

UNIVERZITA KARLOVA
V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOSIE

Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů
v rostlinných buněčných kulturách

Diplomová práce

Olga Kolářová

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.
Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem použila uvedenou literaturu.

Děkuji PharmDr. Tomášovi Siatkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytoval během vypracovávání této diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	CÍL PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	<i>Angelica archangelica</i> L.	10
3.1.1	<i>Angelica archangelica</i> subsp. <i>officinalis</i>	11
3.1.2	<i>Angelica archangelica</i> subsp. <i>litoralis</i>	12
3.1.3	Význam <i>Angelica archangelica</i> L.	12
3.2	Explantátové kultury rostlin.....	15
3.2.1	Dělení rostlinných explantátových kultur	16
3.2.2	Vlastnosti rostlinných kultur	16
3.2.3	Fáze kultivace rostlinných explantátů.....	17
3.2.4	Podmínky kultivace rostlinných explantátů.....	18
3.2.4.1	Složení kultivačního média pro explantátové kultury.....	19
3.2.4.2	Fyzikální podmínky kultivace.....	22
3.2.5	Využití explantátových kultur k produkci sekundárních metabolitů.	22
3.2.6	Mikropropagace rostlin	24
3.3	Kumariny	25
3.4	Rostliny a stres	26
3.4.1	Stresory	27
3.4.2	Stresová reakce	27
3.4.3	Obranné reakce rostlin	28
3.4.4	Elicitace.....	30
3.5	Stříbro.....	32
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
4.1	Přístroje	33
4.2	Chemikálie	33
4.3	Tkáňová kultura <i>Angelica archangelica</i> L.....	34

4.3.1	Kultivace tkáňové kultury	34
4.3.2	Živné médium podle Murashigeho a Skooga.....	34
4.4	Stanovení skopoletinu	35
4.5	Statistické zpracování.....	36
5	VÝSLEDKY	37
6	DISKUSE.....	48
7	ZÁVĚR	51
8	LITERATURA.....	52

1 ÚVOD

V dřívějších dobách bylo všeobecně rozšířeno jedno velmi moudré pořekadlo: "Není na světě bylina, aby na něco nebyla". Lidé poznali již na počátku historie, kdy žili v těsném styku s přírodou, že některé rostliny pomáhají navracet zdraví, jiné že naopak mohou zdraví ohrozit. O léčivých rostlinách se píše již v nejstarších pramenech ze 4. tisíciletí př. n. l. (1)

Rostliny však zdaleka nemají pro člověka přínos jen při léčení nemocí. Jsou odedávna využívány také jako zdroj aromatických látek pro parfumerii a potravinářství, tříslovin pro koželužství, přírodních barviv a přadných vláken pro textilní průmysl či dřevo. Některé rostliny jsou zároveň kaučukodárné nebo olejodárné, jiné se využívají pro výkrm domácích zvířat, jako ovoce a zelenina v potravě lidí nebo jako okrasné rostliny v zahradách či parcích. Farmaceuticky upotřebitelné pak mohou být i některé jinak vyložené zemědělské plodiny, např. mák nebo chmel. (2)

Léčivé rostliny mají v dnešním lékařství mnohý význam: jako suroviny pro izolaci účinných, chemicky čistých látek nebo jejich souhrnů, které se používají jako takové nebo jsou surovinou pro chemické polosyntézy látek nových, často s významnějším terapeutickým účinkem. Dále se z rostlin a jejich drog připravují tzv. galenické přípravky, např. extrakty, tinktury nebo šťávy. Ty mají v moderní terapii již omezenější význam. Rostlinné drogy jsou také základní surovinou pro přípravu čajových směsí – ty se používají jako podpůrné prostředky (bez nepříznivých účinků), které pacienti obvykle dobře snášejí. Rostlinná říše je také stále nevyčerpaným zdrojem podnětů pro chemiky k výzkumu a objevování nových, terapeuticky významných látek. Díky vývoji vědeckých metod je možno objevovat nové účinné látky i mezi tradičními léčivými rostlinami. (2)

Hlavním úkolem lékařské vědy je péče o zdraví člověka, psychické zdraví nevyjímaje. V současné přetechnizované společnosti je psychika člověka značně zatěžována, vazba člověka na neporušené přírodní prostředí by tedy neměla být podceňována. Na zdraví člověka má z tohoto hlediska pozitivní vliv i rostlinstvo jako celek, a to prostřednictvím blahodárného účinku samotného pobytu ve volné přírodě.

Zelené rostliny využívají energii slunečního záření k přeměně energeticky chudých látek (vody a oxidu uhličitého) a vážou ji v cukrech. Na fotosyntézu pak

navazuje mnoho dalších složitých pochodů, kterými se tvoří všechny pro život nezbytné látky, hlavně bílkoviny, tuky a organické kyseliny – tyto látky souborně označujeme jako primární metabolity. Obecně jsou primární metabolity obsaženy ve všech rostlinách, často ve značném množství, pro člověka mají význam především jako součást potravy a zdroj minerálů a vitamínů. V lékařství je z tohoto typu látek využitelných jen několik, např. sacharóza (příprava sirupů, konzervans), škrob (pomocná látka v technologii), inulin, dále pektiny (protiprůjmová látka), slizy (expektorans), některé organické kyseliny (laxativa, diuretika) a oleje (v kožním lékařství). Z hlediska účinků na lidský organismus jsou ale mnohem významnější produkty sekundárního metabolismu, které rostliny vytvářejí ze základních primárních látek řadou složitých pochodů. Tyto látky jsou v rostlině obsaženy zpravidla jen v malém množství a jsou charakteristické pouze pro určité skupiny nebo dokonce pro jednotlivé druhy nebo formy rostlin. Některé z nich mají velmi silné účinky, již v nepatrných dávkách mohou těžce poškodit zdraví nebo přivodit smrt. Řada těchto jedů je v dnešním lékařství zcela nepostradatelná (např. některé alkaloidy či srdeční glykosidy). Jejich obsah v rostlinách kolísá, proto se mohou podávat jen v čisté lékové formě a pod dohledem lékaře. Mezi sekundární metabolity patří alkaloidy, glykosidy, silice, třísloviny nebo hořčiny. Tvorbu těchto látek v rostlinách je při pěstování možno usměrňovat vytvářením vhodných podmínek.

I přes značnou chemizaci farmaceutické výroby a snahu o co nejekonomičtější a nejefektivnější výrobu se tedy zájem o léčivé rostliny opět neustále zvyšuje, v dnešní době bychom mohli hovořit o renesanci zájmu o léčivé rostliny. V řadě případů se totiž ukázalo, že je výhodné vycházet při výrobě přímo z rostlinného materiálu. Tam, kde je chemická struktura účinné látky známa nedokonale, nebo kde je syntéza z různých důvodů nemožná či látka má lepší účinnost v přírodním stavu, zůstává léčivá rostlina jediným vhodným a využitelným zdrojem. (1)

V poslední době ovšem dochází k obrovskému zabírání půdy pro nezemědělské účely, narušování životního prostředí a dalším jevům, které zdatelně zmenšují dostupnost rostlinných zdrojů. Ceny surovin i potřeby farmaceutického průmyslu stoupají. Pěstování rostlin je sezónní záležitostí, jeho výtěžnost je závislá na mnoha faktorech, např. klimatických vlivech, hmyzu či bakteriálních nákazách, a nelze ji příliš zvyšovat. Proto bylo věnováno velké úsilí na vypracování biotechnologických postupů výroby žádaných rostlinných látek. Kromě produkce

komerčně využitelných sloučenin kulturami rostlinných buněk se rostlinná biotechnologie zabývá také propagací rostlin pomocí tkáňových kultur, uchováváním a skladováním rostlinných buněk, genovou manipulací s rostlinami *in vitro* a genovým inženýrstvím vyšších rostlin. (3)

Biotechnologické pěstování rostlinných buněk a jejich metabolitů má oproti jejich přirozené produkci tu výhodu, že je zcela nezávislé na podnebí, na výkyvech počasí a na kvalitě půdního fondu. Takto získaný materiál je navíc homogennější, sterilní a neobsahuje zbytky insekticidů nebo herbicidů. Kontinuální produkce umožňuje ekonomičtější technologii, vzniká také možnost důsledné kontroly produkce. Oproti chemickým metodám výroby se jedná o metodu téměř bezodpadovou, případně produkované odpady jsou biologicky zužitkovatelné. (4)

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je sledování vlivu dusičnanu stříbrného na produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Angelica archangelica* L.

Andělka lékařská je významná bylina z čeledi miříkovitých (*Apiaceae*). V prvním roce vytváří bohatou růžici přizemních listů, ve druhém, třetím a čtvrtém roce kvete. Plody přináší pouze jednu, potom odumírá. (5)

Tato dvouletá až víceletá monokarpická bylina s dutou, statnou a téměř lysou lodyhou má mohutný, řepovitý, kroužkovitě vrásčitý oddenek dlouhý 5 - 30 cm a široký 3 - 8 cm, s bělavou nebo žlutavou mlékovitou šťávou, s množstvím jemných kořenů a s četnými provazcovitými adventivními kořeny v dolní polovině. Má obvykle 2 - 5 přizemních listů s mohutnou listovou pochvou, které celé postupně odumírají. Jediná lodyha rostliny je přímá, 90 - 250 cm vysoká, v horní polovině odstále větvená, má oblý tvar, nezřetelné rýhování, zelenou nebo tmavě nachovou barvu a velkou centrální dutinu. Mohutnější rostliny mohou mít u báze několik postranních, tenčích lodyh. (6)

Listy andělky jsou střídavé, zpeřené, v obrysu široce trojúhelníkovité, dlouhé až 110 cm. Lístečky jsou nepravidelně vejčité až široce vejčité, postranní bývají nesouměrně dvoulaločné, koncové tří až pětialočné, nestejně hrubě ostře pilovité, se zašpičatělými zuby s bělavou špičkou. Vřetena listů a lístků i 25 - 50 cm dlouhé řapíky jsou duté, listové pochvy objímají lodyhu jen bází, jsou až 16 cm dlouhé a 15 cm široké, u horních listů jsou stejně dlouhé jako přisedlá čepel. Nejhornější listeny jsou téměř redukované v listovou pochvu, pochvy, řapíky a vřetena čepelí jsou jemně rýhované. (6)

Terminální složené okolíky na lodyze i postranních větvích mají 8 - 19 cm v průměru, okolíky jsou polokulovité, husté, bez obalu nebo na postranních větvích s obalem z 1 až 6 nepravidelně rozložených čárkovitých šídlovitých listenů. V okolíku bývá nejčastěji 24 - 66 polokulovitých hustých okolíčků, v okolíčku 24 - 59 květů (u vnějších okolíčků více než u vnitřních). Květní stopky jsou 6 - 10 mm dlouhé, kališní cípy jsou nezřetelné, korunní lístky, vejčitě kopinaté s dovnitř zahnutou špičkou a krátce klínovitou bází, mají zelenavě bělavou až žlutozelenou barvu a velikost 1,2 - 2,0 x 0,8 - 1,4 mm. Nitky tyčinek jsou nápadně dlouhé (až 3 mm), prašníky středem přirůstající k nitce jsou 0,7 - 0,8 mm dlouhé. Semeník je široce elipsoidní, čnělky krátké, za plodu až do 3 mm prodloužené. Kvete v červenci a srpnu. (6)

Dvounažky jsou elipsoidní až široce elipsoidní, ze hřbetu smáčklé, 5 - 8 x 3,5 - 5 mm veliké, na bocích se 2 širokými křídly. Ve vnitřní vrstvě mezokarpu jsou po jednom v hřbetních žebrech a po dvou v okrajových žebrech prstencovitě uspořádané sekreční kanálky. Plody dozrávají v srpnu a v září. (6, 7)

Roste na vlhkých, chladných, minerálními látkami bohatých stanovištích, podél lesních potůčků a na travnatých horských nivách od podhorského do subalpinského stupně. Často je pěstována v kulturách pro farmaceutické účely. (8)

Rozlišujeme dva poddruhy anděliky lékařské – a *Angelica archangelica* subsp. *officinalis* (*Archangelica officinalis* subsp. *officinalis*, česky andělíka lékařská pravá) a *Angelica archangelica* subsp. *litoralis* (*Archangelica officinalis* subsp. *litoralis*, česky andělíka lékařská pobřežní). (6)

3.1.1 *Angelica archangelica* subsp. *officinalis*

Všechny části anděliky lékařské pravé jsou aromatické, krátký kořen je bohatě rozvětvený, lodyha měkká a šťavnatá. Listové pochvy jsou bylinné, listy obalíčku čárkovité, ploché, téměř stejné délky jako květní stopky. Korunní lístky jsou žlutozelené, dvounažky široce elipsoidní, 6,5 - 8 mm dlouhé a 4,5 - 5 mm široké, na bocích křídlaté. Merikarpia na hřbetě mají tři výrazně vystupující žebra a zřetelný kýl.

