

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra farmaceutické botaniky a ekologie**



**EXPLANTÁTOVÉ KULTURY VYŠŠÍCH**  
**ROSTLIN 32**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiřina Dušková, CSc.

Hradec Králové 2010

Hedvika Macháčková

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá použitá literatura a další zdroje, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Datum:

Podpis:

Chtěla bych tímto poděkovat Doc. RNDr. Jiřině Duškové, CSc. za odborné vedení, pomoc a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Poděkování patří rovněž ochotným laborantkám Věře Uhlířové, Ireně Rejlové a mým rodičům za podporu při studiu.

Tento výstup vznikl v rámci projektu specifického vysokoškolského výzkumu 2010-261-002.

# Abstrakt

**Macháčková H.: Explantátové kultury vyšších rostlin 32. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmacie (2010)**

Tato práce byla zaměřena na studium biotransformační aktivity suspenzní kultury *Datura meteloides* DC. ex Dunal po přidání exogenního prekurzoru arbutinu, hydrochinonu, do živného média. Byla tak testována závislost procentuálního obsahu arbutinu na typu a koncentraci růstového regulátoru v živném médiu (IAA, IBA – koncentrace 0,1; 1,0; 10,0 mg/l), na koncentraci hydrochinonu jako prekurzoru arbutinu (100 a 200 mg/l) a intervalech odběru vzorků k analýze tj. době kultivace s prekurzorem (24, 48, 168 hodin). Kultura transformovala hydrochinon na arbutin bez ohledu na typ a koncentraci růstové látky, koncentraci prekurzoru a délku prováděného pokusu. Nejvyšší procentuální obsah arbutinu v extraktu kultury (8,11 %) byl zjištěn po 24 hodinové kultivaci s hydrochinonem o koncentraci 200 mg/l a růstovým regulátorem IAA o koncentraci 0,1 mg/l. Přítomnost arbutinu byla prokázána i v živném médiu a to v čase odběru 48 a 168 hodin (0,68 %). Vyšší produkci arbutinu ve většině případů vykazovaly kultury při použití prekurzoru hydrochinonu v koncentraci 200 mg/l než při koncentraci 100 mg/l. Při použití růstového regulátoru IAA byly získány vyšší výtěžky arbutinu oproti růstovému regulátoru IBA.

**Klíčová slova:** explantátová kultura, biotransformace, prekurzor hydrochinon, arbutin

# Abstract

**Machackova H.: Explant cultures of Higher plants 32. Thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Department of Botanic and Environmental Science, Pharmacy (2010)**

This paper focused on the study of biotransformation activity of suspension culture *Datura meteloides* DC. ex Dunal after addition of arbutin exogenous precursor hydroquinone into nutrient medium. The percentage of arbutin content was tested depending on the type and concentration of growth regulator in nutrient medium (IAA, IBA – concentrations of 0,1; 1,0; 10,0 mg/l), concentration of arbutin precursor hydroquinone (100 and 200 mg/l) and intervals between collection of samples for analysis, i.e. cultivation time with precursor (24, 48, 168 hours). Culture transformed hydroquinone into arbutin regardless of the type and concentration of growth regulator, precursor concentration and the length of the experiment. The highest percentage of arbutin content in culture extract (8,11 %) was detected after 24 hour cultivation using hydroquinone in concentration of 200 mg/l and growth regulator IAA in concentration of 0,1 mg/l. The presence of arbutin was also detected in nutrient medium after 48 and 168 hours (0,68 %). In most cases, cultures using hydroquinone in concentration of 200 mg/l had higher production of arbutin than those with concentration of 100 mg/l. Usage of growth regulator IAA brings higher yields of arbutin compared to growth regulator IBA.

**Keywords:** explant culture, biotransformation, precursor hydroquinone, arbutin

# OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	8
<b>2. Řešená problematika</b> .....	10
<b>3. Teoretická část</b> .....	11
3.1. Explantátové kultury a jejich využití .....	11
3.1.1. Historie explantátových kultur .....	11
3.1.2. Rozdělení explantátových kultur .....	16
3.1.3. Praktický význam a využití kultur rostlinných explantátů .....	18
3.2. Produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami .....	20
3.2.1. Kultivační podmínky pro produkci sekundárních látek kulturami rostlinných explantátů .....	20
3.2.2. Živná média a jejich složení .....	23
3.3. Růstové látky a jejich vliv na produkci sekundárních metabolitů .....	25
3.3.1. Rozdělení a charakteristika jednotlivých růstových látek .....	26
3.3.1.1. Látky působící pozitivně na růst .....	27
3.3.1.2. Látky působící negativně (inhibičně) na růst .....	33
3.4. Další faktory ovlivňující produkci sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami .....	36
3.4.1. Elicitory .....	36
3.4.2. Imobilizace .....	38
3.4.3. Optimalizace kultivačních podmínek .....	38
3.4.4. Aplikace prekurzorů .....	38
3.4.5. Selektce vysoce produkčních rostlin a buněčných linií .....	39
3.4.6. Mutace a selektce mutantů .....	39
3.4.7. Metody genového inženýrství .....	39
3.4.8. Diferenciace a morforegulace .....	40
3.4.9. Vliv ploidie .....	40

3.4.10. Biotransformace .....	40
3.5. Rod <i>Datura</i> .....	41
3.6. Arbutin .....	43
<b>4. Experimentální část</b> .....	<b>46</b>
4.1. Přístroje .....	46
4.2. Chemikálie .....	46
4.3. Použitý biologický materiál .....	48
4.4. Pokusné varianty .....	48
4.5. Analýza obsahových látek .....	49
4.5.1. TLC analýza .....	49
4.5.2. HPLC analýza .....	49
<b>5. Výsledky</b> .....	<b>51</b>
5.1. Použité zkratky .....	51
5.2. Výsledky TLC analýzy .....	52
5.3. Výsledky HPLC analýzy .....	60
<b>6. Diskuze</b> .....	<b>66</b>
<b>7. Závěr</b> .....	<b>68</b>
<b>8. Použitá literatura</b> .....	<b>69</b>

# 1. Úvod

Rostliny měly v dějinách lidstva vždy nezastupitelný význam. Jsou hlavním stavebním kamenem celého ekosystému planety a prvotním zdrojem potravy člověka a zvířat. Zcela zvláštní použití mají rostliny s prokazatelně příznivým účinkem na organismus a jejich schopností léčit. Ty se využívají nejen ve zdravotnictví a farmaceutickém průmyslu, ale i v kosmetice a potravinářství.

