UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE

---

DIPLOMOVÁ PRÁCE

# VLIV METHYLVIOLOGENU NA PRODUKCI SEKUNDÁRNÍCH LÁTEK V *IN VITRO* KULTUŘE *FAGOPYRUM ESCULENTUM*, ODRŮDA *BAMBI*

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

Pověřen vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Hradec Králové, květen 2018

Veronika Vlachová

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení a cenné rady a konzultace, které mi velice pomohly při vypracování této diplomové práce. Děkuji také PharmDr. Janu Martinovi, PhD. za pomoc při analytickém zpracování výsledků pomocí HPLC a v neposlední řadě také pracovníkům katedry Farmakognozie za ochotu a pomoc při realizaci experimentální části, zvláště Markétě Šimůnkové.

Tato práce byla zpracována za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260416 a výzkumu PROGERS Q42.

PROHLÁŠENÍ

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

Veronika Vlachová

# OBSAH

1 ÚVOD .....5
2 CÍL PRÁCE .....7
3 TEORETICKÁ ČÁST .....8
3.1 *Fagopyrum esculentum* Moench – Pohanka obecná .....8
3.1.1 Botanický popis .....8
3.1.2 Výskyt .....9
3.1.3 Droga .....10
3.1.4 Obsahové látky .....10
3.1.5 Využití .....10
3.1.6 Odrůda *Bambi* .....11
3.2 Flavonoidní glykosidy .....13
3.2.1 Charakteristika flavonoidů .....13
3.2.2 Chemická struktura a biosyntéza flavonoidů .....13
3.2.3 Význam pro rostlinu .....14
3.2.4 Význam v medicíně a farmacii .....15
3.2.5 Rutin .....16
3.3 Rostlinné kultury *in vitro* .....17
3.3.1 Explantátové kultury .....17
3.3.2 Kategorie explantátových kultur .....18
3.3.3 Využití explantátových kultur .....18
3.3.4 Vznik kultury, růst a pasážování .....18
3.3.5 Kultivační podmínky .....21
3.4 Metody zvyšování produkce sekundárních metabolitů .....29
3.4.1 Sekundární metabolismus .....29
3.4.2 Produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách .....29
3.4.3 Fyziologie stresu .....30
3.4.4 Stresová reakce a její mechanismus .....31
3.4.5 Biotické a abiotické stresové faktory .....32
3.5 Elicitace .....34

3.5.1 Definice pojmů .....34
3.5.2 Mechanismus působení elicitoru .....34
3.5.3 Faktory ovlivňující elicitaci .....35
3.5.4 Methylviologen .....37
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....38
4.1 Biologický materiál .....38
4.2 Přístroje .....38
4.3 Chemikálie .....39
4.4 Kultivace explantátové kultury .....41
4.4.1 Složení a příprava živného média .....41
4.4.2 Nádoby a nástroje použité ke kultivaci .....42
4.4.3 Průběh kultivace a pasážování .....43
4.4.4 Příprava a kultivace suspenzní kultury .....44
4.5 Elicitace *in vitro* kultur .....45
4.5.1 Příprava elicitoru .....45
4.5.2 Průběh elicitace .....45
4.6 Stanovení obsahu rutinu .....47
4.6.1 Příprava extraktů pro stanovení obsahu .....47
4.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....47
4.6.3 Stanovení obsahu metodou HPLC .....49
4.7 Statistické zpracování výsledků .....52
4.7.1 Aritmetický průměr .....52
4.7.2 Směrodatná odchylka .....52
4.7.3 T-test .....53
5 VÝSLEDKY .....55
5.1 Tabulky .....55
5.2 Grafy .....58
6 DISKUZE .....59
7 ZÁVĚR .....62
8 POUŽITÁ LITERATURA .....63
9 ABSTRAKT .....68
10 ABSTRACT .....69

# 1 ÚVOD

Příroda představuje zdroj více než 250 000 rozmanitých rostlinných druhů, které jsou repozitářem pravděpodobně stovek tisíců nízkomolekulárních sloučenin zvaných sekundární metabolity. [1] K těm se řadí například vonné látky, esenciální oleje, pigmenty, sladidla a mnoho farmaceuticky významných látek. [2] Potenciál řady z nich si uvědomovali už naši předci, kteří postupem času začali empiricky přisuzovat jednotlivým rostlinám charakteristické léčebné vlastnosti, které pak využívali v léčitelství po dlouhá staletí. U většiny těchto rostlin byla později díky rozvoji organické chemie a farmacie objasněna přesná chemická struktura sloučeniny, která je zodpovědná za daný farmakologický účinek, a mnohdy byly snahy o odvozování chemických léčiv podobné struktury a stejného farmakologického účinku, nicméně ne vždy byl tento pokus úspěšný. Organické syntézy jsou navíc často velmi obtížné a nákladné a u složitějších struktur zatím neuskutečnitelné, a proto se i v dnešní době stále spoléhá při získávání mnoha cenných sekundárních metabolitů právě na rostliny. [3]

Pěstování intaktních rostlin kvůli extrakci metabolitů má ovšem také mnoho překážek, od velkých nároků na prostor až po kolísání obsahových látek na základě vnějších vlivů, a se zvyšováním nároků na produkci těchto látek přestává býti jen pouhé pěstování na polích pro veškerou produkci dostačující. [4] Jako nadějná alternativní cesta pro získávání hodnotných sekundárních metabolitů se proto ukazuje pěstování rostlinných kultur *in vitro*. [1] [2] Tato velice perspektivní metoda má bezpochyby obrovskou budoucnost, ale i ona má bohužel svoje omezení – největší překážku v dnešní době tvoří skutečnost, že k produkci obsahové látky v explantátových kulturách často vůbec nedochází, nebo jen v malém množství. [2] [4] Proto je snaha o implementaci řady strategií na podpoření produktivity, včetně metody elicitace, na kterou jsem se zaměřila ve své práci. S rozvojem těchto metod by mohlo pěstování aseptických kultur rostlinných buněk v budoucnu překonat omezení, se kterými se biotechnologie potýká a která překážejí široké komercializaci. [1]

# 2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo seznámit se s technikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále zjistit vliv abiotického elicitoru methylviologenu na produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench, *var. Bambi*. Na základě stanovení obsahu rutinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie jsem si dala za cíl zjistit, zda je uvedený elicitor v různých koncentracích schopen ovlivnit produkci této obsahové látky ve mnou použité kultuře.

# 3 TEORETICKÁ ČÁST

## 3.1 *Fagopyrum esculentum* Moench – Pohanka obecná

### 3.1.1 Botanický popis

Pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum* Moench) je vyšší dvouděložná rostlina patřící do čeledi Rdesnovité (*Polygonaceae*).

Jedná se o jednoletou bylinu o vzrůstu 40 až 140 cm. Lodyha je přímá, jen velmi málo větvená nebo nevětvená, v průběhu roku většinou zčervená. [5] Tato rostlina se vyznačuje heterofilií (různolistost). Listy jsou obvykle řapíkaté a srdčité, jen horní listy jsou přisedlé a mají trojúhelníkovitou čepel, která je na bázi srdčitá až střelovitá. Drobné kvítky bílé nebo růžové barvy jsou ve svazečcích a skládají po 7–9 květech hroznovitá květenství. [6] Jedna rostlina nese vždy velké množství květenství. Jednotlivé květy jsou pak dimorfní (oboupohlavní) a různočnělečné (hyterostylie) – na jedné rostlině se vyskytují dva různé typy květů, jedny mají dlouhou čnělku a krátké tyčinky a druhé mají naopak krátkou čnělku a dlouhé tyčinky. V jednom květu, který je pětičetný, se nachází 8 tyčinek, 1 pestík a 3 čnělky. [7]

Tato rostlina kvete obvykle v období od června do července. Je cizosprašná, převážně hmyzosnubná, nejčastěji opylovávána včelou medonosnou. [6] Stejně jako u ostatních rostlin této čeledi je plodem trojhranná nažka. U pohanky je nažka 2–6 mm dlouhá, ostře hranatá a má tmavě hnědou až šedou barvu. [8] [9]

Může dojít k záměně s pohankou tatarskou (*Fagopyrum tataricum* Gaertner), zvanou tatarka, která se však liší tím, že její plody jsou na hranách vroubkované až zoubkaté a jsou delší než u pohanky obecné, listy mají více podlouhlý tvar a okvětí je nazelenalé. [5] [10]

**Obr. 1:** *Fagopyrum esculentum.* [11]

### 3.1.2 Výskyt

Pohanka obecná, stejně jako její příbuzný druh pohanka tatarská, pochází patrně z oblasti od jižní Sibiře po Himálaj, odkud se její pěstování postupně rozšířilo do Mongolska, Tibetu, Japonska a na východní Sibiř. Patří k nejmladším kulturním rostlinám. Do Evropy se dostala až ve 13. století při vpádu Tatarů. [12] Na našem území se hojněji pěstovala asi od 16. století, a to zejména v horských oblastech na chudých půdách Beskyd, v karpatské oblasti a na východním Slovensku. V současné době se pěstování pohanky v ČR a na Slovensku opět obnovuje. [13] Pěstuje se i v jiných částech Evropy, v Asii a Severní Americe. [10]

Kromě pěstování může pohanka i zplanět. Dokáže růst v širokém areálu půdních podmínek včetně chudých půd v chladném klimatu, na horách i v severských oblastech. Nejlépe jí však vyhovují půdy lehčí až střední, písčité, hlinitopísčité až hlinité, dobře zásobené živinami a vláhou. Pohanka snáší i půdy kyselé. Nesnese však půdy těžké, bohaté na volný vápník, se zásaditou půdní reakcí. [6]

Z živin je pohanka nejnáročnější na draslík. Jeho dostatek zvyšuje výnos i jakost nažek. Pohanka nesnáší chlór (způsobuje skvrnitost listů a inhibuje růst). Z mikroživin je pohanka náročnější na bór, jeho nedostatek se projevuje podobně jako přítomnost chlóru. Během vegetace nevyžaduje většinou žádné zvláštní ošetření. K farmaceutickým účelům je pohanka sklízena na začátku kvetení. [6] [14]

### 3.1.3 Droga

V Českém lékopise 2017 je jako droga uvedena *Fagopyri herba* (Pohanková nať). Je to celá nebo rozlámaná nať druhu *Fagopyrum esculentum* Moench sbíraná v časné fázi kvetení před vytvořením plodů a ihned sušená. [15]

### 3.1.4 Obsahové látky

Hlavní skupinou obsahových látek přítomných v pohance obecné jsou flavonoidy. Nejvíce je zde zastoupen rutin (v sušené droze nejméně 3,0 % rutinu) [15], dále jsou přítomny isoorientin, orientin a vitexin. Speciálně v plodech se nachází velké množství esenciálních aminokyselin a bílkovin. [16] Pohanka také obsahuje mnoho vitaminů – hlavně vitaminy skupiny B a vitamin E, velké množství minerálů (draslík, fosfor, hořčík, vápník) a stopových prvků (železo, měď, mangan, zinek a selen). Z dalších látek specifických pro pohanku zde najdeme naftodianthron fagopyrin a cholin. [5]

### 3.1.5 Využití

Kromě svého využití jako pseudoobilovina v potravinářství i jako krmivo (nažky mají mimo jiné velké množství vlákniny – 3,4–5,2 %) se pohanka využívá pro svůj vysoký obsah flavonoidů. Z pohankové nati se proto izoluje především rutin, který se poté používá k léčbě nedostatečné pevnosti a elasticity cévních stěn. [17] Indikací jsou proto

křečové žíly, bércové vředy, hemoroidy a jiné cévní komplikace včetně ateroskleróz. Zlepšení bylo pozorováno i u pacientů s poruchami prokrvení končetin a u pacientů trpících na otoky končetin vlivem nadměrné permeability cév. [5] [6] [18] Díky fenolickým sloučeninám má pohanka výraznou antioxidační aktivitu. [19] Vzhledem k vysokému obsahu vitaminu E byl dále prokázán vliv konzumace nažek pohanky na snižování LDL cholesterolu a zvyšování HDL cholesterolu. [16] [20]

Pohanka neobsahuje lepek, a tudíž je vhodná jako náhradní potravina pro pacienty trpící celiakií. [14] Hodí se i pro těhotné a kojící jako potravina bohatá na bílkoviny a vlákninu, kdy konzumace pohanky je prospěšná i pro plod. [5] Při větší konzumaci však může způsobovat alergické reakce vlivem alergenních proteinů [18], stejně jako velmi nebezpečnou fotosenzibilní reakci způsobenou fagopyrinem. Tento jev, zvaný fagopyrismus, se může manifestovat příznaky od zarudnutí, svědění a otoků v obličeji až po křeče, ochrnutí nebo dokonce smrt. [21] V homeopatii se pohanka využívá při svědění, vyrážkách a zánětech kůže. [9]

### 3.1.6 Odrůda *Bambi*

*Fagopyrum esculentum var. Bambi* je odrůda pohanky vyšlechtěná v Rakousku, zaregistrovaná ke dni 19. 12. 1989. [22] Tato odrůda sloužila už k několika studiím:

Na univerzitě Novi Sad v Srbsku ve spolupráci s univerzitou v Lublani ve Slovinsku porovnávali fenolické profily a antioxidační vlastnosti evropských kultivarů pohanky s balkánskými druhy pohanky. Odrůda *Bambi* měla spolu s odrůdami *Novosadska*, *Godijevo* a *Spacinska 1* nejvyšší antioxidační kapacitu. V obsahu rutinu však mnohonásobně předčily ostatní kultivary balkánské odrůdy *Bosna 1* a *Bosna 2* (až 46x). [23]

Studie na téma porovnání kolísání obsahu polyfenolů a rutinu v jednotlivých kultivarech pohanky, amarantu a quinoa semínek probíhala na Slovensku v roce 2016. Celkové množství polyfenolů bylo největší v kultivaru *Bambi*, nejméně polyfenolů obsahovala varieta Spačinská. Obsah rutinu byl opět nejvyšší ve varietě *Bambi*, nejnižší obsah byl nalezen v odrůdě *Madawska*. Studie odhalila, že v porovnání s ostatními studiemi obsah rutinu v jednotlivých kultivarech velmi kolísá. [24]

V květnu 2017 v Maďarsku stanovovali koncentrace rutinu pomocí fotoakustické UV spektroskopie v 7 varietách pohanky obecné a v 6 varietách pohanky tatarské. Fotoakustická UV spektroskopie se ukázala v měření obsahu rutinu stejně přesná jako HPLC chromatografie a může být tedy doporučena ke stanovení koncentrace rutinu v odrůdách pohanky. V kultivarech *Bambi* a *Botan* byl prokázán nejmenší obsah rutinu. Z ostatních odrůd *Fagopyrum esculentum* byl obsah rutinu nejvyšší v odrůdě *Emka*, nicméně ve všech odrůdách pohanky tatarské byl obsah rutinu mnohonásobně vyšší (až 59x). [25]

Studie na stanovení koncentrace rutinu a kvercetinu ve varietách *Bambi* a *Lileja* v čerstvé rostlině, v senáži a v siláži s porovnáním produkce flavonoidů při sklízení ve dvou různých fázích sklizně probíhala v Itálii na univerzitě v Pise v červenci 2017. Ze studie vyplývá, že v pozdější fázi sklizně se obsah flavonoidů snižoval. Varieta *Lileja* obsahovala více rutinu než *var. Bambi*, odrůda *Bambi* naopak obsahovala více kvercetinu. [26]

A konečně studie, prováděná ve Výskumném ústavu rastlinnej výroby v Piešťanech na Slovensku, odkud také pochází mnou používaná kultura *Fagopyrum esculentum var. Bambi*. V této varietě studie prokázala značný obsah rutinu a polyfenolů obecně. Vzorky se odebíraly ve 3 fázích růstu rostlin – na začátku kvetení, v plném kvetení a na začátku dozrávání. V deseti odrůdách pohanky obecné byl zkoumán obsah rutinu a polyfenolů ve stonku, v listech, v květech (2. + 3. odběr) a v nažkách (pouze 3. odběr). Největší obsah rutinu byl prokázán zpravidla při třetím odběru ve květech, nejmenší ve stoncích při 1. odběru. Nejvíc polyfenolů bylo prokázáno opět především při třetím odběru v listech, květech a nažkách, nejméně jich bylo opět ve stoncích (zde se výrazně nelišilo množství na základě doby odběru). Co se týče obsahu rutinu, odrůda *Bambi* předčila ostatní odrůdy obsahem rutinu ze stonků při třetím odběru (3600 mg/kg oproti průměrné hodnotě 1446 mg/kg). Zbylé hodnoty byly srovnatelné s ostatními odrůdami, s maximální absolutní hodnotou obsahu rutinu 24375 mg/kg ve květech při třetím odběru. [27]