Tento poddruh anděliky roste na vlhkých půdách v blízkosti vodních hladin, humózních a živinami bohatých, občas zaplavovaných půdách nejčastěji vyplňujících spáry mezi kamením a balvany, kde kořeny snadno dosahují k hladině podzemní vody, prosakující z říčního koryta. Často se tedy vyskytuje na kamenných navigacích a laterálních kanálech zdymadel velkých řek. Osídluje říční úseky se značně znečištěnou vodou s obsahem solí a jiných látek. Pěstuje se v zahradách i polních kulturách, zvláště ve vyšších polohách.

Nejstarší zprávy ze 16. století lokalizují původní výskyt anděliky do Krkonoš, ostatní výskyt na území ČR je druhotný - jedná se o rostliny pěstované v zahradách, popřípadě pozůstatky těchto kultur, vzácněji rostliny zplanělé z těchto kultur do okolí. V posledních desetiletích se andělíka rozšířila jako expanzivní neofyt na březích Labe, šíří se primárně lodní dopravou na Labi proti proudu a na jeho větší přítoky, např. na Vltavu. (6)

3.1.2 *Angelica archangelica* subsp. *litoralis*

Andělka lékařská pobřežní je rostlina bez aromatické vůně, s řepovitým, většinou jednoduchým kořenem. Lodyhu má tuhou, listové pochvy kožovité, listeny obalíčku štětinovité, až dvakrát kratší než květní stopky. Korunní lístky jsou zelenavě bělavé, elipsoidní dvounažky jsou 5 - 6 mm dlouhé a 3,5 - 4,5 mm široké, s nevýrazně vystupujícími žebry a nezřetelným kýlem.

Rostlina s původním výskytem na pobřeží moří a ústí řek je adaptovaná na brakické vody a mírně slané půdy. V Čechách je z původních dvou lokalit potvrzen výskyt pouze v Doupovských horách, cíleně se tento poddruh téměř nepěstuje. (6)

3.1.3 Význam *Angelica archangelica* L.

Andělka lékařská a její kořenová droga (oddenek s adventivními kořeny – *Radix angelicae*) se dostaly do léčitelství ze severských oblastí, u nás se rozšířila ve středověku, kdy ji pěstovali mniši jako účinný prostředek proti moru. Největší oblibě a slávě se těšila v 16. století. Kromě oddenku se dále používají i její plody (*Fructus angelicae*) a listy (*Folium angeliacae*). Droga se vyznačuje kořenitou vůní a ostře kořenitou a hořkou chutí. (6, 9)

Obsahuje silici (kořen 0,3 - 1 %, plody 1 - 2 %), jejíž hlavní složkou jsou terpeny felandren, alfa-pinen a cymol, dále pak alfa-thujon, limonen, beta-karyophylen, linalool, borneol a několik makrocyclických laktonů. Z dalších obsahových látek jmenujme kumariny angelicin, umbeliferon, isopimpinellin, prangolarin, xanthotoxin, xanthotoxol, imperatorin a bergapten, dále jsou to třísloviny, organické kyseliny, cukry a další látky. (5, 7, 10, 11)

Andělikový kořen podporuje podobně jako oddenek puškvorce trávení, neboť jeho účinné látky příznivě ovlivňují sekreci žaludečních šťáv – z tohoto důvodu je droga součástí čajové směsi *Stomaran* (stomachikum). Povzbuzuje nervovou činnost, používá se v celkově posilujících koupelích a vnitřně v sedativně a neurotonicky působící čajové směsi *Valofyt*. Má mírný diuretický účinek, mírní nechutenství a nadýmání, usnadňuje odkašlávání a zklidňuje podrážděné průdušky. Užívá se také proti křečím jako spasmolytikum. V lidovém léčitelství se používá také jako prostředek potopudný, posilující a tonizující, při nervovém vyčerpání, hysterii, nespavosti, střevních kolikách, gastritidách a průjmech. Z jeho baktericidních účinků vyplývá také použití ve formě kloktadla při zánětech dutiny ústní. (1, 2, 9)

Značné množství drogy se dnes spotřebuje k izolaci silice používané při výrobě likérů (např. benediktinka, šartréska), v parfumerii, kosmetice a na výrobu aromatizovaného tabáku (1), dále také k aromatizování rybích konzerv. (6) Mladé stonky a listové řapíky se tradičně používají v kuchyni jako zeleninové koření do polévek, kandovanými řapíky a lodyhami se zdobí cukrářské výrobky. V některých oblastech se andělíka pěstuje i jako dekorativní rostlina ve větších zahradách a parcích poblíž jezírek a vodních toků. (2) Nemalý význam má i jako medonosná rostlina, jejíž bohaté okolíky hojně obletují včely. (9) V poslední době se některé obsahové látky studují i z hlediska možné protinádorové aktivity. (1)

Při častějším vnitřním užívání působí nepříznivě na nervovou soustavu (2), při jednorázovém předávkování (více než 2 g silice) může vyvolat podráždění ledvin a manipulace s čerstvou drogou vlivem obsahu furanokumarinů způsobuje fotosenzibilizaci, tedy přecitlivělost vůči slunečnímu záření. Je-li taková kůže ozářena, u citlivějších osob dochází k zarudnutí a otokům pokožky až k tvorbě puchýřků. (1) Vysoce negativní vliv má také na říčních navigacích, neboť tlusté oddenky prorůstáním ve spárách mezi kameny narušují souvislost umělých hrází a mohou způsobit jejich zborcení. (6)

Obr. č. 1: *Angelica archangelica* L. (34)



Obr. č. 2: *Angelica archangelica* L. (1)



3.2 Explantátové kultury rostlin

Rostlinný explantát je každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů odebraných buď z intaktní rostliny, nebo již z existující kultury a pěstovaný v podmínkách *in vitro* (12) (označení *in vitro* je latinského původu a znamená doslovně "ve skle" (13)).

Explantátové kultury rostlin představují aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. Specifickou vlastností rostlinných buněk je jejich totipotence. Rostlinná buňka diferenciací nedegeneruje, ale je schopna dediferenciace a opětného dělení. Buňky diferencovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristematických. Proces diferenciaci u rostlin je založen na tzv. diferenční genové aktivitě, kdy se specializace buňky vytváří na základě aktivace nebo inaktivace určitých genů. V rostlinném organismu je tedy totipotentní nejen zygota a meristematická buňka, ale i kterákoli jiná rostlinná buňka. Změnou podmínek, ve kterých se specializovaná buňka nachází, je možné vyvolat její dediferenciaci a neorganizovaný růst. (14)

V principu zahrnují rostlinné explantátové kultury izolaci buněk, pletiv a orgánů a jejich kultivaci ve sterilních podmínkách řízeného prostředí (při definovaném kultivačním médiu, teplotě, vlhkosti, kvalitě a kvantitě světla). Vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, kořene, reprodukční části jako mikrospory, vajíčka, embrya, semena nebo spory, jakož i jednotlivé buňky a protoplasty mohou být krátkodobě kultivovány *in vitro* a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny. (14)

Z výše uvedených principů vyplývají následující možnosti aplikace kultivace izolovaných rostlinných částí: kultivace vegetačních vrcholů a pupenů či indukce adventivních pupenů na izolovaných orgánech jako metody vegetativního množení rostlin, kultivace izolovaných meristémů jako metoda ozdravování rostlin od virových infekcí, překonávání fyziologických bariér při hybridizaci taxonomicky vzdálených druhů pomocí kultivace izolovaných embryí, regulace procesu oplození a jeho ovlivnění v podmínkách *in vitro*. Dále produkce haploidů při kultivaci prašníků, mikrospor a vajíček, spontánní výskyt a indukce genových a genomových mutací v buněčných a tkáňových kulturách a jejich selekce na úrovni regenerovaných rostlin, řízená fúze protoplastů s cílem vytvoření nových hybridů a konečně také inkorporace cizího genetického materiálu do buňky s cílem modifikace rostlinného

genomu. Explantátové kultury představují nejen soubor metod pro vědecké studium, ale jsou užívány i pro praktické účely, především k rychlému množení a šlechtění rostlin (šlechtění nových forem a odrůd kulturních plodin i lesních a okrasných dřevin) a k produkci rostlinných metabolitů. (13, 14)

3.2.1 Dělení rostlinných explantátových kultur

Kultury rostlinných explantátů lze podle morfologické, respektive anatomické charakteristiky rozčlenit do následujících kategorií:

Kultura orgánová představuje orgánové systémy, orgány respektive jejich základy či části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a v celku zachovává jejich stavbu a funkci.

Tkáňová resp. *pletivová kultura* je tvořena do různého stupně soudržnými, morfologicky dezorganizovanými mnohobuněčnými komplexy tkáně (pletiva), pomnožovanými na polotuhých či pevných nosičích nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě.

Suspenzní kultury obsahují volné buňky a drobné buněčné shluky suspendované v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.

Kultura buněčná respektive *kultura volných buněk* je tvořena jednotlivými a identifikovanými buňkami, respektive jejich nejbližším potomstvem, pomnožovanými v tekuté či polotekuté půdě nebo na nosiči nasyceném půdou.

Kultury buněčných protoplastů obsahují pouze nahé rostlinné protoplasty, které se získávají enzymatickým štěpením buněčných stěn v hypertonickém prostředí. (4,12)

3.2.2 Vlastnosti rostlinných kultur

Tkáňovou, suspenzní či buněčnou kulturu lze odvodit z buňky či komplexu buněk pletiva kteréhokoliv orgánu rostlinného těla. Výjimku tvoří některé velmi specializované buňky, například sítkovice aj. Kulturu lze pěstovat *in vitro* za vhodných podmínek neomezeně dlouho. Tkáňová, respektive suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje a ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter. Není však zcela homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciaci. Suspenzní kultury jsou tvořeny volnými buňkami a buněčnými

shluky různé velikosti. Rozpadavost kultury lze ovlivnit složením média a kultivačními podmínkami. Buňky tkáňových ani buněčných kultur nejsou schopny na rozdíl od kultur živočišných tvořit "jednovrstevnou kulturu", neuchycují se na tuhé ani polotuhé podklady. Z haploidních buněk či pletiv lze odvodit vysoce haploidní tkáňové kultury. Řada orgánových, tkáňových i buněčných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách jednoduchého složení. Vhodnou kombinací růstově aktivních látek a ostatních složek kultivačního média lze v kulturách indukovat histogenezi nebo organogenezi, z jediné somatické buňky lze tedy odvodit životaschopnou rostlinu. Explantátové orgány mohou v kultuře *in vitro* dorůstat. Orgánové, tkáňové ani buněčné kultury rostlin nelze na rozdíl od kultur živočišných bez poškození konzervovat mrazem. (4) Rostlinné explantátové kultury jsou heterotrofní. (12)

3.2.3 Fáze kultivace rostlinných explantátů

Celý proces kultivace explantátů vyšších rostlin můžeme rozdělit do čtyř fází.

První fáze (fáze odvození explantátové kultury) sestává z výběru vhodné matečné rostliny, pokud možno s vysokou produkcí metabolitu, a ze získání primárního explantátu. Čím více jsou buňky a pletiva diferencované, tím větší problémy jsou s jejich zaváděním do kultury *in vitro*, obecně se obtížněji odvozují kultury jednoděložných rostlin. Z povrchově sterilizované nebo asepticky pěstované rostliny se fragment orgánu umístí *in vitro* na vhodné sterilní agarové médium. Složení živného média je v této fázi velmi důležité, obvykle musí být komplexnější než v dalších fázích. Po několika týdnech se objeví primární kalus, schopný rozmnožování na novém médiu.

V další fázi je získaný kalus po odstranění zbytku výchozího orgánu při pasážování na vhodném médiu schopný neomezené proliferace. Během prvních pasáží se často projevují morfologické a morfogenetické změny, po větším počtu pasáží získáme za dodržování konstantních podmínek kultivace stabilní a homogenní rostlinný materiál. Obecně jsou vlastnosti vyselektované homogenní kultury dány původním genotypem a kultivačními podmínkami.

Ve třetí fázi získáme z tkáně pěstované na pevné půdě suspenzní kulturu v tekutém médiu. Toho lze docílit enzymovým rozvolněním např. pomocí pektináz nebo mechanickou cestou. Získané kultury jsou dále udržovány pomocí pravidelných

pasáží, případně se selekčním tlakem k udržení stupně disociace buněk. Po několika pasážích lze získat suspenze s konstantním stupněm agregace. V suspenzních kulturách se dosud nepodařilo zcela zamezit tvorbě agregátů, pro poměr volných buněk k buněčným shlukům zůstává kromě genetických předpokladů kultury jediným regulátorem rozpadavosti charakter živné půdy a vhodný kultivační režim.