Vůbec první zmínku o léčivých rostlinách najdeme na hliněných tabulkách sepsaných Sumery okolo roku 3000 př. n. l. Tato doba je považována za oficiální začátek fytoterapie, ačkoliv je známo, že člověk využíval rostliny již v dřívějších dobách. Od té doby, počínaje starověkými egyptskými učenci, přes mystické druidy, řecké, římské, čínské lékaře až po vynikající vědce 18. a 19. století, člověk nikdy nepřestal rozšiřovat své znalosti o bylinách, jejich tajemstvích a léčivé síle. Ve 21. století se dávné léčebné prostředky a zkušenosti staly vědou <sup>1)</sup>.

Z přibližně 3 700 taxonů vyšších rostlin rostoucích na území České republiky se v průběhu staletí k léčebným účelům užívalo asi 800 druhů a nyní se jich takto používá asi 200. Celosvětově je z 250 000 známých druhů vyšších rostlin k léčení používáno více než 10 000 druhů <sup>2)</sup>.

Rostliny představují téměř neomezený zdroj fytochemikálií <sup>3)</sup>. Produkuje různé sekundární metabolity, které jsou užitečné svou interakcí s okolním prostředím, různými stresovými faktory a rozvojem rezistence proti napadení patogeny <sup>4)</sup>.

Sekundární metabolity jsou definovány jako látky, u nichž dosud nebyla rozpoznána úloha v udržení základních životních pochodů organismů, kterými jsou syntetizovány <sup>5)</sup>. Biogeneze sekundárních metabolitů se v podstatě odvíjí pouze z několika primárních metabolitů: aminokyselin, acetylkoenzymu A, mevalonové kyseliny a meziproductů syntézy kyseliny šikimové <sup>6)</sup>.

Důležitými skupinami sekundárních metabolitů jsou alkaloidy, steroidy, terpeny, flavonoidy, lignany a další látky. Zatímco primární metabolity jsou nezbytné pro zabezpečení růstu a reprodukce, sekundární metabolity jsou ve většině případů součástí adaptačních mechanismů a interakcí rostliny s prostředím <sup>5)</sup>. Rostliny produkují sekundární metabolity ve všech, nebo pouze v některých orgánech <sup>7)</sup>.



Získávání sekundárních metabolitů z přírodního materiálu je klasická, v současné době stále používaná cesta. K problémům spojeným s využíváním těchto přirozených zdrojů patří závislost na počasí, roční době a chorobách <sup>5)</sup>.

Další možností je využití chemické syntézy pro produkci sekundárních metabolitů. Ta bývá často obtížná a drahá, u řady sloučenin zatím nemožná a produkt je obvykle směsí izomerů, zatímco buňka produkuje jediný stereoizomer <sup>8)</sup>.

Proto se věnuje v současné době stále větší pozornost možnosti získávání sekundárních metabolitů pomocí tkáňových kultur vyšších rostlin. Produkce probíhá řízeně bez vlivu počasí a roční doby, jsou vyloučeny nežádoucí biologické vlivy (mikroorganismy, hmyz apod.). Je možné kultivovat rostliny bez ohledu na jejich původ a selekcí lze dosáhnout vyšší produkce než v polních podmínkách <sup>5)</sup>.

Jedním ze zásadních problémů je relativně pomalý růst rostlinných tkáňových kultur a nízká produktivita tvorby sekundárních metabolitů. Navíc jen v malém počtu tkáňových kultur se podařilo dosáhnout produkce sekundárních metabolitů vyšší než v intaktní rostlině <sup>9)</sup>. Stav fyziologických, resp. kultivačních podmínek má taktéž velký význam pro tvorbu a akumulaci sekundárních přírodních látek <sup>10)</sup>.

Látky nalézané v tkáňových kulturách se dělí do čtyř skupin:

1. Látky široce rozšířené v rostlinné říši, bez vazby na speciální struktury  
– např. kumariny, flavonoidy, steroly, antokyany
2. Látky široce rozšířené, ale vázané na speciální struktury  
– např. lignin uložený v buněčné stěně
3. Látky v rostlinách vzácné, jejichž syntéza není vázaná na zvláštní struktury  
– např. furanokumariny
4. Látky v rostlinách vzácné, jejichž syntéza a akumulace je vázána na speciální strukturu v rostlině <sup>7)</sup>

Tkáňové kultury jsou vhodným modelem studia biosyntetických drah, možným a perspektivním zdrojem sekundárních metabolitů a účinným prostředkem biotransformace různých látek. Ekonomicky aplikovatelné jsou především kultivace buněčných suspenzí a zejména imobilizované buňky. Průběžnou selekcí je možné získat vysoce produkční kmeny, které by měly být užity v provozu, ale i současně uchovány, neboť trvalá stabilita kultury není nikdy zaručena <sup>7)</sup>.

## 2. Řešená problematika

Úkolem mé diplomové práce bylo zjistit závislost biotrasformační aktivity tkáňové kultury *Datura meteloides* DC. ex Dunal po přidání exogenního prekurzoru arbutinu (hydrochinon) na typu a koncentraci různých růstových regulátorů v suspenzním živném médiu.

Jako růstové regulátory byly použity IAA (3-indolyloctová kyselina) a IBA (3-indolylmásečná kyselina) v koncentraci 0,1; 1,0 a 10,0 mg/l. Hydrochinon byl používán v koncentraci 100 mg/l a 200 mg/l. Pokusy byly prováděny za světla na suspenzních tkáňových kulturách. Vzorky k analýze byly odebírány v časovém intervalu po 24, 48 a 168 hodinách.