## 3.2 Flavonoidní glykosidy

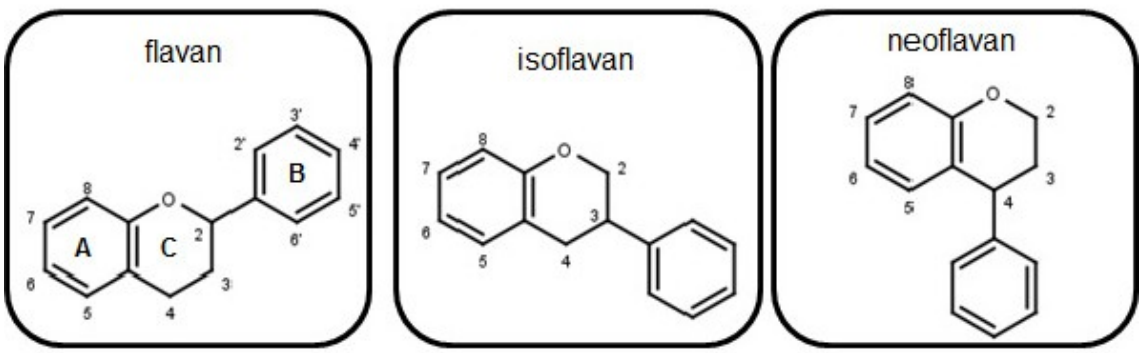
### 3.2.1 Charakteristika flavonoidů

Flavonoidní glykosidy, nebo jinak flavonoidy či bioflavonoidy, jsou žluté (*flavum* = žlutý) až oranžové sekundární metabolity s fenolickým charakterem, obsažené převážně v květech, listech a plodech řady dvouděložných rostlin. Chemicky se jedná o rozmanitou skupinu derivátů odvozených od chromanu (benzopyran) resp. fenylchromanu. [28] V rostlinách se většinou vyskytují vázané ve formě glykosidů (*O*-glykosidy nebo *C*-glykosidy), rozpuštěné v buněčné vakuole. Farmakologicky účinné jsou v glykosidické formě i jako volné aglykony. Lipofilnější methoxylované deriváty jsou nerozpustné ve vodě a vyskytují se v silicích a v kutikule listů. [29]

### 3.2.2 Chemická struktura a biosyntéza flavonoidů

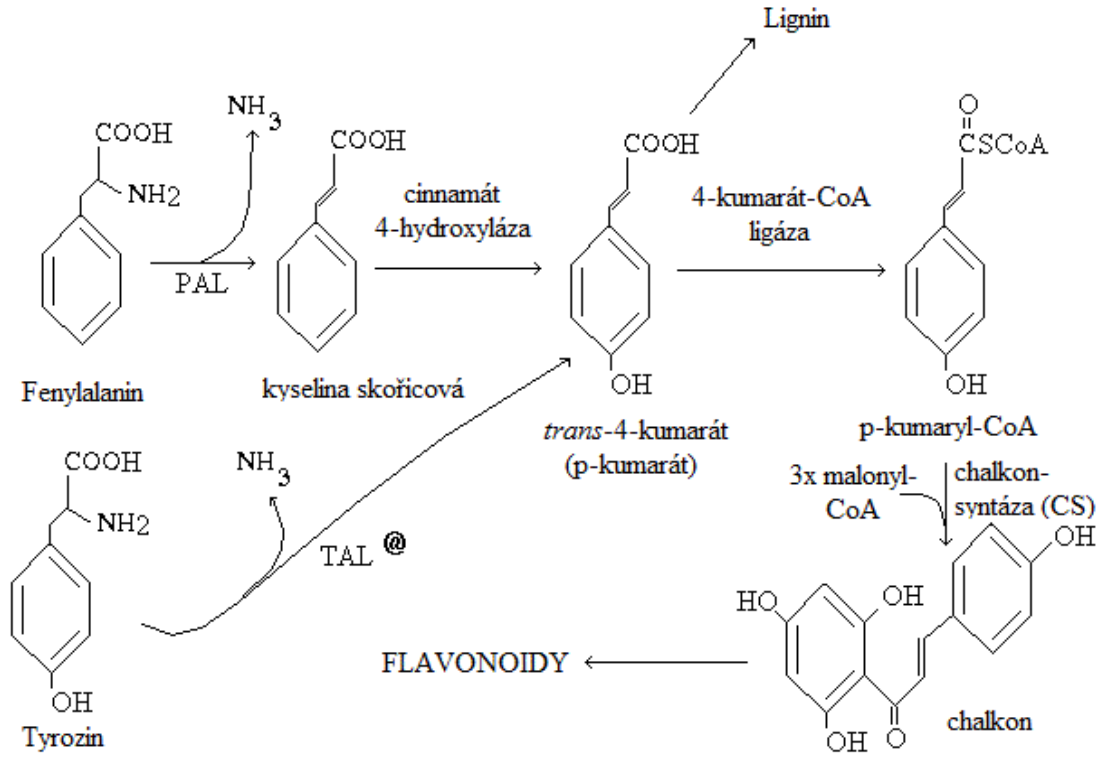
Flavonoidy se dělí do třech skupin podle místa navázání benzylové skupiny na flavany (2-fenylchroman), isoflavany (3-fenylchroman) a neoflavany (4-fenylchroman). V přírodě jsou hojně rozšířeny právě flavany. Postupnou oxidací pyranového kruhu flavanů dojde ke vzniku některých dalších derivátů – flavenů, flavonolů, flavanolů, flavanonolů, flavandiolů, flavonů a flavanonů. Hlavní zástupci flavonoidů však patří mezi flavony, flavonoly a flavanony. [29] Jednotlivé flavonoidy se mezi sebou liší počtem a polohou hydroxylových a methoxylových skupin a mírou a polohou glykosidace. [30]

**Obr. 2:** Struktura flavanu, isoflavanu a neoflavanu. [31]



Syntéza fenolických látek vychází z fenylalaninu, který se pomocí enzymu fenylalaninamoniaklyáza (PAL) mění na kyselinu skořicovou (kyselina fenylpropenová). [32] Ta se poté spojuje se třemi molekulami acetátu pocházejících z acetátového metabolismu a vytváří spolu patnáctiuhlíkový meziprodukt chalkon, z něhož zacyklením vzniká flavanon. Dalšími úpravami pak vznikají ostatní flavonoidní deriváty. Ke glykosylaci dochází v pozdním stádiu tvorby flavonoidů. [29]

**Obr. 3:** Biosyntéza flavonoidů. [33]




### 3.2.3 Význam pro rostlinu

Flavonoidy mají funkci rostlinných pigmentů. Zbarvují květy od žluté, přes červenou až po modrou, čímž lákají opylovače a pomáhají tak v procesu pohlavního rozmnožování rostlin. V rostlinách se účastní oxidoredukčních pochodů (čímž mimo jiné chrání fotosynteticky aktivní buňky rostliny před zničujícím UV zářením [34], ale napomáhají rostlině se vyrovnat i s působením dalších abiotických stresorů, jako je například oxidační stres způsobený chemickými látkami). [35] Pokud rostlinu vystavíme stresu, může jeho vlivem ve vakuolách buněk epidermální vrstvy docházet

ke hromadění těchto absorpčních pigmentů. [34] Některé isoflavony mají estrogenní účinek. [36]

### 3.2.4 Význam v medicíně a farmacii

Jak už bylo uvedeno výše, flavonoidy mají velice příznivý vliv na stav cévního systému člověka. Podporují a navracejí cévám jejich přirozenou elasticitu, čímž snižují jejich lámavost (prevence hemoragií) a předcházejí nadměrné propustnosti cév, která často může způsobovat otoky. [29] Lze je využít při všech cévních onemocněních – u kapilárních defektů (praskání cévek v očích), žilních defektů (křečové žíly) a díky zlepšení cirkulace krve tepnami a jejich dilataci mají význam i v terapii aterosklerózy a při prevenci cévních mozkových příhod a dalších trombotických onemocnění. [18] Flavonoidy mají také schopnost zadržovat ionty vápníku v těle tvorbou komplexních solí s vápenatými ionty. Tímto mechanismem mimo jiné snižují srážlivost krve, a tudíž opět napomáhají v prevenci kardiovaskulárních onemocnění.

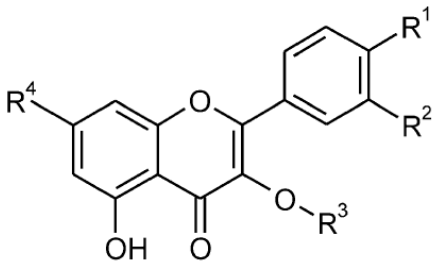
Flavonoidy jsou inhibitory hyaluronidázy, čímž brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi a mají tak význam jako podpůrný prostředek k léčbě infekčních onemocnění. [30] Vzhledem k vysoké antioxidační aktivitě se začaly flavonoidy využívat i v terapii rakoviny (zháší volné radikály mnohdy způsobující rakovinotvorné bujení). [37] Díky tomu se zkoumá i jejich vliv na revmatoidní artritidu a Fanconiho anémii. Nejvyšší antioxidační aktivita byla prokázána u rutinu a u jeho aglykonu kvercetinu. [20]

Z léčivých přípravků s flavonoidy je na českém trhu k dostání například Detralex (mikronizovaná čištěná frakce flavonoidů – 450 mg diosminu, 50 mg hesperidinu), jehož indikací je dle SPC léčba příznaků a projevů chronické žilní insuficience dolních končetin (včetně bércových vředů) a dále léčba hemoroidálních onemocnění. [38] Další registrovaný přípravek je Ascorutin – je to lék s rutinem ve formě trihydrátu rutosidu (20 mg) v kombinaci s kyselinou askorbovou (100 mg). Rutin potencuje účinek vitaminu C, a proto se Ascorutin používá při léčbě zvýšené lomivosti a permeability kapilár způsobené hypovitaminózou vitaminu C. [39]

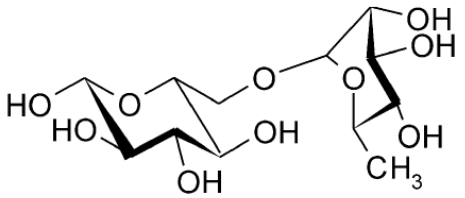
### 3.2.5 Rutin

Rutin je hojně rozšířený a terapeuticky velmi významný flavonoidní glykosid s chemickou strukturou quercetin-3-*O*-beta-rutenosid. [18] Je to tedy molekula skládající se z aglykonu kvercetinu a glykosidicky navázaného disacharidu rutinózy.

**Obr. 4:** Struktura rutinu a kvercetinu. [40]




Obecná struktura flavonoidního glykosidu




Rutinóza, **3**

**1** Rutin: $R^1$ = OH, $R^2$ = OH, $R^3$ = rutinosyl (**3**), $R^4$ = OH
**2** Quercetin: $R^1$ = OH, $R^2$ = OH, $R^3$ = H, $R^4$ = OH

Objeven byl v roce 1842 v rostlině *Ruta graveolens* (routa vonná, čeleď *Rutaceae*), která také dala tomuto sekundárnímu metabolitu jméno. [41] Jeho obsah v pohance byl objeven jen o něco později. Ta dodnes slouží k jeho extrakci.

Vysoký obsah rutinu najdeme také v drogách *Sophorae flos* (pupeny stromu *Sophora japonica* L., *Fabaceae*) a *Eucalypti folium* (list stromu *Eucalyptus macrorhyncha*, *Myrtaceae*). Kromě toho je rutin obsažen například v menších množstvích v mnoha dalších rostlinách včetně oplodí pomeranče a černého rybízu. [17] Obsah rutinu v rostlinách kolísá v závislosti na rostlinném druhu, odrůdě a především přírodních podmínkách, ve kterých byla rostlina pěstována. [20] Po sklizni, během sušení a zpracování drogy je zapotřebí veliké ostražitosti, neboť enzymový systém rostliny je po určitou dobu stále aktivní a může pozměnit nebo dokonce odbourat obsahové látky v droze. V pohance se jedná o enzymy FHG I a FHG II (flavonol-3-*O*-beta-heterodisacharid glukohydroláza I a II), které zapříčiňují hydrolýzu rutinu až na kvercetin. [40]

## 3.3 Rostlinné kultury *in vitro*

### 3.3.1 Explantátové kultury

Explantátové kultury rostlin jsou izolované části rostlin kultivované *in vitro*, tedy ve skleněné nebo plastové nádobce, životaschopné za umělých podmínek na aseptických živných půdách. [2] [42] V praxi to znamená odebrání orgánů rostlin nebo jejich částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů ze sterilně vypěstovaných rostlin nebo z rostliny následně povrchově sterilizované, vložení této části do sterilního prostředí a její kultivaci za více či méně definovaných podmínek. [43] V poměrně malém prostoru lze tak dlouhodobě pěstovat velké populace buněk a z každé z nich lze vypěstovat novou plnohodnotnou rostlinu. [44] Toho je u rostlin umožněno díky totipotenci, což je schopnost každé buňky (i vysoce specializované buňky v pokročilé diferenciaci) vrátit se za určitých podmínek do stavu před diferenciací a znovu zahájit proces dělení buněk. Každá rostlinná buňka totiž obsahuje kompletní genetickou informaci a v cytoplazmě mechanismy umožňující realizaci této informace potřebné k regeneraci ve fertilní rostlinu. [45] Teoreticky je tak jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem vhodné pro odvození explantátové kultury a nemusí se jednat jen o zygotu nebo meristematickou buňku. [3]

První základní koncepce explantátových kultur byla vytvořena už v roce 1902 Haberlandtem. Na rozdíl od dřívějších pokusů s kalusy už pracoval ve sterilních podmínkách, takže kultury nehynuly, nicméně buňky nebyly schopné dělení, protože živné médium neobsahovalo všechny nezbytné složky. Průlomem byly až pokusy, které provedl White kolem roku 1934 na kořenech rajčete (*Lycopersicon esculentum*). Jeho kultury za přítomnosti kvasničného extraktu v médiu vykazovaly stálý růst i při přenosu na čerstvou živnou půdu. Od té doby se poznávání principů explantátových kultur stále prohlubuje. [46]

### 3.3.2 Kategorie explantátových kultur [45]

Podle morfologických kritérií lze explantátové kultury rozdělit do několika kategorií:

a) **Orgánové kultury** – orgánové systémy, jednotlivé orgány nebo jen jejich části. Buňky jsou diferenciované, stavba a funkce orgánů jsou zachovány.

b) **Tkáňové kultury (pletivové, kalusové)** – neorganizované shluky buněk tkáně, částečně soudržné. Jsou obvykle kultivovány na polotuhých nebo tuhých živných půdách nebo na nosičích nasycených živnou půdou.

c) **Suspenzní kultury** – volné buňky nebo jen drobné buněčné shluky suspendované v tekuté živné půdě za promíchávání a provzdušňování.

d) **Buněčné kultury** – jednotlivé volné buňky. Kultivace probíhá většinou v tekuté nebo polotekuté živné půdě, případně na nosiči.

e) **Kultury buněčných protoplastů** – pouze nahé rostlinné protoplasty (tedy část buněk ohraničená cytoplazmatickou membránou, bez buněčné stěny). Vznikají enzymatickým štěpením buněčné stěny v hypertonickém prostředí.

### 3.3.3 Využití explantátových kultur

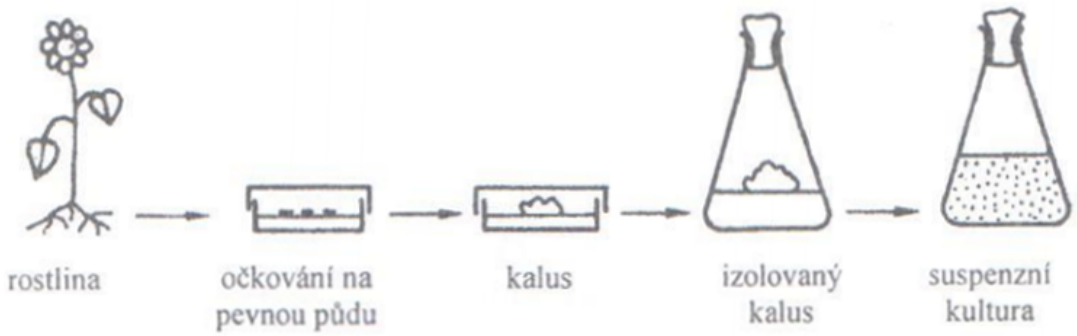
Velmi významné je pěstování kultur pro produkci sekundárních metabolitů, ale metoda vytvoření explantátové kultury se využívá v širokém spektru odvětví. Tímto způsobem můžeme rostliny vegetativně množit (čehož se využívá například u některých okrasných rostlin), šlechtit je, zbavovat je patogenů a uchovávat jejich genetickou informaci. [43] [45]

### 3.3.4 Vznik kultury, růst a pasážování

Metodologie explantátových kultur využívá principů a technik z mikrobiologie a biotechnologie s několika rozdíly. Kultivace explantátových kultur probíhají delší dobu, kultivační půdy jsou dražší a rostlinné kultury jsou citlivější na střižné síly při míchaní, je tedy zapotřebí větší opatrnosti. [44]

Založení explantátové kultury začíná výběrem vhodné části rostliny. Po povrchové sterilizaci se explantuje parenchymatická tkáň, která je očkována na vhodnou tuhou živnou půdu na Petriho misce. Poté probíhá inkubace v teplotním rozmezí 23 až 28 °C po dobu cca 18–25 dnů. [3] [44] Mezitím dochází k nárůstu počtu buněk na médiu vlivem dediferenciace na meristematické buňky schopné neomezeného dělení, a tak vzniká kalus, tedy shluk nediferenciovaných stále se dělících buněk. Kalus roste neorganizovaně na všechny strany. [42] Výhodou explantátových kultur jsou malé požadavky na péči, neboť přijímají všechny potřebné živiny z média. [44]