V poslední fázi jsou suspenzní kultury udržovány vsádkově v malých baňkách na rolerech či třepačkách. Přechod na větší objemy, nutný pro každé biotechnologické využití, je velmi náročný z hlediska udržení dokonalé sterility, zajištění dostatku kyslíku a optimalizace dalších faktorů. Rostlinné buňky jsou řádově větší než bakteriální, z nemíchaného média by tedy rychle sedimentovaly. Zároveň jsou křehké a špatně snášejí mechanické míchání. Z tohoto důvodu se k míchání často používá procházející proud sterilního vzduchu. Volba vhodného způsobu kultivace závisí na vlastnostech kultury, stupni agregace a diferenciaci i na žádaném produktu – zda je cílem zisk biomasy nebo metabolitu uvolněného do média. Buňky jsou obecně pěstovány při teplotách 25 - 30 °C a při 10 - 200 otáčkách roleru za minutu. Průměrná vsádková kultivace trvá 7 - 15 dní. (4)

Převod kultivace rostlinných buněk z laboratorního měřítka do poloprovozu a provozu je podmíněn úrovní genetických, fyziologických a bioinženýrských poznatků a také jeho ekonomickou výhodností. Z ekonomických důvodů je žádoucí izolace a využívání vysokoprodukčních kmenů rostlinných buněk. Vychází se z rostliny produkující co největší množství žádaných látek nebo s co největší rychlostí přeměny žádaných metabolitů v případě biotransformace. K jejich získání se s úspěchem využila mutageneze, a dále růst v přítomnosti různých chemických látek, které usmrcují divoké buňky a zvýhodňují žádané mutanty. Obecně lze říci, že pro selekci lze použít metody, které se osvědčily v mikrobiologii. Kromě tradičních metod se v současnosti využívají moderní metody spočívající v zavedení cizorodé DNA do rostlinné buňky. (4, 15)

3.2.4 Podmínky kultivace rostlinných explantátů

Mezi faktory ovlivňující růst a produkci rostlinných explantátových kultur patří složení kultivačního média a fyzikální podmínky kultivace. I volba vhodného kultivačního zařízení má pro přípravu explantátových kultur rostlinných buněk značný význam, neboť při kultivacích ve větších objemech mají rostlinné buňky

vyšší zdánlivou viskozitu buněčné suspenze a jsou citlivé ke střízným silám. Při šetrném, avšak nedostatečném způsobu promíchávání mohou být metabolické procesy limitovány kyslíkem, navíc dochází ke vzniku trvalého třífázového systému v důsledku nadměrné sedimentace nebo flotace buněk. Vhodným zařízením jsou pomaloběžné rolery nebo plastické vaky umístěné na pomaloběžném reciprokém třepacím stroji. (15)

3.2.4.1 Složení kultivačního média pro explantátové kultury

Složení kultivačního média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin. Živná média obsahují nezbytné a volitelné komponenty. Média pro kultivaci buněk, rostlinných pletiv či orgánů obvykle obsahují makroelementy, mikroelementy, vitaminy, aminokyseliny nebo jiný zdroj organického dusíku, sacharidy, další organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory. (14)

Pro různé druhy rostlin a různé účely kultivace existuje celá řada médií. Pro kultivaci kalusu na agaru i pro kultivaci buněčných kultur v tekutých médiích se dá dobře použít médium vyvinuté Murashigem a Skoogem pro tkáňové kultury tabáku. Příznačným rysem tohoto média je velmi vysoký obsah nitrátů, draslíku a amonných iontů. (16)

Makroelementy v kultivačních médiích zahrnují 6 nejdůležitějších prvků – dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru. Jejich optimální koncentrace je značně závislá na rostlinném druhu. Dusík může být pro lepší růst dodáván společně v nitrátové formě a ve formě amonných solí, draslík ve formě dusičnanu nebo chloridu. Makroprvky by v médiu měly být v koncentraci vyšší než 30 mg/l.

Mezi mikroelementy nezbytné pro růst rostlinných tkáňových kultur patří železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Kobalt, jód, sodík a chlór nejsou obvykle pro růst nezbytné. Železo a zinek se dodávají v chelátové formě.

Vitaminy nezbytné pro rostlinu jako katalyzátory řady metabolických procesů si normální rostlina syntetizuje sama. *In vitro* mohou být ale limitujícím faktorem růstu kultur, do živných médií se proto přidává nepostradatelný thiamin a dále kyselina nikotinová, pyridoxin a myoinositol, které sice nejsou nezbytné, ale mohou růst stimulovat. Z dalších vitaminů se někdy přidává biotin, kyselina listová, kyselina askorbová a další látky. Jejich přítomnost není nezbytná. (14)

Přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, může jejich přítomnost v médiu stimulovat jejich růst. Slouží buňkám jako zdroj dusíku v organické formě, který je využíván rychleji než dusík anorganický. Nejčastěji se používá směs aminokyselin, např. hydrolyzát kaseinu. Aminokyseliny samotné mohou ovšem při vyšších koncentracích inhibovat růst. Stimulující koncentrace závisí na druhu aminokyseliny.

Sacharidy slouží v médiu jako zdroj uhlíku a energie. Nejčastěji se používá sacharóza v koncentraci 2-3 %, někdy se nahrazuje glukózou či fruktózou. Jiné sacharidy jsou méně efektivní. Sacharidy se do médií dodávají z důvodu převážné heterotrofní výživy explantátů.

Růst explantátové kultury je možné často stimulovat přidáním řady organických extraktů, např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, extraktu z banánů či pomorančové nebo rajčatové šťávy. Někdy se do médií dodává i aktivní uhlí, může mít na růst stimulační i inhibiční efekt.

Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. Jeho gel je stabilní při kultivačních teplotách, nereaguje se složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Jeho tuhost se reguluje koncentrací a druhem agaru a pH média. Kromě agaru je možné používat ke zpevnění média syntetickou agarózu, Phytigel a Gerlite. Další možností je fixace explantátu na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě nebo perforovaném celofánu. (14)

Růstové regulátory jsou látky ovlivňující růst a vývoj rostliny i rostlinných kultur, způsobují změny kvantitativní, ale i kvalitativní. Působí zásahem do integrity (celistvosti) rostlin, mohou korigovat stupeň větvení, délku stonku, vývin kořenů, poměr mezi vegetativními a generativními orgány, stupeň dormance, senescence apod. Působí na úrovni genu, v určitých případech umožňují začátek syntézy bílkovin enzymů, které pak kontrolují metabolismus a fyziologické procesy v rostlinách. Růstové regulátory jsou buď přirozené, tzv. fytohormony, které rostlina sama syntetizuje v určité části a translokuje je do části jiné, kde v malých dávkách vyvolávají fyziologickou reakci, nebo syntetické. Regulátory růstu můžeme dále rozdělit na regulátory povahy stimulační (stimulátory) a povahy inhibiční (inhibitory). Toto rozlišení je ovšem nepřesné, protože i stimulátor může ve vyšších koncentracích růst inhibovat a naopak inhibitor ve velmi nízkých koncentraci může mít účinek stimulační. Neexistuje růstový proces, který by byl ovlivňován pouze jedním fytohormonem a neexistuje ani fytohormon, který by ovlivňoval pouze jediný

růstový proces. Účinek fytohormonů je tedy pleiotropní. Regulátory růstu ovlivňují chování kultury buď samostatně, nebo častěji ve vzájemných kombinacích. Jejich účinek závisí na druhu použité látky, na konkrétní látce a na její koncentraci. Celá kultivace může proběhnout na médiích, kde se nemění obsah rostlinných hormonů. Častěji se však zastoupení rostlinných hormonů v médiu mění kvalitativně i kvantitativně v průběhu kultivace, respektive při přenášení na čerstvé kultivační médium. Jiné je složení pro indukci kalusu, jiné pro jeho vlastní kultivaci. Někdy se s úspěchem využívá jen krátké, tzv. pulzní působení. (17, 18)

Růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová.

Mezi používané auxiny patří především kyseliny indolyloctová, indolylmásečná, dichlorfenoxyoctová a naftyloctová, pouze první z nich je nativní, ostatní jsou syntetické. Různé druhy auxinů mají různou fyziologickou aktivitu, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jiným způsobem metabolizovány. V kultivačním médiu se používají za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu apikálních meristémů. (14)

Zástupci používaných cytokininů jsou nativní 6-dimethylaminopurin a zeatin a syntetický benzylaminopurin a kinetin. Cytokininy stimulují buněčné dělení, indukují tvorbu prýtů a inhibují tvorbu kořenů. (14)

Morfogenetická reakce v explantátové kultuře je značně závislá na vzájemném poměru auxinu a cytokininu v médiu. Iniciace tvorby kořenů, embryogeneze a iniciace tvorby kalusu je stimulována, je-li poměr auxinu a cytokininu vysoký. Je-li naopak nízký, je indukována tvorba adventivních či axilárních prýtů. Stejně významná jako poměr auxinu a cytokininu je i jejich koncentrace. (14)

Zástupce giberelinů (GA_3 a GA_7) a kyselina abscisová mohou u některých druhů růst stimulovat, ale většina explantátů je pro růst nevyžaduje. Gibereliny stimulují růst buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, růst kalusu a zakrslých rostlin. Abscisová kyselina stimuluje nebo inhibuje růst kalusu v závislosti na rostlinném druhu, stimuluje proliferaci prýtů a inhibuje pozdější fáze embryogeneze.

Chemické složení a fyzikální vlastnosti média musí odpovídat požadavkům rostliny v různých fázích rozmnožovacího cyklu. V první etapě se do média přidávají antioxidanty, které zabraňují aktivaci hydrolytických enzymů a hynutí explantátů.

Ve druhé etapě se médium často obohacuje o látky, které stimulují tkáňovou proliferaci, především vyšší koncentrace cytokininů. Ve třetí etapě množení se do média přidávají auxiny podporující tkáňovou diferenciaci a elongační fázi růstu. (14)

3.2.4.2 Fyzikální podmínky kultivace

Ke kultivačním podmínkám náleží kromě složení živného média také světelný režim, tj. intenzita a kvalita světla a fotoperioda, významnou úlohu hraje i teplota, aerace a acidita kultivačního média. Teplota a světlo ovlivňují explantátovou kulturu modifikováním nejrůznějších biochemických a fyziologických procesů, včetně metabolismu růstových regulátorů. Zvýšená či snížená teplota může například významně ovlivnit androgenezi u řady druhů. (17)

V závislosti na světle dochází často v intaktních rostlinách i v tkáňových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů, což bývá spojeno s anatomickou diferenciací. Světlo může být také indukčním faktorem některých biosyntetických pochodů nebo může ovlivňovat orgánovou diferenciaci. Může také způsobovat degradaci rostlinných hormonů v kultivačním médiu. Rozhodující přitom není jen intenzita a délka působení světla, ale také vlnová délka světelného záření. (4)

Teplotní optima metabolických reakcí jsou obvykle okolo 28 °C. Kultivační teplota bývá zvolena empiricky v těsném rozmezí okolo 25 °C. Teplota má vliv na dobu zdvojení počtu buněk, její zvýšení může indukovat organogenezi kultur. (14)

Přesná hodnota pH živného média není u rostlinných tkáňových kultur bezpodmínečně nutná. Používané roztoky bývají slabě kyselé, optimální hodnota pH je závislá na typu kultury. Většinou je počáteční hodnota pH média mezi 5,5 - 6,0. V případě potřeby se acidita média upravuje přísadou hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové. (4)

3.2.5 Využití explantátových kultur k produkci sekundárních metabolitů

Rostliny mají schopnost syntetizovat ze živin pestrou paletu látek, jejichž funkce není zřejmá a které jsou pravděpodobně pro růst rostliny postradatelné. Existují různé teorie o funkci těchto rostlinných sekundárních metabolitů – část autorů věří v jejich ekologickou funkci (repelenty proti predátorům a parazitům), jiní

zastávají názor, že mají regulační funkci v metabolismu, někdy jsou tyto látky považovány za produkt detoxikačního metabolismu. (14)

Z principů totipotence rostlinné buňky vyplývá, že pletivové a buněčné kultury mají kompletní genetickou výbavu daného genotypu a mohou tudíž syntetizovat a hromadit sekundární produkty typické pro intaktní rostlinu. Neplatí to ovšem ve všech případech. Neschopnost některých kultur syntetizovat a akumulovat sekundární metabolity typické pro původní rostlinu se vysvětluje mutacemi nebo ztrátou genů řídících jednotlivé úseky biosyntetické dráhy, ale také represí faktorů kódujících biosyntézu enzymů a jejich aktivitu, případně vznik specifických buněčných struktur. Někdy se naopak setkáme se situací, kdy se v pěstovaných pletivech tvoří látky, které v rostoucí rostlině nejsou. (12)

