

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakognozie

Produkce sekundárních metabolitů in vitro

Diplomová práce

Jana Špalová

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

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

OPONENT: PharmDr. MARIE KASPAŘOVÁ, Ph.D.

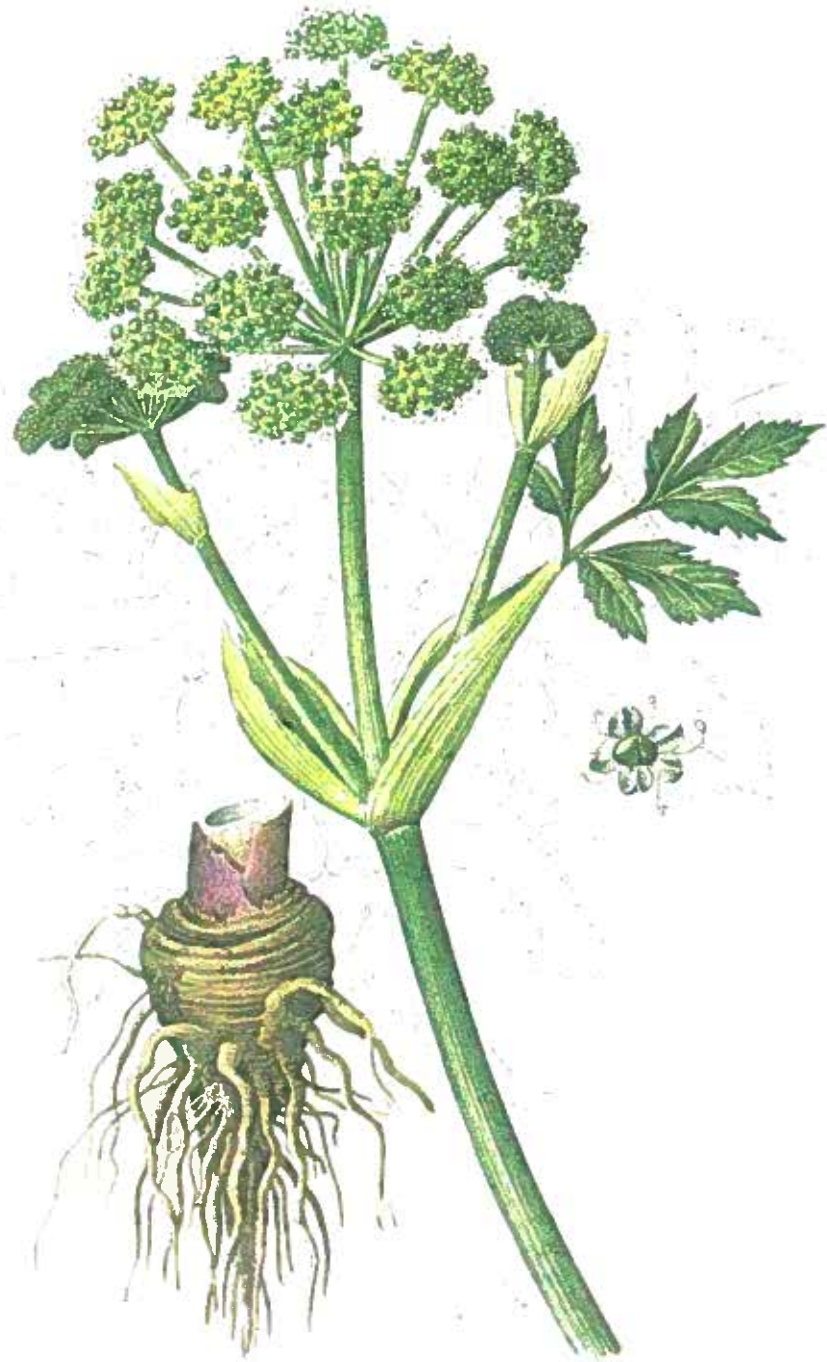
Den obhajoby: 06.06.2006

180

Katedra
farmakognozie
Farmaceutická
v Hradci Králové

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použila pouze uvedenou literaturu.

Úvodem bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce PharmDr. Tomáši Siatkovi, CSc. za jeho vstřícnost, odborné vedení a ochotnou pomoc, které mi při vypracování poskytl.



| | |
|---|-----------|
| 1. Úvod..... | 7 |
| 2. Cíl práce..... | 9 |
| 3. Teoretická část..... | 10 |
| 3.1. Andělíka lékařská | 10 |
| 3.1.1. Popis rostliny | 10 |
| 3.1.2. Výskyt rostliny | 10 |
| 3.1.3. Charakteristika drog | 12 |
| 3.1.4. Sběr drog | 12 |
| 3.1.5. Obsahové látky | 12 |
| 3.1.6. Užití drog | 13 |
| 3.1.7. Toxicita | 13 |
| 3.2. Kumariny | 14 |
| 3.2.1. Chemická struktura | 14 |
| 3.2.2. Biologické a terapeutické účinky | 16 |
| 3.3. Rostlinné explantáty | 18 |
| 3.3.1. Základní pojmy | 18 |
| 3.3.2. Rozdělení explantátových kultur | 18 |
| 3.3.3. Vlastnosti explantátových kultur | 19 |
| 3.3.4. Kultivace | 19 |
| 3.3.5. Živná média | 20 |
| 3.3.6. Fyzikální podmínky kultivace | 21 |
| 3.3.7. Produkce sekundárních metabolitů | 22 |
| 3.3.8. Využití explantátových kultur | 23 |
| 3.4. Elicitace | 24 |
| 3.4.1. Schéma průběhu stresové reakce..... | 24 |
| 3.4.2. Obranné reakce | 24 |
| 3.4.3. Elicitace, fytoalexíny | 25 |
| 3.4.4. Elicitory | 25 |
| 3.5. Měď' | 27 |
| 3.5.1. Minerální výživa rostlin | 27 |
| 3.5.2. Měď' | 27 |
| 3.5.3. Toxicita těžkých kovů | 28 |
| 4. Experimentální část..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. Přístroje | 29 |
| 4.2. Chemikálie..... | 29 |
| 4.3. Tkáňová kultura Angelica archangelica L. | 30 |
| 4.3.1. Tkáňová kultura | 30 |
| 4.3.2. Kultivace tkáňové kultury | 30 |
| 4.3.3. Živné médium podle Murashigeho a Skooga | 30 |
| 4.4. Stanovení skopoletinu | 31 |
| 4.5. Statistické zpracování | 32 |
| 5. Výsledky..... | 33 |
| 6. Diskuse..... | 37 |
| 7. Závěr | 39 |
| 8. Seznam použité literatury..... | 40 |

1. Úvod

Rostliny jsou součástí lidského života od počátku jeho existence. Člověk byl nucen hledat rostliny jako potravu. Nacházel však i takové, po jejichž požití se dostavily určité účinky. Tlumily bolest, vyvolávaly spánek apod., nebo působily i toxicky. (17)

Od starověku až do počátku novověku tvořily léčivé rostliny základ tehdejší „materia medica“ – souboru léčiv. Sušené drogy sloužily tehdy nejen k přípravě čajů, ale už i k přípravě tinktur a extraktů, kapek, sirupů, nálevů, vývarů, mastí atd. Koncem 18. a začátkem 19. století vyvrcholila, ale zároveň už také odeznívala, proslulost léčivých rostlin, do té doby ničím nedotčena. (2) V druhé polovině 19. století v návaznosti na pokroky v chemii lékárníci izolovali z drog účinné látky. (2, 17) Objevila se i první syntetická léčiva, jež postupně zatlačila drogy a ovládla terapii.

Dnešní význam léčivých rostlin tkví například v izolaci látek, jejichž syntéza není známa, nebo je ekonomicky nevýhodná. Z rostlin a jejich drog se připravují galenické přípravky jako extrakty nebo tinktury. Drogy jsou také základní surovinou pro přípravu čajových směsí. Chemickou obměnou stávajících struktur látek léčivých rostlin lze získat látky s lepším nebo jiným účinkem.