**Obr. 5:** Odvození explantátové kultury z rostliny. [44]



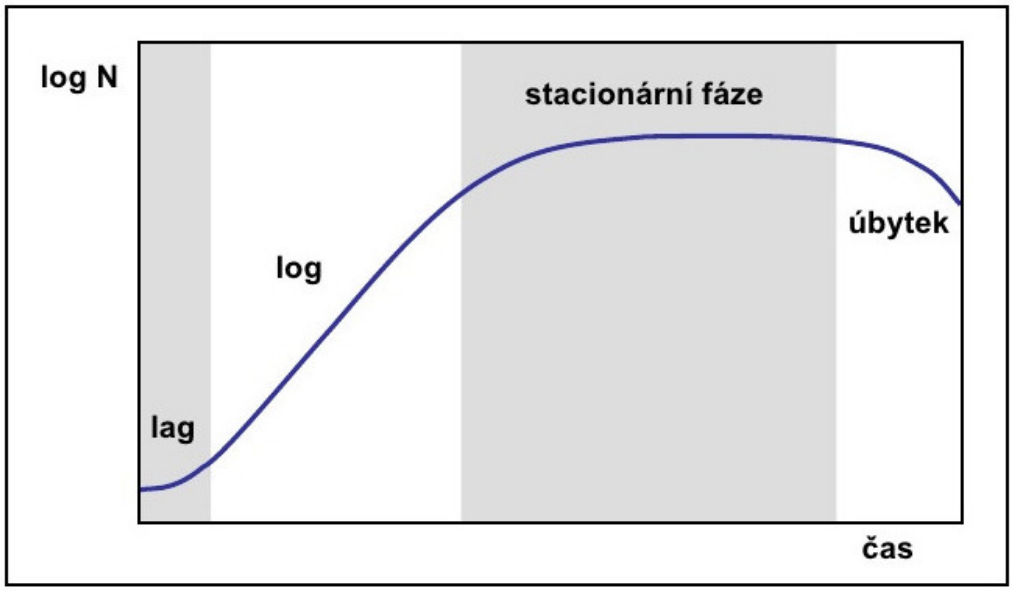

Při dostatečném množství narostlých buněk můžeme menší části kalusu opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a tím udržovat kulturu aktivní a stále rostoucí. [44] Tomu se říká pasážování. Takto můžeme kalusové kultury kultivovat neomezeně dlouho. Během růstu však kultury procházejí několika fázemi, které jsou definované růstovou křivkou. [42]

Růstová křivka popisuje závislost hmotnosti kultivovaných buněk na čase kultivace v měnících se kultivačních podmínkách. [44] První fáze, fáze lag, je charakteristická jen pomalým nárůstem počtu buněk hned po naočkování půdy. Na tuto fázi navazuje exponenciální fáze, ve které dochází k intenzivnímu vzrůstu množství buněk. V exponenciální fázi také začíná syntéza sekundárních metabolitů. Po této fázi nastává znovu útlum dělení, tzv. stacionární fáze, ve které už se buňky

téměř nedělí, ale na jejím počátku je zároveň produkce sekundárních metabolitů nejvyšší. [42] [47]

Kalusové explantátové kultury obvykle potřebují novou pasáž každých 4–6 týdnů, po této době se totiž většina kultur dostává z exponenciální fáze do stacionární fáze. Buněčné kultury rostou zpravidla rychleji, a proto je třeba je pasážovat každých 18–25 dní. U některých velmi aktivně se dělících buněčných kultur se může inkubační doba zkracovat až na 6–9 dní. [2] Pokud by nedošlo k přesazení, kalus takto může růst jen do určité velikosti, limitován prostorem a dostatkem živné půdy stejně jako hromaděním toxických metabolitů, a po určité době by došlo k uhynutí kultury. Rozsazování na nové půdy je také potřeba provádět ve sterilním prostředí, aby na kalusy nebyly zaneseny kontaminanty, které kulturu znehodnocují a můžou ji taktéž zahubit.

**Obr. 6:** Růstová křivka explantátových kultur. [47]




Změnou ve složení živného média můžeme kalus přimět k organizovanému růstu, jehož výsledkem jsou listy a výhonky. Z těch může po přenosu do vhodné zakořeňovací půdy s dostatkem živin vzniknout celistvá rostlina schopná rozmnožování. Zde je největší překážkou přenos do nesterilních podmínek zeminy, při kterém často velké množství klonů zaniká. [44]

Jistou překážkou v regeneraci rostlin z explantátových kultur je i fakt, že může docházet ke genetickým odchylkám. Tomu lze předcházet použitím kultury z embryí nebo z meristému, kde je zachován organizovaný růst. V opačném případě může docházet ke změnám buněčného cyklu na úrovni chromozomálních a jaderných mutací. [43] Nejčastěji se vyskytuje polyploidie (znásobení celých sad chromozomů), aneuploidie (odchylky v počtu jednotlivých chromozomů) nebo chimerismus (buňky se dvěma různými genetickými informacemi v jedné rostlině). [3]

### 3.3.5 Kultivační podmínky

Přesně stanovené kultivační podmínky umožňují správný růst a vývoj explantátové kultury. Zároveň velmi ovlivňují i produkci sekundárních metabolitů. Jedním z nejdůležitějších faktorů je bezpochyby správné složení kultivačního média. Dále hrají roli i sterilita (rostlinného materiálu, živných médií, použitých nástrojů i pracovního prostředí [48]) a fyzikální faktory kultivace jako je světelný režim, teplota a složení plynné fáze kultivačního prostředí. [3] [46]

Na růst kultury má velký vliv i kondice daného explantátu. Rostlinné kultury prokazují rozdílný růst a produkci sekundárních látek v závislosti na konkrétní rostlině, ze které byly buňky izolovány (vliv např. genotypu, orgánu, stáří rostliny nebo fáze buněčného cyklu, ve kterém byly buňky odebrány), a v závislosti na velikosti a hustotě inokula a číslu pasáže. [32] [42]

**A) Živná média**

Živná půda je tedy základním reakčním prostředím umožňujícím optimální průběh metabolických pochodů. Pro kulturu představuje zdroj energie, výživy i regulačních látek. Musí být schopná dodávat všem buňkám potřebné substráty, a to po poměrně dlouhou dobu. Kromě složení je důležitá její konzistence a acidita. Pro kalusové kultury se většinou používají média zpevněná agarem a nebo tekutá média s můstky z filtračního papíru. Optimální pH se pohybuje v rozmezí 5,4−5,7. [45]

Pěstování explantátů v *in vitro* kulturách vyžaduje existenci širokého spektra kultivačních médií rozdílného složení, neboť různé kultury mají různé požadavky

na složení média. [42] Média však vždy obsahují následující složky: makroelementy, mikroelementy, sacharidy, vitaminy, aminokyseliny a jiné zdroje dusíku, další nedefinované organické složky, růstové regulátory, destilovanou vodu a v případě tuhých živných půd pak navíc ještě látku zpevňující médium. Všechny složky média se navzájem ovlivňují a usměrňují procesy probíhající v kultivovaných pletivech. [46]

Mezi nejznámější a také nejčastěji používaná média patří půdy Murashigeho a Skooga (MS, 1962), Linsmaiera a Skooga (LS, 1965), Shenk and Hilderant (SH, 1968), Gamborg *et al.* (B5, 1968), Chu (N6, 1978) a Nitsch and Nitsch (1969). Média MS, SH a B5 jsou charakteristická vysokým obsahem makroelementů, ostatní média mají makroelementů podstatně méně. [2] [3]

**Makroelementy**

Mezi makroelementy, tedy základní minerální živiny nebo makroprvky, řadíme šest nejdůležitějších prvků: dusík, draslík, fosfor, vápník, hořčík a síru. V médiu se vyskytují ve formě solí. Jejich kvantitativní zastoupení se liší vzhledem k požadavkům jednotlivých rostlinných druhů, ale celkový obsah makroelementů v médiu je vždy v řádech desítek milimolů. [49] Kultivační médium by mělo obsahovat cca 25–60 mM anorganického dusíku. Optimální růst je zajištěn, pokud se v půdě vyskytuje dusík jak ve formě nitrátové, tak i ve formě amonných solí (ty pak v koncentraci cca 2–20 mM, vyšší koncentrace jsou pro kulturu toxické a vedou k nežádoucí změně pH živného média). Draslík je většinou obsažen v koncentraci 20–30 mM. Koncentrace ostatních makroelementů je zpravidla 1–3 mM. [3]

Půda MS je charakteristická především zvýšeným obsahem dusíku a draslíku.

**Mikroelementy**

Mikroelementy, tedy stopové minerální prvky, jsou v médiu obsaženy v koncentracích v řádech desítek mikromolů. Mezi elementární mikroelementy řadíme železo (přestože z fyziologického hlediska patří mezi makroelementy), dále mangan, zinek, bór, měď, kobalt a molybden. [2] Železo bývá do média dodáváno obvykle v koncentracích cca 100 µM. S ním se přidává EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová),

která tvoří se železem komplex a zajišťuje tak jeho postupné uvolňování do média. [50] Bór se obvykle dávkuje v množství 25–100 µM, mangan 20–90 µM, zinek 5–30 µM, molybden 1 µM a měď s kobaltem v koncentraci cca 0,1 µM. Někdy se do médií dodávají ještě další prvky, jako například jód, sodík a chlor, ale ty nejsou většinou pro kulturu nezbytné. [3]

**Sacharidy**

Sacharidy se používají v kultivačním médiu jako zdroj uhlíku a energie. U explantátových kultur je vlivem dediferenciace potlačena schopnost autotrofní výživy fotosyntézou, a proto kultura potřebuje heterotrofní substrát ve formě sacharidů. [51] Sacharid současně slouží jako účinné osmotikum, ale zároveň umožňuje v případě nedostatečné sterilizace nežádoucí růst mikroorganismů. [42] Nejčastěji je využívána sacharóza. Její koncentrace v médiu je obvykle 2–3 %. Výjimečně je v půdě nahrazena glukózou nebo fruktózou nebo jejich směsí. Ostatně při sterilizaci v autoklávu se disacharid sacharóza vlivem zvýšené teploty stejně z části rozkládá právě na směs glukózy a fruktózy. Ostatní sacharidy, jako například laktóza, galaktóza, rafinóza, maltóza nebo škrob, prokázaly v médiu výrazně menší účinnost a jejich použití tedy není příliš časté. [3]

**Vitaminy**

Vitaminy slouží rostlině jako katalyzátory metabolických procesů. Běžná rostlina je schopná syntetizovat všechny vitaminy potřebné ke svému růstu a vývoji svépomocí. V *in vitro* kulturách je tato schopnost však významně omezena. Nedostatek vitaminů může být značně limitujícím faktorem růstu explantátových kultur. V krajních případech může docházet až k úplné zástavě růstu. Hodí se tedy, aby živná půda některé rostlinné vitaminy obsahovala. Nejčastěji jde o thiamin (0,1–10 mM), který je pro růst tkáňových kultur naprosto nepostradatelný, dále kyselinu nikotinovou (0,1–5 mM), pyridoxin (0,1–10 mM), myo-inozitol (50–5000 mM). V malých dávkách se v médiích často vyskytuje i kyselina askorbová (sloužící též jako antioxidant), kyselina pantothenová, biotin, kyselina listová a riboflavin. [2] [3]

**Aminokyseliny a další zdroje dusíku**

Aminokyseliny slouží v živném médiu především jako zdroj organického dusíku. Přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntézy veškerých esenciálních aminokyselin, jejich přídavek do média může významně stimulovat růst explantátů. Slouží jako operativní zdroj dusíku, který může rostlina rychle využívat, nebo jsou využívány k přímé syntéze proteinů. Do média se z tohoto důvodu přidává nejčastěji směs aminokyselin ve formě hydrolyzátu kaseinu (zpravidla v koncentraci 0,05–0,1 %). Přidávat se mohou i jednotlivé aminokyseliny, například L-glutamin, L-asparagin, glycin a nebo adenin, ale zde hrozí inhibice růstu kultury, pokud by byly aminokyseliny přidány v příliš vysoké koncentraci. Obvykle se používá koncentrace v rozsahu 1–100 mM. [3]

**Nedefinované organické složky médií**

Mezi nedefinované organické složky médií patří zejména bílkovinné hydrolyzáty, dále kvasničné extrakty, sladový extrakt, kokosové mléko, extrakty z banánů, pomerančové nebo rajčatové šťávy, výluhy ze dřeva nebo mízní tekutina. Jejich přídavek může často stimulovat růst tkáňových kultur. Zároveň se však jejich použití mnohdy nedoporučuje, právě z důvodu jejich nedefinovaného složení. [2]

Často je do média přidáváno také aktivní uhlí (v koncentraci 0,5–1 %), jemuž se připisuje schopnost absorpce látek inhibujících růst kultury, ale zároveň také absorpce růstových regulátorů a ztmavnutí média. Může mít na explantát tedy jak stimulační, tak inhibiční účinek. [3]

**Látky používané pro zpevnění média**

Pro kultivaci *in vitro* se nejčastěji používají tuhá média. Tuhá média totiž zajišťují to, že explantát zůstane na jejich povrchu a poskytují mu dostatečný kontakt se vzduchem. Dříve uvedené složky média je tedy třeba po jejich dokonalém rozpuštění převést na pevné médium. Toho se docílí přídavkem agaru. Agar se získává z vláken mořských řas. Oproti ostatním gelotvorným látkám má řadu výhod. Pokud je smíchán s vodou, dojde k vytvoření gelu při teplotě 60–100 °C, při teplotě cca 45 °C gel tuhne

a při teplotách kultivace je tedy stabilně pevný. Zároveň je inertní – nereaguje s ostatními složkami média, ani není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhost média se dá regulovat druhem agaru, jeho koncentrací (obvykle 0,8–1 %) a pH prostředí. [3]

Kromě agaru je možné použít k vytvoření pevného média různé syntetické látky, například agarózu, Phytagel nebo Gerlite. Tuhé médium lze také nahradit přídavkem skleněných kuliček, perlitu, molitanové drti, čedičové vaty nebo perforovaného celofánu do tekutého média. Často se využívá technika papírových můstků z filtračního papíru. [2] Novinkou jsou tzv. rafty, což jsou plastové nosiče, do kterých se upevňuje polypropylenová membrána. Kultura je poté položena na membránu, která plave na povrchu tekutého média. Výhodou je snadnější přístup živin přes membránu, růst kultury v relativně suchém a homogenním prostředí a zabránění akumulace exudátů v okolí explantátu, jak je tomu často u kultur rostoucích na pevných půdách. [3]

**Růstové regulátory**

Růstové regulátory dělíme na regulátory nativní (přirozené) a syntetické. Nativní si rostlina vyrábí sama dle svých potřeb a reguluje tak svůj růst a vývoj. Nativním růstovým regulátorům se říká fytohormony (rostlinné hormony). Fytohormony vznikají ve velmi malých množstvích v určité části rostliny a jsou transportovány do jiných částí, kde působí regulačně na různé procesy, především růstové, vývojové a pohybové. Syntetické růstové regulátory nejsou součástí přirozeného metabolismu rostlin, ale při vnější aplikaci (tedy aplikaci do živného média) jimi můžeme rostliny ovlivňovat na podobném principu jako u fytohormonů, tedy buď je stimulovat nebo retardovat. [52]

Růstové regulátory, které se používají v živných médiích, je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová. O tom, jak bude daná kultura růst, nerozhoduje jen koncentrace jednotlivých hormonů, ale hraje zde velikou roli jejich vzájemný poměr. Především u auxinu a cytokininu rozhoduje jejich poměr o organogenezi – tedy tvorbě kořenů a prýtů. [3] Pokud je poměr cytokinu k auxinu velký, bude docházet primárně k vytváření pupenů. Pokud je poměr nízký, rostlina bude spíše podněcována k tvorbě kořenů. [52] Správný poměr auxinu

a cytokininu, aby docházelo k morfogenezi, závisí na rostlinném druhu, kultivaru i typu explantátu. [3]

Auxiny jsou v médiu třeba pro stimulaci růstu buněk, k zahájení tvorby prýtů a kořenů, k indukci somatické embryogeneze a k růstu apikálních meristémů (vzrostných vrcholů). Principiálně se tedy řadí mezi růstové stimulátory. [2] Hlavním auxinem je kyselina β-indolyloctová (IAA). [52] Dále se používá například kyselina β-indolylmáselná (IBA), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina α-naftyloctová (NAA). Až na IAA, která je nativní, patří ostatní látky mezi auxiny syntetické. Různé auxiny mají různou aktivitu. Kromě toho se liší kinetikou – rychlostí pohybu pletivy, vazbou na odlišné receptorové buňky a různou metabolizací. Jejich účinnost je navíc opět závislá na konkrétním typu explantátu a růstových podmínkách. Bylo dokázáno, že 2,4-D, která má výrazný stimulační efekt na formování kalusu, je průměrně 8–12x účinnější než IAA, NAA přibližně 2x. Přestože se 2,4-D a některé další syntetické auxiny používají v médiích k indukci rychlého buněčného dělení, jejich vysoká koncentrace nebo dlouhodobé používání mohou způsobovat potlačení morfogenetické aktivity explantátových kultur. Auxiny jsou v médiu většinou obsaženy v množství 0,1–20,0 milimolů. [2] [3] [52]

Cytokininy, v přítomnosti auxinů, podporují u rostlin buněčné dělení, indukují aktivitu dělivých pletiv a tvorbu pupenů. Významně snižují apikální dominanci a stimulují větvení. Inhibují také zakládání adventivních kořenů a jejich přítomnost v médiu tak často brání vytváření kořenů. [2] Zpomalují stárnutí pletiv, brzdí odbourávání chlorofylu a zvyšují odolnost rostlin vůči vnějším vlivům prostředí. Mezi nativní cytokiny patří některé deriváty adeninu. Nejdůležitější z nich je zeatin a isopentenyladenin (2iP či IPA). Ze syntetických cytokinů dominuje v používání kinetin (6-furfuryladenin), benzyladenin (BA) někdy označovaný jako benzylaminopurin (BAP) a dále 6-dimethylaminopurin (6-DMAP). Cytokininovou aktivitou disponují i některé deriváty močoviny. [2] [52]