Tkáňové kultury mají proti tradičním způsobům získávání sekundárních metabolitů podstatné výhody. Syntéza probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatu a půdních podmínkách, produkčním systémem jsou vyloučeny negativní biologické vlivy (mikroorganismy a hmyz). Můžeme selektovat kultivary s vyšší produkcí a pomocí automatizace řízení buněčného růstu a regulací metabolických procesů může klesat výrobní cena a stoupat produkce. (14)

Pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami se zdá perspektivní využití imobilizovaných rostlinných buněk. Imobilizace buněk spočívá v jejich uzavření do nosného inertního materiálu, používá se např. agar, alginát sodný, agaróza, želatina nebo polyuretanová pěna. Imobilizované buňky jsou potom kultivovány v bioreaktorech a mohou se používat k biotransformacím nebo komplexním syntézám. (14)

Syntézu a akumulaci sekundárních metabolitů je možné považovat za aspekt diferenciací. Ukazuje se, že v rychle rostoucích kulturách se produkuje malé množství a naopak při vyšší produkci metabolitů dochází ke zpomalení růstu kultury. Faktory zpomalující růst buněčných kultur působí často stimulačně na produkci sekundárních metabolitů omezením metabolismu primárního. Stimulačně na produkci může působit i vliv určitého stresu, např. snížení koncentrace živin, růstového regulátoru nebo aplikace prekurzorů či elicitorů do média. (14)

Tkáňové kultury jsou využívány např. k produkci kardioglykosidů digitoxinu a lanatosidu k léčbě srdečních onemocnění a alkaloidů vinkristinu a vinblastinu pro léčbu leukémie. Problémem zůstává obvykle nízký obsah produkovaných látek s nestabilitou produkce. Do stádia průmyslové výroby byly dotaženy zatím některé

kultury, např. kultura *Lithospermum erythrorhizon* produkuje 5x více shikoninu oproti původní rostlině. Průmyslová fermentace buněk tabáku se využívá k produkci ubichinonu a nikotinu. (12)

3.2.6 Mikropropagace rostlin

K tradičním způsobům vegetativního množení rostlin se v posledních desetiletích řadí metoda tkáňových kultur – tzv. mikropropagace. Proti běžněji používaným postupům má mikropropagace mnoho výhod. Kultura se odvozuje z velmi malých částí rostlin, na nichž regenerují malé rostliny, vyžaduje tedy málo prostoru k produkci velkého počtu rostlin. Rozmnožování se provádí ve sterilních podmínkách, nedochází k úhynu rostlin v důsledku onemocnění a odvozené rostliny jsou prosté bakteriálních a houbových nákaz. V kultuře *in vitro* je možné úpravou kultivačních podmínek eliminovat virové částice přítomné v explantátu. Produkce bezvirózních rostlin usnadňuje mezinárodní výměnu rostlin vzhledem k sanitárním opatřením jednotlivých států. Podmínky množení jsou přesně definovány a faktory ovlivňující rozmnožování je možné za účelem zvýšení koeficientu množení přesně regulovat. Rychlost mikropropagace je tedy mnohem vyšší než u tradičních metod. Metoda dává možnost produkovat i klony či druhy rostlin, které se tradičními metodami vegetativního množení množí pomalu nebo vůbec. Klonování *in vitro* je možné provádět celoročně bez ohledu na meteorologické podmínky. Metoda neklade velké nároky na skleníkové plochy pro uchovávání matečných rostlin, rostliny mezi pasážemi nevyžadují téměř žádnou péči. *In vitro* kultura umožňuje provedení rejuvenilizace potřebné pro klonování dřevin. Kultury je možné uchovávat dlouhou dobu při nízké teplotě a v prostředí prostém patogenů. To umožňuje rovnoměrně načasovat produkční systém na jednotlivá období roku. Mikropropagace umožňuje zkrátit šlechtitelský cyklus a rychle namnožit nově vyšlechtěné odrůdy. Významná je i možnost genetické manipulace v *in vitro* systému. Nevýhodou mikropropagace je drahé laboratorní vybavení i provoz laboratoře a pracnost metody bez možnosti mechanizace. Problematická je i aklimatizace odvozených rostlin po přenosu z kultivačních nádob do podmínek *extra vitrum*. Existuje i nebezpečí vzniku geneticky aberantních rostlin, získané rostliny navíc nejsou autotrofní. (14)

3.3 Kumariny

Kumarin je aromatická, vonná látka. Byl izolován v roce 1820 z tonkových bobů, což jsou semena jihoamerického stromu *Dipteryx odorata* z čeledi *Fabaceae*, pocházejícího z Guayany a Brazílie. Od kumarinu se odvozují glykosidické látky – obecně tzv. kumariny. (2)

Podle chemické konstituce lze kumariny rozdělit na jednoduché kumariny – sloučeniny substituované hlavně v polohách C-6 a C-7 hydroxylovou nebo methoxylovou skupinou, méně pak v polohách C-5 a C-8 (hydroxykumariny a methoxykumariny). Kondenzované kumariny můžeme dále rozdělit na furanokumariny s přikondenzovaným furanovým kruhem v poloze C-6/C-7 (psoralenový typ) nebo v poloze C-7/C-8 (angelicinový typ) a pyranokumariny s přikondenzovaným pyranovým kruhem v poloze C-7/C-8. (11)

Kumarinových glykosidů je známo asi 200, z nich více než polovina byla izolována z rostlin čeledi miříkovitých (*Apiaceae*). Kromě toho byly nalezeny v zástupcích 30 dalších čeledí rostlin, např. bobovitých (*Fabaceae*), routovitých (*Rutaceae*), hluchavkovitých (*Lamiaceae*), hvězdicovitých (*Asteraceae*), lipnicovitých (*Poaceae*) atd. Jde tedy o látky všeobecně poměrně rozšířené. Nejvíce kumarinů se nachází obvykle v kořenech a semenech, to bylo podnětem k vyslovení teorie, že mají v rostlinách funkci jakýchsi usměrňovačů růstu a klíčení. (2)

Svou strukturou patří kumariny mezi deriváty α -chromonu, vznikají z cis-formy kyseliny o-hydroxyskořicové vytvořením laktonového kruhu. Prekursor kumarinu v rostlinách jsou glykosidy kyseliny o-kumarové (trans forma) a kyseliny kumarinové (cis forma), které jsou enzymem izomerázou udržovány ve vzájemné rovnováze. Při sušení se glykosidy štěpí a tvoří se kumarin, lakton volné kumarinové kyseliny, která se stále vytváří z kyseliny o-kumarové v důsledku posunu rovnováhy. Kumarin je příčinou charakteristické vůně drogy. (19)

Nositelem účinku kumarinů je podobně jako u kardioaktivních glykosidů nenasycený laktonový kruh. Kumariny působí tlumivě na centrální nervový systém, snižují horečku a mají hypnotické účinky, některé působí také spasmolyticky. Velmi silně absorbují ultrafialové záření. Obzvláště některé furanokumariny senzibilizují kůži na sluneční ozáření a používají se tedy k léčbě vitiliga (depigmentace kůže), některé furanokumariny mohou působit i jako rybí jedy. Dříve se kumarin používal do potravinářských výrobků jako aromatická přísada, dnes je toto použití značně omezeno a v mnoha zemích zcela zakázáno z důvodu jeho značné toxicity. Účinky

odstraňující krevní srážlivost jsou zvláště patrné u dikumarolu, který působením antagonistickým vitamin K omezuje v játrech tvorbu protrombinu a dalších hemo-koagulačních faktorů. (19)

Toxikologicky významný je fotosenzibilizující efekt furanokumarinů. Mají prokázané mutagenní a karcinogenní vlastnosti (zabudováním do nukleových kyselin a poškozením genomu dochází k tvorbě melanomů). Způsobují anomálie v buněčném dělení, změny permeability membrán a s tím související změny v aktivních transportních procesech, poruchy glykolýzy a buněčného dýchání, porušení syntézy bílkovin a DNA a buněčnou smrt. Klinické projevy fotosenzibilizace závisí na typu fotodynamické látky, na množství, které se periferním oběhem dostalo do pokožky, a na délce působení UV záření. Počáteční svědění, pálení a celkový neklid se může vyvinout až do formy generalizované fototoxické reakce charakterizované erytémem a edémem, častými sekundárními infekcemi, které mohou vést až k nekrotizaci velkých ploch pokožky. Z celkových příznaků se může objevit žloutenka, furanokumariny mohou být také příčinou alergické kontaktní dermatitidy a fotodermatitidy. (10)

3.4 Rostliny a stres

V průběhu života jsou rostliny vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí, které mohou zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést až k jejich uhynutí. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu označujeme jako stresové faktory neboli stresory. Termín stres obvykle souhrnně označuje stav, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů. Nejde přitom o ustálený a snadno definovatelný stav, ale o dynamický komplex mnoha reakcí.

U rostlin je problematika stresu komplikovanější než u živočichů. Je to dáno přisedlým způsobem života rostlin, který neumožňuje únik před působením stresorů a také větší mezidruhovou variabilitou a heterogenitou vnitřního prostředí rostlin.

Stresové faktory pronikají v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur do vnitřního prostředí různých druhů rostlin nesterjně snadno. Tento způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter, jedná se v podstatě o schopnost vyhnout se stresu (např. tlustá kutikula listů, výrazná impregnace buněčných stěn, rezervoáry vody a snadno rozložitelných organických látek tlumících jejich

nedostatek). I vhodně načasované životní cykly přispívají k této pasivní ochraně před stresem.

Zajímavější jsou mechanismy aktivní odolnosti, které omezují negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn označovaného jako stresová reakce. (20)

3.4.1 Stresory

Stresové faktory, se kterými se rostliny v přírodě setkávají, můžeme rozdělit na abiotické a biotické, abiotické stresory podle povahy dále na faktory fyzikální a chemické. Biotické stresové faktory pak zahrnují závažné negativní vlivy ostatních rostlin, živočichů a mikroorganismů na stresovanou rostlinu.

Mezi fyzikální abiotické stresory řadíme negativní mechanické účinky větru, nadměrné záření, především ultrafialové a viditelné oblasti, a extrémní teploty zahrnující horko, chlad, případně mráz.

Mezi abiotické stresory chemické povahy patří nedostatek vody, nedostatek kyslíku (hypoxie nebo anoxie), nedostatek živin v půdě, nadbytek iontů solí a vodíku v půdě, toxické kovy a organické látky v půdě a toxické plyny obsažené ve vzduchu.

Jako biotické stresory pak působí herbivorní živočichové, kteří rostliny buď poraní, nebo spasou, dále viry, mikrobi a houby souhrnně označované jako patogenní mikroorganismy a také ostatní rostliny, které se alelopatii či parazitismem vzájemně ovlivňují. (20)

3.4.2 Stresová reakce

Průběh stresové reakce u rostlin lze zjednodušeně popsat stejně jako u člověka. Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí v první, tzv. poplachové fázi. Pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, dochází záhy k mobilizaci kompenzačních mechanismů ve fázi restituční. Tyto mechanismy směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům, tedy k fázi rezistence. Nastalé zvýšení odolnosti nemá vždy trvalý charakter, při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být ve fázi vyčerpání vystřídáno dalším poklesem odolnosti. Toto základní schéma ovšem nevypovídá o rozmanitosti vlastního působení stresorů ani

o koordinaci složitého komplexu reakcí, kterými je odpověď rostliny na jejich působení podložena.

Průběh a konečný výsledek stresové reakce závisí na intenzitě a délce působení stresového faktoru na rostlinu i na geneticky vázaných předpokladech odpovědi, souhrnně označovaných jako adaptační schopnosti. Termín aklimace označuje přechodné zvýšení odolnosti získané pod vlivem stresoru, které může být založeno na změnách rychle pomíjivých, např. na tvorbě specifických metabolitů, i na změnách trvalejších, např. změnách v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře.

Zvýšení odolnosti a opětovné ustavení homeostáze i za dlouhodobého působení stresorů bývá dosahováno za cenu energetických nákladů, především na syntézu specifických metabolitů. Tyto změny jsou často provázány snížením rychlosti tvorby biomasy. Působení stresorů může na druhé straně podmiňovat průběh důležitých morfogenetických procesů, např. klíčení nebo tvorby květních orgánů, a tím zvýšit reprodukční schopnosti i kompetitivní úspěšnost. Posuzování příznivosti či nepříznivosti vnějších faktorů pro rostliny je tedy obtížné, velmi významné je při tomto hodnocení i časové měřítko. Působení stresorů bývá často omezeno jen na určitou část rostliny, např. kořeny či listy, ve které dochází k lokální stresové reakci. Ta může druhotně způsobovat stres i v ostatních orgánech. (20)

3.4.3 Obranné reakce rostlin

Mechanismus působení různých stresových faktorů je do značné míry specifický, stejně rozmanité jsou i reakce rostlin směřující k potlačení následků působení stresoru. I přes velkou různorodost aklimačních biochemických změn v buňkách lze najít některé procesy, které se opakují i při působení velmi odlišných stresorů.

