápadným indikátorem vznikajícího stresu je poškození fotosystému II. Za zvyšující se teploty dochází nejprve k rozpadu jednotlivých částí fotosystému a teprve až později k denaturaci proteinů. Stavová změna lipidové vrstvy je vratná a při poklesu teploty pod kritickou hodnotu dochází rychle k obnově původní struktury a funkce. Celkový stupeň poškození buněk je dán součinem aktuální teploty a doby jejího působení.

Aklimační reakce na zvýšenou teplotu lze pozorovat již za necelou hodinu od začátku působení stresoru. Zvláště nápadná je tvorba stresových proteinů. Jejich přítomnost má zcela zásadní význam pro zvýšení termostability.

b) Stresové účinky nízkých teplot

Citlivost na chlad vykazují zejména některé užitkové rostliny původem z teplejších oblastí. Doba, po kterou chlad působí, je velmi důležitá. Většina proteinů není nízkými teplotami poškozována, a tak primární účinky nepříznivého působení chladu je nutno hledat především ve změně fyzikálně-chemických vlastností membrán. Volná propustnost membrán pro ionty vede ke ztrátě transmembránového potenciálu, k zastavení selektivního a aktivního transportu a navíc i k zastavení osmotických procesů. Po jisté době trvání tohoto stavu musí nutně dojít k vyčerpání energetických zdrojů a k odumření buňky.

Aklimační změny za nízkých teplot jsou spojeny s hromaděním osmoticky aktivních látek, s tvorbou stresových proteinů a se změnami složení lipidové vrstvy membrán. 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.

c) Vodní stres

Ze všech abiotických faktorů, které omezují růst a produktivitu rostlinstva na kontinentech naší planety, 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. Vodní potenciál vzduchu v okolí listů je téměř vždy velmi nízký, a proto rostliny ve všech typech prostředí jsou ohroženy vodním stresem. Příjem oxidu uhličitého pro fotosyntézu

otevřenými průduchy je obvykle spojen s takovou ztrátou vody, jakou nelze okamžitě nahradit. Nejvíce postiženým orgánem jsou vždy listy.

Při poklesu vodního potenciálu na hodnotu $-0,2$ až $-0,8$ MPa dochází v buňkách k velmi podstatnému (až čtyřicetinásobnému) zvýšení koncentrace kyseliny abscisové, zejména v listech, kde má za následek zavírání průduchů. Při větším poklesu vodního potenciálu k hodnotám okolo $-1,0$ 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 (od $-1,0$ do $-2,0$ MPa), dochází již 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.

Funkční podstata vysoké odolnosti k vyschnutí není dosud dostatečně známa. Její výzkum je totiž velmi obtížný, neboť ke změnám dochází ve všech metabolických cestách a k analýze silně dehydratovaných pletiv se nedají použít běžné biochemické metody.

d) Nedostatek kyslíku v půdě

Nadzemní části rostlin jsou obklopeny vzdušným prostředím, ve kterém se koncentrace kyslíku mění jen nepatrně. Ve zcela jiné situaci jsou ale podzemní orgány, neboť koncentrace kyslíku v plynné fázi půdního systému je trvale snížena ve srovnání s volnou atmosférou. Hypoxické až anoxické podmínky způsobují vážný stres u těch druhů rostlin, které nemají vhodné adaptace. Jakmile koncentrace kyslíku v intercelulárách klesne pod 2 až 4%, dochází k inhibici aerobních procesů.

Aklimační reakce na náhlé snížení koncentrace kyslíku má značně komplexní charakter. Dochází především ke změnám v koncentraci fytohormonů a k syntéze stresových proteinů. Zvyšuje se syntéza kyseliny abscisové, která zprostředkovává regulaci řady procesů i v nadzemních orgánech. Tvorba cytokininů v kořenech je naopak zpomalena a stejně tak i tvorba etylenu, protože vyžaduje kyslík.

e) Zasolené a kyselé půdy

Zasolené půdy se vyskytují nejen v blízkosti moře, ale i ve vnitrozemských oblastech, kde potenciální výpar převažuje nad srážkami. K zasolení může také dojít při dlouhodobých závlahách a také v okolí komunikací posypávaných solí v zimním období. Problémy, kterým rostliny musí čelit při růstu na zasolených půdách, jsou komplexní povahy. Kromě vlastního toxického vlivu vysoké koncentrace některých iontů (zejména sodných, chlorných, síranových a hořečnatých) to bývá velmi nízký vodní potenciál a zhoršení fyzikální vlastnosti půdy. Neadaptované rostliny hromadí ve svých buňkách uvedené ionty v takovém množství, které je neslučitelné s normální funkcí enzymů. Velmi brzy pak dochází k zastavení dělivého i dlouhivého růstu a nakonec k odumření celé rostliny.

Adaptace k zasolení probíhala několika směry. U části druhů je příjem solí dokonale kontrolován vysokou selektivitou plazmatické membrány pro transport iontů do buněk kořenů. Pokud je vystavena běžná, neadaptovaná rostlina náhlému působení zasolené půdy, jednou z prvních reakcí je zvýšení osmotického tlaku v buňkách kořenů (osmoregulací). Další významnou reakcí je tvorba stresových proteinů, které jsou velmi podobného typu jako při stresech z vysoké teploty a z nedostatku vody.

Kyselé půdy představují v současné době závažný problém nejen ve střední Evropě, ale i na jiných kontinentech. Přímé poškození rostlin vysokou koncentrací vodíkových iontů je poměrně vzácné, neboť k němu dochází obvykle až při hodnotě pH3 a nižší. Mnohem významnější je tedy nepřímé negativní působení zvýšenou rozpustností některých sloučenin v půdě při nízkém pH. Zejména dochází k uvolňování vysoce toxických iontů hliníku. Také volné ionty železnaté a manganaté působí v nadbytku toxicky. Vysoká koncentrace vodíkových iontů v půdě vytěsňuje kationy (zejména vápenaté, hořečnaté a draselné) ze sorpčních vazeb na koloidech a snadno dojde k jejich vyplavení z půdy. Rostliny pak trpí nedostatkem těchto kationů. Dále je snížena dostupnost fosforu i nitrátového dusíku, protože nitrifikační bakterie jsou citlivé na pokles pH.

f) Toxické látky v prostředí

Plynné, kapalné i pevné složky prostředí, ve kterém v přírodě rostliny rostou, jsou velmi pestrou směsí desítek chemických sloučenin, z nichž některé mohou mít výrazně inhibiční až toxické účinky. Z plynů je nejvíce nebezpečný oxid siřičitý a ozon, v půdě pak ionty těžkých kovů a aromatické organické látky. Oxid siřičitý vstupuje do listů hlavně otevřenými průduchy a difuzí v intercelulárách se snadno šíří ke všem buňkám listového mezofylu. Po proniknutí buněčnou stěnou se rychle rozpouští a mění na siřičitanové aniony, jejichž naprostá většina vstupuje do chloroplastů. Ve vyšší koncentraci siřičitanové ionty blokují činnost karboxylačního enzymu Rubisko, a tím je inhibován i průběh sekundárních procesů fotosyntézy. V odolnosti k toxickému působení oxidu siřičitého existují velké mezidruhové rozdíly. Aklimační reakce na působení oxidu siřičitého zahrnují zvýšení aktivity enzymů metabolismu síry a také zvýšení pufrční kapacity buněk.

Ozon je neméně toxický plyn než SO_2 a jeho koncentrace v přízemních vrstvách atmosféry bývá velmi podobná. Naprostá většina ozonu vzniká fotolýzou oxidů dusíku (NO , NO_2) a také některých plynných organických sloučenin. Ozon vstupuje do listů výhradně průduchy a již v intercelulárách v kontaktu s vlhkými buněčnými stěnami se velmi rychle rozkládá. Průnik nerozloženého ozonu přes plazmatickou membránu je stěžejí možný. Při rozkladu ozonu vzniká nejen molekulární kyslík, ale jako meziprodukty i vysoce reaktivní superoxid (O_2^-) a hydroxylový radikál (OH^\cdot). Ozon indukuje tvorbu etylenu, polyamidů a flavonoidů, které jsou také součástí obranných mechanismů. Probíhá také tvorba stresových proteinů, které jsou téměř shodné s proteiny tvořenými při napadení rostliny patogenními organizmy. Při vyšších koncentracích ozonu a při jeho delším působení nejsou ochranné oxidační systémy dostatečné a dochází k poškození buněčných součástí.

Toxické kovy, zejména zinek, olovo a kadmium, se dostávají do půdy ve větších množstvích usazováním prachu z průmyslových procesů, z výfukových plynů atd. Ionty těchto kovů jsou velmi snadno přijímány kořeny. Po vstupu do buněk inaktivují některé enzymy a redoxní systémy. Inhibice dělení a dlouhivého růstu buněk, která se projevuje zejména zpomalením růstu primárního kořene, bývá jedním z prvních příznaků jejich toxického působení. V odolnosti rostlin k působení těžkých kovů existují velké rozdíly nejen mezi druhy, ale i uvnitř téhož druhu. K vnitrobuněčným detoxikačním mechanismům patří zejména tvorba stresových proteinů. Další velmi účinnou aklimační reakcí je tvorba specifických sloučenin (fytochelatinů) schopných inaktivovat těžké kovy vazbou do chelátových komplexů. Komplexně vázané toxické ionty jsou transportovány do vakuoly, kde i po uvolnění z fytochelatinu jsou inaktivovány vysokou koncentrací organických kyselin.