Gibereliny jsou látky diterpenické povahy, které se v živé rostlině tvoří v místech aktivního růstu, tedy v nejmladších listech, kořenových špičkách a v embryích semen. [52] Většina explantátových kultur je pro svůj růst v médiu nepotřebuje, ale

u některých kultur mohou podporovat růst. Mezi používané gibereliny patří giberelin $GA_3$ (označovaný jako kyselina giberelinová) a giberelin $GA_7$. [3] Po přidání giberelinů do živného média je u rostliny často stimulován přírůstek biomasy, zkrátí nebo přeruší se odpočinek, navíc gibereliny zabraňují procesu stárnutí a prodlužují juvenilní fázi růstu rostliny. [42] $GA_3$ se běžně přidává do média za účelem stimulace růstu u zakrslých rostlin a pro podpoření růstu kalusů a suspenzních kultur při nízké hustotě suspenze. Aby se projevil stimulační účinek giberelinu, je však zapotřebí přítomnosti auxinu. [2] [3]

Kyselina abscisová (ABA) byla dlouho považována jen za růstový inhibitor. Později však bylo zjištěno, že její přítomnost v explantátových kulturách může podporovat normální vývin izolovaných zygot. [46] V nativních rostlinách je syntetizována v chloroplastech dospělých listů, v semenech a kořenech. Snižuje permeabilitu buněčných membrán, čímž omezuje dostupnost vody a důležitých látek v buňkách. Omezuje také transkripci RNA. V rostlině zesiluje odpočinek pupenů a semen, urychluje opad listů a plodů. [42] [52] Do médií se může přidávat kvůli schopnosti indukce somatické embryogeneze, dále kvůli stimulaci tvorby hlíz, indukci kvetení, navození dormance, nebo k brzdění růstu nadměrně se dělící explantátové kultury. [2]

**B) Fyzikální podmínky kultivace**

Kromě složení živného média hrají při kultivaci velkou roli fyzikální podmínky. Mezi ně patří například světelný režim, teplota, acidita kultivačního média, vlhkost vzduchu, složení plynné fáze, provzdušňování a protřepávání. Především světlo a teplota mají u *in vitro* kultur významný vliv na probíhající biochemické a fyziologické procesy. [3] [46]

**Světelný režim**

Světelným režimem rozumíme nejen fotoperiodu (počet hodin světla v intervalu 24 hodin), ale i intenzitu a kvalitu (vhodné spektrum) světla. [48] Murashige (1984) doporučuje deset hodin osvětlení denně (při nedostatečné délce osvětlení začínají

kultury intenzivně nekrotizovat), přičemž intenzita by měla být determinována stupněm vývinu explantátu. Při nižší intenzitě se obvykle vytváří menší množství orgánů, při příliš velké intenzitě je však organogeneze často až úplně zastavena a rostlina vykazuje příznaky chlorózy (skvrnitost listů a inhibice růstu). [42] Délka a intenzita osvětlení výrazně ovlivňuje nejen růst kultury, ale i produkci sekundárních metabolitů. Světlo může některé biosyntetické pochody v rostlinách přímo indukovat, příkladem je produkce anthokyanů v buňkách mrkve nebo flavonoidů v buňkách petržele při zvýšení intenzity osvětlení. [49]

**Teplota**

Optimální rozsah teplot pro explantátové kultury je většinou mezi 20 a 25 °C. [42] Příliš nízká teplota může zastavovat metabolické pochody a růst buněk, moc vysoká teplota naopak poškozuje buňky. [49] Na počátku zakládání kultury se však obecně doporučuje používat spíše nižší teploty, protože ty zabezpečují zvýšení životaschopnosti explantátů a snižují šance na šíření infekcí. [42]

**Acidita prostředí**

Na koncentraci vodíkových iontů v prostředí závisí mnoho pochodů v rostlinných buňkách. Acidita ovlivňuje metabolismus bílkovin, rostlinných regulátorů, vitaminů. [42] Jak už bylo uvedeno výše, optimální pH pro většinu kultur je 5,4–5,7, tedy mírně kyselé. [45] Některé kultury však vyžadují o něco zásaditější pH, například 6,0–7,0. Hodnota pH se dá v médiu upravit přídavkem hydroxidu draselného pro posun do zásaditější reakce nebo kyseliny chlorovodíkové při nedostatečné aciditě půdy. [3]

**Vlhkost vzduchu**

Vlhkost vzduchu kolísá v poměrně širokém rozmezí na základě požadavků dané kultury od 20 do 98 %. [3]

## 3.4 Metody zvyšování produkce sekundárních metabolitů

### 3.4.1 Sekundární metabolismus

Kromě primárního metabolismu rostlin, pomocí kterého rostlina syntetizuje všechny nepostradatelné složky svého těla (jako jsou aminokyseliny, vitaminy, nukleové kyseliny a ostatní látky, vyskytující se v rostlinách), mají některé rostlinné buňky schopnost produkovat i další látky, které jsou patrně pro růst rostliny postradatelné, ačkoliv mají pro rostlinu svůj význam. Ty jsou označované jako sekundární metabolity. Jejich metabolismus úzce navazuje na metabolismus primární. [3] [4]

Sekundární metabolity se hromadí v rostlinných tkáních, protože rostlina nemá enzymy k jejich štěpení. Jsou specifické pro každý biologický druh. Některé slouží rostlinám jako barviva nebo vonné látky lákající opylovače. Jiné naopak chrání rostlinu před predátory nebo napadením patogenem (mohou přímo navozovat rezistenci rostliny proti infekci, bakteriální i fungální). [2] [3] [4] [53] Pigmenty zpravidla slouží jako antioxidanty – mohou se hromadit ve vakuolách buněk epidermální vrstvy a chránit tak fotosynteticky aktivní buňky před ničivým vlivem volných radikálů, které v rostlině vznikají působením UV záření. [34] Jejich produkce se tedy často zvyšuje, pokud se rostlina nachází ve stresové situaci, což otevírá velký prostor studiím a výzkumům, které se týkají metod zvyšování produkce sekundárních metabolitů v rostlinách. [2]

### 3.4.2 Produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách

Pěstování intaktních rostlin kvůli produkci sekundárních metabolitů má řadu nevýhod. Hraje zde velkou roli závislost množství obsahových látek na vnějších podmínkách (klima, minerální výživa, světlo, dostupnost vody, přítomnost predátorů a jiných ničivých faktorů). Chemické syntézy jsou zase zpravidla velmi obtížné, drahé, u složitějších látek často zatím neuskutečnitelné. Proto došlo k projevení snahy o produkci sekundárních metabolitů, které mají svůj význam jak v průmyslu farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém, tak i v zemědělství, cestou biotechnologie. [3] [4]

Tkáňové kultury se dají využít přímo k mikropropagaci, tedy vlastnímu množení rostlin, které jsou významné přítomností látek sekundárního metabolismu. [3] Pro produkci sekundárních metabolitů mají nezanedbatelnou výhodu v tom, že jsou kultivovány v řízeném prostředí bez klimatických vlivů, mikroorganismů a jiných škůdců, proces může být zautomatizován a lze selektovat kultivary s vyšší schopností produkce sekundárních metabolitů (nebo lze do média aplikovat prekurzory zvyšující výtěžnost kultury), což vše slibuje nižší výrobní cenu mnohdy velmi nákladných obsahových látek rostlin. [2] [4]

Syntéza a akumulace sekundárních metabolitů se dá považovat za aspekt diferenciace. V rychle rostoucích rozpadavých buněčných kulturách se akumuluje jen velmi malé množství sekundárních metabolitů. Naopak při pomalejším růstu kultury dochází vlivem diferenciace buněk, buněčné agregace a morfologické organizace zpravidla ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů. [2] Tento poznatek tedy naznačuje jistý antagonismus mezi primárním a sekundárním metabolismem rostlin – při rychlém růstu využívá rostlina všechny prekurzory a zásobní látky k syntéze látek primárního metabolismu a sekundární metabolity se neprodukují. Pokud však rostlina nevyužívá dané látky k syntéze proteinů (což může být způsobeno i vlivem rostlinných retardandů nebo vlivem stresu na danou kulturu), slouží tyto látky jako výchozí prostředky pro sekundární metabolismus. [3]

### 3.4.3 Fyziologie stresu

Stres je obvykle definován jako stav, který nepříznivě ovlivňuje homeostázu buňky nebo celého organismu. [54] Obecně se dá tedy za stres považovat každý výkyv od ideálních podmínek. Je nutno podotknout, že se nejedná o přesně definovaný ustálený stav, ale jde spíše o dynamický komplex řady reakcí. [32] [53]

Vzhledem k tomu, že rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám životního prostředí, termín stres používáme u rostlin jako všeobecné označení pro stav pod vlivem stresorů, tedy nepříznivých vlivů vnějšího prostředí, které ovlivňují rostlinu. [32] [53] U rostliny může být vlivem stresu omezená produktivita a schopnost reprodukce. Dochází pak k předčasnému stárnutí, a když je

rostlina na stres citlivá, tento děj může končit buněčnou apoptózou, vedoucí v důsledku až k zániku celé rostliny. [53] [55]

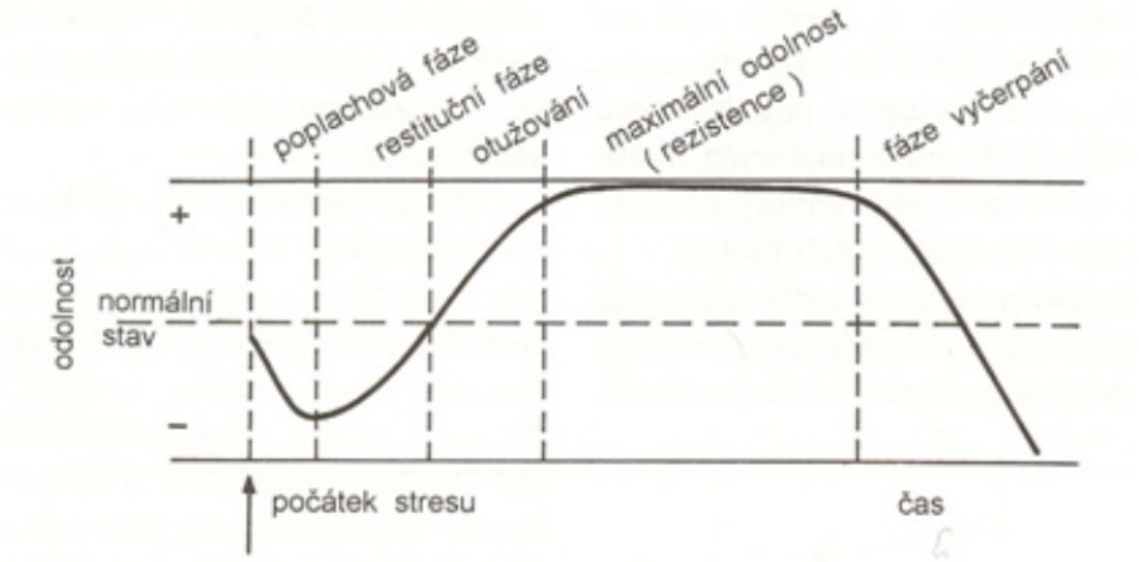
Na rozdíl od většiny živočichů však nedisponují rostliny schopností vyhnout se stresovému faktoru nebo se od něj vzdálit. Musí být proto vybaveny speciálními mechanismy, které rostlinu chrání a umožní jí přizpůsobit se nastalým podmínkám. K tomu rostlinám slouží například tlustá kutikula na listech, tvorba trichomů, výrazná impregnace rostlinných buněčných stěn, rezervoáry vody a zásobních látek. Tento způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter. Dá se hovořit o tzv. s*tress avoidance*, tedy vyhýbání se stresu. [32] [56]

Další metoda boje se stresem je tzv. *stress tolerance* (tedy aktivní odolnost), která funguje na principu aktivního omezení negativního dopadu stresorů na rostlinu až po jejich průniku do rostliny. V tu chvíli dochází v rostlině ke spuštění kaskády změn, které jsou označovány jako stresová reakce. [32] [57]

### 3.4.4 Stresová reakce a její mechanismus

Stresová reakce u rostlin funguje na stejném principu jako stresová reakce známá z fyziologie člověka. Bezprostředně po zahájení působení stresového faktoru na organismus dojde k narušení buněčných struktur a funkcí. Odolnost organismu nebo rostliny klesá. Tato fáze se označuje jako poplachová fáze. Pokud intenzita stresoru nepřesáhne letální úroveň, dochází v dalším kroku k tzv. resuscitační fázi, při které se mobilizují přirozené kompenzační mechanismy rostliny. Tato fáze směřuje ke zvýšení celkové odolnosti rostliny, fázi rezistence, kdy se rostlina dokáže efektivně bránit stresovým faktorům a jejich nežádoucím vlivům na její homeostázu. Pokud však stresory působí na rostlinu dlouhodobě a nebo s velkou intenzitou, může rostlina znovu dospět do fáze poklesu odolnosti – do fáze vyčerpání. [32] [55] [57]

**Obr. 7:** Idealizovaný průběh stresové reakce. [32]




Míra, jakou bude rostlina schopna chránit se před dopadem stresu, však kromě délky a intenzity působení faktoru závisí významně na geneticky vázaných předpokladech odpovědi, které se označují jako adaptační schopnosti. Přechodné zvýšení odolnosti rostliny po působení stresoru nazýváme aklimace. [53] Aklimace může být založena na dočasných změnách, jako je například tvorba specifických sekundárních metabolitů, nebo se rostlina dokáže bránit stresu i pomocí změn trvalých (například tvorba nových orgánů nebo změna vnitřní struktury rostliny). [32]

### 3.4.5 Biotické a abiotické stresové faktory

Biotický stres je stres, při kterém rostlina interaguje s ostatními žijícími organismy. [58] Biotické stresové faktory tedy mohou být herbivoři (býložravci), kteří rostlinu spásají anebo ji mohou poranit, popřípadě patogenní mikroorganismy – viry, mikroby, houby, které rostlinu napadají. [55] Do biotických faktorů se počítá i vzájemné ovlivňování rostlin na úrovni alelopatie nebo parazitismu. Alelopatie může nastat, když jedna rostlina produkuje sekundární metabolity, které působí inhibičně až toxicky, pokud se vyskytují v těsné blízkosti jiné rostliny. Jakmile skutečně dojde k přenosu účinné látky a sousední rostlina je ovlivněna, mluvíme o alelopatii. Tuto metodu ovládá například česnek medvědí (*Allium ursinum*) nebo metlička křivolaká (*Avenella flexuosa*). [32]

Abiotické stresory jsou naproti tomu faktory fyzikální či chemické, které působí na rostlinu z vnějšího prostředí. [53] Mezi fyzikální abiotické stresory patří například extrémní teplota (chlad, mráz, horko), nadměrné záření (viditelné světlo, UV záření) nebo i mechanické ohýbání částí rostliny vlivem větru. K chemickým stresorům se jednak řadí nedostatek vody, kyslíku nebo živin, tak nadbytek různých látek v půdě nebo plynů ve vzduchu. Sem spadá i ovlivňování rostlin xenobiotiky, tedy chemickými sloučeninami, které se v přírodě původně nevyskytovaly. [32]

## 3.5 Elicitace

### 3.5.1 Definice pojmů

Elicitace je proces, při kterém jsou v rostlině pěstované *in vitro* indukovány změny ve fyziologii vlivem působení stopového množství elicitoru. Elicitor je pak látka, ať biotického nebo abiotického původu, spouštějící svým působením stresovou reakci – tedy kaskádu mechanismů, které ovlivňují rostlinný metabolismus a podporují biosyntézu metabolitů, které mají za úkol stres eliminovat. [1] [32] [59]

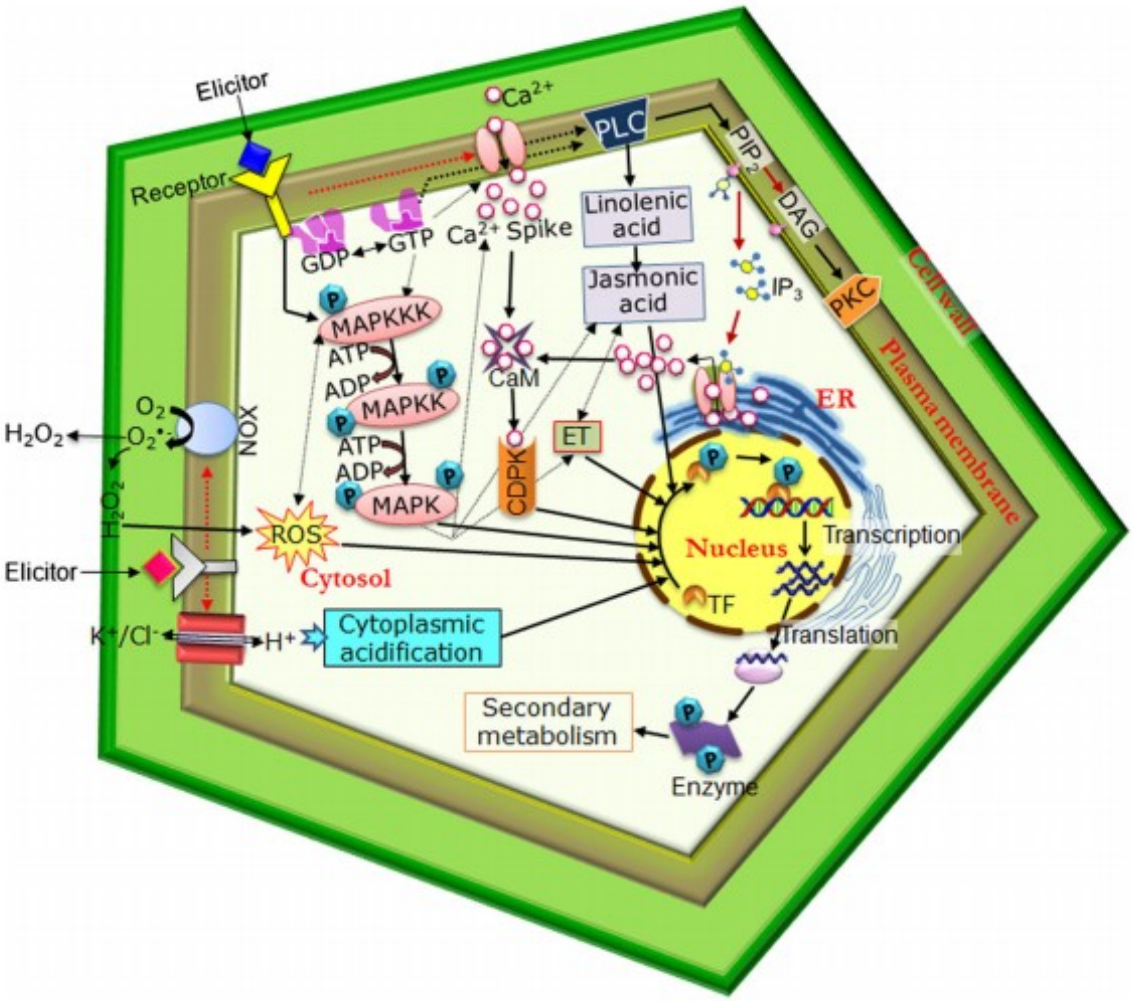
### 3.5.2 Mechanismus působení elicitoru