Aklimační reakce, podobně jako některé jiné projevy fenotypové plasticity, podléhají také genově vázanému řízení. Jsou to vlastně jisté "programy" aktivace určitých genů, které mohou být za jistých okolností spuštěny, a to někdy i několika odlišnými mechanismy. I přes výhrady k představě jediné obecné stresové reakce nepochybně u rostlin existují jisté dílčí komplexy společných reakcí, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresům současně. K nejčastějším společným změnám, které vedou ke zvýšení odolnosti patří tvorba stresových proteinů, tvorba

a odstraňování aktivních forem kyslíku, tvorba stresových fytohormonů a tvorba osmoregulačních sloučenin.

Pod vlivem stresového faktoru dochází během několika desítek minut k dramatickým změnám v kvantitativním i kvalitativním zastoupení proteinů v buňkách. V hojné míře se syntetizují stresové proteiny, které se za normálních okolností nedají v buňkách zjistit nebo jsou v mnohonásobně menším množství. Mezi proteiny, jejichž tvorba je indukována nespecificky různými typy stresorů patří např. molekulární chaperony, proteázy nebo ubikvitin.

Běžný molekulární kyslík může být některými mechanismy v rostlinách přeměněn na aktivnější formy (singletový kyslík a superoxidový anion) nebo silně oxidační sloučeniny (hydroxylový radikál či peroxid vodíku). Úloha těchto látek ve stresovaných rostlinách je rozmanitá a rozporná. Vznikají jednak jako nebezpečné produkty při působení řady stresových faktorů a rostliny musí mít systémy na jejich deaktivaci a jednak mohou mít kladnou úlohu jako signály či ochranné látky při některých typech stresů, a je tudíž žádoucí jejich koncentraci udržovat na jisté úrovni. Zásadní roli mají aktivní formy kyslíku v hypersenzitivní reakci při napadení rostliny patogenem. Peroxid vodíku v součinnosti s kyselinou salicylovou indukuje také tvorbu některých stresových proteinů. Regulovaná tvorba aktivních forem kyslíku může mít i přímý antimikrobiální účinek a může také významně přispívat ke zpevnění buněčné stěny a tím k větší odolnosti vůči různým stresovým faktorům. Peroxid vodíku se podílí i na vzniku pevných vazeb mezi proteiny v buněčné stěně a na zvýšení jejich nerozpustnosti.

Mezi stresové fytohormony, jejichž produkce vede v rostlinách k vyšší odolnosti proti stresorům, patří hlavně kyselina abscisová, ethylen, kyselina jasmonová, methyljasmonová a polyaminy. Mechanismus působení fytohormonů je podobný hormonům živočišným, vážou se na specifické vazebné bílkoviny, receptory na membránách či v cytoplazmě nebo v jádře. Komplex hormon-receptor pak v případě membránových receptorů aktivuje systémy druhých posílů a jejich prostřednictvím proteinkinázy, v případě cytoplazmatických a jaderných receptorů tento komplex přímo ovlivňuje expresi genů. (20)

Tvorba osmoregulačních sloučenin slouží rostlině ke zvýšení odolnosti proti působení nedostatku vody, nízké teploty či zasolení. Mezi takové látky patří např. cukry, polyalkoholy nebo jednoduché dusíkaté látky.

Vlastní obranná reakce na stres vyvolaný patogenními organismy zahrnuje kromě tvorby specifických stresových proteinů i syntézu a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem. Tyto sekundární metabolity s ochrannou funkcí jsou u některých druhů rostlin přítomny trvale, i když v menším množství než při infekci. Patří k nim různé flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy, které bývají souhrnně označovány jako fytoncidy či inhibitory.

Fytoalexiny jsou specifické nízkomolekulární obranné látky, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začínají se syntetizovat až po napadení patogenem. Více než 300 druhů fytoalexinů je po chemické stránce velmi různorodých. U systematicky příbuzných druhů se obvykle vyskytují podobné druhy fytoalexinů, u čeledi *Apiaceae* převažují furanokumariny. Většina fytoalexinů je lipofilních, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů. Mechanismem toxického působení fytoalexinů je poškození membránových funkcí.

Častou a účinnou reakcí na průnik patogenů je i řízená tvorba nekroz. V buňce jsou po napadení spuštěny biochemické procesy vedoucí k rychlé zkáze vlastní i napadající buňky. Při této hypersenzitivní reakci dochází k rozpadu membránového systému hlavně náhlým zvýšením koncentrace vysoce aktivních volných radikálů a peroxidu vodíku, i když je někdy provázena tvorbou dalších toxických látek.

Dalším typem obranných reakcí rostlin je rychlé zvýšení tvorby polysacharidu kalózy, který pak vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa. Kalóza je odolná vůči houbovým hydrolázám. Někdy se poblíž ohniska infekce založí sekundární meristém produkující buňky s dobrou ochrannou funkcí nebo může dojít k tvorbě odlučovací vrstvy a celá infikovaná část rostliny odpadne. (20)

3.4.4 Elicitace

Na počátku každé obranné reakce rostlin musí být podnět k jejímu spuštění, kterým obvykle bývá specifický metabolit (elicitor) uvolňovaný při počáteční interakci buňky s patogenem a identifikovaný vhodným receptorem hostitelské rostliny. Jako elicitory mohou sloužit jednak zmíněné metabolity patogenů (exogenní elicitory, např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy), jednak sloučeniny, které se uvolňují z narušovaných buněčných stěn obou organismů

(endogenní elicitory). K těm patří například oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteiny uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub či oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky.

Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory většinou neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu, tzv. druhých poslů. Přenos od aktivovaných receptorů elicitorů (obvykle v plazmatické membráně) k DNA v jádře je možný více systémy, které někdy fungují obdobně jako u přenosu signálu z receptoru fytohormonů. Například hydrolýzou lipidů plazmatické membrány jsou generovány signální sloučeniny inositoltrifosfát a diacylglycerol, které za účasti vápenatých iontů aktivují proteinkinázy a posléze i expresi genů. Aktivace proteinkináz zvýšenou koncentrací vápenatých iontů v cytosolu může být dosaženo i jinými cestami.

Častým a rychlým způsobem přenosu signálu je tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku vyvolaná elicitory. Kromě přímého účinku peroxidu vodíku na expresi genů existuje ještě nepřímá cesta, při které nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmonová a methyljasmonát, které následně ovlivňují transkripci. Při napadení rostliny patogeny se také rychle zvyšuje tvorba ethylenu, který se rovněž podílí na iniciaci genové exprese. (20)

Elicitaci můžeme provádět i v explantátových kulturách. Jedná se o indukční proces, při kterém přidáním vhodného elicitoru do živného média navodíme stresovou reakci. (14) Také elicitory můžeme rozdělit na abiotické a biotické. Mezi abiotické elicitory lze zařadit např. těžké kovy a jejich soli, změny teploty, pH, osmotického tlaku a ultrafialové záření. K biotickým elicitorům patří viry, bakterie, mykoplazmy nebo organické molekuly pocházející z těchto organismů. (21)

Stresovou reakcí navozenou přidáním těžkých kovů do média dojde k ovlivnění transkripce genů kódujících enzymy ovlivňující následně biosyntézu sekundárních metabolitů v explantátových kulturách. Experimentálně byl například potvrzen nárůst produkce anthracenových derivátů explantátovými kulturami *Rheum palmatum* L. po přidání iontů těžkých kovů do živného média. (22)

Pro zdárný průběh elicítace musí být splněno několik podmínek. Především musí být vhodně zvolený elicitor, každý elicitor totiž nestimuluje v buněčné kultuře produkci sekundárních látek. (23, 24) Optimálně musí být zvolena i koncentrace vybraného elicitoru a doba jeho působení. Důležité je i složení živného média

a samotný výběr vhodného rostlinného explantátu, včetně jeho stáří a fáze růstu. (25, 26, 27)

3.5 Stříbro

Stříbro je prvek první vedlejší skupiny periodické soustavy prvků s protonovým číslem 47 a atomovou hmotností 107,87. Vlivem vysokého efektivního náboje jádra na vnější elektrony má poměrně nízkou hodnotu atomového poloměru, a tedy vysokou hustotu. Jedná se o ušlechtilý kov, měkký, kujný a tažný. Za normálních podmínek je prvkem málo reaktivním, případné sloučeniny tvoří typicky v oxidačním stupni I. Stříbro se používá ke zhotovování speciálních nástrojů, v elektrotechnice a do různých slitin, koloidní roztoky stříbra slouží jako antiseptika a dezinficiencia v očním a ušním lékařství. Stříbro může tvořit oxidy, halogenidy (především bromid stříbrný se využívá při výrobě fotografií, fluorid stříbrnatý účinkuje jako fluorační činidlo), komplexní sloučeniny a především soli, z nichž dusičnan stříbrný je nejvýznamnější. Připravuje se rozpouštěním stříbra v kyselině dusičné a slouží k získání halogenidů stříbrných, jako analytické činidlo, ve farmaceuticko-medicínské praxi k dezinfekci, případně k leptání tkání. Využívá se i jeho adstringentní účinek. (28) V této práci byl dusičnan stříbrný využit jako elicitor přidávaný do média explantátových kultur, s cílem ovlivnit produkci kumarinů jako sekundárních metabolitů.

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.*

dusičnan stříbrný *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.

Pro pokusy byla použita jedenáctiletá 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-dichlor-fenoxyoctové a 0,4 mg/l benzylaminopurinu na roleru ve tmě a na světle (světelná perioda 16 h světlo/8 h tma). Pasážování bylo prováděno ve čtrnáctidenním intervalu.

4.3.1 Kultivace tkáňové kultury

Pro sledování vlivu dusičnanu stříbrného na produkci kumarinů byl k suspenzní kultuře šestý den po subkultivaci přidán 1 ml roztoku dusičnanu stříbrného tak, aby koncentrace v kultuře byla 0,17 a 0,85 mg/l. Kultura byla kultivována za střídavé světelné periody (16 h světlo/8 h tma). Kultury byly sklizeny po 24, 48, 72 a 192 hodinách od aplikace dusičnanu stříbrného, současně byly sklizeny kontrolní kultury bez přidavku dusičnanu stříbrného. 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.

4.3.2 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

Tab. č. 1: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 24 hodinách od aplikace elicitoru.

Koncentrace AgNO ₃ [mg/l]	Obsah kumarinů v buňkách [mg/g]	Směrodatná odchylka
0	0,593	0,047
0,17	0,471	0,148
0,85	0,258	0,008

Tab. č. 2: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 24 hodinách od aplikace elicitoru.

Koncentrace AgNO ₃ [mg/l]	Obsah kumarinů v médiu [mg/l]	Směrodatná odchylka
0	0,089	0,011
0,17	0,123	0,038
0,85	0,140	0,016

Tab. č. 3: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 48 hodinách od aplikace elicitoru.

Koncentrace AgNO ₃ [mg/l]	Obsah kumarinů v buňkách [mg/g]	Směrodatná odchylka
0	0,260	0,018
0,17	0,239	0,008
0,85	0,167	0,009

Tab. č. 4: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 48 hodinách od aplikace elicitoru.

Koncentrace AgNO ₃ [mg/l]	Obsah kumarinů v médiu [mg/l]	Směrodatná odchylka
0	0,157	0,008
0,17	0,128	0,008
0,85	0,123	0,010

Tab. č. 5: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 72 hodinách od aplikace elicitoru.

Koncentrace AgNO ₃ [mg/l]	Obsah kumarinů v buňkách [mg/g]	Směrodatná odchylka
0	0,594	0,025
0,17	0,467	0,093
0,85	0,428	0,076

Tab. č. 6: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 72 hodinách od aplikace elicitoru.