Léčivé účinky některých druhů rostlin podmiňuje přítomnost určitých látek nebo skupin látek, které rostlina vytváří během své ontogeneze. Rostlinné metabolity dělíme na produkty primárního a produkty sekundárního metabolismu rostlin. Produkty primárního metabolismu jsou pro rostlinu nepostradatelnými energetickými a stavebními látkami. Pro člověka jsou však z hlediska léčivosti významnější produkty sekundárního metabolismu. (2)

Planě rostoucí a na polích pěstované léčivé rostliny jsou ovlivněny mnoha činiteli jako jsou škůdci, choroby, kontaminace v důsledku poškozování životního prostředí. Zároveň však vzrůstají nároky farmaceutického průmyslu. (14) Hledají se proto nové možnosti získávání přírodních látek. Jednou z nich je biotechnologická metoda pěstování rostlinných buněk, pletiv a orgánů. Stejně jako někteří činitelé působí na tvorbu sekundárních metabolitů u planě rostoucích či pěstovaných rostlin, můžeme pomocí různých faktorů působit na produkci sekundárních metabolitů

in vitro. Mechanismy řídící sekundární metabolismus nejsou doposud do detailu známy, je třeba hledat u každé konkrétní kultury optimální produkční podmínky. (28)

1. Cíl práce

Cílem této práce je sledování vlivu síranu měďnatého v různých koncentracích na produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L.

3. Teoretická část

3.1. Andělíka lékařská

3.1.1. Popis rostliny

Archangelica officinalis (MOENCH HOFFM.), *Angelica archangelica* L.

Dvouletá až čtyřletá mohutná bylina. Hyne po odkvětu. Vyznačuje se aromatickou kořenitou vůní. Oddenek je řepovitý, svrasčitý s bělavou nebo žlutavou mlékovitou šťávou, s množstvím jemných kořenů. Tvoří přímou lodyhu, která je v horní polovině větvená, oblá, nezřetelně rýhovaná, zelené nebo tmavě nachové barvy, s velkou centrální dutinou. Lodyha dorůstá až do výšky dvou metrů. Listy jsou střídavé, dvakrát až třikrát trojně speřené, v obrysu trojúhelníkovité. Přízemní listy jsou dlouho řapíkaté, přisedají mohutnou pochvou. Lístičky jsou vejčité, nestejně hrubě ostře pilovité s bíle hrotitými zuby.

Květenství tvoří velké okolíky z dvaceti až čtyřiceti okolíčků. Kalich je nezřetelný. Korunní lístky jsou zeleně bělavé až žlutozelené barvy. Květy jsou oboupohlavé, paprscité, medově vonné. Rostlina kvete v červenci a v srpnu.

Plodem jsou elipsoidní bledožluté dvounažky, ze hřbetu smáčklé, po stranách křídlaté. V době zralosti, tj. v srpnu a září, se svisle odzdola dělí ve dvě nažky. (1, 2)

Botanické znaky rostliny – obr. 1. (1)

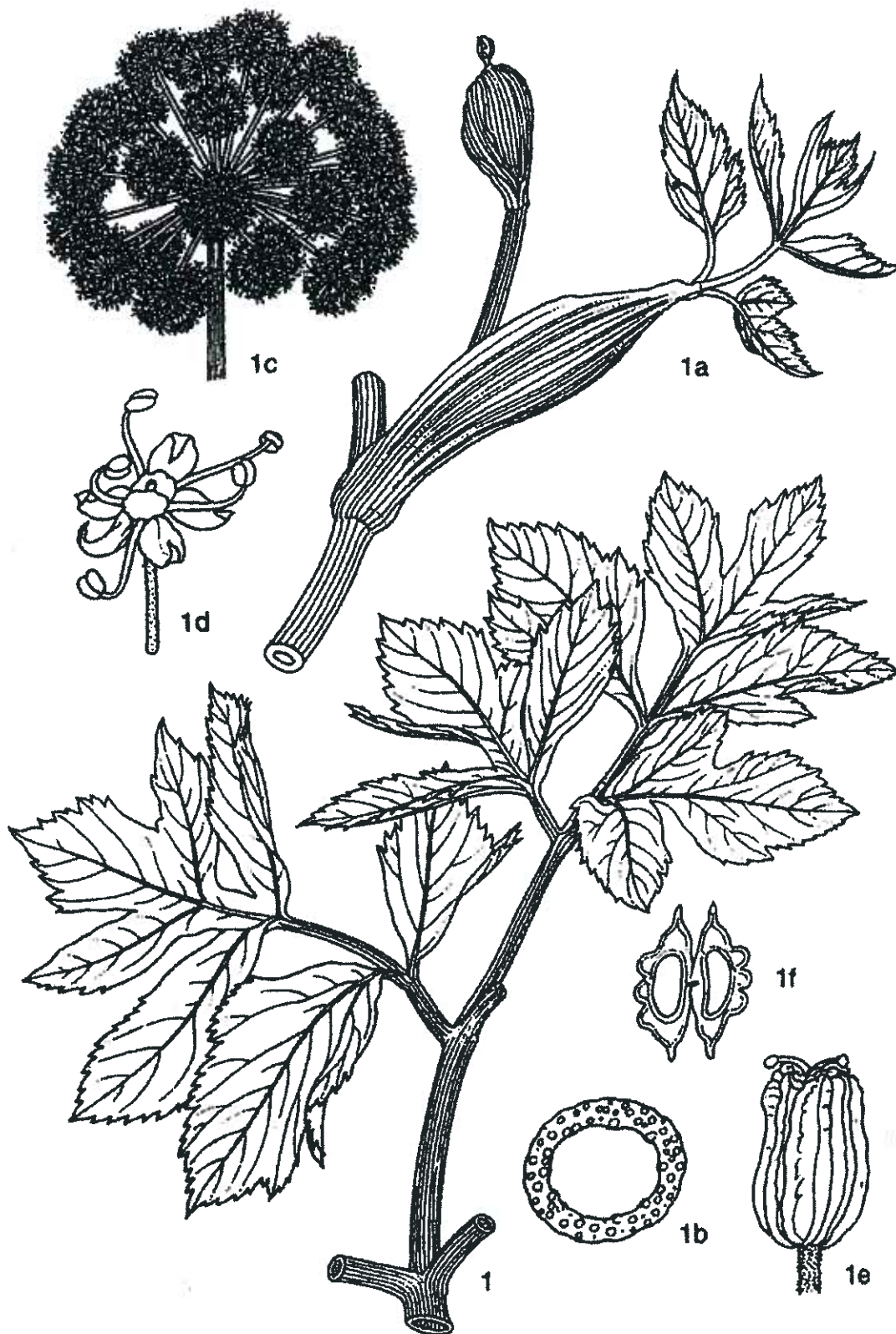
3.1.2. Výskyt rostliny

Původním místem výskytu andělíky jsou horské oblasti severní a severovýchodní Evropy. Rozšířila se po celé Evropě a Asii. Nejzápadnějším nalezištěm je Grónsko. Pravděpodobná druhotná stanoviště, podobná primárním, jsou horské nivy, břehy potoků a řek, vlhké příkopy. Roste na vlhkých půdách.

Nejstarší zprávy o andělice na našem území pochází ze středověku, kdy byla hojně pěstována v zahradách v Krkonoších a dále v Krušných horách, Jeseníkách, Jizerských horách a na Šumavě. (1, 2)

Dnes se rostliny pro sběr drog pěstují. (2)

Obr. 1 Charakteristické botanické znaky anděliky lékařské (1)



1-dolní list; 1a-horní list; 1b-průřez listovým řapíkem; 1c-květenství; 1d-květ;
1e-plod; 1f-příčný řez plodem

3.1.3. Charakteristika drog

Z anděliky lékařské se jako drogy získávají oddenek s adventivními kořeny – *Angelicae radix*, méně plody – *Angelicae fructus*, listy – *Angelicae folium* a nať – *Angelicae herba*. (1, 2) Droga *Angelicae radix* je součástí Českého lékopisu 2005. (36) *Angelicae radix* a *Angelicae fructus* jsou součástí Českého farmaceutického kodexu. (3) Obě drogy jsou ostře kořenité, nahořklé chuti i vůně. (2)

Droga *Angelicae radix* je usušený kořen s oddenkem bez vedlejších kořínků a zbytků nadzemní části. Usušená droga je na zevní straně šedohnědá až načervenalé hnědá. Na příčném lomu je patrna vrstva šedobílé kůry a světležlutavě šedé dřevo. Struktura lomu je paprscitá.