Většina obranných mechanismů rostliny závisí na aktivaci vhodných tzv. *defense-related* genů nebo naopak na inaktivaci *non-defense-related* genů. Tyto geny kódují enzymy zapojené přímo do syntézy sekundárních metabolitů. [1] Elicitory zpravidla neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale jejich účinek je zprostředkován tzv. druhými posly, tedy přenašeči buněčných signálů jako je například inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) a vápenaté ionty. [32] Druzí poslové, nebo také *second messengers*, aktivují v buňce příslušné transkripční faktory, popřípadě iniciují jejich *de novo* syntézu. Aktivované transkripční faktory poté regulují expresi právě defenzních genů. [3] [59]

Elicitor obvykle aktivuje syntézu pomocí několika různých signálních cest zároveň. [1] K přenosu signálu a aktivaci genové exprese může docházet například tvorbou superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku (ROS). Kromě potenciálního přímého účinku peroxidu vodíku na expresi genů existuje ještě nepřímá cesta. V té nejprve dochází k peroxidaci membránových lipidů, při které vzniká kyselina jasmonová a methyljasmonát, které následně ovlivňují transkripci. Na iniciaci genové exprese se může podílet i etylen, jehož produkce se významně zvyšuje při ohrožení rostliny. [32]

Signální cesty vedoucí k biosyntéze sekundárních metabolitů jsou velmi specifické pro každý elicitor, který na danou rostlinu působí, a hraje zde roli vysoká variabilita v mechanismech procesů včetně širokého rozsahu metabolických odpovědí na stres. Z toho důvodu je vliv elicitace na produkci sekundárních metabolitů poměrně empirická záležitost. [1] [59]

**Obr. 8:** Schematická ilustrace signální cesty pro produkci rostlinných sekundárních metabolitů indukovanou elicitorem. [1]




### 3.5.3 Faktory ovlivňující elicitaci

Zásadním krokem při snaze o ovlivnění *in vitro* kultury elicitací je výběr vhodného elicitoru. Jak už bylo zmíněno výše, elicitory mohou být buď biotické,

nebo abiotické. Biotickými elicitory mohou být metabolity vylučované patogeny, například některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy (exogenní elicitory), stejně jako sloučeniny uvolňované z narušených buněčných stěn obou organismů, například oligomery chitinu, oligoglukany, glykoproteiny nebo oligogalakturonany (endogenní elicitory). [32] [59] Tyto elicitory však mají obvykle velmi složitou a špatně definovatelnou chemickou strukturu, která je navíc mnohdy proměnná kvůli faktorům jako jsou například i jen nepatrné rozdíly v přípravě. Buněčná odpověď na tento typ elicitorů se tedy může velmi lišit. [1] Častěji se proto k elicitaci používají abiotické elicitory, které mají oproti biotickým elicitorům přesně definovanou strukturu, jsou dostupnější a výrazně levnější. [3]

K elicitaci musí být použit elicitor, který je vhodný pro indukci syntézy daného sekundárního metabolitu. To znamená, že u dané rostlinné kultury musí mít schopnost dostatečně ovlivňovat alespoň některé ze signálních cest vedoucích k biosyntéze daného metabolitu. Musí být tedy zvolen správný typ elicitoru s vhodnou specifitou. [1] [59] [60]

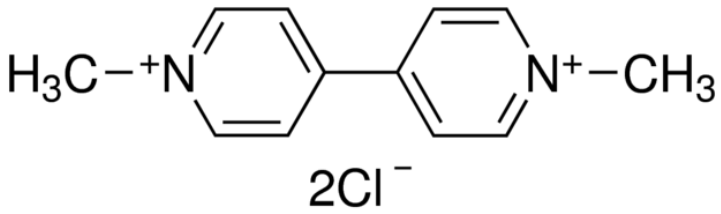
Dalším faktorem je koncentrace elicitoru. Nedostatečné množství elicitoru nebude mít na produkci sekundárních metabolitů dostatečný účinek, nicméně nadměrná koncentrace může kulturu inhibovat až způsobit její úhyn. Senzitivita vůči konkrétní koncentraci elicitoru se navíc může měnit mezi jednotlivými buněčnými liniemi stejné kultury.

Velmi diskutovaným faktorem je i doba elicitace. Zde se musí postupovat většinou empiricky, neboť každý elicitor a každá *in vitro* kultura může mít odlišnou potřebu doby působení elicitoru na základě reaktivity elicitoru, citlivosti rostliny a odlišné délky její stresové reakce.

Kromě toho závisí úspěšnost elicitace samozřejmě na produktivitě kultury. [1] [60]

### 3.5.4 Methylviologen

Methylviologen, jiným názvem paraquat, je chemickou strukturou 1,1‘-dimethyl-4,4‘-bipyridinium dichlorid. Jedná se o kvarterní dusíkatou sloučeninu, která je široce užívaná jako neselektivní kontaktní herbicid. [61] [62]




Methylviologen v rostlině zasahuje do procesu fotosyntézy, konkrétně do intracelulárního systému přenosu elektronů. Inhibuje redukci NADP na NADPH, což vede ke vzniku superoxidového aniontu a dalších volných kyslíkových radikálů. V rostlině tak svým působením způsobuje významný nárůst koncentrace ROS. Tyto vysoce aktivní formy kyslíku interagují s nenasycenými membránovými proteiny, na které se váží, čímž způsobí poškození organel v rostlinné buňce a následně i smrt celé buňky. [63]

Pokud se však aplikuje na explantátové kultury ve stopových množstvích, může u nich podnítit zvýšení produkce sekundárních metabolitů. [62] K tomu dochází právě indukcí stresové reakce, při které v rostlině dojde k aktivaci obranných mechanismů indukujících vznik sekundárních metabolitů, které mají za úkol tyto volné radikály zhášet a zabránit tak jejich škodlivým vlivům na buněčné struktury. [34] [35]

Methylviologen se také jako zdroj ROS často využívá k obecnému sledování působení oxidačního stresu na rostliny. Tímto způsobem pomáhá poznat odlišnosti stresových reakcí u jednotlivých rostlinných druhů a objasňuje rozličné mechanismy obranné reakce. [62]

# 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Biologický materiál

Pracovala jsem s kalusovou kulturou *Fagopyrum esculentum var. Bambi*, jejíž semena byla získána z genové banky Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanech na Slovensku v roce 2015. K pokusu jsem použila 16. – 21. pasáž kultury, která byla odvozená z kořenové části klíčící rostliny na katedře Farmakognozie na Farmaceutické fakultě UK. Suspenzní buněčné kultury jsem odvozovala od kultur kalusových.

## 4.2 Přístroje

Autokláv PS 20 A, Chirana

Box s laminárním prouděním, Fatran LF

Horkovzdušný sterilizátor SVS 9/1, Chirana

Laboratorní analytické váhy Sartorius PRLT A 1

Laboratorní třepačka Unimax 2010, Heidolph Instruments

Mikrofiltry (0,45 µm), Tessek

Sušárna HS 61A, Chirana

Těsnění na vialky, LABICOM s.r.o Olomouc

Ultrazvuk Bandelin Sonorex RK 100 H

Vialky, LABICOM s.r.o Olomouc

Vodní lázeň, typ 1042, GFL

**HPLC**

Autosampler Jasco AS-2055

Diodový detektor Jasco MD-2015

Kolona LiChrospher RP-18 250x4, sorbent LiChrospher 5 µm

Předkolona LiChroCART 4-4, sorbent LiChrospher 5 µm

Pumpa Jasco PU-2089

Termostat kolony Jetstream 2 Plus

## 4.3 Chemikálie

Ajatin plus roztok 10%, Profarma–produkt s.r.o, ČR

Destilovaná voda R, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR

Ethanol 96%, Lachema, ČR

Methanol R 80%, Penta, ČR

Methylviologendichlorid dihydrát, Sigma–Aldrich, USA

**Živné médium**

Dihydrogenfosforečnan draselný *p.a.*, Lachema, ČR

Dusičnan amonný *p.a.*, Penta, ČR

Dusičnan draselný *p.a.*, Lachema, ČR

Edetan disodný *p.a.*, Sigma–Aldrich, USA

Glycin *p.a.*, Penta, ČR

Hydrolyzát kaseinu, Imuna, SR

Chlorid kobaltnatý hexahydrát *p.a.*, Lachema, ČR

Chrorid vápenatý dihydrát *p.a.*, Penta, ČR

Jodid draselný *p.a.*, Penta, ČR

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová, Lachema, ČR

Kyselina boritá *p.a.*, Lachema, ČR

Kyselina nikotinová, Sigma–Aldrich, USA

Molybdenan sodný dihydrát *p.a.*, Penta, ČR

Inozitol, Fluka, Švýcarsko

Pyridoxin, Plant Cell Culture, Sigma–Aldrich, USA

Sacharóza *p.a.*, Lachema, ČR

Síran hořečnatý heptahydrát *p.a.*, Penta, ČR

Síran manganatý monohydrát *p.a.*, Lachema, ČR

Síran měďnatý pentahydrát *p.a.*, Lachema, ČR

Síran zinečnatý heptahydrát *p.a.*, Lachema, ČR

Síran železnatý heptahydrát *p.a.*, Lachema, ČR

Thiamin, Plant Cell Culture, Sigma–Aldrich, USA

**HPLC**

Acetonitril R – čistota pro HPLC, Gradient Grade, Lachema, ČR

Kyselina fosforečná R – čistota pro analýzy, Penta, ČR

Methanol HPLC Grade, Merck, Německo

Rutin R, Sigma–Aldrich, USA

Superčistá voda, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR

## 4.4 Kultivace explantátové kultury

### 4.4.1 Složení a příprava živného média

Kalusové i suspenzní kultury byly kultivovány v živném médiu dle Murashigeho a Skooga (MS), s přídavkem růstového regulátoru 2,4-D (2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina) v množství 1 mg na litr živného média.

Konkrétní složení MS média je následující: [64]

| **Složka média** | **mg/l** |
|---|---|
| Makroelementy | |
| $CaCl_2 . 2 H_2O$ | 440,00 |
| $KNO_3$ | 1900,00 |
| $MgSO_4 . 7 H_2O$ | 370,00 |
| $NH_4NO_3$ | 1650,00 |
| $KH_2PO_4 . H_2O$ | 170,00 |
| Železnatý komplex | |
| $FeSO_4$ | 27,84 |
| $Na_2EDTA$ | 37,31 |
| Mikroelementy | |
| $MnSO_4 . 4 H_2O$ | 22,30 |
| $ZnSO_4 . 7 H_2O$ | 11,50 |
| $H_3BO_3$ | 6,20 |
| KI | 0,830 |
| $CuSO_4 . 5 H_2O$ | 0,025 |
| $Na_2MoO_4 . 5 H_2O$ | 0,025 |
| $CoCl_2 . 6 H_2O$ | 0,025 |
| Vitaminy | |
| Kyselina nikotinová | 0,50 |
| Pyridoxin | 0,50 |
| Thiamin | 0,10 |
| Další složky | |
| Glycin | 2,00 |
| Inozitol | 100,00 |

| Složka média | mg/l |
|---|---|
| Hydrolyzát kaseinu | 1000,00 |
| Sacharóza | 30 000,00 |

Do odměrné baňky o objemu 1000,0 ml jsem odpipetovala požadovaný objem následujících složek ve formě předpřipravených zásobních roztoků:

- 100 ml makroelementů
- 10 ml železnatého komplexu
- 1 ml mikroelementů
- 1 ml glycinu
- 1 ml vitaminů
- 1 ml kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové

Zbylé sypké substance jsem odvažovala na analytických vahách s přesností na tři desetinná místa:

- 30,0 g sacharózy
- 0,1000 g inozitolu
- 1,000 g hydrolyzátu kaseinu

Všechny složky média jsem poté v odměrné baňce rozpustila a doplnila destilovanou vodou po rysku. Roztok byl před rozléváním do kultivačních baněk náležité promíchán.

### 4.4.2 Nádoby a nástroje použité ke kultivaci

Na kultivaci mých explantátových kultur (kalusových i suspenzních) jsem využila Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml, vyrobené z varného skla. Baňky byly na kultivaci připraveny vymytím horkou vodou se saponátem a vypláchnuty nejdříve pitnou a následně destilovanou vodou. Sušeny byly v horkovzdušném sterilizátoru při 200 °C. Do baněk určených pro kultivaci kalusových kultur jsem vložila můstky z filtračního papíru a přidala 30 ml živného média obohaceného o růstový regulátor 2,4-D. U baněk pro suspenzní kultury jsem jen vlila živné médium do prázdných baněk.

Hrdla baněk pak byla přikryta alobalem a takto připravené baňky jsem umístila do autoklávu na dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

Pinzety použité při pasážování i pipety k přidávání elicitoru byly nejdříve pečlivě omyty stejným způsobem jako použité baňky, poté ošetřeny 96% ethanolem, zabaleny do alobalu a následně sterilizovány pomocí horkovzdušného sterilizátoru při teplotě 200 °C po dobu 2 hodin.

### 4.4.3 Průběh kultivace a pasážování

Jakákoliv práce s kulturami (pasážování i přídavek elicitoru) probíhala v laminárním boxu, který jsem nejdříve vymyla roztokem Ajatinu v koncentraci 1:10, a poté byl box vyzářen minimálně po dobu 1 hodiny germicidní zářivkou. Box s laminárním prouděním jsem vždy uvedla do chodu minimálně 30 minut před začátkem práce, aby v boxu došlo k ustálení proudění. Při práci jsem dodržovala principy práce v aseptických podmínkách. Tedy pracovala jsem v čistém plášti a latexových rukavicích omytých 96% ethanolem, každá baňka byla předem pečlivě otřena buničinou napuštěnou ethanolem, snažila jsem se mít baňky odkryté jen po nezbytně nutnou dobu a obecně se vyhnout jakémukoliv riziku kontaminace kultury nebo přenesení případné kontaminace z jedné baňky do jiné.

Pasážování bylo prováděno pravidelně každé cca 4 týdny dle růstu kultury. Pomocí pinzet ošetřených dle postupu uvedeného výše jsem do nově připravených a vysterilizovaných baněk s živnou půdou vložila na můstek shluk buněk z kalusu o velikosti cca 1 $cm^3$. Případně kontaminované kalusy byly vyřazeny a nebyla z nich pasážována další generace. Při pasážování jsem preferovala světlejší, čerstvě narostlé buňky kalusu. Z jedné baňky s narostlým kalusem jsem obvykle založila 3 nové baňky. Bezprostředně po přenesení dostatečného shluku buněk byly baňky s novou pasáží opět zakryty alobalem.

Kultury byly kultivovány za neměnných podmínek v kultivační místnosti na katedře Farmakognosie FaF UK při teplotě 25 °C za fotoperiody 16/8, tedy 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

### 4.4.4 Příprava a kultivace suspenzní kultury

Suspenzní kultury použité při elicitaci jsem vždy odvodila od kalusových kultur při pasážování. Do Erlenmeyerových baněk bez přidaných můstků bylo do média přidáno přibližně stejné množství buněk z narostlých kalusů, jaké bylo použito při pasážování kalusových kultur, ale u suspenzních kultur jsem shluky buněk mechanicky rozmělnila, aby došlo k jejich separaci a vytvoření suspenze.

Kultury poté byly kultivovány přibližně 3 týdny, za stejných podmínek kultivační místnosti jako kalusové kultury (tedy 25 °C a světelná perioda 16/8), ale na rozdíl od nich byly po celou dobu kultivace umístěny na třepačce s frekvencí 120 otáček za minutu, což zajišťovalo jejich míchání a provzdušňování.

## 4.5 Elicitace *in vitro* kultur

Jako elicitor jsem ve své práci použila paraquat, tedy methylviologendichlorid dihydrát. Pokusy jsem prováděla se třemi různými koncentracemi elicitoru, a to: 10,0 mg/100 ml, 1,0 mg/100 ml a 0,1 mg/100 ml.