3.2.4. SPOLEČNÉ MECHANIZMY STRESOVÝCH REAKCÍ (3)

U rostlin existují jisté dílčí komplexy společných reakcí, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresům současně. Poznání detailního mechanismu těchto reakcí na molekulové a biochemické úrovni je věnována stále větší pozornost. 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, etylenu, kyseliny jasmonové, metyljasmonátu a polyaminů)
- tvorba osmoregulačních sloučenin

•Stresové proteiny

Pod vlivem kteréhokoliv ze stresových faktorů dochází často již během několika desítek minut k velmi dramatickým změnám v kvantitativním i kvalitativním zastoupení proteinů v buňkách. Tvorba některých prudce stoupá, u jiných se naopak zastavuje. V hojné míře se však také syntetizují proteiny, které se za normálních okolností vůbec nedají v buňkách zjistit. Proteiny indukované zvýšenou teplotou patří k nejdéle známým a také k evolučně nejstarším, neboť řada z nich se vytváří při zvýšení teploty jak u rostlin a živočichů, tak i u bakterií a hub. Proteiny indukované chladem jsou méně početné. Proteiny indukované dehydratací jsou do značné míry podobné skupině chladových proteinů a také skupině

stresových proteinů indukovaných vysokým obsahem solí v půdě. Je to pochopitelné, protože jak za nízkých teplot, tak při zasolení půdy jsou rostliny ohroženy dehydratací buněk. Zvláštní skupinou asi dvaceti proteinů, které se nově vytvářejí při nedostatku vody v buňkách jsou dehydriny. Proteiny indukované sníženou koncentrací kyslíku můžeme v buňkách dokázat nejen za úplné anoxie, ale už při snížení koncentrace kyslíku ve vzduchu v okolí rostliny asi na 4%. Proteiny indukované patogeny tvoří mimořádně početnou a různorodou skupinu. Kromě mnoha obecně stresových proteinů se zde vyskytují některé proteiny se specifickými antimikrobiálními účinky.

■ Aktivní formy kyslíku

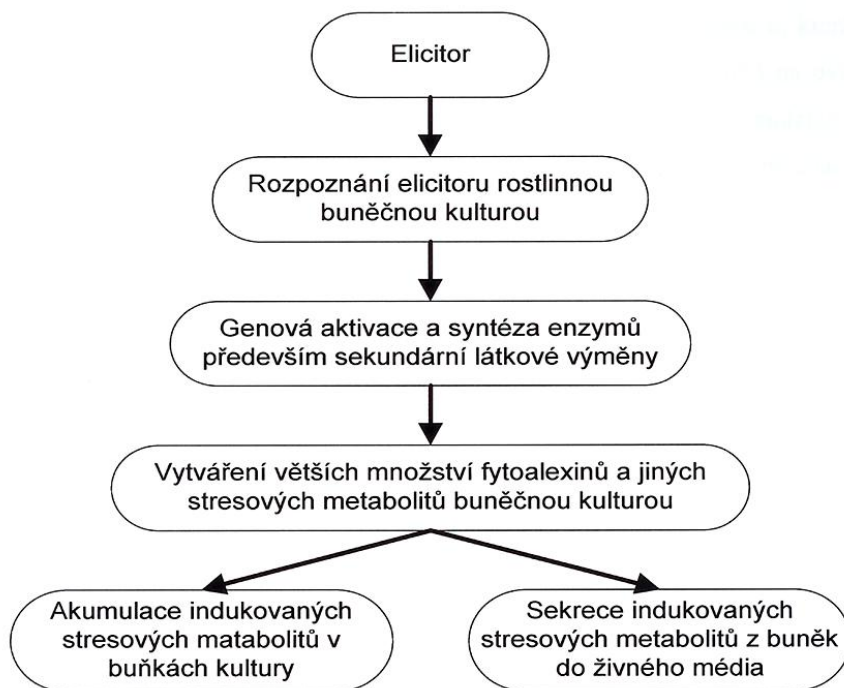
Úloha těchto látek ve stresovaných rostlinách je značně rozmanitá a do jisté míry rozporná. Jednak vznikají jako nebezpečné produkty při působení řady stresových faktorů a rostliny musí mít účinné systémy na jejich deaktivaci, jednak mohou mít kladnou úlohu jako signály či ochranné látky při některých typech stresů, a je tudíž žádoucí jejich koncentraci udržovat na jisté úrovni. Negativní působení aktivních forem kyslíku spočívá především v peroxidaci lipidů. Mechanizmy ochrany před oxidačním poškozením lze rozdělit do několika skupin. Patří sem především deaktivace pomocí karotenoidů, tokoferolu, některých specializovaných enzymů a enzymatických systémů. Regulovaná tvorba aktivních forem kyslíku může mít ovšem i přímý antimikrobiální účinek a může také významně přispívat ke zpevnění buněčné stěny, a tím i k větší odolnosti vůči různým stresovým faktorům. Protistresová úloha aktivních forem kyslíku dosud není uspokojivě prozkoumána ve všech souvislostech.

3.2.5. ELICITACE A ELICITORY

Elicitace je indukční proces vedoucí ke zvýšení hladiny enzymů (případně jejich aktivaci), jehož následkem dochází k vyšší produkci a akumulaci určitých sekundárních metabolitů. Elicitor lze chápat jako látku, která má schopnost dát podnět k aktivaci genů, a tím vyvolat tvorbu tzv. fytoalexinů.

K elicitacím se používají jak biotické elicitory (houby, bakterie, viry, kvasinky, hnědé řasy nebo části těchto organismů), tak abiotické elicitory (UV záření, soli těžkých kovů, kyselina trichloroctová, změny osmotického tlaku, změny pH). Výhoda abiotických elictorů spočívá v jejich definované chemické struktuře, v možnosti použití jejich přesné hmotnosti nebo objemu a jejich menší ekonomické náročnosti. (10)

Obrázek č. 4 (14): Mechanismus působení elictoru



PŘÍKLADY ABIOTICKÝCH ELICITACÍ

Byla zkoumána stimulace syntézy betacyaninu pomocí exogenního methyljasmonátu a ostatních elicitorů v suspenzní kultuře buněk *Portulaca*. Produkce betacyaninu se značně zvýšila vlivem abiotických i biotických elicitorů. Hladiny betacyaninu vzrostly 1,3 a 1,5 krát v přítomnosti 20 μ mol/l CuSO_4 a 100 μ mol/l FeEDTA. Nárůst produkce 1,8 a 1,6 krát způsobil β -glukan a chitosan. Maximální nárůst hladin betacyaninu byl získán po úpravě kultury elicitory β -glukanem a FeEDTA ve dni nultém a prvním. Přidání methyljasmonátu

v koncentraci 0,1 μ mol/l 3.den způsobilo nárůst produkce betacyaninu 2,6 krát. Nicméně kombinace methyljasmonátu s ostatními elicitory pozitivní výsledek nepřinesla.(7)

Další práce se soustředila na produkci sekundárních metabolitů v kalusech, buněčné suspenzi a vlasových kořenech *Ammi majus* vystavených působení abiotických elicitorů (suspenze SiO₂, k. jasmonová) a biotických elicitorů (autoklávované lyzáty *Enterobacter sakazaki*, *Erwina chrysanthemi*, scleroglukan). Tenkovrstvá a plynová chromatografie prokázala v kalusech, buněčné suspenzi a vlasových kořenech akumulaci umbelliferonu, biogenetického prekursoru furanokumarinů. Největší koncentrace umbelliferonu byla pozorována v kalusech elicitovaných oxidem křemičitým. Příklad s scleroglukanu do buněčné suspenze vyvolal produkci furanokumarinu marmesininu. Pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrofotometrie byl identifikován scopoletin v kalusech elicitovaných *Enterobacter sakazaki*.(8)

Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu, ke kterým patří především vápenaté ionty. V další práci byl sledován vliv čtyř koncentrací vápenatých iontů na produkci anthracenových derivátů kalusovou a suspenzní kulturou *Rheum palmatum* L., která byla elicitována abiotickým elicitorem-20 μ M roztokem chloridu olovnatého. Kultura byla kultivována na MS médiu s přídavkem k. α -naftyloctové. Z výsledků vyplývá, že maximální obsah anthracenových derivátů byl prokázán v suspenzní kultuře po 24 hodinové aplikaci elicitoru a 10mM roztoku chloridu vápenatého. Po přidání vápenatých iontů k elicitované kalusové kultuře k pozitivnímu ovlivnění produkce nedošlo.(9)