Koncentrace AgNO ₃ [mg/l]	Obsah kumarinů v médiu [mg/l]	Směrodatná odchylka
0	0,090	0,019
0,17	0,077	0,005
0,85	0,072	0,009

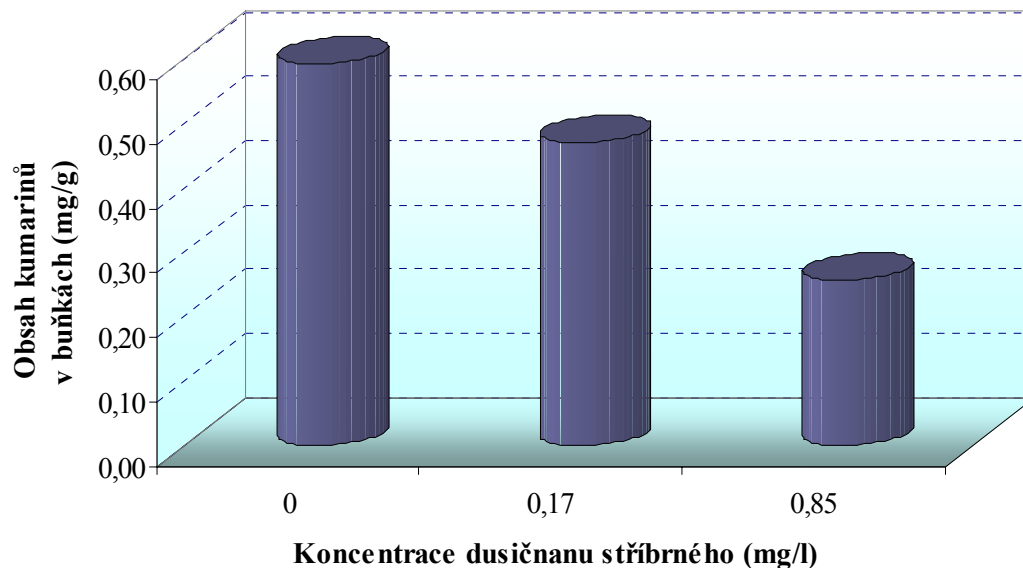
Tab. č. 7: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 192 hodinách od aplikace elicitoru.

Koncentrace AgNO ₃ [mg/l]	Obsah kumarinů v buňkách [mg/g]	Směrodatná odchylka
0	0,180	0,008
0,17	0,058	0,004
0,85	0,053	0,018

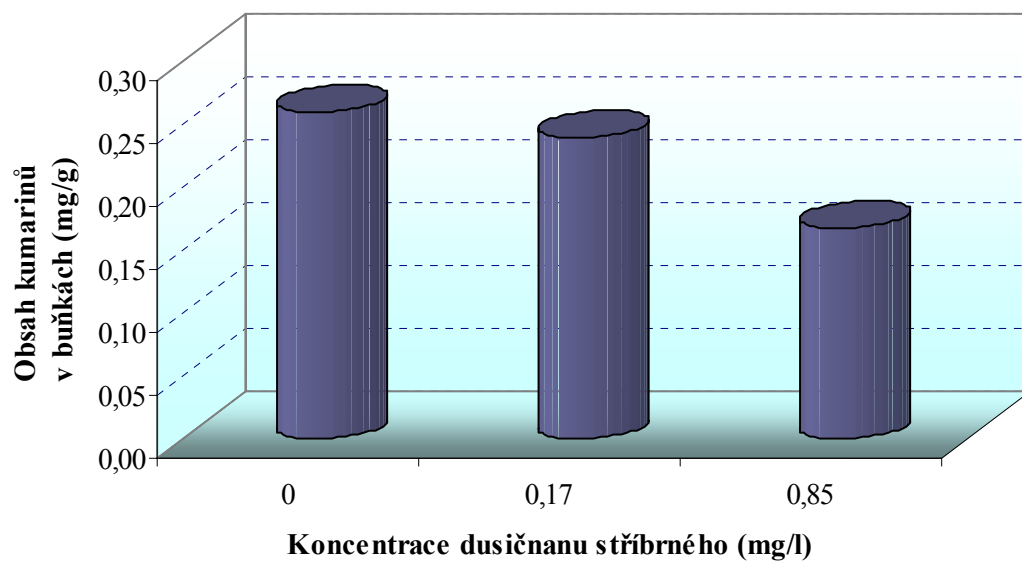
Tab. č. 8: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 192 hodinách od aplikace elicitoru.

Koncentrace AgNO ₃ [mg/l]	Obsah kumarinů v médiu [mg/l]	Směrodatná odchylka
0	0,281	0,012
0,17	0,036	0,006
0,85	0,003	0,000

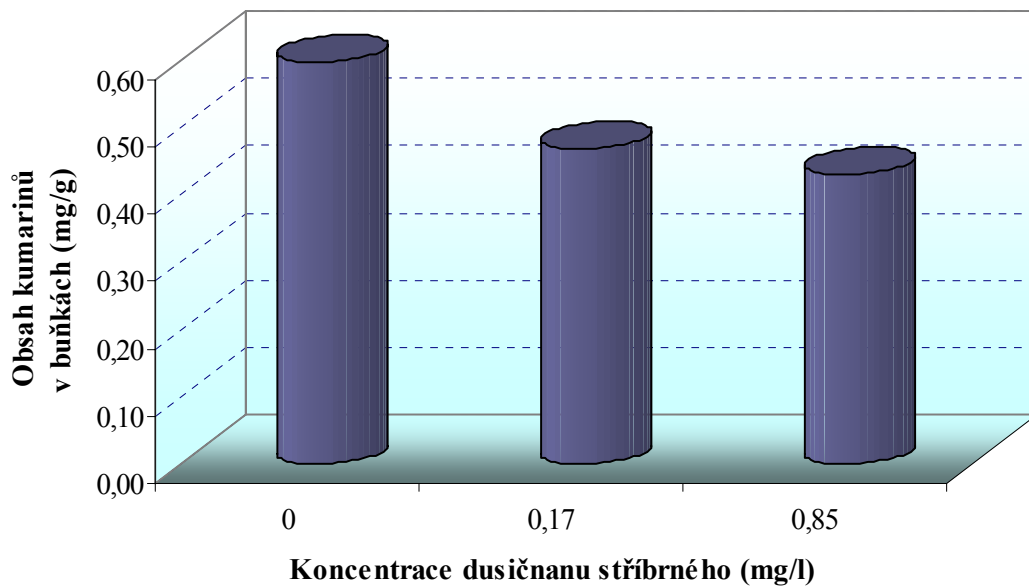
Graf č. 1: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 24 hodinách od aplikace elicitoru.



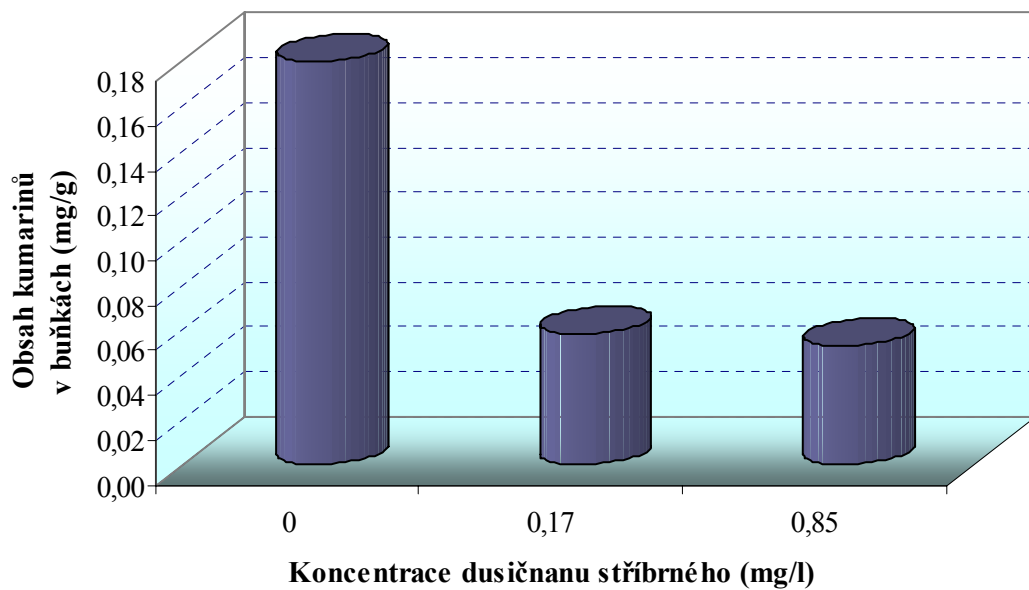
Graf č. 2: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 48 hodinách od aplikace elicitoru.



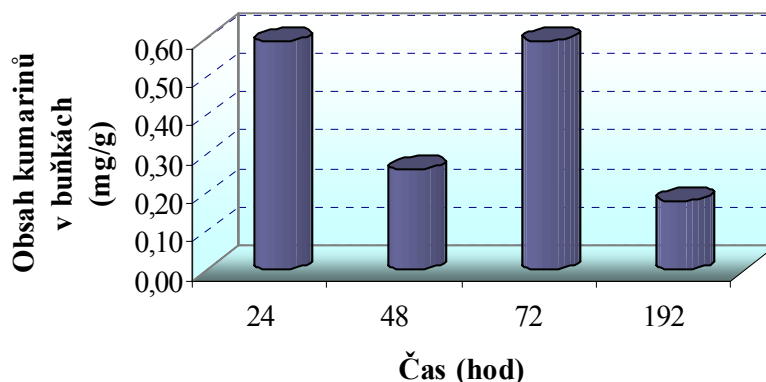
Graf č. 3: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 72 hodinách od aplikace elicitoru.



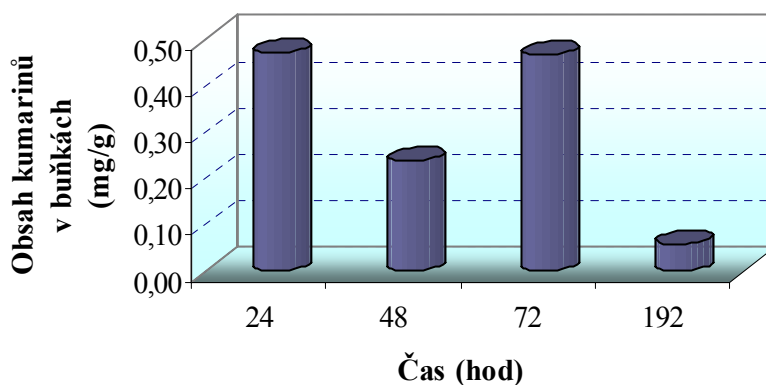
Graf č. 4: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 192 hodinách od aplikace elicitoru.



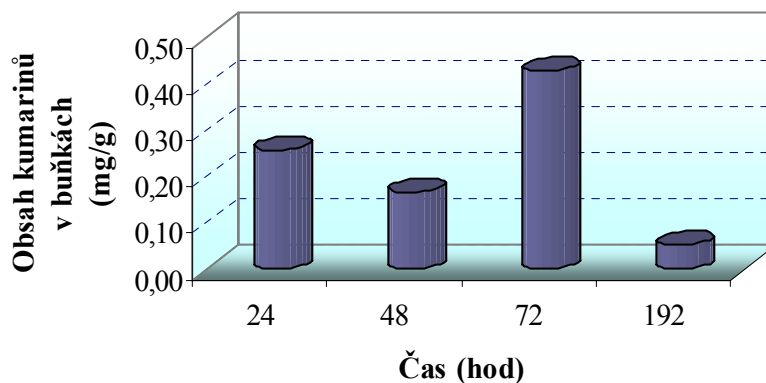
Graf č. 5: Závislost obsahu kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. na délce kultivace bez přidání dusičnanu stříbrného.



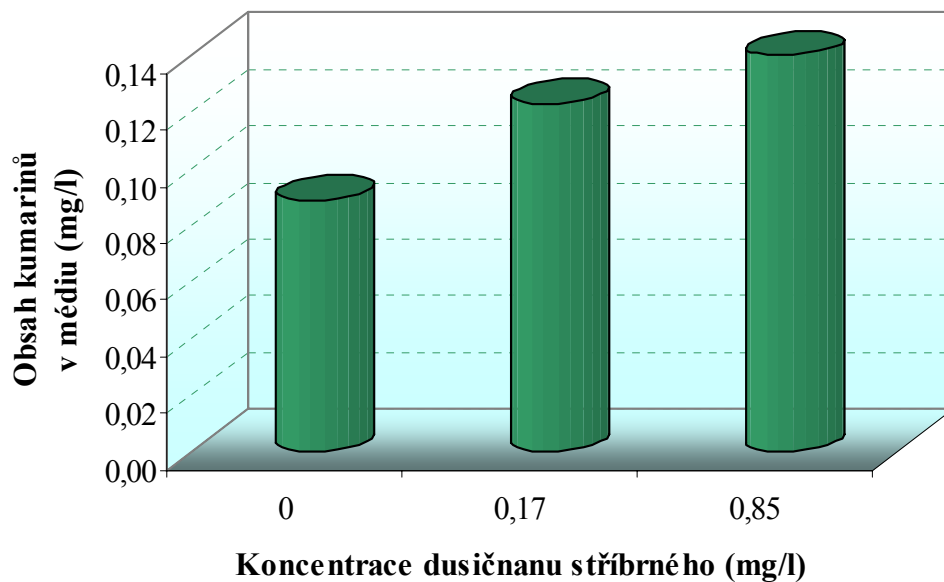
Graf č. 6: Závislost obsahu kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. na délce kultivace po přidání dusičnanu stříbrného o koncentraci 0,17 mg/l.