Tato práce navazuje na práci Hany Mrákové, která testovala růstové látky NAA (kyselina  $\alpha$ -naftyloctová) a 2,4 D (kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová) za stejných podmínek <sup>11)</sup>.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Explantátové kultury a jejich využití

Kultura rostlinných explantátů představuje soubor rostlinných buněk, pletiv nebo orgánů asepticky kultivovaných izolovaně od „mateřské“ intaktní rostliny na umělém živném mediu v řízených kultivačních podmínkách<sup>12)</sup>. Rostoucí izolovaná pletiva s prakticky neomezenou životností se pravidelně pasážují (přenášejí) do nového živného prostředí<sup>6)</sup>. Médium dodává explantátu nejen potřebné minerální živiny, ale také organické látky (cukry, vitamíny, aminokyseliny a růstové stimulatory)<sup>13)</sup>.

Vývoj kultivace rostlinných explantátů, zejména pletiv a buněk, probíhal paralelně s rozvojem kultur živočišných<sup>14)</sup>. Na rozdíl od živočichů, kde procesy buněčné a tkáňové diferenciaci (přeměna embryonální buňky na buňku specializovanou) jsou obecně ireverzibilní, existuje u rostlin schopnost přechodu diferencovaných buněk a pletiv do meristemického stavu charakterizovaného intenzivním buněčným dělením. Rostlinná somatická buňka je totipotentní tj. obsahuje kompletní genetickou informaci nutnou k vývoji celistvého organismu. Kultivace organizovaných struktur, zejména meristémů, umožňují hromadně množit geneticky identické potomstvo (klon) nepohlavní cestou<sup>15)</sup>.

Aplikace metod rostlinných explantátů v základním výzkumu vede k získání teoretických poznatků v oblastech:

- buněčného dělení
- totipotence rostlinné buňky
- diferenciaci rostlinné buňky a pletiva
- metabolismu rostlin
- regulačních mechanismů
- transformace a mutageneze<sup>16)</sup>

#### 3.1.1. Historie explantátových kultur

Přestože kultury rostlinných explantátů v dnešní době nepředstavují ideální experimentální materiál, uplatnily se úspěšně při řešení řady problémů fyziologie a biochemie růstu a vývoje, experimentální embryologie, genetiky a fytopatologie<sup>14)</sup>.

První úspěchy spojené se základy explantátových kultur zaznamenal již roku 1756 Henri Louis Duhamel du Monceau tvorbou hojivého kalusu. V letech 1838 – 1839 publikovali Matthias Jakob Schleiden a Theodor Schwann své poznatky a formulovali buněčnou teorii, ze které pak vycházela celá řada vědců v pokusech s explantátovými kulturami <sup>17)</sup>.

Německý bakteriolog Theodor Klebs na základě svých zkušeností vyslovil názor, že lze realizovat pokusy i s materiálem z vyšších rostlin, avšak jasně formuloval ideu kultur rostlinných explantátů až Gottlieb Haberlandt roku 1902. Haberlandt byl z hlediska současných kritérií neúspěšný díky neznalosti působení rostlinných regulátorů, použití vysoce diferencovaných buněk a nedostatečné sterilizaci materiálu. Dodnes platí, že obtíže při zavádění pletiv a buněk do kultury *in vitro* jsou přímo úměrné stupni jejich diferenciaci. Ke zvratu došlo, až když byly diferencované buňky a pletiva zaměněny za explantáty, obsahující pletiva meristematická a až byly splněny požadavky aseptické kultivace <sup>14), 18)</sup>.

První skutečné kultury izolovaných embryí na živné půdě s minerálními látkami a sacharosu demonstroval roku 1904 E. Hannig. Jeho výsledky potvrdila a dalším výzkumem se zabývala řada vědců. Robbins (1922) pěstoval terminální fragmenty os hrachu, kukuřice a bavlníku, White (1933) segmenty s vrcholovými meristémy *Stellaria media*, plně úspěšný byl až LaRue (1936), v jehož experimentech vegetační vrcholy regenerovaly ve výhony a kořeny <sup>14)</sup>.

Doposud však získané kultivace explantátů na umělých půdách nebyly neomezeně rostoucí, tj. udržitelné v pasážní kultuře po několik za sebou jdoucích subkultur. Až roku 1934 Američan White získal kulturu izolovaných kořenů na rajčatech, která byla neomezeně rostoucí a také nahradil kvasničný extrakt médiem plně syntetickým s aminokyselinami a vitamíny (1937). Gautheret (1933) experimentoval s kambiálním pletivem stromů a podařilo se mu udržet růst kultury na mediu doplněném kyselinou  $\beta$ -indolyloctovou až po 18 měsíců (1934 – 1935). Také roku 1937 realizoval neomezeně rostoucí kultury odvozené z explantátu mrkvového kořene. Podobného úspěchu dosáhl i Nobécourt (1937 – 1938) <sup>14)</sup>.

Se zaváděním pletiv nových druhů do kultury *in vitro* souvisely i studie na přísun živin a specifických růstových látek. Vznikaly tak nové formule živných půd se zvýšeným obsahem makro- a mikroelementů ve srovnání s klasickými půdami Whitea (1943) a Gauthereta (1942) např. 1946 – Hildebrandt a kol., 1949 – Burkholder a

Nickell, 1953 – Keller, 1956 – Nitsch a Nitsch, 1962 – Murashige a Skoog. Také byl popsán význam auxinů, cytokininů a kokosového mléka <sup>14)</sup>.

Rozšíření znalostí umožnilo posléze pěstovat a pomnožovat v podmínkách *in vitro* i jednotlivé buňky, uvolněné z pletiva. Vývoj byl tak dovršen realizací suspenzních a buněčných kultur, vznikajících proliferací rozpadavého kalusového pletiva či primárních explantátů po přenosu do tekuté pohyblivé a provzdušňované živné půdy. Paralelně se suspenzními kulturami se rozvíjela kultivace volných izolovaných buněk – buněčné kultury ( 1954, 1958 Muir a kol., 1963 a 1969 Lutz, 1959 Torrey a další.) <sup>14)</sup>.

Řada vědců pozorovala náhlou tvorbu orgánů v kulturách pěstovaných za standardních podmínek. Spontánní vznik kořenů v kalusových kulturách poprvé oznámil roku 1939 Nobécourt. Pokusy o chemicky kontrolovanou indukci organogeneze, případně embryogeneze, byly realizovány zejména na kulturách kalusů mrkve a tabáku, kde mají dominantní úlohu specifické růstové látky <sup>14)</sup>.