Byl také sledován vliv abiotických elicitorů - CuSO₄ a CdCl₂ na produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. po 24, 48 a 168 hodinové aplikaci. Testované elicitory výrazně ovlivňovaly produkci flavonoidů v této kultuře. Významný nárůst produkce flavonoidů byl zaznamenán při použití roztoku CdCl₂ v koncentraci 0,5mg/l a 0,05mg/l po 48 hodinách kultivace, u koncentrace 0,005mg/l po 24 i 48 hodinách kultivace. U roztoku CuSO₄ v koncentraci 0,5mg/l po 48 i 168 hodinách. Nejvyšší nárůst hladiny flavonoidů byl zjištěn po elicitaci CdCl₂ o koncentraci 0,005mg/l.(10)

Další práce se zabývala vlivem abiotického elicitoru chloridu chromitého na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinové aplikaci. Testovaný elicitor ovlivňoval pozitivně tvorbu flavonoidů. Maximální zvýšení tvorby flavonoidů o 98% nastalo v kalusové kultuře po elicitaci roztokem chloridu chromitého v koncentraci 6,32.10⁻⁸ mol/l po 48 hodinách aplikace a v suspenzní kultuře po elicitaci CrCl₃ o koncentraci 6,32.10⁻⁶ mol/l po 12 hodinách o 100%.(11)

Prudký nárůst koncentrace flavonoidů byl zaznamenán v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. a to o 308% po použití elicitoru CoCl₂ v koncentraci 2,1.10⁻⁷ mol/l po 24 hodinách. Naproti tomu hladina flavonoidů značně poklesla po 48 hodinách působení CoCl₂ v koncentraci 4,2.10⁻⁷ mol/l. Při použití NiCl₂ jako elicitoru u této kultury maximálně vzrostla produkce flavonoidů o 700% při použití koncentrace 4,2.10⁻⁷ mol/l po 24 hodinách.(37)

Signifikantní nárůst obsahu flavonoidů u kalusové kultury *Ononis arvensis* L. byl pozorován po 48 hodinách po elicitaci 11,900 nM HgCl₂ a to o 109% oproti kontrole.(38)

V další práci byl sledován vliv iontů těžkých kovů na produkci anthracenových derivátů explantátovou kulturou *Rheum palmatum* L. Maximální zvýšení obsahu anthracenových derivátů oproti kontrole o 66% nastalo po 48 hodinovém působení 10 μ M koncentrace chloridu kademnatého. Chlorid hlinitý způsobil největší zvýšení produkce po 6 hodinové aplikaci 100 μ M koncentrace, kdy došlo v porovnání s kontrolní kulturou ke stimulaci produkce o 60%.(12)

Zajímavý výsledek poskytlo použití nově syntetizovaných sloučenin (substituovaných anilinů pyrazin-2-karboxylových kyselin) jako abiotických elicitorů. Testované sloučeniny mají výrazný vliv na produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. Zejména po elicitaci roztokem 4-hydroxyanilid-6-chlor-5-terc.butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny v koncentraci 3,32.10⁻⁷ mol/l a době elicitace 48 hodin došlo ke zvýšení tvorby flavonoidů o 976% oproti kontrole.(13)

Jedna ze studií sledovala vliv síranu vanadylu (VOSO₄) na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. in vitro. Maximální zvýšení tvorby flavonoidů nastalo v kalusové kultuře po 24 hodinové elicitaci VOSO₄ v koncentraci 1,227.10⁻⁴ mol/l, a to o 313% oproti kontrole a v suspenzní kultuře u koncentrace 1,227.10⁻⁶ mol/l po 48 hodinovém působení elicitoru o 485% ve srovnání s kulturou.(14)

Výčet následujících prací a studií sledoval vliv abiotického elicitoru dusičnanu stříbrného a stříbrných iontů u různých rostlin.

- U *Arabidopsis thaliana* L. nemá na hromadění camalexinu elicitor AgNO₃ významnější vliv.(17)

- Ke kultuře *Salvia miltiorrhiza* byl přidán Ag₂S₂O₃ v koncentracích 15-40 μ M. Nárůst produkce látek (diterpenoidy- tanshionI, tanshionIIA, cryptotanshion) byl dvojnásobný 12. a 22. den působení elicitoru.(16)

- Rozmnožování in vitro *Andrographis paniculata* bylo zkoumáno pro vliv 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny na somatickou embryogenezi s pozitivním výsledkem. Přidání 11,7 μ M roztoku AgNO₃ k MS médiu mělo za následek v 71% dospění embryí.(18)

- U *Lagenaria siceraria* Standl. byl pozorován vliv na regeneraci výhonků z cotyledonu. Maximální regeneraci vykazovala kultivace na MS médiu s přídatkem 0,5mg/l AgNO₃. K úspěšnému zakořenění výhonků na médiu došlo navíc s přídatkem 0,1mg/l k. indolyloctové.(19)

- Suspenzní kultury *Sussurea medusa* produkují jaceosidin a hispidulin. V kulturách proběhl pokus s elicitory dusičnanem stříbrným a glutathionem. Přídavek AgNO₃ nebo

glutathionu zvýšil produkci jaceosidinu a hispidulinu (z 32,01 na 51,25mg/l a z 3,11 na 5,13mg/l). Přidáním obou látek současně v koncentracích 0,01 a 1,0mmol/l dosáhla produkce jaceosidinu a hispidulinu hodnot 84,3 a 7,9mg/l. Z toho vyplývá, že použitím obou elicitorů současně bylo dosaženo lepších výsledků, než použitím každého elicitoru samostatně.(20)

■U *Capsicum annuum* L. byl pozorován pozitivní vliv AgNO_3 na tvorbu haploidních embryí z prašníků rostlin. Největší úspěch byl zjištěn u koncentrace 15mg/l AgNO_3 (45,7 embryí na 100 prašníků).(21)

■Dusičnan stříbrný byl použit u *Coffea arabica* L. a *Coffea canephora* P ex Fr. k somatické embryogenezi. Výzkum probíhal na MS médiu obsahujícím 10-70 μM AgNO_3 a 1,1 μM N-6-benzyladeninu a 2,85 μM k. indolyl-3-octové. Maximum embryí bylo získáno při použití roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci 40 μM .(22)

3.3. STŘÍBRO A DUSIČNAN STŘÍBRNÝ

Ve své práci jsem pro elicitaci kalusových kultur *Ononis arvensis* L. použila abiotický elicitor- dusičnan stříbrný (AgNO_3). Pozorovala jsem závislost produkce flavonoidů na různých koncentracích AgNO_3 .

Stříbro je ušlechtilý kov bílé barvy, vyznačuje se nejlepší elektrickou a tepelnou vodivostí ze všech známých kovů.

Patří mezi přechodné prvky. Ve sloučeninách se vyskytuje především v mocenství Ag^+ , sloučeniny dvojmocného stříbra Ag^{2+} jsou nestálé a mají silné oxidační schopnosti.

Přestože je stříbro řazeno mezi drahé kovy, které se obecně vyznačují chemickou stabilitou, je velmi dobře rozpustné v kyselině dusičné, především díky jejím silným oxidačním vlastnostem. Reakce probíhá podle rovnice:



Z pohledu praktického využití je nejvýznamnější sloučeninou stříbra dusičnan stříbrný. Je to bílá krystalická látka, velmi dobře rozpustná ve vodě. Lze ji připravit ve velmi vysoké čistotě, nejlépe elektrolytickým rozpouštěním čistého stříbra v roztoku kyseliny

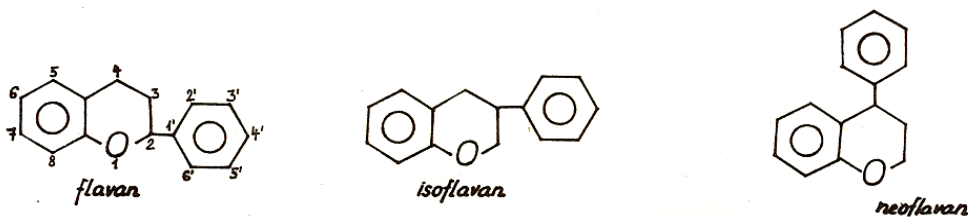
dusičné. Tato sloučenina poté slouží v chemické výrobě jako zdroj stříbrných iontů pro další reakce.

Stříbro obecně působí především baktericidně a desinfekčně. Je jednoznačně prokázáno, že koloidní stříbro ničí houby a plísňe, zabíjí parazity, pomáhá regeneraci buněk, přitom je prakticky minimálně toxické pro vyšší organismy.(23)

3.4. FLAVONOIDNÍ GLYKOSIDY

Flavonoidy jsou fenolické látky s vlastnostmi podobnými vitamínům. Mají výrazné biologické účinky, a proto se také nově označují jako bioflavonoidy.(24)

Základem struktury je chroman arylovaný v poloze 2(flavany), 3(isoflavany) nebo 4(neoflavany).



Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavany dělí do několika skupin. Flavany jsou v přírodě hojně rozšířeny v cévnatých rostlinách. Zvláště významné jsou flavonoidy-flavony, flavonoly a flavanony, a katechinové tříslovinové deriváty flavanu. Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin.

Flavonoidy se v rostlinách vyskytují většinou glykosidně vázané, rozpuštěné v buněčné šťávě vakuoly. Methoxylované deriváty jsou lipofilní a vyskytují se v silicích. V živém rostlinném organismu se flavonoidy patrně účastní oxidačně redukčních pochodů.

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemoragicky a antiedematózně (P-vitaminový účinek). Jsou inhibitory hyaluronidázy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi, jsou proto podpůrnými prostředky při léčení infekčních nemocí. Některé působí diuretický, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S ionty Ca^{2+} tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C. Mají též vlastnosti choleretické, cholagogní a spasmolytické.(25) Mimoto je prokázán regenerační účinek na jaterní tkáň, účinek uroseptický. Všechny obecně působí jako geriatrika, především pro jejich protektivní a regenerační účinek na stárnoucí organismus. Nově se hovoří i o kancerostatickém působení některých flavonoidů.(24)

Jako příklad lze uvést flavonoidní glykosid scutellarin obsažený ve *Scutellaria albida*. Působí spasmolyticky, sedativně, potlačuje nervové vypětí. Uplatnění nachází také při záchvatech hysterie a epilepsie.(30) Flavonoid diosmin (izolovaný z různých druhů rostlin) působí při chronické venózní insuficienci, hemeroidech, lymfedému a jako antioxidant. Své uplatnění nachází také při léčbě pacientů s diabetem 1. typu a u pacientů s rakovinou (účinek chemoprotektivní a antiproliferativní). Další možné použití je na dermatitis, premenstruační syndrom, mastitis, dermatofibrosclerosis, virové infekce a colitis.(31) Flavonoid (3,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavon) a flavonoidní glykosid (3,3'-dihydroxy-4'-methoxyflavon-7-O- β -D-glukopyranosid) byly izolovány z kořenů *Butea superba* Roxb. Tyto látky se používají k léčbě diabetu, hypertenze, astmatu, lupénky.(32)

PRODUKCE FLAVONOIDŮ V KALUSOVÝCH KULTURÁCH (6)

Kalusová kultura je kultura dediferencovaných rostlinných buněk na médiu obsahujícím relativně vysokou koncentraci auxinu, nebo kombinaci auxinu a cytokininu v in vitro podmínkách. Kalusové kultury mohou být embryogenetické nebo neembryogenetické. Neembryogenetické kalusové kultury, obsahující větší či menší homogenní shluky dediferencovaných buněk, jsou využívány pro produkci sekundárních metabolitů. Toho je často užíváno pro produkci flavonoidů. Jedinák ve své práci shromáždil data o produkci různých skupin flavonoidů kalusovými kulturami. Některé příklady jsou prezentovány v tabulce č.1.(6)

Madhavi studoval izolaci bioaktivních složek z plodů *Vaccinium myrtillus* a z tkáňových kultur. Plody a kultury byly extrahovány a frakcionovány. Hlavní frakce obsahovaly flavonoidy, jakož i cyanidin-3-galaktosid, cyanidin-3-glukosid, cyanidin-3-arabinosid a proanthocyanidiny. Obsah anthocyanidinu akumulovaný v kalusech byl nižší (0,08mg/g sušiny) než v plodu (27,3mg/g sušiny). Kultury obsahovaly oba oligomerní a polymerní proanthocyanidiny; proanthocyanidiny byly podobně přítomny i v extraktech z plodů.(34)

Dias s kolektivem prezentoval izolaci nové, přírodně se vyskytující látky 6-C-prenylluteolinu společně s luteolin-5,3'-dimethyletherem, luteolin-5-glucosidem a luteolin-3'-glucosidem z kalusů *Hypericum perforatum* var. *angustifolium*.(35) Fedoreyev použil kalusové kultury z různých částí *Maackia amurensis* a provedl analýzu flavonoidů. Objevil, že kultury produkovaly izoflavony daizein, retuzin, genistein, formononetin a pterokarpany maakiain a medicarpin. Maximální výtěžek izoflavonů a pterokarpanů v kalusech byl 20,8mg/g sušiny, což bylo přibližně čtyřikrát více než v mateřské rostlině.(36)

Byly zkoumány kalusové kultury *Genista species* s produkcí izoflavonů fytoestrogenní aktivity. Pro kultury byla používána různě se měnící média a přítomnost nebo absence světla. Nejlepší růst kultury a nejvyšší produkce izoflavonů byla objevena v přítomnosti světla na SH základním médiu obsahujícím 22,6μmol/l 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny, 23,2μmol/l kinetinu a 3%(w/v) sacharózy . Kalusové kultury všech species produkovaly více izoflavonů než mateřské rostliny. In vitro kultury měly nižší obsah esterů genisteinu než mateřské rostliny. Kalusy s nejvyšším obsahem izoflavonů byly získány z *Genista tinctoria*.(6)

Efekt použitých elicitorů (usmrcené buňky *Pseudomonas aeruginosa*, k. linoleová, chromium trichlorid, k. jasmonová, substituované anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny a k. jodoctová) na produkci flavonoidů v kalusových kulturách *Ononis arvensis* L. byl též zkoumán. Všechny testované elicitory výrazně zvyšovaly produkci flavonoidů.(5, 11, 13, 39, 40, 41)

Tabulka č.1 (6)

Druh flavonoidu	Obsahová látka	Rostlina
Flavanony	silymarin silybin	<i>Silybum marianum</i>

	silychristin	
	silydianin	
	sophoraflavon G	<i>Sophora flavescens</i>
	wogonin	<i>Scutellaria columnae</i>
	6-C-prenyl luteolin	<i>Hypericum perforatum var. angustifolium</i>
	luteolin-5,3'-dimethyl ether	
	luteolin-5-glukosid	
	luteolin-3'-glukosid	
flavony	vitexin	<i>Drosophyllum lusitanicum</i>
	isovitexin	
	orientin	
	isoorientin	
	daidzein	<i>Maackia amurensis</i>
	retuzin	
	genistein	
	formononetin	
	lehmanin	<i>Sophora flavescens</i>
Anthocyaniny	cyanidin 3-O-(6-O-(E)-ferulyl- -D-glukopyranosyl)-2-O- -D-xylopyranosyl- -D-glukopyranosid	<i>Glehnia littoralis</i>
	anthocyanin	<i>Hyoscyamus muticus L.</i>
	cyanidin-3-lathyrosid[cyanidin-3-O{β-D-xylopyranosyl(1>2)β-D-galaktopyranosid}]	<i>Daucus carota</i>
	cyanidin 3-β-D-glukopyranosid	
	cyanidin 3-(6"-malonylglukosid)	<i>Taraxacum officinale</i>
	cyanidin-3-galactosid	<i>Vaccinium myrtillus L.</i>
cyanidin-3-glukosid		

3.5. ONONIS ARVENSIS L.

■ POPIS

Jehlice rolní (*Ononis arvensis* L., Fabaceae) je vytrvalá, 30-60 cm vysoká rostlina, polokeřového charakteru. Její kmínky jsou přímé nebo vystoupavé, avšak ani položené větve nezakořeňují. Jsou bez trnů, jen s dlouhými odstálými chlupy a žlázkami (rozdíl od *Ononis spinosa* L.). Má dlaniť složené 3-četné lístky, oválné, zubaté, žlaznatě chlupaté, asi 2,5cm dlouhé. Palisty jsou vejčité. Květenství tvoří hustý hrozen, přičemž květy vyrůstají po dvou z paždí listů. Kalich je žlaznatě chlupatý, koruna růžová nebo i bílá s červenavými žilkami; pavéza je o polovinu delší než křídla. Lusky jsou vejčité, kratší než kalich, žlaznaté a mají po 2 semenech. Kvete od začátku července do poloviny září.(26) Český lékopis 2002 uvádí jako drogu *Ononidis radix*. Matečnou rostlinou je *Ononis spinosa* L. Kořen této rostliny je více či méně zploštělý, zkroucený, rozvětvený, hluboce zvrásněný, na povrchu hnědý, podélně svrasklý. Na příčném řezu je patrná úzká kůra a výrazné vějířovité dřevo. Lom je krátký a vláknitý. Upráškovaná droga je světle hnědý nebo hnědý prášek s těmito charakteristickými znaky: hnědé úlomky korku z tenkostěnných mnohohranných buněk; skupiny ztlustlých úzkých vláken často provázených komůrkovými vlákny s hranolovitými krystaly šťavelanu vápenatého; úlomky cév s četnými malými dvůrky; parenchymatické buňky s hranolovitými krystaly šťavelanu vápenatého.(15)

■ VÝSKYT

Je to kontinentální druh, patříci k evropsko-západoasijskému geoelementu. U nás roste jen v teplejších nížinách a pahorkatinách, ojediněle i v podhorských polohách. Je to rostlina teplomilných porostů, která se sekundárně rozšířila na pastviny, úhory, meze. Dává přednost minerálně bohatším a sušším půdám.(26)