Droga *Angelicae fructus* je usušený zralý plod, žlutohnědé barvy, který má lesklý, svraštělý povrch. (3)

3.1.4. Sběr drog

Drogy se získávají z rostlin pěstovaných, pouze výjimečně z volně rostoucích. (2) Kořen se sbírá v září a říjnu druhého roku. Rychle se omyje, silnější kořeny se púlí, suší se v sušárně do 35 °C. Plody se sbírají v srpnu a září seřezáváním zralých částí okolíků, které se poté osuší a nažky se vydrolí. (7) Naťová a listová droga se získává pouze z mladých částí rostliny.

Drogy jsou uchovávány v uzavřených obalech. (5)

3.1.5. Obsahové látky

Kumariny se nacházejí především v oddencích s kořeny (do 0,2 %) a plodech (0,1-0,5 %). (5)

Oddenková droga obsahuje až 1 % silice s hlavním podílem alfa-pinenu, limonenu, alfa-felandrenu, para-cymenu, alfa-thujonu, beta-karyofylenu, borneolu a linaloolu. Další součástí silice jsou kyseliny methyloctová a oxymyristová, sesviterpeny a makrocyclické laktony. Z kumarinů je obsažen angelicin, bergapten, imperatorin, xantotoxol, umbelliferon a skopoletin.

Nažky obsahují až 1,5 % silice s vyšším podílem terpenů. Z kumarinových derivátů převažuje imperatorin.

Naťová droga má silice nejméně. (2, 4)

Dalšími významnými obsahovými látkami jsou hořčiny, třísloviny, sacharidy a flavonoid archangelinon. (4)

3.1.6. Užití drog

Vnitřně se užívá nálev při zhoršené činnosti zažívacího ústrojí jako stomachikum a karminativum. Podává se při špatném trávení plynatosti, křečích, zpomalení střevní činnosti. Dále je vhodný při snížené tvorbě moči a sklonu ke vzniku močových kamenů. Je účinný i expektoračně a jako kloktadlo. (5, 6, 7) Častější používání však působí nepříznivě na CNS. (2)

K zevnímu užití slouží obklady z odvaru při myalgiích, zhmožděninách s krevními podlitinami, zánětech pokožky ve vlasové části hlavy, při popáleninách. (5, 6, 7)

Droga *Angelicae radix* je využívána také jako zeleninové koření, průmyslově v likérnictví a v tabákovém průmyslu. Z oddenků i plodů se destiluje silice pro parfumerii. (2) V potravinářství je užití kumarinů již ve většině zemí zakázáno. (4)

3.1.7. Toxicita

Významným projevem toxicity je fotosenzibilizace. Jedná se o zcitlivění organismu vůči slunečnímu záření po styku se šťávami nebo drogami anděliky. Fotosenzibilizace je vlastností furanokumarinů. Obecně jde o látky schopné absorbovat a krátkou dobu držet kvanta světelné energie. Vzniká aktivovaná molekula fotodynamické látky, která předává svou energii okolí a poškozuje tkáň. Klinické projevy jsou závislé na typu látky, jejího množství, délce vystavení pokožky slunečnímu záření a intenzitě záření. (8) Projevem bývají kožní alergie a otoky. (2) Zhoršují se s vlhkostí. (11)

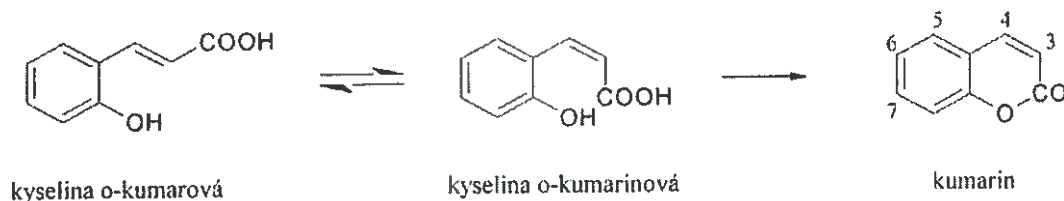
Při požití velkých dávek drogy může působit nejdříve povzbudivě, později ale ochromuje CNS. (7)

3.2. Kumariny

Kumarin je aromatická látka. Poprvé byl izolován v roce 1820 ze semen jihoamerického stromu slivoně vonné (*Dipterix odorata*, *Fabaceae*) rostoucího v Guayaně a Brazílii. Od kumarinu odvozujeme látky obecně řazené mezi tzv. kumariny. Podle substituentů pak rozlišujeme např. hydroxykumariny, methoxykumariny, furanokumariny, atd. Známe asi dvě stě druhů kumarinových glykosidů. (2) Kumariny se nejčastěji vyskytují v rostlinách čeledi *Apiaceae*, *Asteraceae* a *Poaceae*. (9) Také v čeledi *Rutaceae*, *Lamiaceae*. Nacházejí se většinou v rostlinných kořenech a semenech.

3.2.1. Chemická struktura

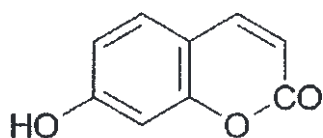
Strukturně jsou kumariny deriváty alfa-chromonu. Vznikají vytvořením laktonu z cis formy kyseliny o-hydroxyskořicové. (10) Kyselina o-hydroxyskořicová se nachází v rostlině ve formě glykozidyckých prekurzorů. Prekurzory kumarinů jsou glykosidy kyseliny o-kumarové (trans-forma) a kyseliny kumarinové (cis-forma). Jsou enzymaticky udržovány ve vzájemné rovnováze. Při sušení se glykosidy štěpí a tvoří se kumarin, lakton volné kumarinové kyseliny. Kumarinová kyselina se stále vytváří z kyseliny o-kumarové díky posunu rovnováhy.



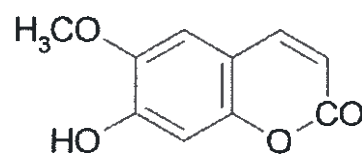
Kumariny lze rozdělit podle chemické struktury na jednoduché a „kondenzované“. Kondenzované kumariny se dále dělí na furanokumariny a pyranokumariny.

- a) **jednoduché kumariny** – sloučeniny substituované v polohách C₆ a C₇, méně pak v polohách C₅ a C₈ hydroxy skupinou nebo methoxyskupinou.

Zástupci: umbeliferon, skopoletin



umbelliferon



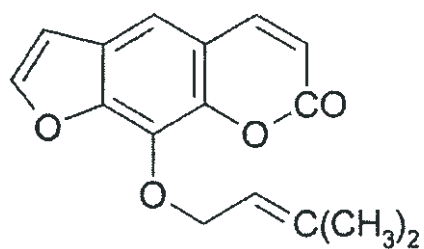
skopoletin

b) „kondenzované“ kumariny

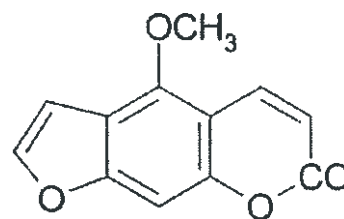
- furanokumariny mají přikondenzovaný furanový kruh v poloze C₆, C₇ (psoralénový typ) nebo v poloze C₇, C₈ (angelicinový typ).

Zástupci psoralénového typu: xantotoxin, xantotoxol, bergapten, imperatorin

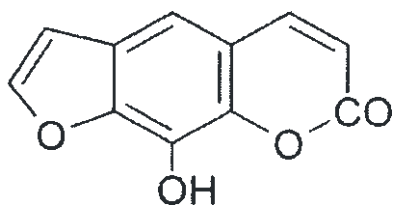
Zástupci angelicinového typu: angelicín



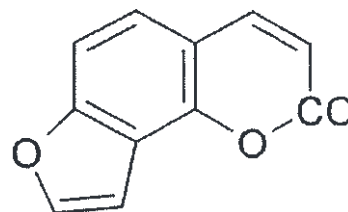
imperatorin



bergapten



xantotoxol



angelicin

- pyranokumariny mají přikondenzovaný kruh v poloze C₇, C₈. (9)

3.2.2. Biologické a terapeutické účinky

Nositelem účinku je nenasycený laktonový kruh. Kumariny působí tlumivě na CNS a mají hypnotické účinky. Mohou snižovat tělesnou teplotu. Některé působí spazmolyticky. Velmi silně absorbují ultrafialové záření. Zvláště furanokumariny senzibilizují kůži na sluneční záření. Používají se proto k léčbě vitiliga (např. kumariny z *Ammi majus*).