Chemická indukce adventivních embryí v tkáňových kulturách byla dlouho považována za výjimečný zjev. Změna nastala, když řada autorů prokázala na kulturní a divoké mrkvi i u jiných druhů, že vznik embryí ze somatických buněk kalusů je za určitých kultivačních podmínek zcela běžný. Jako základní indukční faktory se kromě kokosového mléka uplatňují auxiny a dusíkatá výživa. Podobně byl popsán průběh embryogeneze v suspenzních kulturách <sup>14)</sup>.

S etapou genového inženýrství a biotechnologií na počátku sedmdesátých let úzce souvisí pěstování tkáňových i suspenzních kultur odvozených z rostlinných nádorů. První tkáňové kultury z crown - gall nádorů (= tumory vzniklé na rostlinách působením indukčního faktoru bakterií rodu *Agrobacterium*) připravili roku 1942 White a Braun <sup>14)</sup>.

## **Historický přehled v datech**

### **Historický vývoj in vitro kultur**

**1902 Haberlandt** – první kultivace pletiva listového mezofylu, dřev stonku, svěrací

buňky průduchů v podmínkách *in vitro* – neznalost výživy, nesterilní kultura

a použití diferencovaných buněk v kultuře

**1922 Knudson** – výsevy semen orchidejí

**1925 Laibach** – izolovaná embrya lnu

**1935 White** – izolované kořeny rajčat

**1937 Gautheret** – kalusové kultury z kambia kořene mrkve

- 1939 White, Nobécourt** – kalusové kultury tabákového nádoru
- 1951 Skoog a Tsui** – indukce pupenů adenin sulfátem na tabákových segmentech
- 1957 Skoog a Miller** – objev kinetinu
- 1957 Stowe a Yamaki** – objev giberelinů <sup>16)</sup>

### **Historie experimentů s izolovanými rostlinnými embryi**

- 1754 Bonnet** – sledování klíčení zárodků fazolu zbavených děloh
- 19. stol. Sachs** – špatné klíčení embryí bez endospermu
- Van Tieghem** – pěstování izolovaných embryí na rozetřeném endospermu jiného druhu  
– důkaz významu nutričních látek
- 1890 Brown a Morris** – transplantace embryí ječmene do endospermu pšenice
- 1904 Hannig** – pěstování nezralých i zralých embryí brukvovitých rostlin *Raphanus* a *Cochlearia*
- 1920 – 1930 Knudson** – kultivace rostlin ze zárodků *Orchidaceae* na agarovém médiu s cukrem bez přítomnosti symbiotických hub
- 1924 Dietrich** – možnost zkrácení dormance kulturou izolovaných embryí <sup>16)</sup>

### **Historický vývoj meristémových kultur**

- Ball** – regenerace rostliny z izolovaného meristému lupiny (*Lupinus*)
- 1949 Limmaset a Cornuet** – průkaz rozdílné koncentrace virových částic v rostlinných orgánech různého ontogenetického stáří, meristémy téměř viru prosté
- 1952 Morrel a Martin** - ozdravování virózních jiřin (*Dahlia*) regenerací rostlin z izolovaných meristémů
- 1957 Skoog a Miller** – regenerace tabáku z kalusových kultur aplikací cytokininů a auxinů do živného média
- 1962 Murashige a Skoog** – standardní kultivační médium
- 1964 Morel** – regenerace ozdravených orchidejí z izolovaných meristémů <sup>16)</sup>

### **Historie suspenzních kultur a somatické embryogeneze**

- 1958 Steward a Reinert** - tekuté médium, třepané kultury buněk mrkve a buněčných shluků - růst kalusů i struktur podobných embryím (= somatická embrya)
- 1979 Fujimura a Komamine** – synchronizace somatické embryogeneze v suspenzní kultuře mrkve
- 2005 Stasolla a kol.:** popis morfogeneze, fyziologie, biochemie a molekulární biologie somatických embryí jehličnanů <sup>16)</sup>

### **Historie rostlinných buněčných suspenzních kultur**

- 1970 Gamborg a Shyluk** – vliv auxinu 2,4-D na růst a vývoj rostlinných buněk v kultuře, kultivace rostlinných buněk ve fermentorech
- 1978 Hahlbrock** – průkaz sekundárních metabolitů v rostlinných buněčných kulturách
- 1992 Nagata** – popsána synchronizovaná buněčná suspenze tabáku linie BY – 2 <sup>16)</sup>

### **Historie haploidních kultur**

- 1964 Guha a Maheshwari** – kultivace nezralých prašníků a regenerace homozygotních rostlin durmanu *Datura innoxia Mill.*
- 1967 Bourghin a Nitsch** – kultivace haploidních buněk (mikrospor) a regenerace homozygotních rostlin tabáku *Nicotiana tabacum*
- 1996 Keller a Korzun** – gynogeneze řepy *Beta vulgaris L.*, *Allium cepa L.*, *Gerbera jamesonii H. Bolus ex Hook*
- 2000** šlechtitelské programy polních plodin (obiloviny, řepka) využívají haploidní kultury in vitro <sup>16)</sup>

### **Historie protoplastových kultur**

- 1960 Cocking** – izolace protoplastů a vývoj nových šlechtitelských metod překonávajících inkompatibilitu při křížení (somatická hybridizace)
- 1970 Takebe a Nagata** – regenerace rostlinek tabáku z izolovaných protoplastů
- 1972** první mezinárodní konference protoplastových technologií ve Francii
- 1973** první konference rostlinné molekulární biologie o výzkumu rostlinných pletivových kultur za účasti komerční firmy Monsanto
- 1977** vznik Mezinárodní komise pro výzkum rostlinné buňky při Mezinárodní organizaci výzkumu buňky (**ICRO**) UNESCO <sup>16)</sup>

### **Historie transformace rostlinného genomu**

- 1965 Morel** – studium *Agrobacterium tumefaciens*
- 1970** – objev restričních endonukleáz.
- 1974 Zaenen** – důkaz integrace Ti plasmidu do rostlinného genomu
- 1983 Schell** – první transgenní rostliny
- 1984** – přímý přenos DNA do rostlinného protoplastu (mikroinjekce DNA do jádra)
- 1986** – přímý přenos DNA do rostlinných buněk <sup>16)</sup>

### 3.1.3. Rozdělení explantátových kultur

Kultury rostlinných buněk se dělí dle stupně organizace, asociace a diferenciaci in vitro <sup>14)</sup>.