■ OBSAHOVÉ LÁTKY

0,02-0,2% silice neznámého složení, podílející se na účinku drogy. Isoflavonový glykosid ononin (formononetin-7-β-D-glukosid). Aglykon formononetin (7-hydroxy-4'-methoxyisoflavon) má slabě estrogení účinky. Ononid je amorfni látka podobné struktury a vlastností jako glycyrrhizin. Právě saponiny však nejsou přítomny. Triterpen α-onocerin (onokol).(25) Mezi další obsahové látky patří fenolové kyseliny různých typů

(benzo- a fenylypropan kyseliny), menší množství tříslovin, laktonů a sterolů. Důležitým zástupcem je též aglykon formononetin, genistein a biochanin A.(29) Rostlina dále obsahuje 0,02-0,1% esenciálních olejů jakož i trans-anethol, carvon a menthol, částečně též sitosterol.(4)

■ POUŽITÍ

Jako diuretikum vnitřně v nálevu nebo v odvaru, při poruchách látkové výměny, při zadržování vody v organismu, při močových kamencích, zánětech močového měchýře a při revmatických onemocněních. Pro děti je nevhodná. Zevně se užívá při kožních vyrážkách.(27)

Je součástí: Species urologicae Planta, Nephrosal, Species cholagogae Planta(25), Urologická bylinná směs Megafyt.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. PŘÍSTROJE

- Laboratorní analytické váhy Sartorius PRLT A 1
- Spektrofotometr CECIL 1000 SERIES
- Autokláv P S 20 A, Chirana
- Horkovzdušný sterilizátor, Chirana SVS 9/1

- Box s laminárním prouděním, FATRAN LF

4.2. CHEMIKÁLIE

- Destilovaná voda
- Dusičnan stříbrný, p.a.
- Roztok methenaminu, čistý
- Aceton, čistý
- Kyselina chlorovodíková, p.a.
- Ethylester kyseliny octové, p.a.
- Síran sodný bezvodý, čistý
- Chlorid hlinitý, p.a.
- Kyselina octová 99,8%, p.a.
- Metanol, p.a.

4.3. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

K vypracování rigorózní práce jsem použila tkáňovou kulturu odvozenou z kořenové části klíčící rostliny *Ononis arvensis* L. v 54.-57. pasáži.

4.4. PŘÍPRAVA ŽIVNÉHO MÉDIA

Ke kultivaci bylo použito živné médium připravené dle Murashigeho a Skooga ve složení (28):

mg/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,00
KNO_3	1900,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,00
NH_4NO_3	1650,00
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	170,00
FeSO_4	27,84
Na_2EDTA	37,31
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11,50
H_3BO_3	6,20
KI	0,830
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	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 jsem odvážila na analytických vahách, látky používané v malých množstvích jsem pipetovala z koncentrovaných zásobních roztoků. Vše jsem rozpustila v destilované vodě v odměrné baňce na 1000,0 ml a doplnila destilovanou vodou po rysku. Jako stimulant růstu jsem použila roztok kyseliny α -naftyloctové v množství 10 mg na litr živného média.

4.5. 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.

Do každé baňky byl umístěn můstek z filtračního papíru a nalito 30 ml živné půdy. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a poté se nechaly sterilizovat v autoklávu 15 minut při teplotě 121°C. Takto připravené půdy bylo možné použít pro pasážování tkáňových kultur.

Pasážování se provádělo 25. den kultivace kultury v boxu s laminárním prouděním vzduchu, který byl předem vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vysvícen germicidní UV lampou. Před pasáží byl roztokem Ajatinu omyt také hliníkový kryt baněk. K pasážování byly použity sterilní pinzety.

Kultivace kalusové kultury probíhala 3-4 týdny za teploty 25°C a osvětlení s 16-ti hodinovou světelnou periodou.

4.6. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ ELICITORU

Jako elicitor jsem použila dusičnan stříbrný (AgNO_3)

Navážka čisté substance dusičnanu stříbrného (20,0 mg) byla kvantitativně přenesena do odměrné baňky na 1000,0 ml a doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok dusičnanu stříbrného byl vysterilizován v autoklávu (při 121°C 15 min.). Takto byla připravena koncentrace $c_5=20 \text{ mg/l}$ ($11,77 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$).

Odpipetováním 375,0 ml roztoku c_5 do odměrné baňky na 500,0 ml a doplněním destilované vody po rysku byla připravena koncentrace $c_4=15 \text{ mg/l}$ ($8,83 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Roztok byl vysterilizován v autoklávu (při 121°C 15 min.).

Odpipetováním 250,0 ml roztoku c_5 do odměrné baňky na 500,0 ml a doplněním destilované vody po rysku byla připravena koncentrace $c_3=10 \text{ mg/l}$ ($5,89 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Roztok byl vysterilizován v autoklávu (při 121°C 15 min.).

Odpipetováním 125,0 ml roztoku c_5 do odměrné baňky na 500,0 ml a doplněním destilované vody po rysku byla připravena koncentrace $c_2=5 \text{ mg/l}$ ($2,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Roztok byl vysterilizován v autoklávu (při 121°C 15 min.).

Převedením 12,5 ml roztoku c_5 do odměrné baňky na 500,0 ml a doplněním destilované vody po rysku byla připravena koncentrace $c_1=0,5 \text{ mg/l}$ ($0,29 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Roztok byl vysterilizován v autoklávu (při 121°C 15 min.).

4.7. ELICITACE IN VITRO KULTUR

Elicitace kalusových kultur byla prováděna po 3-4 týdnech od poslední pasáže. Ke vnášení roztoku elicitoru byly použity sterilní pipety.

K elicitaci bylo vždy použito 40 baněk pro každou koncentraci elicitoru (c_1 , c_2 , c_3 , c_4 , c_5). Do 30 baněk byl přidán 1 ml roztoku elicitoru dané koncentrace a 10 baněk bylo použito jako kontrola bez přidaného elicitoru.

Kalusy byly odebírány po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách působení elicitoru. Kontrolní kalusy se odebíraly po 24 a 168 hodinách. V rámci každého časového intervalu působení elicitoru včetně kontrol bylo k odběru použito 5 baněk.

Kalusy se po vyjmutí z baněk sušily na filtračním papíru za laboratorní teploty.

Usušené kalusy se nakonec upráškovaly v třence s těrkou a použily ke stanovení flavonoidů dle ČL 2002.

4.8. STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ

Stanovení flavonoidů bylo provedeno fotometricky dle metody uvedené v ČL 2002.(15)

Postup stanovení:

Navážka (g) upráškovaného kalusu byla ve 100 ml baňce s kulatým dnem smíchána s 1 ml roztoku methenaminu R (5 g/l), 20 ml acetonu R a 2 ml kyseliny chlorovodíkové RS a vařena 30 min pod zpětným chladičem. Roztok se zfiltraval přes chomáček vaty. Droga i chomáček vaty se vařily 10 min ještě dvakrát s 20 ml acetonu R pod zpětným chladičem. Po ochlazení se každý extrakt zfiltraval přes chomáček vaty. Spojené acetonové extrakty se zfiltrovaly přes filtrační papír do 100,0 ml odměrné baňky a zředily se acetonem R předem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převedlo do dělicí nálevky, přidalo se 20 ml vody R a protřepávalo se 15 ml a pak třikrát 10 ml ethyl-acetátu. Spojené ethylacetátové vrstvy se protřepaly dvakrát 50 ml vody R, zfiltrovaly se přes 10 g síranu sodného bezvodého R do odměrné baňky a zředily se ethyl-acetátem R na 50,0 ml. Tímto postupem byl připraven **základní roztok**.

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

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

Po 30-ti minutách byla naměřena absorbance zkoušeného roztoku při maximu 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech se vypočítal podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

kde A je absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm a m je navážka drogy v gramech.(15)

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

4.9. STANOVENÍ ZTRÁTY SUŠENÍM

Do tří předem vysušených váženek se na analytických vahách odvážil přesně 1,000 g vzorku a sušil se 2 hodiny v sušárně při 105°C. Vysušené vzorky na váženkách byly uchovány v exsikátoru do vychladnutí a poté byly zváženy na analytických vahách. Hmotnost sušiny byla vztažena na hmotnost vzorku a vyjádřena v hmotnostních procentech.(15)

Byl vypočítán aritmetický průměr těchto tří měření.

4.10. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Pro zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah flavonoidů byl použit t-test rozdílu 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** vypočteným 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 .(33)

Pro zjištění obsahu flavonoidů byla vždy provedena tři paralelní stanovení. Z toho vyplývá, že počet členů souboru $n_1 = n_2 = 3$ a počet stupňů volnosti $v = 4$.

Pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ a čtyři stupně volnosti je kritická hodnota $t(v)_p = 2,78$.

Výsledky jsou statisticky významné, je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než kritická hodnota.