U dikumarolu jsou patrné účinky odstraňující krevní srážlivost. Ovlivňuje syntézu prothrombinu a srážecích faktorů VII, IX, X. Při vyšších dávkách či dlouhodobém podávání poškozuje játra. Tyto účinky byly objeveny na dobytku nakrmeném zplesnivělým senem obsahujícím *Melilotus officinalis*. Díky těmto účinkům se dikumarol začal využívat v profylaxi tromboembolických příhod a v teapii, tromboflebitid a flebotrombóz. (10, 4)

Významné je také antibakteriální působení kumarinů především vůči grampozitivním mikroorganismům.

Pro hepatotoxicitu kumarinu je ve většině zemí zakázáno jeho použití v potravinářství. (10)

Kumariny prochází přes placentární bariéru, mohou ohrozit plod. Přechází i do mateřského mléka a mohou způsobit krvácení z pupečníku, tvorbu podkožních hematomů či poškození jater. Jsou proto v graviditě kontraindikovány a při kojení nedoporučovány. Dále jsou kontraindikovány při krvácivých stavech, poškození jater a ledvin, vředové chorobě žaludku a dvanáctníku, pankreatitidě.

Užívání kumarinových látek může způsobit nežádoucí účinky jako nevolnost, zvracení a průjem. Může se objevit i zvýšená krvácivost při minimálních dávkách. Při náhlém přerušení terapie hrozí naopak riziko zvýšené srážlivosti krve. (4)

Některé furanokumariny působí jako rybí jedy. (10)

3.3. Rostlinné explantáty

Rostlinné explantáty jsou různé typy rostlinných orgánů, jejich částí, meristemických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. Explantátové kultury jsou explantáty pěstované po určitou dobu *in vitro*. Využívají se při šlechtění rostlin (uchovávají genetickou stabilitu materiálu) a při produkci rostlinných metabolitů. Výhodou je dlouhodobá kultivace velké populace buněk v poměrně malém prostoru. Z každé buňky lze vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. Vegetativní množení rostlin je možné díky totipotenci buněk. (12, 13)

3.3.1. Základní pojmy:

Rostlinný explantát: fragment pletiva, orgánu nebo celý orgán či komplex orgánů odebraný z intaktní rostliny nebo již existující kultury s cílem pěstovat jej *in vitro*

Intaktní rostlina: rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách

Kultivace *in vitro*: pěstování rostlinného materiálu v co nejúplněji definovatelných chemických i fyzikálních podmínkách a zabraňující kontaminaci cizorodými organismy

Kalus: původně neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny, přeneseně pletivo proliferující na povrchu primárních explantátů, schopné kultivace

Totipotence rostlinných buněk: všechny rostlinné buňky i diferencované obsahují veškerý genetický materiál potřebný pro regeneraci celé rostliny (12)

3.3.2. Rozdělení explantátových kultur (12)

Kultury orgánové: orgánové systémy, orgány resp. jejich části pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a zachovává jejich stavbu a funkci.

Kultury tkáňové (pletivové): mnohobuněčné komplexy tkáně (pletiva), které jsou do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované, pomnožené na polotuhých nebo pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo vyjimečně na tekuté živné půdě.

Kultury suspenzní: volné buňky a buněčné shluky společně pomnožené a suspendované v tekutém médiu, které je promícháváno a provzdušněno.

Kultury buněčné (kultury volných buněk): jednotlivé volné buňky jsou pomnožené v tekutém nebo polotuhém médiu nebo na nosiči nasyceném živnou půdou.

Kultury protoplastů: kultury buněk, které nemají buněčnou stěnu, obsah buňky je obalen elasticou plazmalemou.

3.3.3. Vlastnosti explantátových kultur (12, 14)

- Tkáňovou, suspenzní či buněčnou kulturu lze odvodit z buňky či komplexu buněk pletiva kteréhokoliv orgánu rostlinného těla. Výjimku tvoří některé specializované buňky (sítkovice, tracheidy, sklereidy).

- Kulturu lze pěstovat *in vitro* za vhodných kultivačních podmínek neomezeně dlouho.

- Tkáňová resp. suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje, ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter, není však homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciaci.

- Řada orgánových, tkáňových či buněčných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách často velmi jednoduchých.

- Orgánové, tkáňové ani buněčné kultury nejsou schopny bez poškození podstoupit konzervaci mrazem.

- Explantátové orgány, resp. orgánové základy v kultuře *in vitro* mohou dorůstat.

- Základní prvky totipotece buněk jsou zachovány.

- Suspenzní kultury jsou tvořeny volnými buňkami a jednotlivými buněčnými shluky, poměr volných buněk a buněčných shluků se v průběhu kultivace může měnit.

3.3.4. Kultivace

Průběh kultivace lze rozdělit do čtyř fází (12, 15):

1. fáze: Základním předpokladem je výběr vhodné rostliny produkující požadovaný metabolit. Z rostliny získáme primární explantát. Fragment některého orgánu z povrchově sterilizované nebo asepticky pěstované rostliny se umístí *in vitro* na vhodné sterilní agarové médium. Médium má přesně definované složení, které má maximálně podporovat růst a dělení buněk. Po několika týdnech vzniká nepravidelný výběžek buněk – primární kalus, který je schopen se rozmnožovat na novém médiu.

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

3. fáze: Třepáním kalusu v kapalném médiu nebo enzymovým rozvolněním pomocí pektinázy se uvolní jednotlivé buňky, které dále rostou a vytváří suspenzní kultury.

4. fáze: Nežádoucí kontaminaci suspenzních kultur se předchází pravidelným pasážováním, které je prováděno za aseptických podmínek.

3.3.5. Živná média

Složení živného média je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují růst a morfogenezi tkáňových kultur. Složení je závislé na typu kultivace:

- heterotrofní buněčné kultury – bezbarvé, sacharid 2 %, světlo
- fotomixotrofní buněčné kultury – zelené, sacharid 2 %, světlo
- fotoautotrofní buněčné kultury – zelené, oxid uhličitý, světlo (14)

Může se také lišit pro jednotlivé druhy rostlin. (16)

Složky živných půd:

- 1) **Makroelementy** – jsou nezbytné pro kultivaci intaktních rostlin, patří sem dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík, síra a chlor. Prvky se přidávají do média ve formě svých solí, dusík navíc v nitrátové formě. (12, 16)

- 2) **Mikroelementy** – jsou nutné pro růst, zahrnují železo, mangan, zinek, bor, měď, molybden. Železo se dodává v chelátové formě. Lze dodat i kobalt, jód a sodík nejsou však pro růst nepostradatelné. (16)
- 3) **Zdroje organického uhlíku** – cukry, alkoholy a organické kyseliny; nejvhodnější a nejčastější je sacharóza (2-5 %), někdy se nahrazuje glukózou nebo fruktózou.
- 4) **Vitamíny a bios faktory** – mají významnou roli, jsou nezbytné jako katalyzátory metabolických procesů; nejčastěji se přidávají vitamíny skupiny B, tzv. bios faktory jako je myoinositol a biotin, dále vitamin C a kyselina nikotinová.
- 5) **Nedefinované organické složky** – často se využívá hydrolyzát kaseinu a pepton, také kokosové mléko; lze použít i tekutý endosperm kokosového ořechu, extrakty z koňského kaštanu, vlašského ořechu, kvasničný či sladový extrakt. (12, 16)
- 6) **Růstové stimulatory** – podněcují rostlinu k růstu. Rostliny jsou schopny lépe využívat živiny a asimilační pochody probíhají intenzivněji. Je důležitá koncentrace a jejich vzájemný poměr. V kultivačních médiích se používají auxiny, cytokininy a gibereliny.
 - auxiny – Nejčastěji používané jsou kyselina indolyloctová, indolylmáselná, dichlorfenoxyoctová a naftyloctová. Auxiny jsou používány za účelem stimulace růstu kalasu a buněk, někdy k indukci tvorby prýtů a kořenů.
 - cytokininy – Používá se benzylaminopurin, dále 6-dimethylaminopurin, furfurylaminopurin a zeatin. Používají se ke stimulaci buněčného dělení a k tvorbě axilárních prýtů.
 - gibereliny – Nejvíce využívaná je kyselina giberelová. Přidávají se do média pro stimulaci růstu kultur při nízké hustotě suspenze. (16)