Úrovně organizace explantátu :

- rostlina (klíčící rostlinka, embryo)
- orgán (kořen, list, řapík, pupen)
- pletivo (dřeňový parenchym, endosperm, kambium = pletivové kultury)
- buňka (mikrospory, pylová zrna, buněčné suspenze)
- izolovaný protoplast <sup>16)</sup>

Kultury lze rozlišit dle morfologické charakteristiky na:

#### **1. Meristémové kultury**

- = jsou to okrsky nediferencovaných buněk, které jsou schopny opakovaného dělení <sup>16)</sup>;
- meristém vhodný na založení kultury in vitro je struktura obsahující vlastní apikální meristém a jeden až dva páry listových primordií (= základ rostlinného orgánu na úplném počátku jeho vzniku);
  - buňky apikálního meristému vytváří integrovaný, geneticky vysoce stabilní systém <sup>12)</sup>;
  - kultury izolovaných vrcholových nebo axilárních meristémů se používají k množení a při eliminaci rostlinných patogenů = ozdravování <sup>16)</sup>.

#### **2. Kultury izolovaných embryí = embryokultury**

- = aseptické vyjmutí embrya a jeho přenos na vhodné médium s optimálními kultivačními podmínkami;
- embryokultury se člení do dvou kategorií kultur semenných embryí obsahujících kořenový a stonkový meristém a kultur proembryí (stádia nezralých zárodků);
  - raná vývojová stádia embryí (= proembrya) jsou heterotrofní a kultivují se na médiích s vysokým osmotickým potenciálem, pokročilejší vývojová stádia embryí jsou autotrofní a vyvíjejí se na jednoduchých anorganických médiích;
  - embryokultury se rovněž vyznačují značnou genetickou stabilitou <sup>12), 19)</sup>;
  - kultury izolovaných embryí se využívají k překonání dormance, získání vzdálených kříženců (mezidruhových a mezirodových) a jako zdroj ontogeneticky mladého pletiva pro množení <sup>16)</sup>.



### **3. Kalusové (tkáňové) kultury**

- v povrchových vrstvách buněk explantátu se při přenosu do in vitro podmínek indukuje mitotické dělení, diferencované buňky trvalých pletiv přechází do meristemického stavu – dediferencují a vytváří se tak neorganizovaná hmota buněk – kalus, dále pomnožovaný na polotuhých nebo pevných půdách;
- primární kalus může obsahovat velmi heterogenní buněčnou populaci, která odráží podmínky a výsledky procesů, které probíhají během indukce kalusu;
- všechny buňky kalusu můžeme považovat za totipotentní, ne všechny jsou pak z morfogenetického hlediska schopné regenerovat v intaktní rostlinu <sup>12)</sup>.

### **4. Suspenzní (buněčné) kultury**

- = kultury buněk a rostlinných protoplastů v tekutém médiu <sup>16)</sup>;
- tento typ kultury lze založit po přenesení rozpadavého kalusu do tekutého média a jeho následným roztřepáním <sup>12)</sup>;
- hlavní výhodou suspenzních kultur je velmi rychlý růst buněk způsobený jejich lepším kontaktem s živným médiem <sup>20)</sup>.

### **5. Kultury protoplastů**

- = suspenzní kultury rostlinných buněk, u nichž byla pomocí směsi enzymů (celuláza, hemiceluláza, pektináza) odstraněna buněčná stěna;
- izolace protoplastů při použití kombinace těchto enzymů při pH 5,5 – 5,8 trvá 3 – 18 hodin <sup>16)</sup>;
- protoplasty lze získávat ve velkých množstvích z různých pletiv nebo i buněčných kultur;
- kalusy či rostliny (embryoidy) získané z protoplastů mohou pak vykazovat značnou míru genetické variability <sup>12)</sup>;
- izolované protoplasty se využívají při přímých metodách genetických transformací <sup>16)</sup>.

### **6. Haploidní kultury = kultury prašníků (pylů), mikrospor a vajíček**

- představují neobyčejně cenný materiál pro genetický výzkum i šlechtění;
- použití haploidního materiálu umožňuje sledování segregace genů (alel) na gametické úrovni a současně dovoluje získat dokonale homozygotní rostliny už v F<sub>1</sub> generaci <sup>12)</sup>;
- k vývoji kultur dochází dvěma způsoby 1. přímou nebo 2. nepřímou androgenezí (gynogenezí) tj.

1. regenerací haploidních rostlin ze samčího gametofytu = kultury nezralých prašníků nebo izolovaných mikrospor nebo ze samičího gametofytu = kultury neoploďných vajíček
2. zdvojením haploidního genomu = dihaploidizace <sup>16)</sup>.

Geneticky nestabilní jsou kalusové, buněčné a protoplastové kultury a v některých případech rostliny z nich regenerované. Pokud kultura projde fází kalusu, vzrůstá cytogenetická variabilita. Naopak kultury intaktních orgánů, vyznačujících se růstem organizovaných struktur (meristémů, embryí), jsou do značné míry geneticky stabilní a rostliny z nich regenerované mají charakter klonu (geneticky uniformního potomstva).

Tyto dva různé systémy stability, resp. variability, poskytují významné možnosti pro studium genetiky rostlinné buňky a rovněž aplikace možnosti pro současné šlechtitelské biotechnologie <sup>12)</sup>.

### 3.1.4. Využití a praktický význam kultur rostlinných explantátů

Využití kultur *in vitro* lze rozdělit na dvě oblasti, ve kterých je nejintenzivněji prováděn výzkum, který má i své praktické uplatnění. Jde o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami a o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin <sup>19)</sup>.

Hlavní výhody buněčné kultivace oproti kultivaci celé rostliny jsou následující:

1. Využívané složky mohou být produkovány za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických změnách.
2. Pěstované buňky mohou být zbaveny mikrobů a hmyzu.
3. Buňky jakékoliv rostliny mohou být snadno pěstovány k získání jejich specifických metabolitů.
4. Automatická kontrola buněčného růstu a racionální regulace metabolických procesů může přispět ke snížení pracovních nákladů a zvýšení produktivity <sup>19)</sup>.