Při výpočtu hodnot testovacího kritéria pro odběry po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách byla jako kontrolní hodnota použita hodnota odběru po 24 hodinách a pro odběr po 168 hodinách byla použita kontrola odebraná po 168 hodinách.

5. VÝSLEDKY

Tab.č.2. Obsah flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. po elicitaci roztokem $AgNO_3$ v různých koncentracích a dobách odběru.

Koncentrace elicitoru [mg/l]	Hodina odběru	Obsah flavonoidů [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C_1	6	0,0169	0,002	6,7
	12	0,0323	0,004	9,11

	24	0,0362	0,002	16,35
	24K	0,0035	0,002	-
	48	0,0030	0,001	0,31
	72	0,0090	0,002	2,75
	168	0,0234	0,002	10,31
	168K	0,0071	0,001	-
C₂	6	0,0051	0,004	0,5
	12	0,0099	0,003	2,51
	24	0,0039	0,002	0,2
	24K	0,0035	0,002	-
	48	0,0301	0,002	13,3
	72	0,0102	0,001	4,23
	168	0,0201	0,003	5,81
	168K	0,0071	0,001	-

24k.....kontrola po 24 hodinách

168k...kontrola po 168 hodinách

$C_1 = 0,5 \text{ mg/l} = 0,29 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$

$C_2 = 5 \text{ mg/l} = 2,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$

**Tab.č.3. Obsah flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L.
po elicitaci roztokem AgNO₃ v různých koncentracích a
dobách odběru.**

Koncentrace elicitoru [mg/l]	Hodina odběru	Obsah flavonoidů [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C₃	6	0,0045	0,004	0,31
	12	0,0107	0,003	2,82
	24	0,0098	0,001	3,98
	24K	0,0035	0,002	-
	48	0,0059	0,002	1,2
	72	0,0357	0,003	12,63
	168	0,0228	0,004	5,39
	168K	0,0071	0,001	-
C₄	6	0,0227	0,004	6,07
	12	0,0163	0,002	6,4
	24	0,0051	0,002	0,8
	24K	0,0035	0,002	-
	48	0,0051	0,001	1,01
	72	0,0229	0,003	7,61
	168	0,0338	0,002	16,89
	168K	0,0071	0,001	-

24k.....kontrola po 24 hodinách

168k...kontrola po 168 hodinách

$$C_3=10 \text{ mg/l}=5,89 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

$$C_4=15 \text{ mg/l}=8,83 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

Tab.č.4. Obsah flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. po elicitaci roztokem AgNO₃ v různých koncentracích a dobách odběru.

Koncentrace elicitoru [mg/l]	Hodina odběru	Obsah flavonoidů [%]	Směrodatná odchylka	Hodnota testovacího kritéria
C₅	6	0,0338	0,001	19,16
	12	0,0290	0,002	12,75
	24	0,0165	0,002	6,5
	24K	0,0035	0,002	-

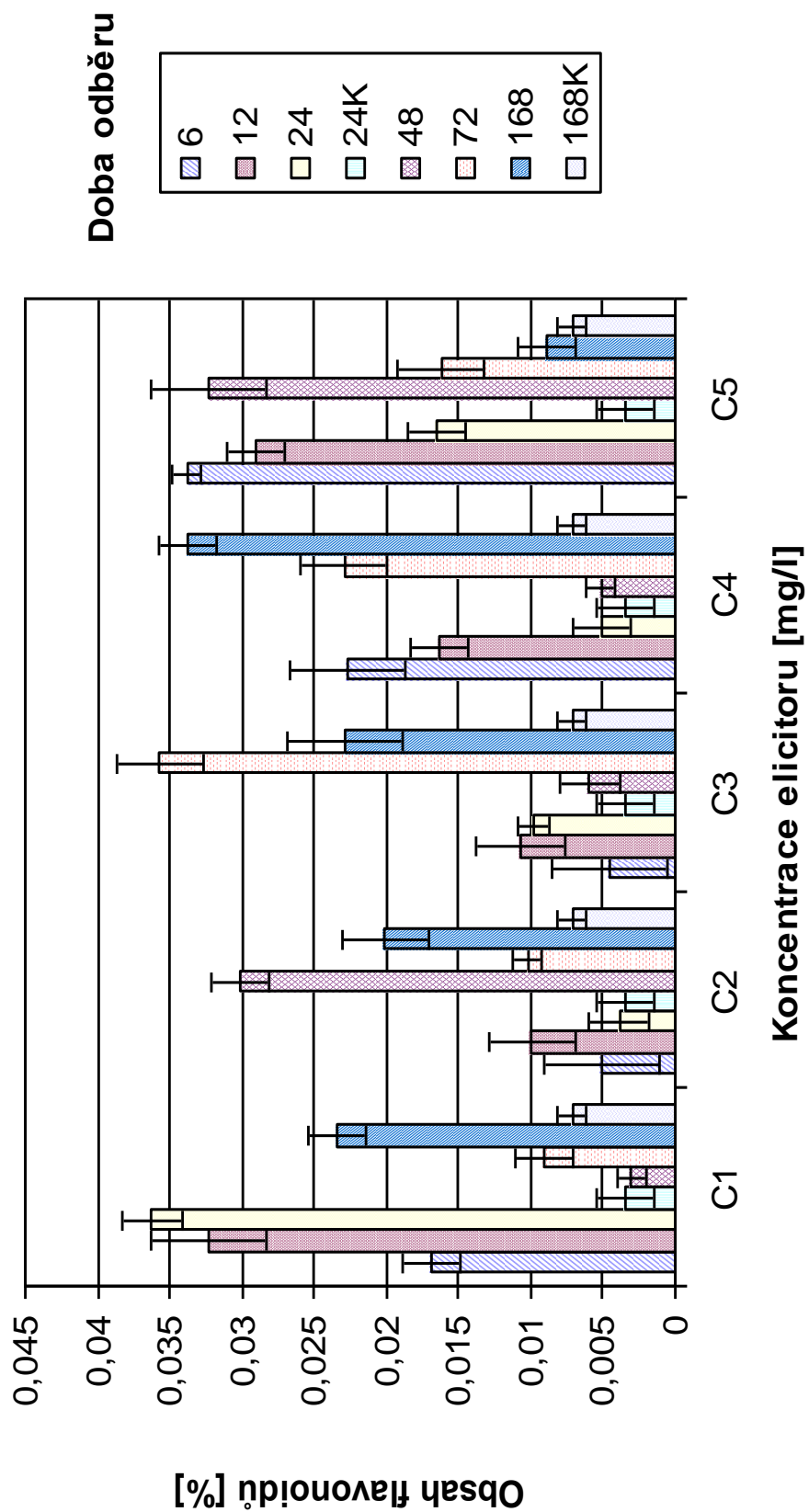
	48	0,0323	0,004	9,11
	72	0,0162	0,003	4,98
	168	0,0089	0,002	1,14
	168K	0,0071	0,001	-

24k.....kontrola po 24 hodinách

168k...kontrola po 168 hodinách

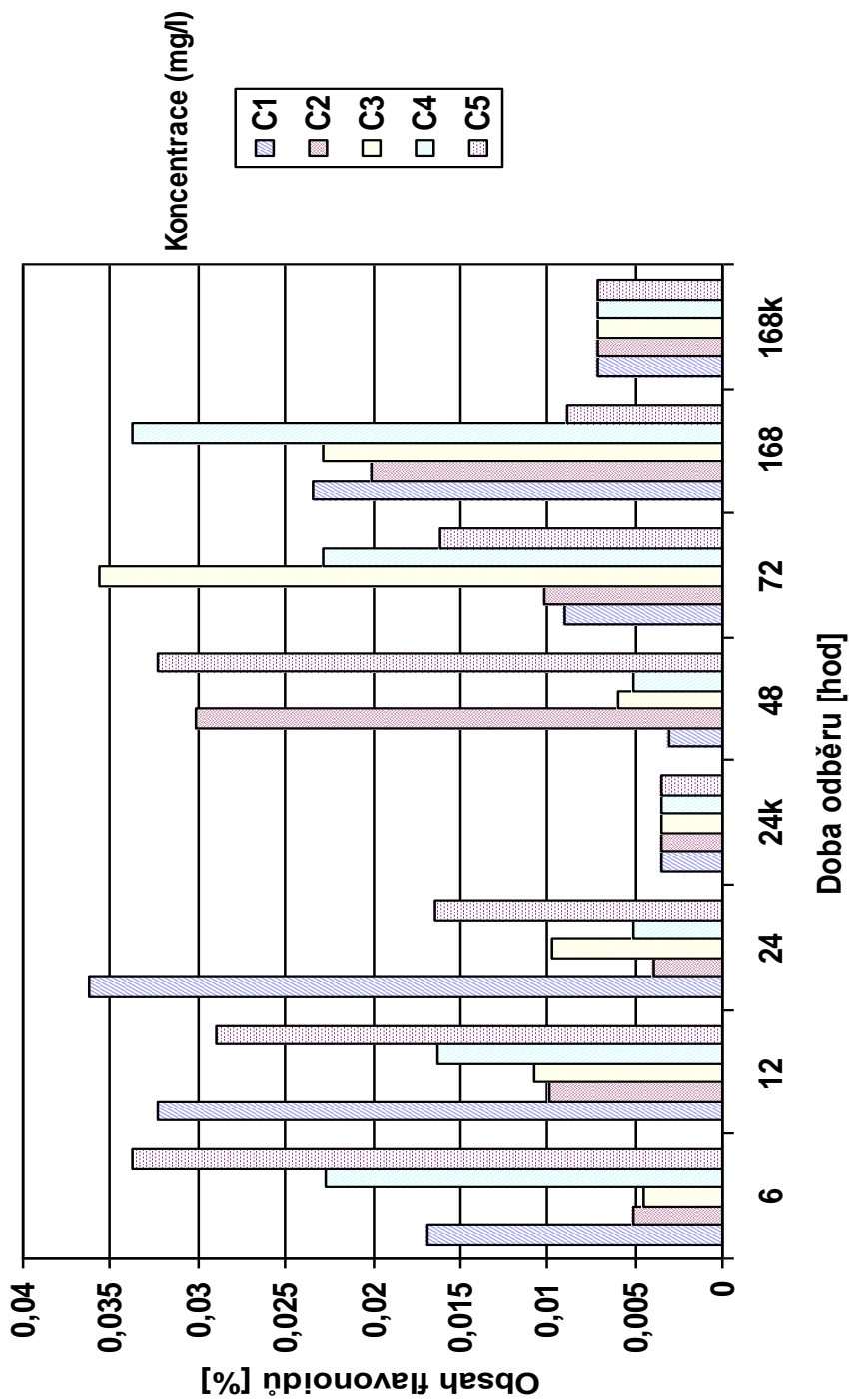
$$C_5=20 \text{ mg/l}=11,77 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