3.3.6. Fyzikální podmínky kultivace

Sterilita kultivačního prostředí

Je nezbytná sterilita pracovního prostředí, používaných nástrojů, rostlin a kultivačního média. (16)

➤ Světlo

V závislosti na světle dochází v rostlinách i v tkáňových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a k akumulaci sekundárních metabolitů. Tkáňové kultury se pěstují za světla, za tmy a za běžného světelného režimu. (12)

➤ Teplota

Kultivační teplota velmi ovlivňuje průběh kultivace tkáňových kultur, a to rychlost metabolismu, dělení buněk a její zvýšení může indukovat organogenezi. Většinou leží v těsném rozmezí kolem 25°C. (12)

➤ Hodnota pH média

Není nezbytně nutné, aby byla při kultivaci tkáňových kultur udržována v určitém rozmezí. Optimální hodnota závisí na typu kultury, obvykle se doporučuje pH 5,5-6,0. Příslušná hodnota pH se upraví hydroxidem draselným nebo kyselinou chlorovodíkovou. (12, 16)

3.3.7. Produkce sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity jsou látky, které rostliny mají schopnost syntetizovat, jež ale pravděpodobně nejsou pro vlastní růst rostliny nepostradatelné. (17)

Jsou to látky specifické pro určité taxony, zejména rostlinné, vyznačující se často určitým specifickým účinkem.

Charakteristické pro sekundární metabolity je:

- jsou jen v určitých skupinách organismů
- tvoří se jen v určitých stádiích ontogenetického vývoje organismů
- jejich rozklad a syntéza je pomalejší, ukládají se v určitých orgánech. (17)

Ukázalo se, že v rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se akumuluje malé množství sekundárních metabolitů, a že při procesech cytodiferenciace, buněčné agregace a morfologické organizace dochází ke zpomalení růstu a k vzestupu syntézy sekundárních metabolitů. Důvodem může být výhodné uspořádání enzymů, kompartmentace enzymu a substrátu, existence prostoru pro ukládání substrátu nebo přítomnost specifických organel. Faktory zpomalující růst buněčných kultur působí často stimulačně na produkci sekundárních metabolitů, a to především omezením primárního metabolismu. (16)

3.3.8. Využití explantátových kultur

Explantátové kultury se využívají zejména při :

- Alternativní přípravě produktů získávaných dosud z rostlin v polní kultuře. Výhodou je řízení podmínek procesů bez ohledu na roční období, klimatické či půdní poměry. Produkty jsou homogenní, bez kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií.
- Získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách.
- Získávání nových látek, které nebyly zjištěny v mateřských rostlinách, v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk.
- Produkci biotransformací, kdy z poměrně dostupných substrátů lze získat farmaceuticky významné látky. (13)

3.4. Elicitace

3.4.1. Schéma průběhu stresové reakce

Poplachová fáze – po začátku působení stresového faktoru dojde k porušení buněčných struktur a funkcí.

Restituční fáze – pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, dochází k imobilizaci kompenzačních mechanismů.

Fáze resistence – kompenzační mechanismy směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům.

Fáze vyčerpání – při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru. (21)

3.4.2. Obranné reakce

K nejčastějším změnám, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči stresovým faktorům patří (21):

- Tvorba aktivních forem kyslíku.
- Tvorba osmoregulačních sloučenin (cukrů, polyalkoholů a jednoduchých dusíkatých látek).
- Tvorba stresových fytohormonů (kyseliny abscisové, ethylenu, kyseliny jasmonové, metyljasmonové a polyaminů).
- Syntéza a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s antibiotickým účinkem. Tyto sekundární metabolity s ochrannou funkcí se u některých druhů vyskytují trvale. Patří k nim flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy, které bývají souhrně označovány jako fytoncidy či inhibitiny.

Mezi další obranné reakce patří tvorba zvláštních látek tzv. fytoalexinů. Účinnou reakcí na průnik patogenů je tvorba ochranných nekrot. Při této tzv. hypersenzitivní reakci dochází k rozpadu membránového systému zvýšením koncentrace reaktivních volných radikálů a peroxidu vodíku. Jiným typem obranné reakce rostliny je zvýšení tvorby polysacharidu kalózy, který pak vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa. (21)

3.4.3. Elicitace, fytoalexiny

Elicitace je indukční proces, při němž přidáním vhodného elicitoru do živného média dochází k navození stresových podmínek. (16) Za stresové podmínky se považují všechny situace, které vznikají odchylkami životního prostředí od fyziologického standardu a které organismus zatěžují. Dochází ke zvýšení hladiny enzymů nebo k jejich aktivaci a ke zvýšení tvorby sekundárních metabolitů jako obranného mechanismu rostlin.

Tkáňová kultura při vystavení stresu začne jako obrannou odpověď produkovat sekundární látky tzv. fytoalexiny. Jsou to nízkomolekulární látky, které jsou uloženy buď v buňkách rostlinných kultur nebo vyloučeny do media.

Ve zdravé rostlině nejsou přítomny vůbec, nebo jen ve velmi nízkých koncentracích. Pronikají přes plazmatickou membránu patogenů a způsobují poškození membránových funkcí. Patří sem například flavonoidy, terpeny, steroidy aj. (18, 19, 20)

3.4.4. Elicitory

Elicitor je podnět ke spuštění obranné reakce. Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale pomocí přenašečů signálu. (21)

Elicitory se dělí do dvou skupin:

a) **biotické** – organické sloučeniny

- celé patogenní i nepatogenní organismy, jejich části (bakterie, viry, kvasinky, mykoplazmata).
- organické molekuly parazitických mikroorganismů, metabolity vylučované patogeny (oligosacharidy, peptidy, enzymy).
- endogenní konstitutivní elicitory (molekuly uvolňující se z narušených buněk rostliny – peptidy, enzymy)

b) **abiotické** – chemické a fyzikální vlivy, které rostlinu stresují

- nadbytek iontů solí
- toxické kovy a organické látky
- detergenty

- rostlinné ochranné prostředky (pesticidy)
- nedostatek vody, kyslíku a živin
- fyzikální (UV záření, změny pH a osmotického tlaku, extrémní teploty) (21, 22)

3.4.5. Podmínky elicitace

Pro indukci tvorby sekundárních metabolitů musí být splněny určité podmínky pro vzájemnou interakci elicitoru a buněčné kultury:

- volba vhodného elicitoru
- doba působení elicitoru na kulturu
- optimální koncentrace elicitoru
- volba vhodného rostlinného explantátu pro kultivaci
- stáří kultury
- složení živného média (23)

3.5. Měď

3.5.1. Minerální výživa rostlin

Veškerá hmota rostlin je tvořena asimilací jednoduchých anorganických látek, které jsou přijímány z vnějšího prostředí. Asimilací iontů rozumíme jejich přeměnu ve struktury a účast v procesech rostliny, což je nezbytným předpokladem všech vývojových procesů. Minerální výživa rostlin zahrnuje téměř vždy výživu všemi prvky kromě uhlíku, vodíku a kyslíku. Zahrnuje tedy prvky, které jsou ve formě iontů přijímány kořeny.

Kvalitativně odpovídá obsah prvků v rostlinách jejich výskytu v kořenovém substrátu. (21) Často zvýšený obsah prvku není vždy požadavkem rostliny, ale je spíše charakteristický pro půdu, na níž rostlina vegetuje. (24) Avšak kvantitativní zastoupení jednotlivých prvků v rostlině a v půdě může být naprosto rozdílné. Obecně platí, že zvýšení obsahu živin v půdě se projeví i zvýšením obsahu v rostlinách. Obsah prvků v rostlinách je ovlivněn také geneticky. Významné jsou i rozdíly mezi jednotlivými orgány a pletivy.