### 4.5.1 Příprava elicitoru

Na analytických vahách jsem odvážila 250,00 mg čisté látky s přesností na dvě desetinná místa. Substanci sem kvantitativně přenesla do odměrné baňky o objemu 250,0 ml a doplnila 96% ethanolem po rysku. Takto vznikla koncentrace $c_1$.

Z tohoto roztoku jsem odpipetovala 10,0 ml a přenesla je do odměrné baňky o objemu 100,0 ml. Doplněním 96% ethanolem po rysku byla získána koncentrace $c_2$.

Z roztoku $c_2$ jsem pipetou odebrala 10,0 ml, přenesla je do další odměrné baňky o objemu 100,00 ml a koncentrovaným ethanolem jsem doplnila baňku po rysku, čímž vznikla koncentrace $c_3$.

Koncentrace připravených roztoků methylviologenu tedy byly následující:

$c_1$ = 100,0 mg/100 ml (2,1929 . $10^{-2}$ mol/l)

$c_2$ = 10,0/100 ml (2,1929 . $10^{-3}$ mol/l)

$c_3$ = 1,0/100 ml (2,1929 . $10^{-4}$ mol/l)

### 4.5.2 Průběh elicitace

Elicitaci kalusových kultur jsem prováděla vždy po 4 týdnech kultivace. Veškerá práce probíhala opět v aseptických podmínkách laminárního boxu, k přidávání roztoku elicitoru jsem používala sterilní pipety ošetřené dle popisu uvedeného výše.

K elicitaci jsem zpravidla používala 3-5 baněk pro každý časový interval každé koncentrace, dle nárůstu kalusu. Do baňky byl vždy přidán 1 ml roztoku methylviologenu v příslušné koncentraci. Jako kontrolní sloužily baňky, do kterých byl místo roztoku methylviologenu přidán 1 ml ethanolu 96%. Kalusy jsem odebírala v šesti časových intervalech po elicitaci – konkrétně po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách. Kontrolní vzorky byly odebrány ve 4 časových intervalech – po 6, 24, 72 a 168 hodinách.

Po uplynutí požadovaného časového intervalu elicitace jsem kalus vyjmula z baňky, přefiltrovala pomocí filtrační aparatury přes filtrační papír a zbytky ulpělé na baňce případně vymyla malým množstvím 96% ethanolu. Kalusy odebrané ze všech baněk a filtračních papírů, elicitované po stejnou dobu danou koncentrací, jsem umístila na čistý filtrační papír a dala je sušit za laboratorní teploty. Po usušení byly uskladněny za laboratorních podmínek zabalené v alobalu. Před samotnou extrakcí byly tyto vzorky pomocí porcelánové třenky s těrkou pečlivě upráškovány a dále použity ke stanovení obsahu rutinu.

V mé práci jsem sledovala i vylučování metabolitů kultury do živného média. Médium, které mi tedy zbylo po filtraci kultury, jsem uschovala do vysterilizovaných skleněných lahviček a dala skladovat do mrazáku při teplotě -18 °C.

U suspenzních kultur probíhala elicitace po 3 týdnech kultivace, a to stejným způsobem jako u kultur kalusových, se stejnými časovými intervaly odběrů i koncentracemi elicitoru. Při odebírání buněčných shluků z baňky jsem využila filtrace pomocí Büchnerovy nálevky, která zajistila rychlejší průběh. Vzorky médií jsem opět uschovala do mrazáku.

## 4.6 Stanovení obsahu rutinu

Obsah rutinu v kulturách pohanky jsem stanovovala pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím standardu rutinu zakoupeného u firmy Sigma–Aldrich. Příprava vzorků před vlastní HPLC analýzou proběhla dle metody uvedené v ČL 2005. Postup se shoduje s postupem v aktuálním ČL 2017. [15]

### 4.6.1 Příprava extraktů pro stanovení obsahu

Všechny napráškované vzorky jsem zvážila na analytických vahách s přesností na 4 desetinná místa a hmotnosti jsem si pečlivě zaznamenala. Každý vzorek jsem přenesla do varné baňky o objemu 50 ml a přidala 10 ml methanolu 80% R. Následně jsem dala vzorky v baňkách extrahovat na vodní lázeň pod zpětný chladič po dobu 30 minut. Ještě za horka se roztok zfiltroval přes vatu do odměrné baňky o objemu 25,0 ml. Do varné baňky se zbytkem upráškovaného vzorku jsem opět přidala 10 ml methanolu, přenesla do ní vatu použitou při filtraci a baňku se zakrytým hrdlem jsem umístila na ultrazvukovou lázeň po dobu 15 minut. Poté jsem obsah znovu přefiltrovala přes novou vatičku do odměrné baňky s předchozím filtrátem, kterou jsem v následujícím kroku doplnila methanolem po rysku. Po důkladném promíchání jsem část výsledného roztoku přefiltrovala přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 µm a získaný vzorek jsem převedla do vialek vhodných pro analýzu HPLC.

Vzorky uschovaného média jsem po rozmražení odpařila do sucha na porcelánových miskách na vodní lázni. Odparek jsem poté rozpustila v 5 ml methanolu 80% R. Získaný roztok jsem opět přefiltrovala přes mikrofiltr a produkt plnila do vialek vhodných k HPLC analýze.

### 4.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

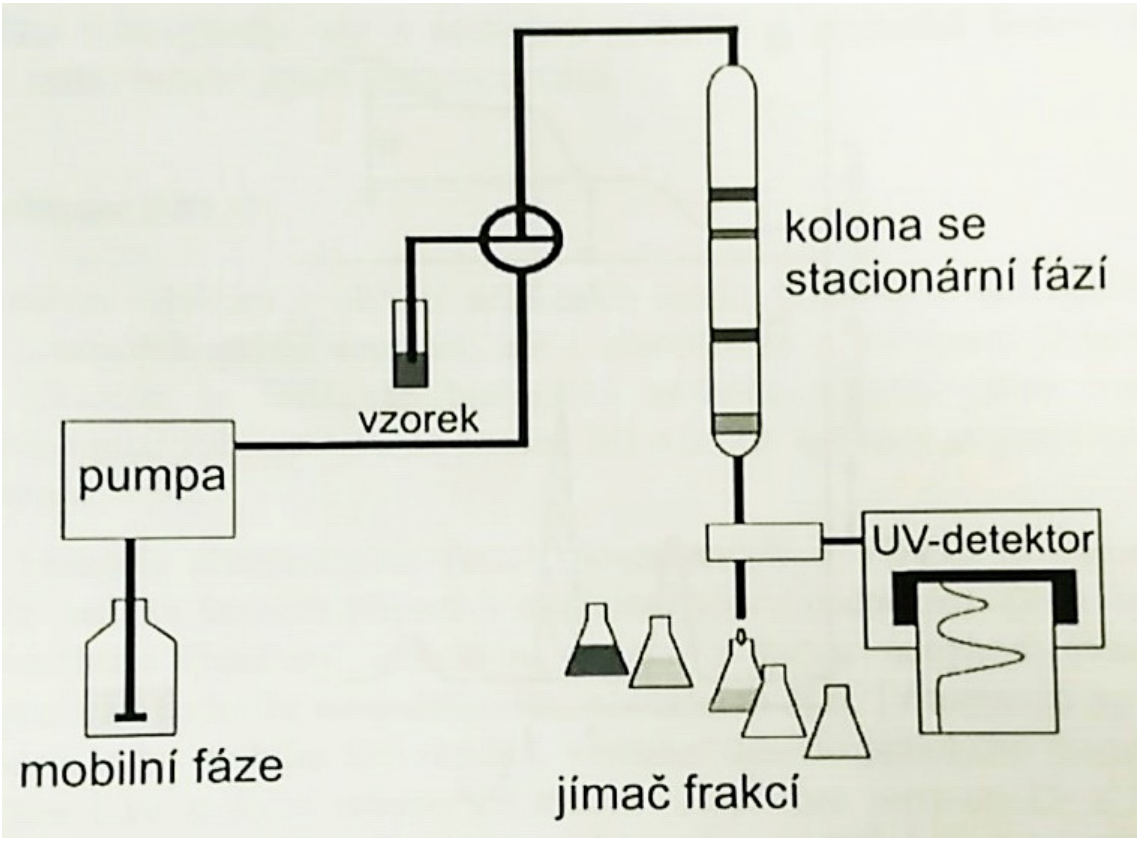
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je velice přesná separační metoda, která umožňuje současně kvalitativní i kvantitativní analýzu. V dnešní době se jedná o jednu z nejpoužívanějších separačních metod, neboť se hodí i pro analýzy složitých směsí biologických molekul nebo tepelně nestabilních nebo těkavých látek. [65] [66]

U HPLC je stacionární fáze pevná a nachází se v průmyslově plněné koloně chromatografu. Separační účinnost závisí především na velikosti částic pevné fáze. Čím menší a pravidelnější částice stacionární fáze jsou, tím je metoda přesnější a účinnější. Mobilní fáze je kapalná. Pro zajištění vysoké účinnosti metody je mobilní fáze hnaná kolonou pod vysokým tlakem pomocí čerpadla. [65]

Přístroj, na kterém se chromatografické separace provádějí, se tedy nazývá chromatograf. Záznamem chromatografie je chromatogram; jsou na něm zobrazené píky neboli eluční pásy, které definují jednotlivé separované složky.

Kapalinový chromatograf se skládá z vysokotlakých čerpadel, čerpajících mobilní fáze do systému, dále ze směšovače, z předkolony, dávkovače vzorku, samotné kolony se stacionární fází, která poté navazuje na detektor se zapisovačem. Po detekci odchází směs vzorku a mobilní fáze do sběrače frakcí. Systém je opatřen manometrem, který kontroluje tlak před kolonou, aby nedošlo k poškození finančně velice nákladné kolony. [65]

**Obr. 9:** Schéma kapalinového chromatografu. [66]



Čerpadlo čerpá mobilní fáze do systému za tlaku obvykle 7–20 MPa [66] (v některých případech až 40 MPa). Dávkování vzorku lze provést speciální injekční mikrostříkačkou nebo dávkovacím kohoutem na neměnné množství vzorku. Kolony pro HPLC jsou obvykle ocelové nebo skleněné trubice o délce 5–30 cm, s vnitřním průměrem 2–8 mm. Detektory pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii musí být schopné detekovat látky v roztoku v koncentracích nanogramů až mikrogramů na mililitr, měření musí být reprodukovatelné a výsledky nezávislé na změně složení při gradientové eluci. Nejčastěji se využívají detektory spektrofotometrické. [65]

### 4.6.3 Stanovení obsahu metodou HPLC

HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 µm) s ochrannou předkolonkou.

**Parametry analýzy:**

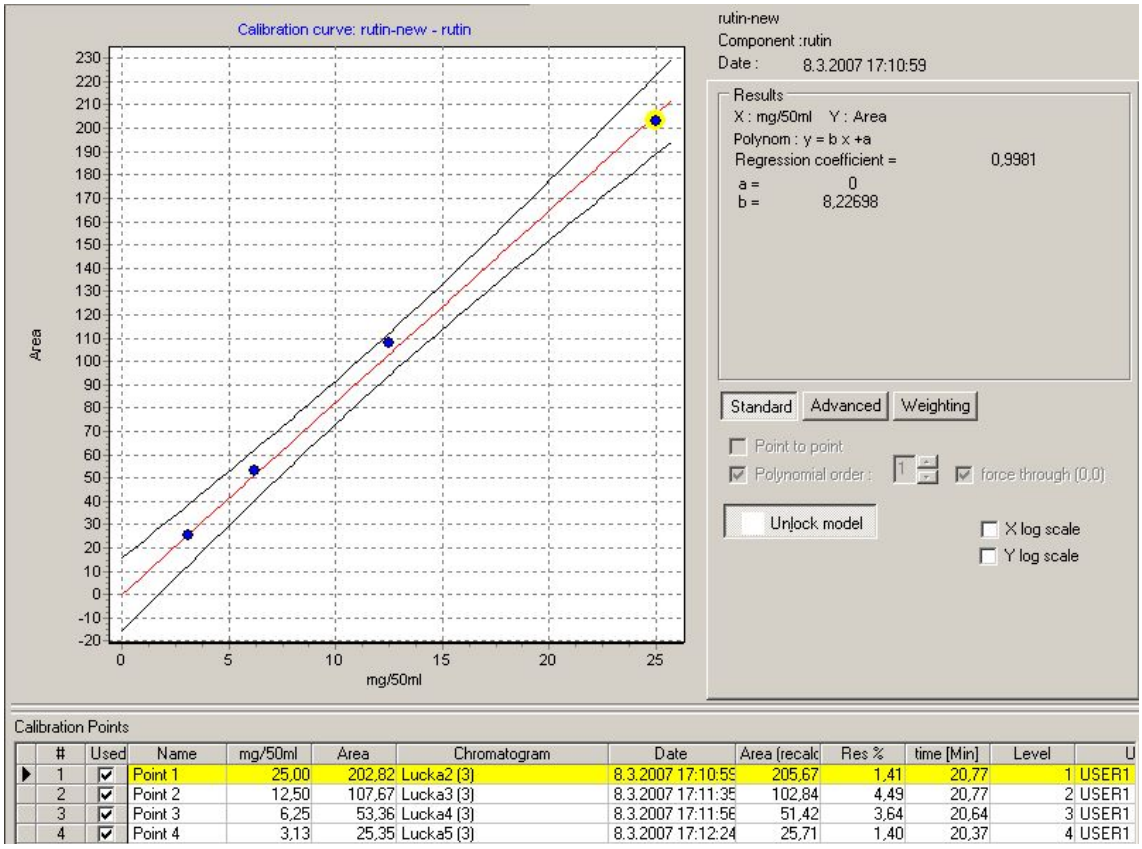
- eluent A: 5% acetonitril + 0,15% $H_3PO_3$ ve vodě (úprava pH na hodnotu 2)
- eluent B: 100% acetonitril
- prvních 6 minut isokratická (složení fáze se v čase nemění), poté gradientová eluce dle následující tabulky:

| Čas (min) | % eluentu A | % eluentu B |
|---|---|---|
| 0 | 96 | 4 |
| 6 | 96 | 4 |
| 16,5 | 80 | 20 |
| 22 | 65 | 35 |
| 23 | 60 | 40 |

- rychlost průtoku: 1,0 ml/min
- teplota kolony: 25 °C
- nastřikovaný objem: 20 µl
- detekce: DAD detektor, rozmezí vlnových délek 200–450 nm (obsah sledovaných látek vypočten z píku při vlnové délce 350 nm)

Roztoky standardu byly vytvořeny přímým rozpuštěním v methanolu. Použité koncentrace byly: 25 mg/100 ml; 12,5 mg/100 ml; 6,25 mg/100 ml a 3,125 mg/100 ml. Na základě HPLC analýzy těchto roztoků byla pomocí softwaru ChromPass vytvořena následující kalibrační přímka.

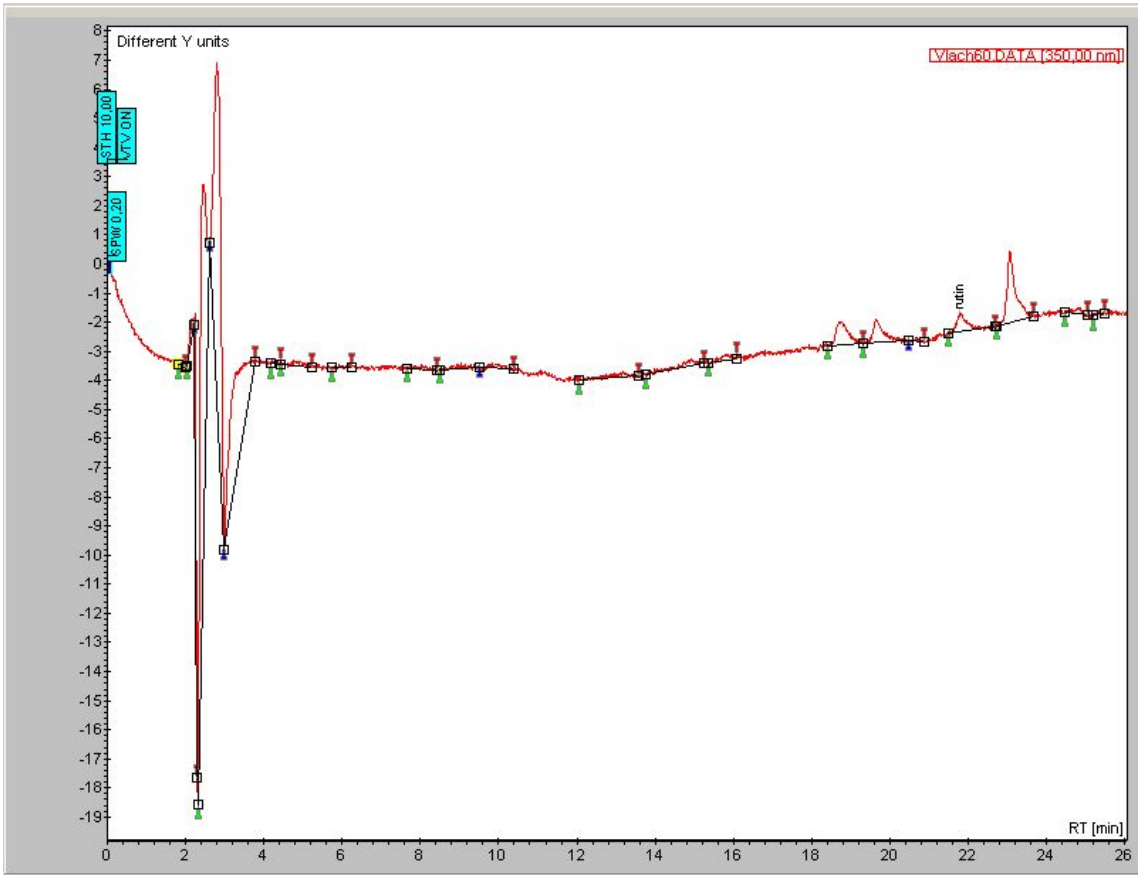
**Obr. 10:** Kalibrační přímka rutinu.