Graf
č.1.
Obsah



flavonoidů v závislosti na koncentraci roztoku elicitoru

v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L.



Graf č.2.
Obsah

flavonoidů v závislosti na době odběru

v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L

6. DISKUSE

Elicitace rostlinných kultur je metoda, při které jsou využívány obranné reakce rostlin za účelem zvýšení produkce sekundárních metabolitů v podmínkách in vitro. Předpokladem

úspěchu této metody je použití vhodného elicitoru o určité koncentraci za optimálních podmínek a doby působení.

Cílem mé práce bylo stanovit obsah sekundárních metabolitů- flavonoidů, produkovaných kulturou *Ononis arvensis* L., která byla kultivována na médiu podle Murashigeho a Skooga s přídatkem 10 mg/l kyseliny α -naftyloctové, po působení abiotického elicitoru - dusičnanu stříbrného. Elicitor jsem dodávala ke kalusové kultuře kultivované na papírových můstcích syčených živným médiem v pěti různých koncentracích: $c_1=0,5$ mg/l ($0,29 \cdot 10^{-5}$ mol/l)

$$c_2=5 \text{ mg/l } (2,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l})$$

$$c_3=10 \text{ mg/l } (5,89 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l})$$

$$c_4=15 \text{ mg/l } (8,83 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l})$$

$$c_5=20 \text{ mg/l } (11,77 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l})$$

Elicitor byl v kontaktu s kulturou 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin.

Obsah flavonoidů jsem stanovovala spektrofotometricky podle ČL 2002.

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že ke statisticky významnému zvýšení obsahu flavonoidů došlo po aplikaci elicitoru v koncentraci c_1 po 6, 12, 24 a 168 hodinách; v koncentraci c_2 po 48, 72 a 168 hodinách (viz. Tabulka 2, Graf 1); v koncentraci c_3 po 12, 24, 72 a 168 hodinách; v koncentraci c_4 po 6, 12, 72 a 168 hodinách (viz. Tabulka 3, Graf 1); v koncentraci c_5 po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách (viz. Tabulka 4, Graf 1).

U koncentrace c_1 byl maximální nárůst produkce po 24 hodinách elicitace- o 934%; u koncentrace c_2 byl maximální nárůst produkce po 48 hodinách elicitace - o 760%; u koncentrace c_3 po 72 hodinách - o 920%; u koncentrace c_4 též po 72 hodinách - o 554%; u koncentrace c_5 po 6 hodinách - o 866% v porovnání s kontrolou.

U koncentrací c_2 , c_3 , c_4 a c_5 byly všechny naměřené hodnoty obsahu flavonoidů vyšší než u kontrolních vzorků. U koncentrace c_1 byl zaznamenán pokles obsahu flavonoidů po 48 hodinách a to o 14% v porovnání s kontrolou.

Nejvyšší nárůst obsahu flavonoidů nastal po elicitaci roztokem AgNO_3 o koncentraci c_1 po 24 hodinách, a sice o 934% ve srovnání s kontrolou.

Experimenty provedené v minulých letech prokázaly, že po elicitaci solemi těžkých kovů dochází ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinných tkáních. Například u kultury *Ononis arvensis* L. in vitro bylo pozorováno zvýšení produkce flavonoidů po elicitaci CdCl_2 a CuSO_4 . Vliv elicitorů byl sledován po 24, 48 a 168 hodinové aplikaci. Statisticky významný nárůst produkce flavonoidů byl zaznamenán při použití roztoku CdCl_2 v koncentraci 0,5 mg/l a koncentraci 0,05 mg/l po 48 hodinách kultivace, u koncentrace 0,005 mg/l po 24 i 48 hodinách kultivace. U roztoku CuSO_4 v koncentraci 0,5 mg/l po 48 i

168 hodinách. Nejvyšší nárůst hladiny flavonoidů byl zjištěn po elicitaci CdCl_2 v koncentraci 0,005 mg/l, kde se produkce zvýšila o 67% oproti kontrole po 48 hodinách kultivace.(10)

Další ze studií sledovala vliv síranu vanadydu na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. Maximální zvýšení tvorby flavonoidů nastalo v kalusové kultuře po 24 hodinové elicitaci síranem vanadydu v koncentraci $1,227 \cdot 10^{-4}$ mol/l a to o 313% oproti kontrole a v suspenzní kultuře u koncentrace $1,227 \cdot 10^{-6}$ mol/l po 48 hodinovém působení elicitoru o 485% ve srovnání s kontrolou.(14)

V kalusové a suspenzní kultuře *Ononis arvensis* L. byl také sledován vliv chloridu chromitého po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinové aplikaci. Statisticky významný nárůst produkce flavonoidů byl zaznamenán při použití roztoku CrCl_3 v koncentraci $6,32 \cdot 10^{-4}$ mol/l po 24, 48, 72 a 168 hodinách, u koncentrace $6,32 \cdot 10^{-6}$ mol/l po 24, 48 a 72 hodinách a u koncentrace $6,32 \cdot 10^{-8}$ mol/l po 12, 24 a 48 hodinách. U suspenzní kultury statisticky významně zvyšovaly produkci flavonoidů koncentrace $6,32 \cdot 10^{-4}$ mol/l po 12 a 72 hodinách, koncentrace $6,32 \cdot 10^{-6}$ mol/l po 12, 24, 48 a 72 hodinách a koncentrace $6,32 \cdot 10^{-8}$ mol/l po 12, 24, 48 a 72 hodinách. Maximální zvýšení tvorby flavonoidů o 98% nastalo v kalusové kultuře po elicitaci roztokem CrCl_3 v koncentraci $6,32 \cdot 10^{-8}$ mol/l po 48 hodinách aplikace a v suspenzní kultuře po elicitaci CrCl_3 o koncentraci $6,32 \cdot 10^{-6}$ mol/l po 12 hodinách o 100%.(11)

Další práce sledovala vliv elicitorů NiCl_2 a CoCl_2 na produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis* L. Prudký nárůst produkce flavonoidů o 308% byl zaznamenán po elicitaci CoCl_2 v koncentraci $2,1 \cdot 10^{-7}$ mol/l po 24 hodinách. Naproti tomu hladina flavonoidů značně poklesla po použití CoCl_2 v koncentraci $4,2 \cdot 10^{-7}$ mol/l po 48 hodinách nebo po použití NiCl_2 v koncentraci $2,1 \cdot 10^{-8}$ mol/l po 48 hodinách. Po použití NiCl_2 v koncentraci $2,1 \cdot 10^{-7}$ mol/l vzrostla produkce flavonoidů po 24 hodinách o 283%. Maximálního nárůstu produkce flavonoidů – o 700% bylo dosaženo po použití NiCl_2 v koncentraci $4,2 \cdot 10^{-7}$ mol/l po 24 hodinách.(37)

Signifikantní nárůst obsahu flavonoidů u kalusové kultury *Ononis arvensis* L. byl pozorován po 48 hodinách po elicitaci 5,941 nM HgCl_2 – zvýšení obsahu o 75% oproti kontrole, nebo 11,900 nM HgCl_2 – zvýšení o 109% oproti kontrole.(38)