K nejzákladnějším funkcím prvků patří jejich využití jako substrátů v biochemických reakcích, kofaktorů enzymů, osmoticky aktivních látek a posílů v přenášeném signálu. (21)

3.5.2. Měď

Je esenciální stopový prvek. Hromadí se hlavně v listech, ve vyšší koncentraci se vyskytuje také v dozrávajících semenech. Tvoří jednomocné a dvojmocné kationty. Má významnou úlohu hlavně ve fotosyntéze, je součástí primárního donoru elektronu ve fotosystému I. Podílí se také na funkci oxidáz, dekarboxylačních, deaminačních, hydrolytických a jiných enzymů. Vysoká koncentrace mědi inhibuje elektronový transport ve fotosyntéze. Při nedostatku mědi dochází ke zbrždění růstu, projeví se chloróza mezi žilnatinou listů a nekrotické skvrny. Nedostatek i nadbytek mědi negativně ovlivňují schopnost fotosyntézy. Toxicita mědi je zřejmě způsobena snadným vstupem jejího iontu do buňky a velkou schopností tvořit komplexy s organickými látkami. (25, 26, 27)

3.5.3. Toxicita těžkých kovů

Těžké kovy jako Cd, Pb, Cu, Mg, Zn, Ni jsou, s výjimkou velmi nízkých koncentrací, pro rostliny toxické. Podstata toxicity spočívá v jejich vysoké afinitě k chemickým skupinám obsahujícím redukované formy síry, takže inaktivují enzymy s volnými skupinami –SH.

Známe dva způsoby adaptace rostliny na vyšší množství těžkých kovů: tolerance a rezistence.

Tolerance je schopnost snášet přítomnost a působení těžkých kovů. Podstatou je jejich inaktivace vazbou na nízkomolekulární bílkoviny mající vysoký podíl cysteinu. Nazývají se fytochelatiny nebo metalotioneiny.

Rezistence je schopnost omezit až vyloučit možnost působení těžkých kovů. Rostlina omezí vstup iontů do buněk, transport do nadzemních orgánů apod.

Armeraria maritima ssp. se vyznačuje schopností akumulovat velká množství mědi, a to jak v kořenech, tak i v nadzemních částech rostliny. Měď je hromaděna především ve vakuolách ve formě sraženin, v nichž je chelatizována polyhydroxyfenoly. Kromě toho je měď vylučována na povrch listu.

Je snaha využít rostliny k odstranění těžkých kovů z kontaminovaných vod i půd. Proto je žádoucí spojit rychle rostoucí rostliny se schopností zvýšené akumulace těžkých kovů. Výskyt takovýchto rostlinných „superakumulátorů“ těžkých kovů by však mohl ohrozit jak půdní faunu, tak i mnohé herbivory. (21)

4. Experimentální část

4.1. Přístroje

Laboratorní analytické váhy, Sartorius, Göttingen

Autokláv PS 20 A, Chirana, Brno

Elektrická sušárna HS 31 A, Chirana, Brno

Laboratorní odstředivka MPW 342, Med-Instruments, Varšava

Ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100H, Bandelin Electronic, Berlín

Čerpadlo PU-2089, Jasco, Tokyo

Detektor diode array MD-2015, Jasco, Tokyo

Detektor fluorescenční FP-2020, Jasco, Tokyo

Automatický dávkovač AS-2055, Jasco, Tokyo

Box s laminárním prouděním Fatran, Výrobné družstvo Pokrok, Žilina

Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha

4.2. Chemikálie

acetonitril *p. a.*

dihydrogenfosforečnan draselný *p. a.*

dusičnan draselný *p. a.*

dusičnan amonný *p. a.*

chlorid kobaltnatý *p. a.*

chlorid vápenatý *p. a.*

chlorid thiaminia *puriss.*

chlorid pyridoxinia *puriss.*

Myoinositol

skopoletin *p. a.*

glycin č.

hydrolyzát kaseinu

sacharóza *p. a.*

jodid draselný *p. a.*

kyselina boritá *p. a.*

kyselina nikotinová č.

kyselina fosforečná *p. a.*

metanol *p. a.*

kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová *p. a.*

benzylaminopurin *p. a.*

molybdenan sodný *p. a.*

síran hořečnatý *p. a.*

síran manganatý *p. a.*

síran měďnatý *p. a.*

síran zinečnatý *p. a.*

síran železnatý *p. a.*

4.3. Tkáňová kultura *Angelica archangelica* L.

4.3.1. Tkáňová kultura

Pro pokusy byla použita desetiletá suspenzní kultura odvozená ze vzrostného vrcholu intaktní rostliny *Angelica archangelica* L., pěstované na zahradě léčivých rostlin farmaceutické fakulty. Kultura byla kultivována v tekutém živném médiu podle Murashigeho a Skooga s přidavkem 2 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 0,4 mg/l benzylaminopurinu na roleru na světle (světelná perioda 16 h světlo/8 h tma). Pasážování bylo prováděno ve čtrnáctidenním intervalu.

4.3.2. Kultivace tkáňové kultury

Pro sledování vlivu síranu měďnatého na produkci kumarinů byla kultura přepasážována na živná média podle Murashigeho a Skooga bez síranu měďnatého a s přidavkem síranu měďnatého v koncentraci 0,025; 0,125; 0,25; 1,25; 2,5; 12,5 a 25 mg/l média a kultivována čtrnáct dní na světle (světelná perioda 16 h světlo/8 h tma). Na konci kultivace byly kultury sklizeny, buňky byly odděleny od média odsátím za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a usušeny za laboratorní teploty. V usušených buňkách a v médiu byl stanoven obsah skopoletinu.

4.3.3. Živné médium podle Murashigeho a Skooga

Složení živného média vztažené na 1 litr je následující (29):

| | |
|--|------------|
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 440,00 mg |
| KNO ₃ | 1900,00 mg |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 370,00 mg |
| NH ₄ NO ₃ | 1650,00 mg |
| KH ₂ PO ₄ | 170,00 mg |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 27,84 mg |
| Na ₂ EDTA | 37,34 mg |
| MnSO ₄ · 4 H ₂ O | 22,30 mg |
| ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 11,50 mg |
| H ₃ BO ₃ | 6,20 mg |
| KI | 0,83 mg |

| | |
|---|---------------|
| CuSO ₄ . 5 H ₂ O | 0,025 mg |
| Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O | 0,25 mg |
| CoCl ₂ . 6 H ₂ O | 0,025 mg |
| Myoinositol | 100,00 mg |
| hydrolyzát kaseinu | 1000,00 mg |
| glycin | 2,00 mg |
| kyselina nikotinová | 0,50 mg |
| pyridoxin hydrochlorid | 0,50 mg |
| thiamin hydrochlorid | 0,10 mg |
| sacharóza | 30 000, 00 mg |

Médium bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

4.4. Stanovení skopoletinu

Stanovení skopoletinu v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí. Podmínky stanovení byly následující: kolona Lichrospher RP18 (250 x 4 mm, velikost částic 5 µm) s předkolonou ze stejného materiálu; lineární gradient mobilní fáze A (acetonitril) ve fázi B (voda s obsahem 0,15 % kyseliny fosforečné) 5-29 % od 0 do 20 minut, následné promytí kolony mobilní fází 5 % acetonitrilu ve vodě s 0,15 % kyseliny fosforečné; rychlost eluce 1,2 ml/min; počáteční tlak na koloně 15,9 MPa; dávkovaný objem vzorku 20 µl; excitační vlnová délka 345 nm, emisní vlnová délka 450 nm.

Stanovení skopoletinu v médiu

V médiích bylo stanovení skopoletinu prováděno přímo bez další úpravy vzorku. Obsah skopoletinu byl počítán z kalibrační křivky a vyjadřován v mg na litr média.

Stanovení skopoletinu v buňkách

Usušené buňky byly rozpráškovány v třecí misce a extrahovány třikrát 15 a jedenkrát 10 minut metanolem v ultrazvukové lázni. Získané výluhy byly spojeny a doplněny v odměrné baňce na 25 ml po rysku metanolem, promíchány, odstředěny (10 minut, 3000 ot./min.) a použity pro stanovení obsahu skopoletinu. Obsah skopoletinu v buňkách byl počítán z kalibrační křivky a vyjadřován v mg na g sušiny.