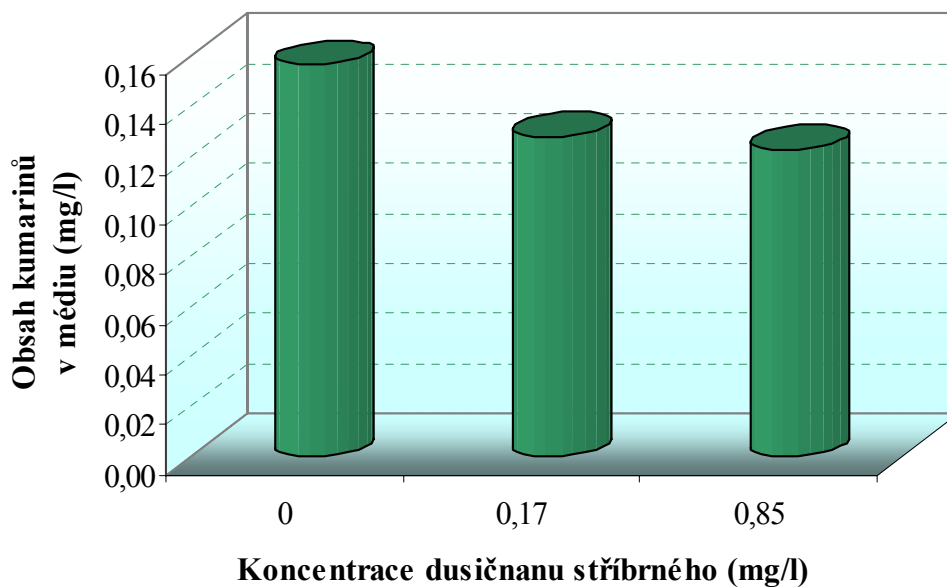
Graf č. 7: Závislost obsahu kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. na délce kultivace po přidání dusičnanu stříbrného o koncentraci 0,85 mg/l.



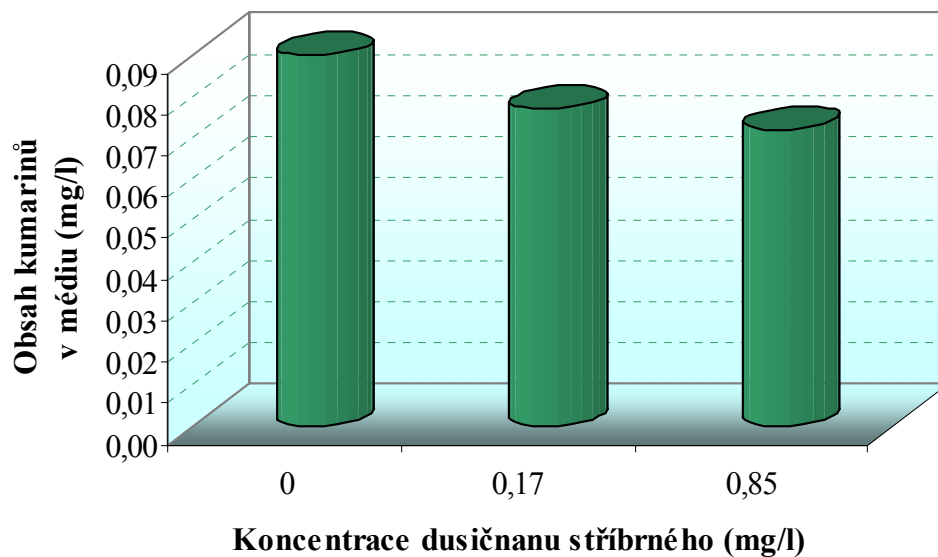
Graf č. 8: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 24 hodinách od aplikace elicitoru.



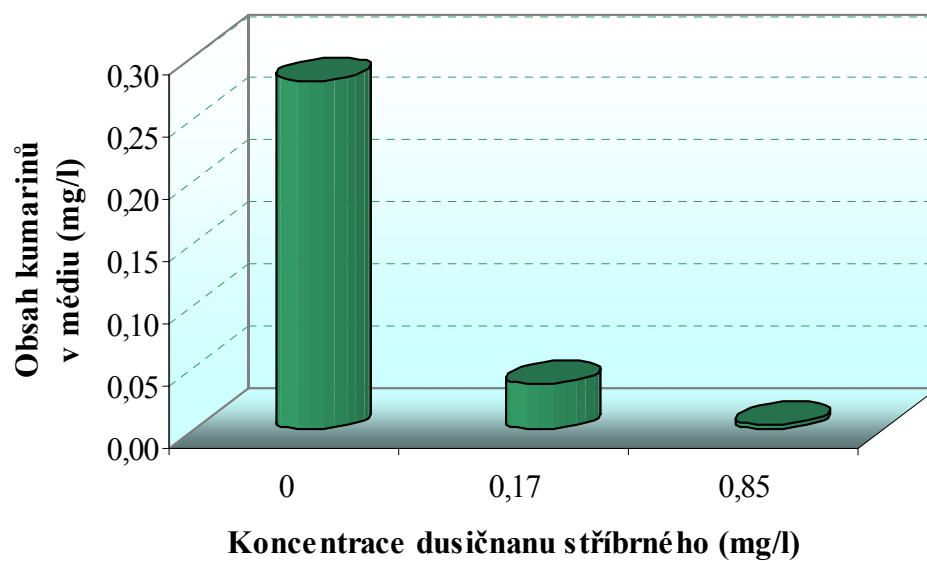
Graf č. 9: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 48 hodinách od aplikace elicitoru.



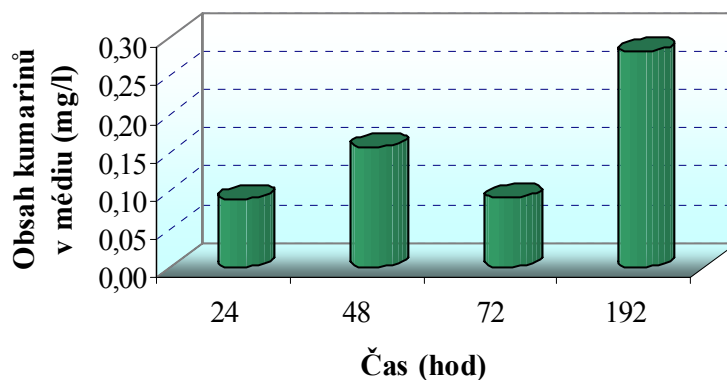
Graf č. 10: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 72 hodinách od aplikace elicitoru.



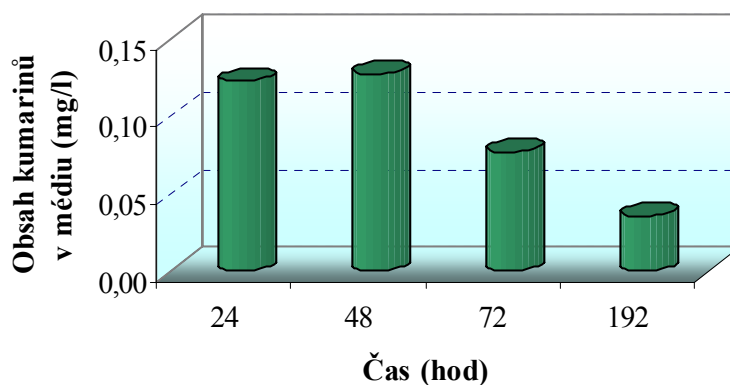
Graf č. 11: Vliv dusičnanu stříbrného na obsah kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. po 192 hodinách od aplikace elicitoru.



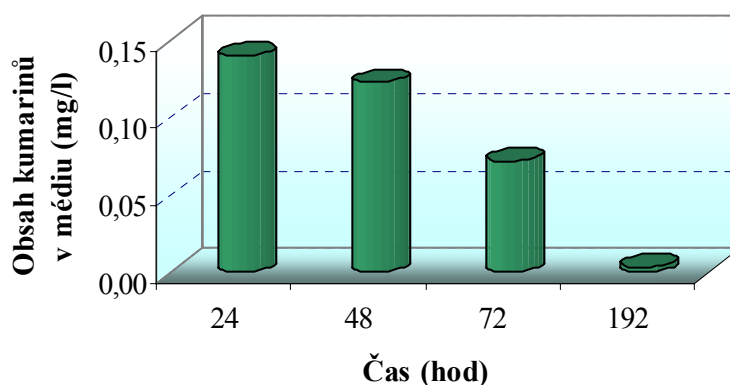
Graf č. 12: Závislost obsahu kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. na délce kultivace bez přidání dusičnanu stříbrného.



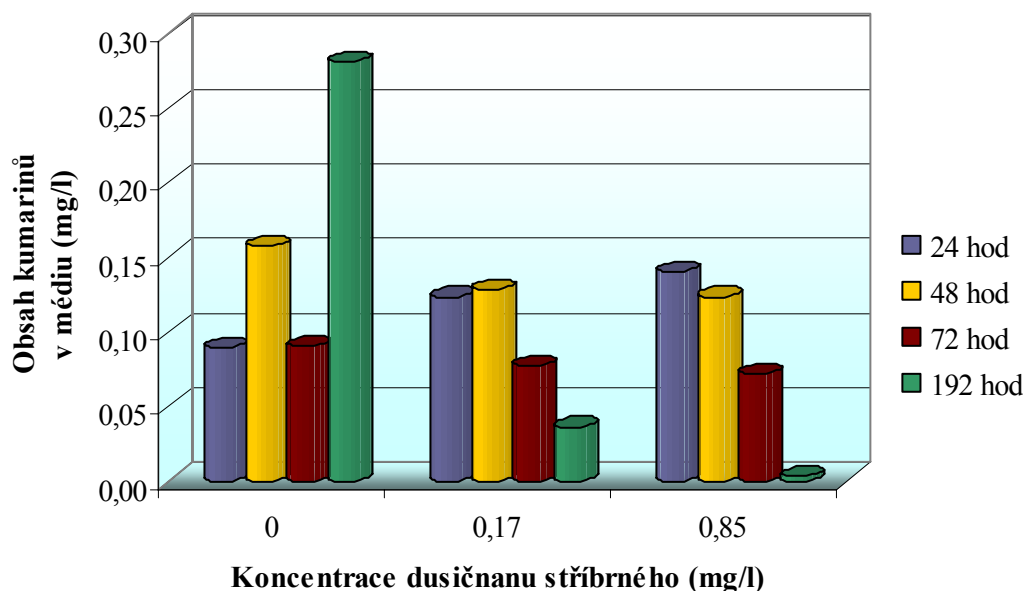
Graf č. 13: Závislost obsahu kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. na délce kultivace po přidání dusičnanu stříbrného o koncentraci 0,17 mg/l.



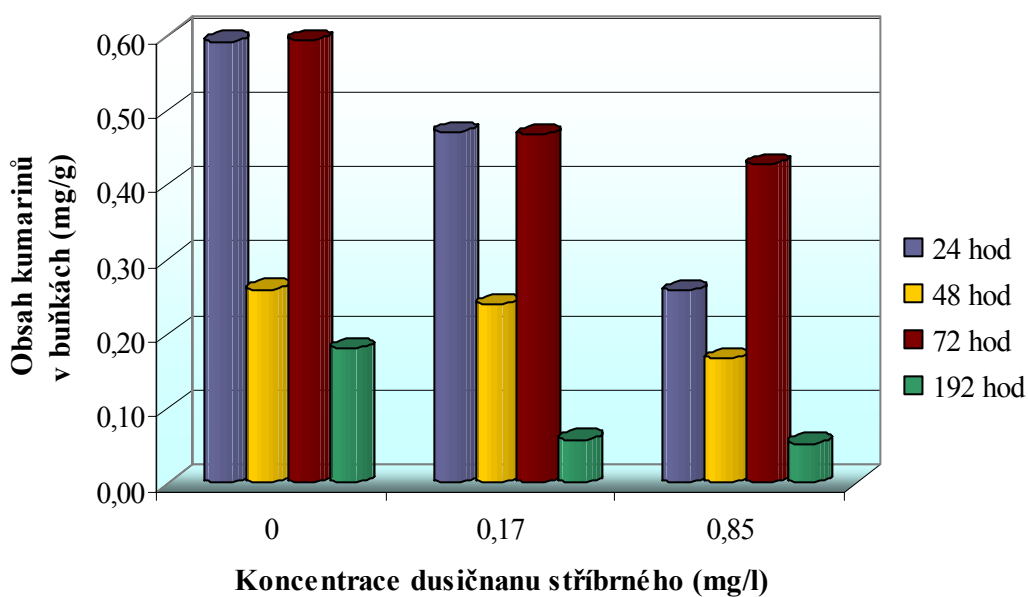
Graf č. 14: Závislost obsahu kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. na délce kultivace po přidání dusičnanu stříbrného o koncentraci 0,85 mg/l.