Existují tři hlavní směry rostlinných biotechnologií:

1. Kontrola růstu a vývoje (vegetativní růst = mikropropagace, generativní vývoj a klonální množení) – **regenerace rostlin**.
2. Ochrana rostlin proti fytopatogenům (viry, bakterie, houby), škůdcům a herbicidům – **fytopatologie in vitro**.
3. Výroba potravin, biochemikálií a léků – **produkce sekundárních metabolitů** <sup>16)</sup>.

### Příklady využití vyprodukovaných sekundárních metabolitů

- **farmaceutický průmysl:** kultury *Catharanthus roseus* – ajmalicin (léčba vaskulárních onemocnění), kultury *Taxus brevifolia* – cytostatikum taxol, kultury *Panax ginseng* – saponiny, kultury *Thalictrum minus* a *Coptis japonica* – berberin, digoxin (*Digitalis*) aj.
- **diagnostika:** kultura *Raphanus* – peroxidáza
- **textilní průmysl:** kultury *Lithospermum erythrorhizon* – barvivo šikonin
- **kosmetický průmysl:** vůně a esenciální oleje (*Lavandulla officinalis*), geraniol
- **potravinářský průmysl:** barviva, příchutě, vůně (antokyany, betalainy)
- **zemědělský průmysl:** bioaktivní přírodní insekticidy pyretroidy a fytoalexiny pro integrovanou ochranu rostlin <sup>16, 19)</sup>

Tab. 1. Farmaceuticky využívané sekundární metabolity produkované buněčnými nebo orgánovými kulturami <sup>16)</sup>

druh sek. metabolitu	sekundární metabolit	využití	kultura
alkaloid	ajmalin	antihypertensivum	<i>Catharanthus roseus</i>
alkaloid	berberin	antimikrobiální účinek	<i>Coptis japonica</i> <i>Thalictrum minus</i>
diterpen	taxol	cytostatikum	<i>Taxus brevifolia</i>
alkaloid	kodein, morfin	analgetika antitusika	<i>Papaver somniferum</i>
alkaloid	atropin skopolamin	sympatolytikum	<i>Atropa bella-donna</i>
glykosid	digoxin digitoxin	kardiotonikum	<i>Digitalis lanata</i>
saponin	panaxozid	tonikum	<i>Panax ginseng</i>
alkaloid	vin kristin vinblastin	cytostatikum	<i>Vinca rosea</i>

## 3.2. Produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami

Sekundární metabolity jsou vedlejší produkty metabolismu rostlin, jejichž biosyntéza navazuje na základní metabolismus. Funkcí sekundárních metabolitů je ochrana rostlin proti chorobám a škůdcům, regulace a detoxikace zplodin metabolismu <sup>16)</sup>.

Rostliny i tkáňové kultury syntetizují sekundární metabolity většinou jen v určité ontogenetické fázi v určitém období růstového cyklu. Často se stává, že převedením do kultury *in vitro* a ztrátou diferenciací pletiva dochází ke změně či přerušení metabolických drah. Některé kultury zpočátku produkují látky shodné s výchozí rostlinou či orgánem, po čase však syntéza ustává. Regenerované rostliny produkují ovšem celé spektrum látek <sup>19)</sup>.

Pokud dochází v explantátu ke změnám metabolických drah, jejich důsledkem je kvalitativní změna spektra produkovaných látek, které můžeme rozdělit do tří skupin. V buňkách jsou akumulovány:

1. vedlejší produkty metabolických drah
2. modifikované látky výchozích rostlin
3. látky dosud neznámé

Jednou z možností, jak získat z kultur *in vitro* látky terapeuticky významné je biotransformace. Nejpoužívanější jsou transformace steroidů, jako je hydroxylace, dehydrogenace, epoxidace a degradace postranního řetězce. Tyto reakce se průmyslově využívají k produkci steroidních hormonů (kortizonu, prednizonu). Biosyntetická kapacita tkáňových kultur se dá využít k produkci, ale i biotransformaci jak přírodních, tak i syntetických látek <sup>19)</sup>.

### 3.2.1. Kultivační podmínky pro produkci sekundárních látek kulturami rostlinných explantátů

#### ODVOZENÍ KULTURY

Prvním krokem pro odvození tkáňové kultury je získání sterilní části rostliny. V praxi se používá dvou postupů – vypěstování rostliny ve zcela sterilních podmínkách, nebo šetrná sterilizace části rostliny pěstované za běžných podmínek <sup>5)</sup>.

Zařízení, nástroje, substráty a vzduch se musí sterilizací zbavit nežádoucích mikroorganismů. Živné půdy lze sterilizovat několika způsoby: zahříváním, filtrací, ozáření, ultrazvukem nebo chemicky. Z těchto metod je nejrozšířenější sterilizace párou<sup>21)</sup>.

Získaná sterilní část rostliny (explantát) se přenese na živnou půdu zpevněnou agarem, kde se na řezu začne tvořit hojivé pletivo, které za optimálních podmínek stále narůstá – tvoří se tzv. primární kalus. Ten se oddělí, přenese na novou živnou půdu a dále kultivuje (kalus)<sup>5)</sup>.

Dalším stupněm je odvození suspenzní kultury. Část kalusu se přenese do tekutého média, kde za stálého míchání vzniká suspenzní kultura, skládající se v ideálním případě z jednotlivých buněk. Intenzivní míchání je nutné nejen pro rozpad shluků buněk ale i pro dostatečné provzdušnění živného média<sup>5)</sup>.

Oba typy kultur je nutno po určité době, během níž je vyčerpáno medium, subkultivovat (pasážovat). Tento postup je třeba stále opakovat v intervalech závislých na vlastnostech kultury<sup>5)</sup>. Obsah růstových látek a vitamínů v živné půdě má rozhodující význam nejen pro růst kalusové kultury, ale i pro převádění kalusu do suspenzní kultury<sup>21)</sup>.

Po zvládnutí základních metodických obtíží kultivace rostlinných tkáňových kultur došlo k rychlému rozvoji studia optimalizace jejich pěstování<sup>7)</sup>.