4.5. Statistické zpracování

Statistické zpracování naměřených hodnot bylo provedeno na základě těchto vzorců (30):

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

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

n rozsah souboru

x_i naměřené hodnoty

\bar{x} aritmetický průměr

s směrodatná odchylka

5. Výsledky

Tabulka č.1: Vliv síranu měďnatého na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L.

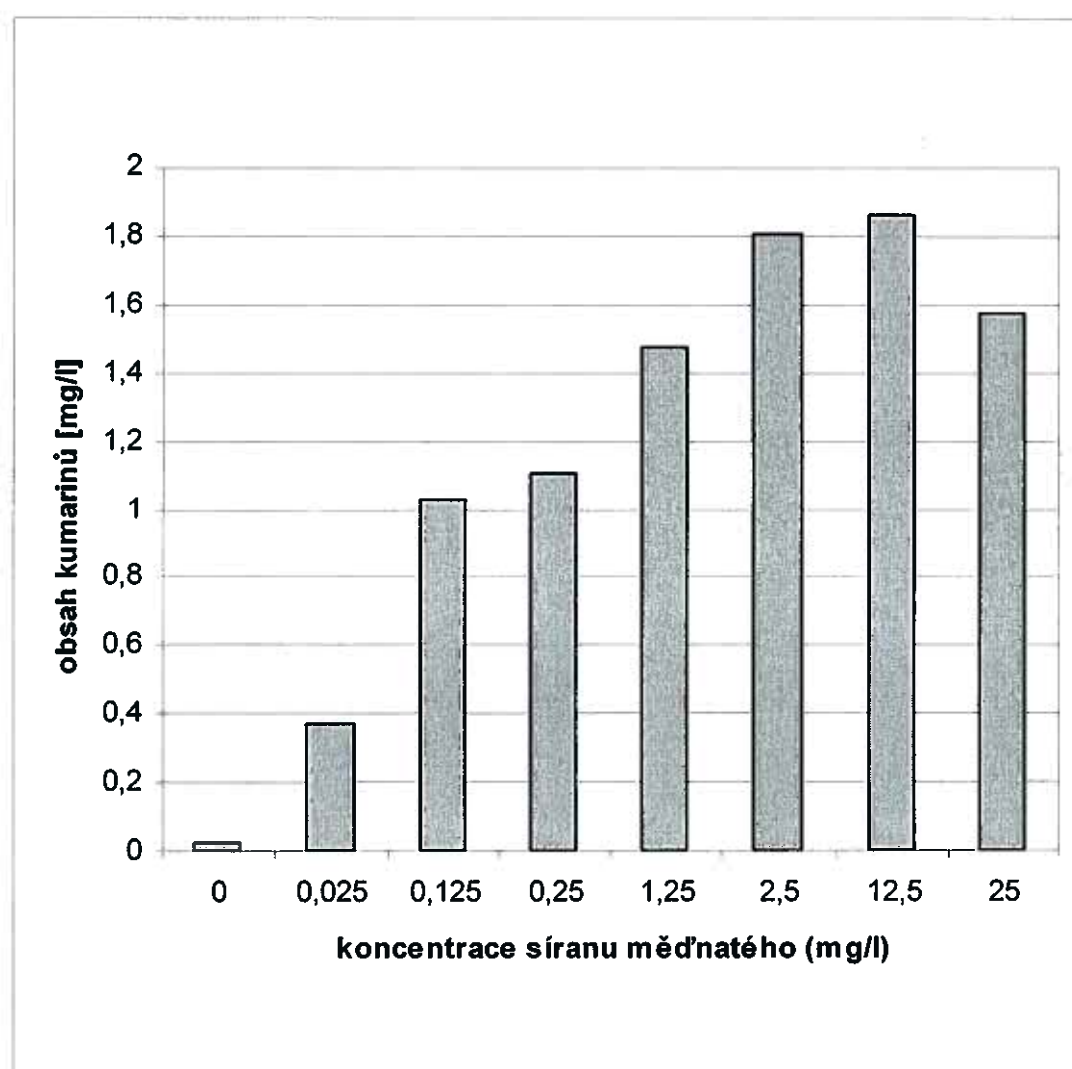
| Koncentrace Cu ²⁺ iontů [mg/l] | Obsah kumarinů [mg/g] | Směrodatná odchylka |
|--|--------------------------|---------------------|
| 0,000 | 0,021 | 0,025 |
| 0,025 | 0,369 | 0,086 |
| 0,125 | 1,027 | 0,004 |
| 0,250 | 1,106 | 0,162 |
| 1,250 | 1,477 | 0,105 |
| 2,500 | 1,806 | 0,418 |
| 12,500 | 1,864 | 0,091 |
| 25,000 | 1,572 | 0,152 |

Tabulka č.2: Vliv síranu měďnatého na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L.

| Koncentrace Cu²⁺ iontů [mg/l] | Obsah kumarinů [mg/g] | Směrodatná odchylka |
|---|----------------------------------|----------------------------|
| 0,000 | 0,322 | 0,006 |
| 0,025 | 0,401 | 0,011 |
| 0,125 | 0,483 | 0,007 |
| 0,250 | 0,530 | 0,071 |
| 1,250 | 0,566 | 0,064 |
| 2,500 | 0,518 | 0,023 |
| 12,500 | 0,547 | 0,078 |
| 25,000 | 0,402 | 0,016 |

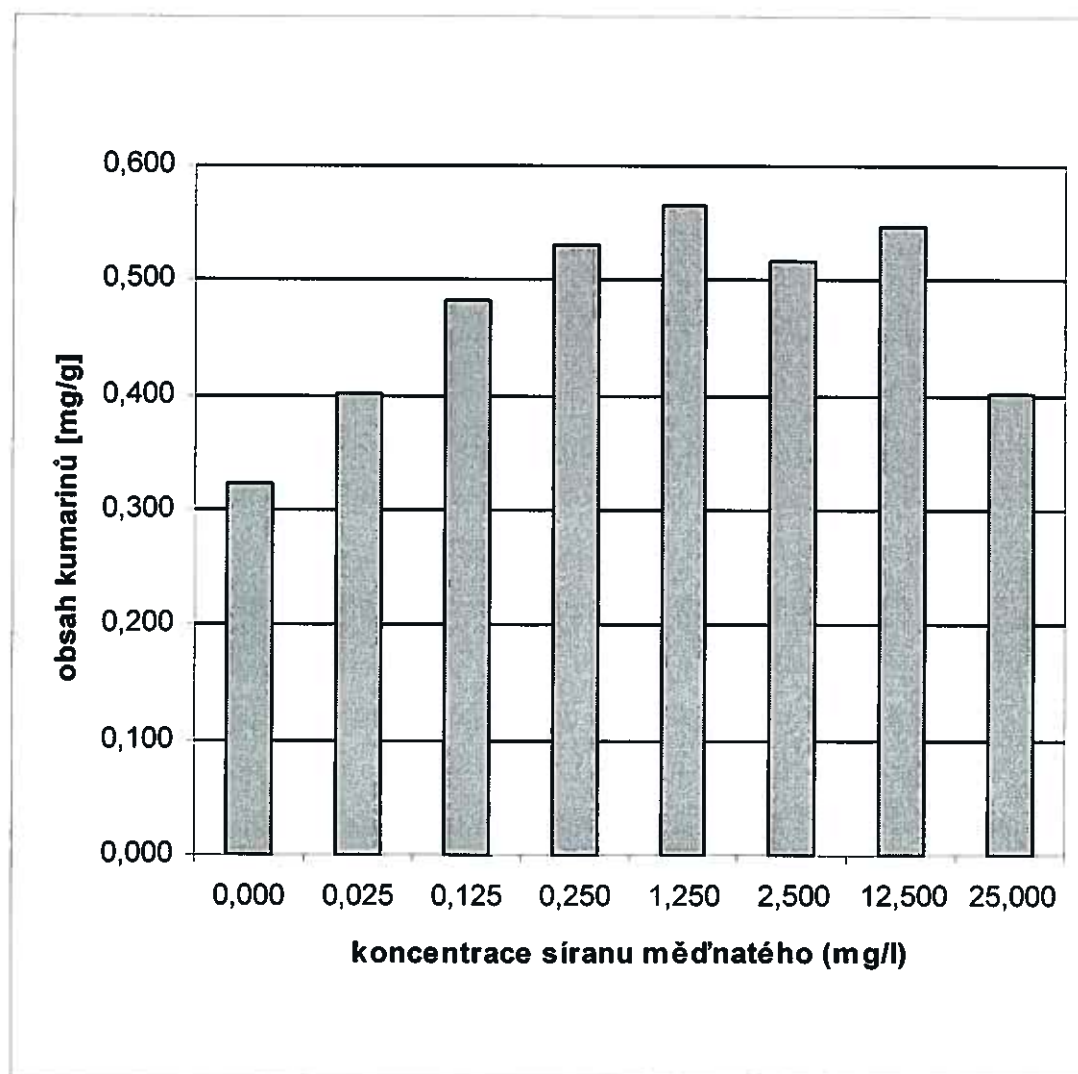
Graf č. 1

Obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L.