Calibration Points

| # | Used | Name | mg/50ml | Area | Chromatogram | Date | Area (recalc | Res % | time [Min] | Level | U |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ☑ | Point 1 | 25,00 | 202,82 | Lucka2 (3) | 8.3.2007 17:10:59 | 205,67 | 1,41 | 20,77 | 1 | USER1 |
| 2 | ☑ | Point 2 | 12,50 | 107,67 | Lucka3 (3) | 8.3.2007 17:11:35 | 102,84 | 4,49 | 20,77 | 2 | USER1 |
| 3 | ☑ | Point 3 | 6,25 | 53,36 | Lucka4 (3) | 8.3.2007 17:11:56 | 51,42 | 3,64 | 20,64 | 3 | USER1 |
| 4 | ☑ | Point 4 | 3,13 | 25,35 | Lucka5 (3) | 8.3.2007 17:12:24 | 25,71 | 1,40 | 20,37 | 4 | USER1 |

**Obr. 11:** HPLC chromatogram standardu.



## 4.7 Statistické zpracování výsledků [67] [68]

### 4.7.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je definován jako součet všech naměřených hodnot dělený počtem vstupů. Jedná se tedy o střední hodnotu souboru. V jistém smyslu vyjadřuje typickou hodnotu popisující soubor mnoha hodnot. Vypočítáme ji dle vzorce:

$$\overline{x} = \frac{1}{n}\left(x_1 + x_2 + \ldots + x_n\right)$$

Respektive dle vzorce:

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

$\overline{x}$ = aritmetický průměr

$x_i$ = jednotlivé hodnoty

n = počet členů souboru

### 4.7.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je veličina, která vyjadřuje, jak se naměřené hodnoty liší od průměrné (střední) hodnoty. Funkce směrodatné odchylky je definovaná vztahem:

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

s = směrodatná odchylka

$x_i$ = hodnota sledované veličiny

$\overline{x}$ = průměrná hodnota sledované veličiny

n = počet členů souboru

### 4.7.3 T-test

T-test je jeden z nejpoužívanějších statistických parametrů. Zajišťuje ověření důležitosti rozdílů mezi určitými průměry. Vzorec pro výpočet je následující:

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

t = testovací kritérium

$x_1$ = aritmetický průměr kontrolního souboru

$x_2$ = aritmetický průměr pokusného souboru

$n_1$ = počet členů kontrolního souboru

$n_2$ = počet členů pokusného souboru

$s_1$ = směrodatná odchylka kontrolního souboru

$s_2$ = směrodatná odchylka pokusného souboru

Ke zjištění statistické významnosti vlivu methylviologenu na obsah rutinu v *in vitro* kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi* byl použit t-test rozdílů dvou průměrů.

Testovacímu kritériu náleží t-rozdělení se stupněm volnosti vypočtenému dle vzorce:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Vypočítaná hodnota testovacího kritéria byla porovnána s příslušnou tabulkovou kritickou hodnotou $\mathbf{t(v)_p}$ pro vypočtený stupeň volnosti **v** a zvolenou hladinu významnosti **p**. Pokud je hodnota **t** větší než hodnota $\mathbf{t(v)_p}$, je rozdíl $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ považován za statisticky významný na hladině významnosti **p**.

Pro zjištění obsahu rutinu ve vzorcích byla vždy provedena tři paralelní stanovení, z čehož vyplývá, že počet členů souboru je $\mathbf{n_1} = \mathbf{n_2} = 3$. Počet stupňů volnosti **v** = 4. Pro zvolenou hladinu významnosti **p** = 0,05 a pro 4 stupně volnosti je kritická

hodnota testovacího kritéria $\mathbf{t(v)_p}$ rovna 2,78. Výsledky jsou statisticky významné, je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než tabelovaná kritická hodnota.

Pro výpočet hodnot testovacího kritéria pro odběry po 6 a 12 hodinách byla použita kontrolní hodnota odběru po 6 hodinách, pro odběry po 24 a 48 hodinách byla použita kontrolní hodnota po 24 hodinách a u odběrů po 72 a 168 hodinách byla použita vždy příslušná kontrolní hodnota odběru.

# 5 VÝSLEDKY

## 5.1 Tabulky

**Tabulka č. 1:** Obsah rutinu (v mg/g DW) v závislosti na čase v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi* po elicitaci roztokem methylviologenu o různé koncentraci.

| Koncentrace elicitoru [mg/l] | Hodina odběru | Obsah rutinu [mg/g DW] | Směrodatná odchylka | Hodnota testovacího kritéria |
|---|---|---|---|---|
| $c_1$ | 6 | 0 | - | - |
| | 6 K | 0 | - | - |
| | 12 | 0 | - | - |
| | 24 | 0 | - | - |
| | 24 K | 0 | - | - |
| | 48 | 0 | - | - |
| | 72 | 0 | - | - |
| | 72 K | 0 | - | - |
| | 168 | 0 | - | - |
| | 168 K | 0 | - | - |
| $c_2$ | 6 | 0 | - | - |
| | 6 K | 0 | - | - |
| | 12 | 0 | - | - |
| | 24 | 0 | - | - |
| | 24 K | 0 | - | - |
| | 48 | 0 | - | - |
| | 72 | 0 | - | - |
| | 72 K | 0 | - | - |
| | 168 | 0 | - | - |
| | 168 K | 0 | - | - |
| $c_3$ | 6 | 0 | - | - |
| | 6 K | 0 | - | - |
| | 12 | 0 | - | - |

| Koncentrace elicitoru [mg/l] | Hodina odběru | Obsah rutinu [mg/g DW] | Směrodatná odchylka | Hodnota testovacího kritéria |
|---|---|---|---|---|
| | 24 | 0 | - | - |
| | 24 K | 0 | - | - |
| | 48 | 0 | - | - |
| | 72 | 0 | - | - |
| | 72 K | 0 | - | - |
| | 168 | 0 | - | - |
| | 168 K | 0 | - | - |

**Pozn.:**

0 = naměřeno stopové množství nebo nebylo detekováno

K = kontrolní vzorek bez přídavku elicitoru

DW = „*dry weight*“ = hmotnost sušiny

Vzhledem k nulovým hodnotám obsahu rutinu v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum var. Bambi* nemohly být výsledky statisticky vyhodnoceny.

**Tabulka č. 2:** Obsah rutinu (v mg/g DW) v závislosti na čase v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi* po elicitaci roztokem methylviologenu o různé koncentraci.

| Koncentrace elicitoru [mg/l] | Hodina odběru | Obsah rutinu [mg/g DW] | Směrodatná odchylka | Hodnota testovacího kritéria |
|---|---|---|---|---|
| $c_1$ | 6 | 0,1 | - | - |
| | 6 K | 0,1 | - | - |
| | 12 | 0,1 | - | - |
| | 24 | 0 | - | - |
| | 24 K | 0,1 | - | - |
| | 48 | 0 | - | - |
| | 72 | 0 | - | - |
| | 72 K | 0,1 | - | - |
| | **168** | **0,1** | **0,03** | **2,82** |

| Koncentrace elicitoru [mg/l] | Hodina odběru | Obsah rutinu [mg/g DW] | Směrodatná odchylka | Hodnota testovacího kritéria |
|---|---|---|---|---|
| | 168 K | 0 | - | - |
| $c_2$ | 6 | 0 | - | - |
| | 6 K | 0,1 | - | - |
| | 12 | 0 | - | - |
| | 24 | 0,1 | - | - |
| | 24 K | 0,1 | - | - |
| | 48 | 0,1 | - | - |
| | 72 | 0,1 | - | - |
| | 72 K | 0,1 | - | - |
| | 168 | 0 | - | - |
| | 168 K | 0 | - | - |
| $c_3$ | 6 | 0 | - | - |
| | 6 K | 0 | - | - |
| | 12 | 0 | - | - |
| | 24 | 0 | - | - |
| | 24 K | 0 | - | - |
| | **48** | **0,1** | **0,03** | **1,66** |
| | 72 | 0 | - | - |
| | 72 K | 0 | - | - |
| | **168** | **0,1** | **0,03** | **1,66** |
| | 168 K | 0 | - | - |

**Pozn.:**

0 = naměřeno stopové množství nebo nebylo detekováno

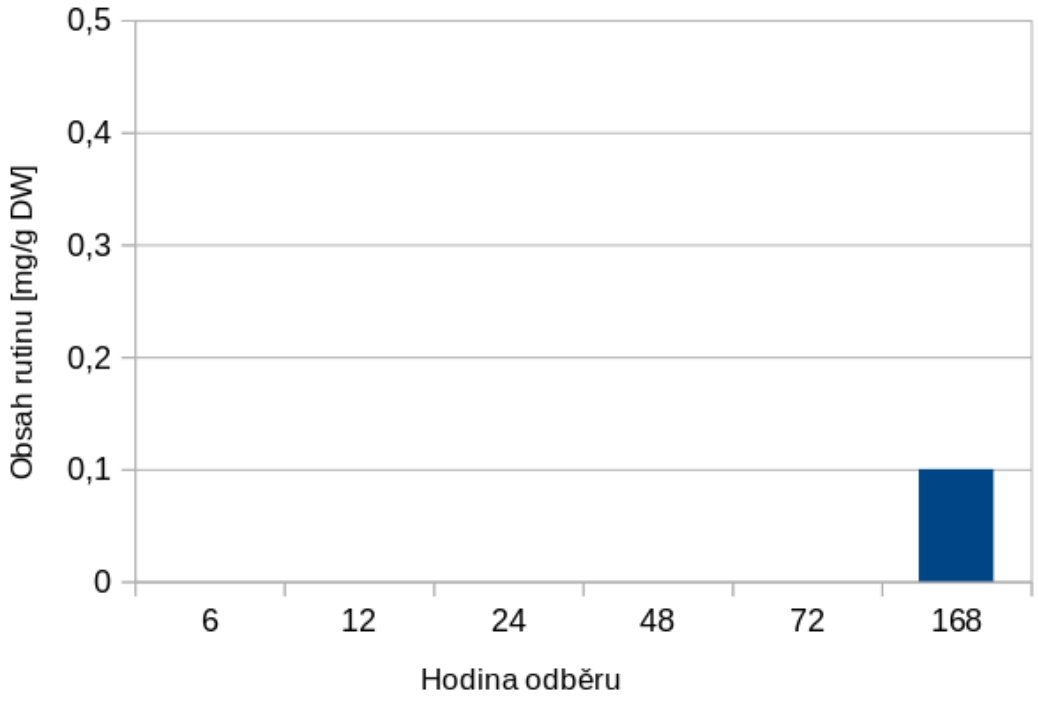
K = kontrolní vzorek bez přídavku elicitoru

DW = „*dry weight*“ = hmotnost sušiny

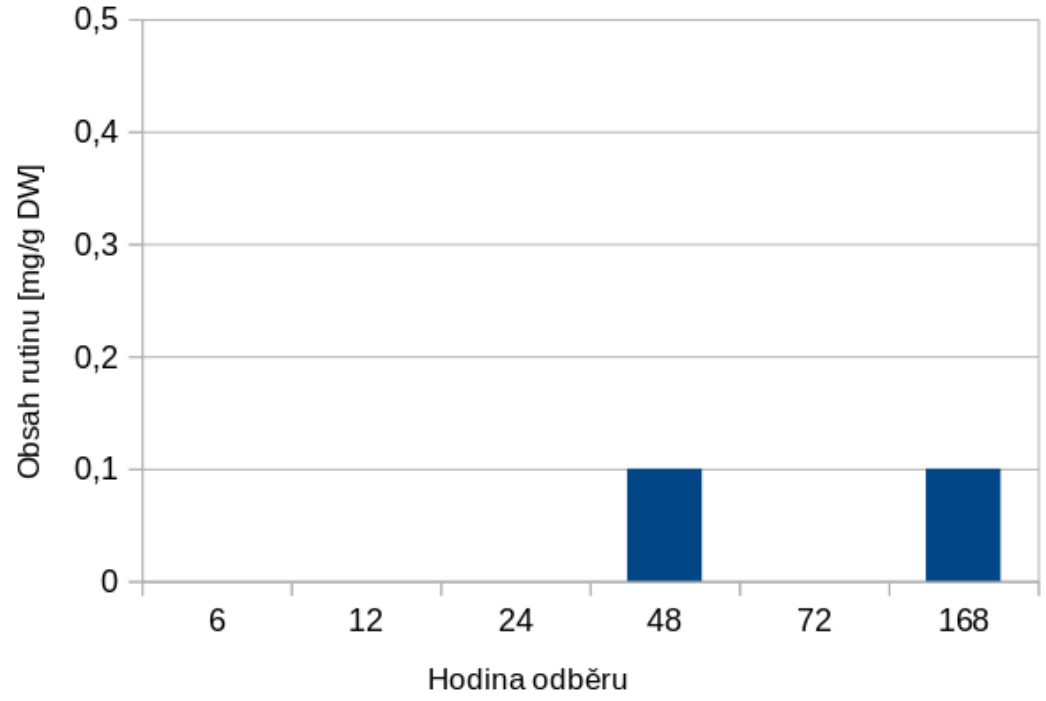
Hodnoty obsahu rutinu produkovaného kalusovou i suspenzní kulturou do živného média byly ve všech případech pod úroveň detekce (tedy menší než 0,01 %), jejich obsah proto nebyl zanesen do tabulky ani grafu a rovněž nemohl být statisticky zpracován.

## 5.2 Grafy

**Obr. 12:** Obsah rutinu (v mg/g DW) v závislosti na čase v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi* po elicitaci roztokem methylviologenu o koncentraci $c_1$.




**Obr. 13:** Obsah rutinu (v mg/g DW) v závislosti na čase v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi* po elicitaci roztokem methylviologenu o koncentraci $c_3$.



# 6 DISKUZE

Léčiva s obsahem látek přírodního původu mají i v dnešní době v terapii stále své místo. Důkazem toho je fakt, že například v roce 2010 se v České republice použilo pro výrobu léčivých přípravků obsahující rutin a jeho deriváty více než 15 kilogramů této účinné látky. Je tedy zřejmé, že podobně velké množství léčivé látky nelze získat jen z polní produkce. [69] Pokud bychom totiž počítali s nejnižším limitním množstvím rutinu v droze *Fagopyri herba* dle ČL 2017, tedy 3,0 %, na tuto produkci bychom potřebovali více než 5 tun sušené rostliny.

Z toho důvodu se k zajištění dostatečného množství rostlinných sekundárních metabolitů využívá biotechnologických metod. Explantátové kultury *in vitro* se navíc dají ovlivňovat metodou elicitace. Správně zvolený elicitor o vhodné koncentraci po optimální době působení vyvolává v rostlině stresovou reakci, jejímž výsledkem je zvýšení produkce daných metabolitů. Při úspěšném ovlivnění kultur se tak znatelně sníží náklady na produkci sekundárních metabolitů. [3]

V této práci jsem se zabývala metodou ovlivnění produkce rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi* použitím abiotického elicitoru methylviologenu o třech různých koncentracích. Zároveň jsem sledovala i uvolňování rutinu do živného média. Závěrečná analýza vzorků byla provedena s pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Na experiment jsem použila 16. – 21. pasáž kultury *Fagopyrum esculentum var. Bambi* odvozenou z kořenové části a pěstovanou na živném médiu dle Murashigeho a Skooga s přídavkem růstového regulátoru dichlorfenoxyoctové kyseliny (2,4-D) v koncentraci 1 mg/l média. Kultivace probíhala za stabilních podmínek kultivační místnosti, tedy při teplotě 25 °C a s pravidelným střídáním fotoperiody (16 hodin světla, 8 hodin tmy). Suspenzní kultury navíc byly umístěny na třepačku s frekvencí 120 otáček/minutu, aby bylo docíleno neustálého míchání a provzdušňování. Kultury byly vystaveny působení methylviologenu po dobu 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Kontrolní vzorky (bez přídavku elicitoru) byly odebírány po 6, 24, 72

a 168 hodinách. Zároveň byl vždy odebírán i vzorek živného média pro následnou analýzu.

Na základě získaných výsledků je patrné, že u kalusové kultury neovlivnil methylviologen produkci rutinu v žádném z elicitovaných vzorků a to v žádné ze třech koncentrací nad úroveň detekovatelnosti (viz tabulka č. 1).

U suspenzní kultury došlo pouze k nepatrnému zvýšení obsahu rutinu, a to na nejnižší detekovatelné množství 0,1 mg/g DW. Tento obsah rutinu byl zaznamenán u vzorků odebraných po 168 hodinách elicitace methylviologenem o koncentraci $c_1$ (2,1929 . $10^{-2}$ mol/l) a dále u vzorků elicitovaných methylviologenem o koncentraci $c_3$ (2,1929 . $10^{-4}$ mol/l) a odebraných po 48 a 168 hodinách elicitace (viz tabulka č. 2).

Hodnoty obsahu rutinu produkovaného kalusovou i suspenzní kulturou do živného média byly ve všech případech pod úroveň detekce (tedy menší než 0,01 %).

Obecně vyšší hodnoty obsahu rutinu byly pozorovány v kulturách suspenzních. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že v suspenzi mají shluky buněk větší povrch díky velké míře rozdrobnění, což zajistilo lepší kontakt buněk s molekulami živného média než v případě kalusů, které byly umístěny na můstcích z filtračního papíru.