## **KULTIVAČNÍ PODMÍNKY**

Jde o celou řadu faktorů, jejichž změna může ovlivnit biosyntetické možnosti tkáňových kultur žadaným směrem. Příkladem může být optimalizace složek živného média, pH, aerace, světla, teploty, růstových regulátorů atd.<sup>5)</sup>

### **Rozdělení:**

Fyzikální faktory: teplota, osvětlení, pH, relativní vlhkost vzduchu, aerace

Biologické faktory: explantát, složení živného média

### **1. teplota**

Kultury rostlinných explantátů se běžně pěstují při konstantní teplotě. Optimální teplota je specifická pro daný objekt. Případně krátkodobější výkyvy teploty snášejí kultury dobře, obvykle dojde pouze ke zpomalení růstu. Je-li výkyv teploty příliš velký nebo trvá-li příliš dlouho, může dojít k poškození kultury, nebo k jejímu odumření. U

většiny kalusových a suspenzních kultur se optimální teplota kultivace pohybuje mezi 24-27 °C<sup>22)</sup>. Pro intenzivní růst vyžadují kultury vyšší teplotu než samotný mateřský organismus<sup>23)</sup>.

## **2. osvětlení**

V posledních letech se rozšířily znalosti o stimulačním vlivu světla na růst rostlinných kultur *in vitro*. Také biosyntéza a akumulace sekundárních metabolitů probíhají v závislosti na světle, a to v intaktních rostlinách i v tkáňových kulturách<sup>7)</sup>.

Světlo nemusí být nezbytné pro pěstované kultury, může však mít podstatný vliv. Významné je při regeneraci rostlin, tvorbě somatických embryí či cílené produkci některých sekundárních metabolitů. Bývá vyžadováno i při pěstování protoplastů<sup>22)</sup>.

Důležitá je intenzita a kvalita světla, jakož i případná fotoperioda. Doba a způsob osvětlení se liší podle objektu a typu kultivace. Nejobvyklejší jsou nepřetržité osvětlení (500-1000 luxů) nebo fotoperioda 8-16 hodin s osvětlením nad 2000 luxů<sup>22)</sup>.

## **3. pH prostředí**

Produkce všech sekundárních metabolitů i růst buněk je silně ovlivněna výchozí hodnotou pH (většinou pH = 5-6), ale ta se v závislosti na komplexních reakcích spojených s růstem postupně mění během celého vývoje kultury. Pro zvýšení produkce ve velkokapacitních fermentorech je hodnota pH často řízena po celou dobu kultivace<sup>24)</sup>.

## **4. relativní vlhkost vzduchu**

V uzavřených nádobách je vysoká vzdušná vlhkost. Hladina vysoké vzdušné vlhkosti v nádobách se projevuje u některých rostlin vitrifikací (sklovitost)<sup>25)</sup>.

## **5. aerace (provzdušnění)**

Rostlinné buňky v tekuté půdě vyžadují aeraci s různým optimem pro růst a syntézu sekundárních metabolitů<sup>7)</sup>. Intenzita samotného provzdušňování je pak důležitá proto, že změna poměru anaerobního a aerobního dýchání může vyvolat různé morfologické a biochemické změny<sup>26)</sup>.

Baňky s kulturami musí být uzavřeny zátkami propustnými po plyny, jako je kyslík difundující z vnějšího okolí do kultivační kapaliny v baňce a oxid uhličitý, který vzniká v kultuře, difunduje z baňky do vnějšího prostředí <sup>21)</sup>.

### 3.2.2. Živná média a jejich složení

Živná půda (též růstové nebo kultivační médium) je substrát poskytující výživu a další vhodné podmínky organismům a jejich částem pěstovaným *in vitro* <sup>22)</sup>.

Vzhledem k uzavřenosti prostoru, ve kterém probíhá látková výměna rostlinného materiálu pěstovaného *in vitro*, je nutné výběrem vhodného živného média dodat kulturám všechny potřebné živiny. Vhodná a dokonale vyvážená kombinace všech potřebných anorganických a organických látek je důležitý předpoklad pro úspěšnou kultivaci rostlinných explantátů. Skladba látek není závislá pouze na rostlinném druhu, ale i na druhu rostlinného orgánu, ze kterého byla daná kultura odvozena <sup>27)</sup>.

#### SLOŽENÍ ŽIVNÝCH MÉDIÍ

1. ANORGANICKÉ SLOUČENINY – dodávají se ve formě solí:

- **makroelementy**: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík, síra
- **mikroelementy**: železo, bór, měď, mangan, nikl, kobalt, jód, zinek
- **voda**

2. ORGANICKÉ SLOUČENINY

- **vitamíny**: vit. B<sub>1</sub> (thiamin), vit. B<sub>6</sub> (pyridoxin), kys. nikotinová, kys. listová, vit. H (biotin)...
- **aminokyseliny** = zdroj organického dusíku: směsi (hydrolyzáty proteinů) nebo čisté (glycin)
- **mono- a disacharidy (sacharóza)** = zdroj organického uhlíku
- **inositol** (rostlinný alkoholický cukr)
- **aktivní uhlí** (likvidace toxinů a nečistot)

3. RŮSTOVÉ REGULÁTORY

- **auxiny, cytokininy, gibbereliny, kys. abscisová, ethylen**

4. LÁTKY TVOŘÍCÍ MATRIX MÉDIA – **agar, gelrit** nebo **alginát** <sup>16)</sup>

## 1. ANORGANICKÉ SLOUČENINY

**Makroprvky** a **mikroprvky** jsou pro daný organismus specificky potřebné, obvykle s nutriční funkcí (draslík, dusík, draslík, atd.). Je velmi důležité, aby látky byly aplikované v přesně stanovené molární koncentraci <sup>22)</sup>.

**Voda** se používá pro přípravu všech živných médií a zaujímá v nich více než 95 % celkového objemu. Nejčastěji se používá voda destilovaná <sup>26)</sup>.

## 2. ORGANICKÉ SLOUČENINY

### Zdroje uhlíku

V naprosté většině případů je nutné dodání energie pomocí cukrů (výjimkou jsou zatím vzácné fotoautotrofní kultury). Optimálním zdrojem uhlíku je **sacharóza**, která se používá v koncentraci nejčastěji 3%. Vyšší koncentrace cukru v médiu (5-7%) většinou negativně ovlivní nejprve růst a další zvýšení i produkci sekundárních metabolitů. Produkce sekundárních metabolitů závisí především na poměru obsahu uhlíku a dusíku v médiu <sup>7)</sup>.