Graf č. 2

Obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L.



6. Diskuse

Cílem kultivace rostlinných kultur je zvýšení produkce a dostupnosti farmaceuticky významných sekundárních metabolitů.

Zvýšení tvorby sekundárních metabolitů je jedním z mechanismů, kterým rostlinné buňky reagují na zvýšenou koncentraci kovů v prostředí. (31) Není ovšem dostatečně známa regulace sekundárního metabolismu, tak se produkce žádaného metabolitu zvyšuje empiricky, většinou změnami kultivačních podmínek. Nejčastěji se zasahuje do výživy tkáňové kultury. (32)

V rámci své diplomové práce jsem sledovala vliv síranu měďnatého v osmi různých koncentracích (0; 0,025; 0,125; 0,25; 1,25; 2,5; 12,5 a 25 mg/l) na produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L. Suspenzní kultury byly kultivovány na světle.

Výsledky působení síranu měďnatého na suspenzní kulturu jsou shrnuty v tabulkách č. 1 a č. 2 a zároveň jsou zpracovány do grafu č. 1 a č. 2.

Z vyhodnocení grafu č. 1 vyplývá, že zvýšený obsah mědi v živném médiu měl pozitivní vliv na množství kumarinů v médiu. Koncentrace kumarinů postupně vzrůstá. Nejvyšší hodnoty dosahuje při koncentraci síranu měďnatého 12,5 mg/l. Při této koncentraci je obsah kumarinů přibližně o 406 % vyšší než v kontrolní kultuře (kontrolní kulturou je kultura s koncentrací síranu měďnatého 0,025mg/l). Poté zaznamenáme opět pokles koncentrace kumarinů. Při nulové koncentraci měďnatých iontů došlo k poklesu obsahu kumarinů oproti kontrolní kultuře (o 94 %).

Z grafu č. 2 je také zřejmý nárůst obsahu kumarinů v buňkách s rostoucí koncentrací síranu měďnatého. Nejvyšších množství kumarinů dosahují kultury pěstované při koncentracích 1,25 až 12,5 mg/l síranu měďnatého. Přičemž nejmarkantnější nárůst obsahu kumarinů je při koncentraci 1,25 mg/l (o 41 % oproti kontrolní kultuře).

Při nejvyšší koncentraci síranu měďnatého dochází opět k poklesu množství kumarinů přibližně na úroveň kontrolní kultury. Při nulové koncentraci obsah kumarinů poklesl oproti kontrolní kultuře (o 20 %).

Na kultuře *Angelica archangelica* L. byly již testovány vlivy iontů manganatých, kobaltnatých a nikelnatých jako potenciálních elicitorů produkce kumarinů. Produkce nebyla žádným kovem stimulována. (31)

Vliv síranu měďnatého jako abiotického elicitoru byl sledován také na produkci flavonoidů v kalusové kultuře *Ononis arvensis*. Byl zaznamenán statisticky významný nárůst produkce flavonoidů. (33)

7. Závěr

Cílem práce bylo zhodnotit vliv síranu měďnatého na produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že síran měďnatý má do určité koncentrace pozitivní vliv na produkci kumarinů. Obsah kumarinů v médiu vzrůstá s rostoucí koncentrací síranu měďnatého až do koncentrace 12,5 mg/l, a to o 406 %. V buňkách množství kumarinů vzrůstá a nejvyšších hodnot dosahuje v rozmezí koncentrací 1,25 – 12,5 g/l síranu měďnatého. Přičemž největší nárůst obsahu kumarinů je patrný při koncentraci 1,25 mg/l síranu měďnatého, o 41 % oproti kontrole. Při nulové koncentraci produkce kumarinů klesá.

Měďnaté ionty jsou vhodný elicitor produkce kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L.

8. Seznam použité literatury

- (1) Slavík, B.: Květena České republiky, 5. díl, Academia Praha 1997, s. 399-402
- (2) Jirásek, V.; Starý, F.: Atlas léčivých rostlin, SPN, Praha 1986, s. 1, 8-10, 12, 13, 20, 21
- (3) Český farmaceutický kodex, 1. vydání, X-EGEM, Praha 1993
- (4) Míka, K.: Fytoterapie, Osveta, Martin 1998, s. 48, 49, 79
- (5) Opletal, L.; Volák, J.: Rostliny pro zdraví, Aventinum, Praha 1999, s. 26, 27
- (6) Kresánek, J.; Krejča, J.: Atlas léčivých rostlin a lesných plodov, Osveta, Martin 1998, s. 105
- (7) Korbelář, J.; Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha 1981, s. 78
- (8) Jahodář, L.: Fytotoxikologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1995, s. 7, 12
- (9) Tomko, J. et al.: Farmakognózia, 2. vydání, Osveta, Martin 1999, s. 176-178
- (10) Hubík, J. et al.: Obecná farmakognózie II., SPN, Praha 1989, s. 24-30
- (11) Bruneton, J.: Pharmacognosy, Intercept, New York 1999
- (12) Sikyta, B.; Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1992, s. 9-11, 84-93
- (13) Sikyta, B.; Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001, s. 75, 78, 79
- (14) Sikyta, B.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1984, s. 86-88
- (15) Vodrážka, Z.: Biotechnologie, Academia, Praha, 1998, s. 412-430
- (16) Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství univerzity Palackého, Olomouc 1995, s. 13-18, 50-52, 54
- (17) Hubík, J.; Dušek, J.; Spilková, J.: Farmakognózie I., SPN, Praha 1989, s. 17, 18
- (18) Rokem, J. S.; Schwarzenberg, J.; Goldberg, I.: Plant Cell Rep. 3, 159 (1984)
- (19) Yoshikawa, M.; Keen, N. T.; Wang, M. C.: Plant Physiol. 73, 497 (1983)
- (20) Cline, S. D.; Coscia, E. J.: Plant Physiol. 86, 161 (1988)
- (21) Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha 1998, s. 89-92, 110, 114-115, 412-430
- (22) Reichling, J.; Beiderbeck, R.: Biologie 3, 188 (1989)
- (23) Dušek, J. et al.: Čes. A Slov. Farm. 45, 204 (1996)

- (24) Kincl, M.: Základy fyziologie rostlin, SPN, Praha 1997, s.71
- (25) Baron, M.; Arellano, J.; Lopez-George, J.: *Physiol. Plant.* 1, 97 (1995)
- (26) Pastýrik, L.: Fyziológia rastlín, Slovenské pedagogické nakladateľství, Bratislava 1997, s. 142
- (27) Švihra, J.: Fyziológia rastlín, Príroda, Bratislava 1981, s. 105, 106
- (28) Siatka, T.; Kašparová, M.: *Čes. a Slov. Farm.* 51, 47 (2002)
- (29) Murashige, T.; Skoog, F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962)
- (30) Klemerová, V.: Základy aplikované statistiky. SPN, Praha 1993, s. 30, 31(31)
- (31) Siatka T. et al.: *Čes. a Slov. Farm.* 1, 54 (2005)
- (32) Dušek, J.; Šícha, J.; Dušková, J.: *českoslov. Farm.* 38, 210 (1989)
- (33) Tůmová, L.; Rusková, R.: *Čes. a Slov. Farm.* 6, 47 (1998)
- (34) Český lékopis 2005, Grada , Praha 2005