Methylviologen tvorbu sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách již několikrát stimuloval, a to i v kulturách pohanky. Například v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum* zvýšil methylviologen o koncentraci 10,0 mg/100 ml (2,1929 . $10^{-3}$ mol/l) po 72 hodinách elicitace produkci rutinu z nedetekovatelné hodnoty na 2,5 mg/g DW. [70] V kalusové kultuře ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) také došlo k ovlivnění produkce sekundárních metabolitů po expozici methylviologenem, a to po 6 hodinách elicitace methylviologenem o koncentraci 1,0 mg/100 ml (2,1929 . $10^{-4}$ mol/l), kdy se produkce flavolignanů zvýšila o 1250 %. [62] Dalším příkladem je kultura šalvěje červenokořenné (*Salvia miltiorrhiza*), kde methylviologen o koncentraci 1,5 . $10^{-4}$ mol/l po 6 dnech elicitace zvýšil produkci fytoalexinu z nedetekovatelné hodnoty na 3,6 mg/g DW. [71]

Jedním z možných vysvětlení nízkého obsahu sekundárních metabolitů ve zkoumaných *in vitro* kulturách může být stáří kultury. Například při použití 3. – 10. pasáže kultury *Fagopyrum esculentum* byla zjištěná průměrná produkce rutinu 0,23 mg/g DW. [72] Naopak při použití kultury *Fagopyrum esculentum* ve 27. – 31. pasáži nebyl rutin v kultuře detekovaný ani po elicitaci chloridem ceritým. [73] Čím je kultura starší, tím vyšší je pravděpodobnost náhodné mutace genetické informace (například suprese nebo redukce exprese klíčových enzymů biosyntézy), která může znatelně ovlivnit produktivitu kultury. [4]

Dalším možným vysvětlením může být příliš krátká doba mezi pasážováním. Jak bylo uvedeno v kapitole 3.3.4 o vzniku kultury, růstu a pasážování, k nejvyšší produkci sekundárních metabolitů v explantátových kulturách dochází na počátku stacionární fáze, kdy už nedochází k exponenciálnímu dělení a rapidnímu růstu počtu buněk. Je to proto, že prekurzory potřebné pro sekundární metabolity už nejsou v takové míře využívány v primárním metabolismu a mohou být tedy použity pro syntézu sekundárních metabolitů. [4] [42] [47] Nabízí se proto možnost, že kultury byly přesazeny dříve, než se množství rutinu v kulturách zvýšilo nad detekovatelnou hodnotu.

Vzhledem k obecně vyššímu ovlivnění kultur po delších dobách expozice elicitorem v této práci můžeme spekulovat i o zlepšení produktivity prodloužením doby elicitace. Jak bylo uvedeno výše, u kultury *Salvia miltiorrhiza* byla kultivace s elicitorem prováděna po dobu 6 dní a nárůst produkce sekundárních metabolitů byl značný. [71]

# 7 ZÁVĚR

Výsledkem sledování působení roztoku methylviologenu ve třech různých koncentracích na produkci sekundárních metabolitů v explantátových kulturách pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum* Moench) v odrůdě *Bambi* je zjištění:

- V hodnocených vzorcích kalusové kultury neovlivnil přídavek methylviologenu produkci rutinu v žádné ze třech koncentrací.
- V suspenzní kultuře došlo ke 3 zvýšením obsahu rutinu nad detekovatelnou mez, a to na úroveň 0,1 mg/g DW:
  - při 100,0 mg/100 ml methylviologenu po 168 hod.
  - při 1,0 mg/100 ml methylviologenu po 48 hod.
  - při 1,0 mg/100 ml methylviologenu po 168 hod.
- Uvolnění rutinu do živného média kalusových ani suspenzních kultur nebylo detekováno (obsah menší než 0,01 %).

Z výsledků je tedy patrné, že pozitivní vliv elicitace methylviologenem na *in vitro* kultury *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi* a jejich produkci rutinu nebyl potvrzen.

Produkci rutinu v *in vitro* kulturách by mohly ovlivnit následující faktory:

- použití mladší kultury
- prodloužení doby mezi jednotlivými pasážemi
- delší doba expozice methylviologenem.

# 8 POUŽITÁ LITERATURA

1: Narayani M., Srivastava S. Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. Phytochemistry Reviews 2017; 16(6), 1227-1252.

2: Hradilík J. Rostlinné explantáty. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita 2005; 8-9, 19-29, 77-79.

3: Kováč J. Explantátové kultury rostlin. 1. přeprac. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého 1995; s. 1, 7, 13-25, 79-82.

4: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2011/Bi6120/um/11_sek_metab2011.pdf (3.3.2017)

5: Janča J., Zentrich J. A. Herbář léčivých rostlin, 4. díl. Praha: Eminent 1996; 28-31.

6: http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Pohanka_seta.htm (21.1.2018)

7: http://botanika.wendys.cz/kytky/K724.php (21.1.2018)

8: Jahodář L. Farmakobotanika: semenné rostliny. Vyd. 3., upr. a dopl. Praha: Karolinum 2011; 63-64.

9: Podleh D. Kapesní atlas léčivé rostliny. Praha: Slovart 2002; s. 130.

10: http://botany.cz/cs/fagopyrum-esculentum/ (21.1.2018)

11: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fagopyrum_esculentum_Sturm64.jpg (21.1.2018)

12: Polák E. Perspektívy šľachtenia pohánky na Slovensku. http://www.agris.cz/clanek/110789/perspektivy-slachtenia-pohanky-na-slovensku (21. 1.2018)

13: Mladá J. Atlas cizokrajných rostlin. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství 1987; s. 250.

14: Petr J., Hradecká J. Základy pěstování pohanky a prosa. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství České republiky 1997; 3-14.

15: Kolektiv autorů. Český lékopis 2017, 4. díl. Praha: Grada 2017; 4031-4032.

16: Tůmová L., Píchová M., Dušek J. Fagopyrum esculentum in vitro. Česká a slovenská farmacie 2007; 56, 125–128.

17: Tůmová L., Píchová M., Dušek J. Pohanka obecná a její terapeutické využití. Praktické lékárenství 2007; 4, 190.

18: Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K. Rutin content in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) food materials and products. Food Chemistry 2006; 98(3), 508-512.

19: Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyck M., Cazin M., Cazin J.-C., Bailleul F., Trotin F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) hulls and flour. Journal of Ethnopharmacology 2000; 72(1-2), 35-42.

20: Jiang P., Burczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J. A., Briggs C. J. Rutin and flavonoid content in three buckwheat species Fagopyrum esculentum, F. tataricum and F. homotropicum and their protective effect against lipid peroxidation. Food Research International 2007; 40(3), 356-364.

21: https://tartarybuckwheat.com/tartary-buckwheat-and-fagopyrism/ (25.3.2018)

22: http://www.baes.gv.at/pflanzensorten/oesterreichische-sortenliste/ (23.1.2018)

23: Kiprovski B., Mikulic-Petkovsek M., Slatnar A., Veberic R., Stampar F., Malencic D., Latkovic D. Comparison of phenolic profiles and antioxidant properties of European Fagopyrum esculentum cultivars. Food Chemistry 2015; 185, 41-47.

24: Vollmannová A., Margitanová E., Tóth T., Timoracká M., Urminská D., Bojňanská T., Čičová I. Cultivar influence on total polyphenol and rutin contents and total antioxidant capacity in buckwheat, amaranth, and quinoa seeds. Czech J. Food Sci. 2013; 31, 589–590.

25: Dóka O., Brunori A., Schmidt R., et al. Rutin in buckwheat grain meal determined by UV photoacoustic spectroscopy and HPLC. Nova Biotechnologica et Chimica 2017; 16(1), 61-67.

26: Mariotti M., Andreuccetti V., Nuvoloni R., et al. Rutin and quercetin content in the forage of common buckwheat as affected by maturity and conservation method. Grassland Science 2017; 63(3), 169-176.

27: Tůmová L. Ústní sdělení. Katedra farmakognozie, Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 09 Hradec Králové. (6.2.2018)

28: Malochán L. Sekundární metabolity. Brno: Masarykova univerzita 2003; 76-77.

29: Hubík J. et al. Obecná farmakognosie II, Sekundární látky. 3., přeprac. vyd. Praha: SPN 1989; 31-34.

30: Tomko J., Kresánek J., Hubík J., et al. Farmakognózia. 1. vyd. Martin: Osveta 1989; 181-183.

31: Pedro F., Gonalo C. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications. RAO, Venketeshwer, ed. Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health [online]. InTech 2012; 33-56.

32: Procházka S., et al. Fyziologie rostlin. Vyd. 1. Praha: Academia 1998; 240-243, 279, 328, 412-430.

33: https://hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/SECPROD/se00008.htm (4.2.2018)

34: http://www.czechglobe.cz/files/skripta/Fyziologie_rostlin_skripta.pdf (24.1.2018)

35: Kalinová J., Tříska J., Vrchotová N. Distribution of Vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (Fagopyrum esculentum Moench). Journal of agricultural and food chemistry 2006; 54(15), 5330-5335.

36: Minařík J. Farmakognosie. Praha: Avicenum 1979; 140-141.

37: Mojžiš J., Mojžišová G. Polyfenolové zlúčeniny a ich vzťah ku kardiovaskulárnym a nádorovým ochoreniam. Bratislava: Vita Crystal Slovakia 2007; s. 20.

38: http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0014075 (25.1.2018)

39: http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0096303 (25.1.2018)

40: Baumgertel A., Grimm R., Eisenbeiß W., Kreis W. Purification and characterization of a flavonol 3-O-β-heterodisaccharidase from the dried herb of Fagopyrum esculentum Moench. Phytochemistry 2003; 64(2), 411-418.

41: Williams C. J. Medicinal plants in Australia. Australia: Rosenberg Pub. 2013; s. 154.

42: Kamenická A., Rypák M. Explantáty v rozmnožování drevín. 1. vyd. Bratislava: Veda 1989; s. 10, 20-47.

43: Landa Z. Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění rostlin. 1. vyd. Praha: Academia 1980; s. 7-8, 33-39.

44: Sikyta B., Dušek J. Biotechnologie pro farmaceuty. 3. vyd. Praha: Karolinum 2001; s. 75-82.

45: Tůma J., Tůmová L. Fyziologie rostlin. Vyd. 1. Hradec Králové: Gaudeamus 1998; 242-245.

46: Procházka S., Šebánek J. Regulátory rostlinného růstu. Praha: Academia 1997; 149-163.

47: https://www.slideshare.net/medik.cz/biologie-pro-bakale-praktikum-2 (4.2.2018)

48: Dubová J., Smíšková A. Od rostlinné kultury "in vitro" k biotechnologiím. https://educoland.muni.cz/down-50/ (22.2.2018)

49: Sikyta B., Dušek J. Biotechnologie pro farmaceuty. 1. vyd. Praha: Karolinum 1992; 90-94.

50: Hangartner R. P., Stasinopoulos T. C. Effect of Fe-Catalyzed Photooxidation of EDTA on Root Growth in Plant Culture Media. Plant Physiology 1991; 96(3), 843-847.

51: Slater A., Scott N. W., Fowler M. R. Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants. 2nd ed. New York: Oxford University Press 2008; s. 37.

52: Procházka S. a kol. Botanika: morfologie a fyziologie rostlin. Vyd. 3., nezměn. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita 2007; 187-193, 207.

53: Ördög V., Molnár Z. Plant physiology. http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_angol_01_novenyelettan/ch01.html (21.3.2018)

54: Kagias K., Nehammer C., Pocock R. Neuronal Responses to Physiological Stress. Frontiers in Genetics 2012; 3(222), 1-17.

55: Kranner I., Minibayeva F. V., Beckett R. P., Seal C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. New Phytologist 2010; 188(3), 655-673.

56: Hájek T. Rostlina a abiotický stres. http://slideplayer.cz/slide/3319329/ (28.3.2018)

57: Lichtenthaler H. K. Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. Journal of Plant Physiology 1996; 148(1-2), 4-14.

58: Hronková M. Rostliny a biotické stresy. http://slideplayer.cz/slide/5623940/ (28.3.2018)

59: Baenas N., García-Viguera C., Moreno D. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. Molecules 2014; 19(9), 13541-13563.

60: Shakya P., Marslin G., Siram K., Beerhues L., Franklin G. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of Hypericum perforatum. Journal of Pharmacy and Pharmacology [online] 2017; 1-13.

61: Moctezuma E., Leyva E., Monreal E., Villegas N., Infante D. Photocatalytic degradation of the herbicide „Paraquat“. Chemosphere 1999; 39(3), 511-517.

62: Tůmová L., Tůma J. Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře Silybum marianum přídavkem elicitoru paraquat. Chem. Listy 2009; 103, 503-510.

63: Suntres Z. E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. Toxicology 2002; 180(1), 65-77.

64: Murashige T., Skoog F. A revise medium for rapid growth and bio assays with tabacco tissues cultures. Journal of Plant Physiology 1962; 15, 473-497.

65: Karlíček R. a kol. Analytická chemie pro farmaceuty. 3. vyd. Praha: Karolinum 2007; 265-279.

66: Fukal L. Bioanalytické metody pro fyziky. Praha: Vydavatelství VŠCHT 2006; 6-21.

67: Reisenauer R. Metody matematické statistiky a jejich aplikace. 2. rev. a dopln. vyd. Praha: SNTL 1970; 26-33, 78-81.

68: Klemera P., Klemerová V. Základy aplikované statistiky pro studující farmacie. 3. vyd. Praha: Karolinum 1999; 15-16, 23-27.

69: Majerová J. Kultury léčivých rostlin in vitro - XIV. Diplomová práce, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2013; s. 52.

70: Kunzová L. Kultury buněčných rostlin in vitro - IV. Diplomová práce, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2006.

71: Chen H., Chen F. Induction of phytoalexin formation in crown gall and hairy root culture of Salvia miltiorrhiza by methyl viologen. Biotechnology letters 2000; 22(8), 715-720.

72: Píchová M. Růstové a produkční charakteristiky kultury Fagopyrum esculentum in vitro I. Diplomová práce, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2006.

73: Maliňáková L. Kultury léčivých rostlin in vitro - X. Diplomová práce, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2008.

# 9 ABSTRAKT

Předmětem této práce bylo hodnocení vlivu abiotického elicitoru na produkci sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách pohanky obecné. Cílem bylo zjistit, zda methylviologen zvyšuje produkci rutinu v kalusových a suspenzních kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi*. Pokus byl proveden na kulturách kultivovaných na živném médiu podle Murashigeho a Skooga s přídavkem 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny (2,4-D) o koncentraci 1 mg/l jako růstového regulátoru. Ke kulturám byl přidáván 1 ml ethanolického roztoku methylviologenu ve třech různých koncentracích: $c_1$ = 100,0 mg/100 ml, $c_2$ = 10,0 mg/100 ml a $c_3$ = 1,0 mg/100 ml a byly elicitovány po dobu 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Ke kontrolním vzorkům (bez přídavku elicitoru) byl přidán 1 ml ethanolu 96 % a vzorky byly odebírány po 6, 24, 72 nebo 168 hodinách. Po uplynulé době byly kultury odebrány, vysušeny a uschovány pro pozdější stanovení obsahu rutinu. Předmětem práce byla i analýza vylučování rutinu do živného média. Obsah rutinu ve všech vzorcích byl později vyhodnocen pomocí HPLC.

V této práci nebyl pozorován žádný zásadní nárůst v produkci rutinu kulturami pohanky po expozici elicitorem. Maximální obsah rutinu, který byl detekován, byl 0,1 mg/g DW, tedy spodní hranice detekovatelnosti, a byl nalezen v suspenzních kulturách ve třech případech; při elicitaci methylviologenem o koncentraci $c_1$ po 168 hodinách elicitace a dále při elicitaci methylviologenem o koncentraci $c_3$, a to po 48 a po 168 hodinách. Uvolnění rutinu do živného média nebylo detekováno v žádném ze vzorků.

Pozitivní efekt elicitace methylviologenem na *in vitro* kultury *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi* a jejich produkci rutinu tedy nebyl potvrzen.

# 10 ABSTRACT

The subject of this study was to evaluate the effect of abiotic elicitor on rutin production in callus and suspension cultures of buckwheat. The cultivar of buckwheat used for this research was *Fagopyrum esculentum* Moench *var. Bambi*, cultivated in Murashige and Skoog nutrient medium with the addition of growth regulator 2,4-dichlorfenoxyacetic acid (2,4-D) in concentration of 1 mg/l. The elicitor used in this study was a solution of methylviologen, 1 ml of it was added to the cultures in three different concentrations: $c_1$ = 100.0 mg/100 ml, $c_2$ = 10.0 mg/100 ml and $c_3$ = 1.0 mg/100 ml. The elicitor was affecting the cultures for 6, 12, 24, 48, 72 or 168 hours. After the defined period of time, cultures were collected, dried out and stored for further analysis of rutin content. To control samples (without elicitor treatment) 1 ml of ethanol 96% was added and they were collected after 6, 24, 72 or 168 hours. Releasing of rutin into the nutrient medium was also investigated. Rutin content in each sample of cultures and in each sample of nutrient medium was later determined by HPLC.

Any significant increase in the production of rutin was not observed in this study. The maximum amount of rutin detected was 0.1 mg/g DW, thus the lowest quantity detectable, and was found in suspension cultures in three cases; after the addition of methylviologen in $c_1$ concentration when collected after 168 hours, and then in cultures after 48 and 168 hours of cultivation with the elicitor in $c_3$ concentration. Release of rutin to the nutrient medium was not detected in any sample at all.

Therefore, the positive effect of methylviologen elicitation on *in vitro* cultures of buckwheat variety *Bambi* and their rutin production was not confirmed in this study.