Graf č. 15: Souhrnné vyjádření závislosti obsahu kumarinů v médiu suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. na koncentraci přidaného dusičnanu stříbrného ve všech zkoumaných časech po přidání elicitoru.



Graf č. 16: Souhrnné vyjádření závislosti obsahu kumarinů v buňkách suspenzní kultury *Angelica archangelica* L. na koncentraci přidaného dusičnanu stříbrného ve všech zkoumaných časech po přidání elicitoru.



6 DISKUSE

Tato diplomová práce si kladla za cíl sledovat a popsat vliv dusičnanu stříbrného jako abiotického elicitoru na produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L.

Sledovala jsem působení dvou různých koncentrací dusičnanu stříbrného na produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L., v jednom případě byl ke kultuře přidáván dusičnan stříbrný tak, aby jeho koncentrace byla 0,17 mg/l, ve druhém případě byla cílová koncentrace dusičnanu v kultuře 0,85 mg/l. Třetí případ tvořily kultury kultivované bez přídavku elicitoru do média jako kultury kontrolní. Sledovala jsem časovou závislost produkce kumarinů suspenzní kulturou při dané koncentraci elicitoru, kultury byly sklizeny po 24, 48, 72 a 192 hodinách od aplikace elicitoru. Celá kultivace probíhala za střídavé světelné periody.

U kontrolních kultur kultivovaných bez přídavku stříbrných iontů jako elicitoru jsem sledovala zajímavou závislost uvolňování kumarinů do média na době kultivace. Nejvyšší obsah kumarinů vykazovalo médium kultury sklizené po 192 hodinách, o 44 % nižší obsah byl v médiu po 48 hodinách. Po 24 a 72 hodinách byl obsah kumarinů v médiu shodně o 68 % nižší než v maximu po 192 hodinách.

Koncentrace 0,17 mg/l dusičnanu stříbrného v kulturách působila proti kontrole na obsah kumarinů v médiu pozitivně pouze po 24 hodinách, kdy došlo k nárůstu o 38 %. Ve všech kulturách vystavených vlivu dusičnanu stříbrného o koncentraci 0,17 mg/l déle než 24 hodin došlo ve srovnání s kontrolou k poklesu obsahu kumarinů v médiu, nejvíce patrný byl pokles po 192 hodinách – o 87 % proti kontrole.

I vliv dusičnanu stříbrného v koncentraci 0,85 mg/l byl v případě 24-hodinového působení stimulační, v médiu jsem zjistila o 57 % více kumarinů než v kontrolní kultuře. Při delším působení této koncentrace jsem sledovala pokles obsahu kumarinů v médiu, nejvýrazněji opět po 192 hodinách kultivace, tentokrát dokonce téměř o 99 %.

Hodnocením závislosti z opačného hlediska lze dojít k závěru, že po 24 hodinách měl přídavek dusičnanu stříbrného pozitivní vliv, čím vyšší koncentraci elicitoru byla kultura vystavena, tím vyšší byl obsah kumarinů v médiu.

Po 48-hodinové kultivaci se situace obrátila, obsah kumarinů byl nejvyšší v médiu kontrolní kultury a s přibývajícím koncentrací dusičnanu stříbrného zvolna klesal. Stejná byla situace i po 72 hodinách kultivace.

Nejvýraznější změny jsem zaznamenala po 192 hodinách kultivace, obsah kumarinů v médiu proti kontrole výrazně klesl již po přidání dusičnanu stříbrného v koncentraci 0,17 mg/l, při působení vyšší koncentrace tvořil obsah kumarinů v médiu pouze 1 % obsahu v kontrolní kultuře.

V buňkách kontrolní kultury byla produkce kumarinů v inverzní závislosti na čase oproti závislosti obsahu kumarinů v médiu stejné kultury. Po 24 hodinách kultivace byl obsah kumarinů v buňkách nejvyšší, následoval pokles o 56 % po kultivaci dlouhé 48 hodin, 72 hodin kultivace znamenalo opět návrat k maximálnímu obsahu totožnému s obsahem v čase 24 hodin. Kultivace 192 hodin měla za následek výrazný pokles na pouhých 30 % maximální hodnoty.

Po přidání dusičnanu stříbrného v koncentraci 0,17 mg/l zůstala závislost velmi podobná – z maximální hodnoty v čase 24 hodin došlo nejprve k poklesu na 49 % v čase 48 hodin od přidání elicitoru, za dalších 24 hodin obsah stoupl na více než 99 % maximální hodnoty. Působení elicitoru po dobu 192 hodin mělo za následek pokles obsahu kumarinů v buňkách o 88 % vzhledem k hodnotě v čase 24 hodin.

Ve srovnání s kontrolou způsobil dusičnan stříbrný v koncentraci 0,17 mg/l pokles obsahu kumarinů v buňkách ve všech časech od přidání elicatorů – nejmenší pokles (o 8 %) jsem zaznamenala po 48 hodinách, po 24 i 72 hodinách klesl obsah o 21 %, po 192 hodinách došlo k poklesu o 68 % vzhledem ke kontrole.

Přidání 0,85 mg/l dusičnanu stříbrného mělo za následek změnu časového průběhu hromadění kumarinů v buňkách – střídavá tendence sice zůstala zachována, ale na rozdíl od obou předchozích případů byl obsah v čase 72 hodin po přidání elicitoru o 66 % vyšší než v čase 24 hodin. Po 48 hodinách působení dusičnanu stříbrného byl obsah kumarinů v buňkách nižší, nejnižší byl opět po 192 hodinách.

Ve srovnání s kontrolou měla koncentrace dusičnanu stříbrného 0,85 mg/l za následek výraznější pokles obsahu kumarinů v buňkách než koncentrace 0,17 mg/l. Po 24 hodinách klesl obsah o 56 %, po 48 hodinách o 36 %, 72 hodin kultivace způsobilo pokles o 28 %. Nejvýraznější snížení obsahu kumarinů v buňkách jsem zaznamenala po 192 hodinách, došlo zde, podobně jako u výše zmíněné nižší koncentrace, k poklesu o 71 % proti buňkám kontrolní kultury.

Při hodnocení závislosti obsahu kumarinů v buňkách na přidané koncentraci dusičnanu stříbrného nalezneme ve všech zkoumaných časech stejný vztah – přidavkem elicitoru dochází ke snižování obsahu kumarinů v buňkách, vyšší koncentrace způsobují výraznější pokles, pouze v čase 192 hodin působí obě koncentrace elicitoru téměř shodné snížení.

Sledováním vlivu dusičnanu stříbrného na produkci kumarinů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L. kultivovanou za střídavé světelné periody jsem tedy došla k závěru, že v žádné ze sledovaných koncentrací a při žádné délce působení elicitoru nebylo dosaženo významného zvýšení obsahu kumarinů ani v médiích, ani v buňkách. Působení stříbrných iontů jako elicitoru za daných podmínek se zdá být pro suspenzní kulturu negativní a tedy bez praktického přínosu.

V minulosti byl sledován vliv abiotického elicitoru chloridu hlinitého na produkci sekundárních metabolitů suspenzní kulturou *Angelica archangelica* L. po čtrnáctidenní kultivaci za tmy a za světla. Za světla kultivované kultury reagovaly na všechny koncentrace pozvolným snížením obsahu kumarinů v médiích i v buňkách, naopak zvýšení obsahu kumarinů v médiích i v buňkách způsobil elicitor při kultivaci za tmy. (31)

V suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. byl zjišťován také vliv iontů manganatých, kobaltnatých a zinečnatých, stimulačně působil na produkci kumarinů zejména roztok síranu zinečnatého při kultivaci za tmy. (32, 33)

7 ZÁVĚR

Produkce kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. kultivované za světla byla po přidání dusičnanu stříbrného jako elicitoru v obou zkoušených koncentracích negativně ovlivněna.

Jedině při délce působení elicitoru 24 hodin došlo k signifikantnímu nárůstu obsahu kumarinů v médiu oproti kontrole, za stejných podmínek ovšem vlivem elicitoru výrazně klesl obsah kumarinů v buňkách odpovídajících kultur, celková produkce kumarinů kulturou tedy byla opět ovlivněna negativně, pouze její větší část byla vyloučena do média.

Kromě zmíněného případu působila vždy vyšší koncentrace dusičnanu stříbrného vyšší pokles než jeho nižší koncentrace. Nejvíce se negativní vliv elicitoru v buňkách i v médiích projevil po 192 hodinách od jeho přidání ke kulturám.

8 LITERATURA

- (1) Rubcov V.G., Beneš K.: Zelená lékárna, Lidové nakladatelství, Praha 1985, s. 7 - 15, 34 - 37.
- (2) Jirásek V., Starý F.: Atlas léčivých rostlin, SPN, Praha 1989, s. 7 - 11, 20, 1.
- (3) Vodrážka Z.: Biotechnologie, Academia, Praha 1992, s. 63.
- (4) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1992, s. 84 - 95.
- (5) Korbelář J., Endris Z.: Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha 1981, s. 78.
- (6) Slavík B.: Květena České republiky 5, Academia, Praha 1997, s. 399 - 403.
- (7) Opletal L., Volák J.: Rostliny pro zdraví, Aventium, Praha 1999, s. 26 - 27.
- (8) Randuška D., Šomsák L., Háberová I.: Barevný atlas rostlin, Obzor, Ostrava 1983, s. 530.
- (9) Kresánek J., Krejča J.: Atlas léčivých rostlin a lesných plodů, Osveta, Martin 1982, s. 104 - 105.
- (10) Hrdina R. et al.: Přírodní toxiny a jedy, Galén, Karolinum, Praha 2004, s. 82 - 84.
- (11) Tomko J. et al.: Farmakognózia, 2. vydání, Osveta, Martin 1999, s. 176 - 178.
- (12) Tůma J., Tůmová L.: Fyziologie rostlin, Gaudeamus, Hradec Králové 1998, s. 242 - 246.
- (13) Šebánek J., Sladký Z.: Biotechnologie rostlinných explantátů, VŠZ, Brno 1988, s. 9, 19.
- (14) Kováč J., Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství univerzity Palackého, Olomouc 1995.
- (15) Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001, s. 75 - 78.
- (16) Votruba M.: Explantátové techniky, VŠZ, Praha 1987, s. 7 - 8.
- (17) Procházka S., Šebánek J. et al.: Regulátory rostlinného růstu, Academia, Praha 1997, s. 17 - 21, 153 - 163.
- (18) Kutina J.: Regulátory růstu, SZN, Praha 1988, s. 7, 10, 11.
- (19) Hubík J. et al.: Obecná farmakognosie II., SPN, Praha 1989, s. 24 - 30.
- (20) Procházka S. et al.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha 1998.
- (21) Yoshikawa M., Keen N. T., Wang M. C.: Plant. Physiol. 73, 497 (1983).

- (22) Kašparová M., Siatka T.: Čes. Slov. Farm. 53, 252 (2004).
- (23) Rokem J. S., Schwarzberg J., Goldberg I.: Plant Cell Rep. 3, 159 (1984).
- (24) Brooks Ch. J., Watson D. G., Freer I. M.: Phytochemistry 25, 1089 (1986).
- (25) Dixon R. A. et al: Planta 151, 272 (1981).
- (26) Cline S. D., Coscia E. J.: Plant Physiol. 86, 161 (1988).
- (27) Fett W. F., Zacharius R. M.: Plant Sci. Lett. 24, 303 (1982).
- (28) Krätšmár-Šmogrovič J. et al.: Všeobecná a anorganická chémia, Osveta, Martin 1994, s. 380 - 383.
- (29) Murashige T., Skoog F.: Physiol. Plant. 15, 473 (1962).
- (30) Klemmerová V.: Základy aplikované statistiky, SPN, Praha 1993, s. 30, 31.
- (31) Harantová T.: Diplomová práce, Univerzita Karlova, farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2005.
- (32) Kolarczyková D.: Diplomová práce, Univerzita Karlova, farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2002.
- (33) Skrbková E.: Diplomová práce, Univerzita Karlova, farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2002.
- (34) Rausch A., Lotz B.: Lexikon bylinek, Rebo Productions CZ, Dobřejuvice 2005, s. 47.