U explantátové kultury *Rheum palmatum* L. bylo maximální zvýšení obsahu anthracenových derivátů dosaženo po působení 10 μM roztoku chloridu kademnatého po 48 hodinách a po působení 100 μM roztoku chloridu hlinitého po 6 hodinách.(12)

U kultury *Salvia miltiorrhiza* měl význam přídavek elicitoru 15-40 μM roztoku $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Dvojnásobný nárůst produkce byl zaznamenán 12. a 22. den.(16)

Suspenzní kultury *Sussurea medusa* produkují jaceosidin a hispidulin. V kulturách proběhl pokus s elicitory AgNO_3 a glutathionem. Přídavek AgNO_3 nebo glutathionu zvýšil produkci obou látek. Přidáním obou elicitorů současně dosáhla produkce jaceosidinu a hispidulinu ještě vyšších hodnot.(20)

Z výše uvedených studií vyplývá, že při použití jednotlivých abiotických elicitorů ve formě solí těžkých kovů u kultury *Ononis arvensis* L. in vitro došlo k rozdílným maximálním nárůstům produkce flavonoidů. V případě použití CdCl_2 to bylo o 67% po 48 hodinách

aplikace, u VOSO_4 v kalusové kultuře o 313% po 24 hodinách a v suspenzní kultuře o 485% po 48 hodinách. Po elicitaci CrCl_3 nastalo zvýšení v kalusové kultuře o 98% po 48 hodinách a v suspenzní kultuře o 100% po 12 hodinách, u CoCl_2 o 308% po 24 hodinách, u NiCl_2 o 700% po 24 hodinách, u HgCl_2 o 109% po 48 hodinách a u AgNO_3 o 934% po 24 hodinách.

To znamená, že nejvyšší procentuální nárůst produkce flavonoidů v kultuře *Ononis arvensis* L. in vitro nastal po použití elicitoru AgNO_3 (934%) po 24 hodinách v koncentraci $0,29 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Další významný maximální nárůst byl zaznamenán u NiCl_2 (700%) též po 24 hodinách v koncentraci $4,2 \cdot 10^{-7}$ mol/l a třetí nejvyšší maximální nárůst byl zaznamenán u suspenzní kultury elicitované VOSO_4 (485%) po 48 hodinách v koncentraci $1,227 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Naopak nejnižší maximální nárůst produkce flavonoidů (67%) byl zjištěn při použití CdCl_2 v koncentraci 0,005 mg/l po 48 hodinách.

Je též zajímavé, že maximální zvýšení produkce flavonoidů nastalo ve většině případů po 24 nebo 48 hodinovém působení elicitorů, což lze vysvětlit tím, že buňky kultury in vitro reagují na působení elicitorů poměrně rychle.

7. ZÁVĚR

Ze získaných poznatků můžeme učinit následující závěry:

■ Statisticky významný nárůst obsahu flavonoidů oproti kontrole byl zjištěn v kalusové kultuře po aplikaci roztoku elicitoru u koncentrace c_1 po 6, 12, 24 a 168 hodinách, u koncentrace c_2 po 48, 72 a 168 hodinách, u koncentrace c_3 po 12, 24, 72 a 168 hodinách, u koncentrace c_4 po 6, 12, 72 a 168 hodinách, u koncentrace c_5 po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách.

■ Maximální zvýšení produkce flavonoidů nastalo u koncentrace c_1 ($0,29 \cdot 10^{-5}$ mol/l) po 24 hodinách, a sice o 934% ve srovnání s kontrolou.

■ Ke snížení obsahu flavonoidů oproti kontrole došlo pouze u koncentrace c_1 po 48 hodinách a to o 14%.

Dusičnan stříbrný je významným elicitorem produkce flavonoidů. Výhoda jeho využití, jako zástupce ze skupiny abiotických elitorů, spočívá v jeho nižší ceně a snadnější dostupnosti vůči biotickým elitorům.

8. SEZNAM LITERATURY

- (1) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum Praha, 75-79, 84-86, 94 (2001)
- (2) Kováč J.: Explantátové kultury rostlin, Univerzita Palackého, Olomouc, 1, 13-18, 26-27, 41-49, 79 (1995)
- (3) Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. et al.: Fyziologie rostlin, Academia Praha, 412-430 (1998)
- (4) Wichtl M.: Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Scientific Publisher Stuttgart, 355 (1994)
- (5) Tůmová L., Zápalková L.: Česká a slovenská farmacie 51(2), 96-98 (2002)
- (6) Jedinák A., Faragó J., Pšenáková I., Maliar T.: Biologia, Bratislava 59(6), 701-702, 704-705 (2004)
- (7) Bhuiyan M. N., Adachi T.: Journal of Plant Physiology 160(9), 1117-1124 (2003)
- (8) Królicka A., Lojkowska E., Staniszewska I., Malinski E. et al.: ISHS Acta Horticulture, IV. International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Tampere-Finland, (30 October 2001) 560
- (9) Kašparová M., Siatka T., Dušek J.: Česká a slovenská farmacie 52(5), 248-251 (2003)
- (10) Tůmová L., Rusková R.: Česká a slovenská farmacie 47(6), 261-263 (1998)
- (11) Tůmová L., Blažková R.: Česká a slovenská farmacie 51(1), 44-46 (2002)
- (12) Kašparová M., Siatka T.: Česká a slovenská farmacie 53(5), 252-255 (2004)
- (13) Tůmová L., Ostrožlík P.: Česká a slovenská farmacie 51(4), 173-176 (2002)
- (14) Tůmová L., Skálová R., Dušek J.: Česká a slovenská farmacie 54(3), 151-154 (2005)
- (15) Kolektiv autorů: Český lékopis 2002, svazek 1., 3., 4., Grada Praha, 134, 3665-3666, 4117-4118 (2002)
- (16) Zhahg Ch., Yan Q., Cheuk W. K., Wu J. Y.: Planta medica 70(2), 147-151 (2004)
- (17) Mert-Turk F., Bennet M. H., Mansfield J. W., Holub E. B.: Physiological and molecular plant pathology 62(3), 137-145 (2003)
- (18) Martin K. P.: In vitro cellular et developmental biology-plant 40(2), 204-209 (2004)
- (19) Han J. S., Oh D. G., Mok I. G., Park H. G. et al.: Plant cell reports 23(5), 291-296 (2004)

- (20) Zhao D. X., Fu C. X., Han Y. S., Lu D. P.: *Process biochemistry* 40(2), 739-745 (2005)
- (21) Buyukalaca S., Comlekcioglu N., Abak K., Ekbic E. et al.: *European journal of horticultural science* 69(5), 206-209 (2004)
- (22) Girindhar P., Indu E. P., Vinod K., Chandrashekar A. et al.: *Acta physiologiae plantarum* 26(3), 299-305 (2004)
- (23) <http://cs.wikipedia.org/wiki>
- (24) Janča J., Zentrich J. A.: *Herbář léčivých rostlin, Eminent*, 1. díl, 52 (1994)
- (25) Hubík J., Dušek J., Spilková J., Šícha J.: *Obecná farmakognosie II.*, SPN Praha, 31-36 (1989)
- (26) Randuška D., Šomšák L., Háberová I.: *Barevný atlas rostlin*, Vydavatel'stvo Obzor Bratislava, 664 (1986)
- (27) Korbelař E., Endris Z.: *Naše rostliny v lékařství*, Avicenum Praha, 172 (1981)
- (28) Murashige T., Skoog F.: *Journal of plant physiology* 15, 473 (1962)
- (29) Council of Europe: *European Pharmacopoeia*, 4. vydání, 1857 (2002)
- (30) <http://www.ienica.net/crops/skullcap.htm>
- (31) http://www.findarticles.com/p/articles/mi_mOFDN/is_3_9/ai_n6228169/print
- (32) http://www.jelitawan.com/bmresearch_copy.htm
- (33) Reisenauer R.: *Metody matematické statistiky*, SNTL Praha, 78-81 (1970)
- (34) Madhavi D.L., Bomser J., Smith M.A.L., Singletary K.: *Plant Science* 1(131), 95-103 (1998)
- (35) Dias A.C.P., Tomás-Barberán F.A., Fernandes-Ferreira M., Ferreres F.: *Phytochemistry* 7(48), 1165-1168 (1998)
- (36) Fedoreyev S.A., Pokuskalova T.V., Veselova M.V., Glebko L.I. et al.: *Fitoterapia* 4(71), 365-372 (2000)
- (37) Tůmová L., Poustková J., Tůma J.: *Acta Pharmaceutica* 51(2), 159-162 (2001)
- (38) Tůmová L., Tůma J., Staňková J.: Heavy metals elicitation and the flavonoid production in *Ononis arvensis* L. culture in vitro, *Herba Pol.* 44(1), 27-32 (1998)
- (39) Tůmová L.: *Česká a slovenská farmacie* 48(6), 262-264 (1999)
- (40) Tůmová L., Bartáková M., Zabloudivá J.: *Česká a slovenská farmacie* 52(4), 189-192 (2003)
- (41) Tůmová L., Dušek J.: *Česká a slovenská farmacie* 49(2), 78-81 (2000)