### Zdroje dusíku

Anorganické zdroje dusíku jsou dusičnanový ( $\text{NO}_3^-$ ) a amonný ( $\text{NH}_4^-$ ) ion. Jsou často nedostačující pro intenzivní růst kultur. Proto se při kultivaci používají jako přírodní zdroje dusíku různé extrakty rostlinného původu (kokosové mléko, kvasnicový extrakt nebo hydrolyzát kaseinu aj.) <sup>26)</sup>.

Organickým zdrojem dusíku jsou **aminokyseliny**, které se využívají v čisté formě nebo ve směsích.

### Vitamíny

Z vitamínů přidávaných do médií je nepostradatelný **thiamin**, užívá se v různých koncentracích 0,1 mg/l (MS médium), 0,5 mg/l (Nitsch médium), 5mg/l (SH médium), až 10 mg/l (B5 médium). Ostatní používané vitamíny jsou podpůrné pro stimulaci růstu, ale je možné se bez nich v řadě případů i obejít <sup>25)</sup>.

## 3. RŮSTOVÉ REGULÁTORY viz kapitola 3.3.

## 4. LÁTKY TVOŘÍCÍ MATRIX MÉDIA

Média dělíme podle skupenství na tuhá, polotuhá a tekutá. Tuhá obsahují nějaký inertní nosič, zatímco u tekutých takový nosič chybí <sup>22)</sup>.



Ke zpevnění média se nejčastěji používá **agar** v koncentraci 0,6-0,8 %. Alternativou agaru jsou **algináty, polymery škrobu, methylcelulosa** a další <sup>26)</sup>.

#### Nejpoužívanější média pro rostlinné explantáty

- **Murashige a Skoog (1962)** <sup>28)</sup> - MS médium
  - živné médium používané v explantátových kulturách ke kultivaci rostlinných částí, buněk a protoplastů;
  - vyznačuje se větší koncentrací dusíku a fosforu, než měla dřívější média např. Miller et al. (1956), Hildebrandt et al. (1946) <sup>22)</sup>.
- **Gamborg et al. (1968)** <sup>29)</sup> - B5 médium
  - široce používané živné médium, které bylo vyvinuto pro kultivování buněčných suspenzí sóji v podmínkách *in vitro* <sup>22)</sup>.
- **Schenk a Hildebrandt (1972)** - SH médium
  - bylo vyvinuto za účelem rozvoje a kultivace kalusu jednoděložných i dvouděložných rostlin;
  - ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  mají podobnou koncentraci jako B5 médium;
  - vyšší koncentrace tohoto média může způsobovat inhibici růstu <sup>22)</sup>.
- **Lloyd a McCown (1980)** - WPM médium <sup>22)</sup>.

### 3.3. Růstové látky a jejich vliv na produkci sekundárních metabolitů

Koordinace metabolismu, růstu a vývoje u složitých vícebuněčných organismů závisí na předávání informace mezi buňkami a orgány pomocí signálů. U rostlin jsou růstové aktivity početných vrcholů regulovány chemickými signály hormonální povahy, fytohormony <sup>30)</sup>.

Přítomnost fytohormonů v místě účinku je dána jejich biosyntézou, rozkladem nebo jinou inaktivací a také transportem vodivými pletivy. Jejich působení v buňce je podmíněno vazbou na receptor. Vytvoření komplexu hormon-receptor spouští řetězec

biochemických změn, který představuje přenos signálu v buňce. V jádře regulují expresi genů, v cytoplasmě vyvolávají uvolnění vápenatých iontů a aktivaci enzymů, závislých na přítomnosti vápníku<sup>30)</sup>.

Koordinační funkce v rostlině a schopnost reagovat na vnější signály takovým způsobem, jaký je pro rostlinu prospěšný, připodobňuje funkci fytohormonů úloze nervové soustavy u živočichů<sup>30)</sup>.

### 3.3.1. Základní rozdělení a charakteristika jednotlivých růstových látek

Látky, které růst povzbuzují, nazýváme stimulátory, látky brzdící růst - inhibitory. Všechny tyto látky působí ve velmi malých, tzv. fyziologických koncentracích<sup>31)</sup>. Nativní jsou produkovány rostlinami a syntetické (morforegulátory) vyrobeny průmyslově<sup>17)</sup>.

Tab. 2. Základní rozdělení<sup>17)</sup>

<b>ROSTLINNÉ REGULÁTORY</b> Přirozené regulátory růstu	<b>MORFOREGULÁTORY</b> Syntetické regulátory růstu
<b>A) <u>RŮSTOVÉ LÁTKY (stimulátory)</u></b>  <u>Auxiny</u> (IAA, IAN, PAA)  <u>Gibereliny</u> (GA <sub>1</sub> , GA <sub>2</sub> atd.)  <u>Cytokininy</u> (zeatin, zeatinribosid, IPA) <u>Brassinosteroidy, polyaminy</u> aj.	<u>Auxinoidy</u> (IBA, NAA, 2,4-D, 2,4,5-T, MCPA, benzolinon)         <u>Syntetické cytokininy</u> (kinetin, PAB, PBA, difenylmočovina)
<b>B) <u>ZÁBRANNÉ LÁTKY (inhibitory)</u></b>  ABA, xantoxin, fenolické látky, kyselina jasmonová	<u>Retardanty</u> (MH, CCC, TIBA, B-995, B-9, Fosfon D, paclobutrazol)
<b>C) <u>ETHYLEN</u></b>	CEPA

### Mezinárodní zkratky:

<b>IAA</b> kyselina indolyl-3-octová	<b>PBA</b> tetrahydropyranyl-benzyladenin
<b>IAN</b> 3-indolylacetonitril	<b>ABA</b> kyselina abscisová
<b>PAA</b> kyselina fenylloctová	<b>MH</b> hydrazid kyseliny maleinové
<b>IBA</b> kyselina indolyl-3-máselná	<b>CCC</b> chlorcholinchlorid (chlormequat)
<b>NAA</b> kyselina 1-naftylloctová	<b>TIBA</b> kyselina 2,3,5-trijodbenzoová
<b>2,4-D</b> kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová	<b>B-9, B-995</b> kyselina N-dimethylaminojantarová (diaminozid)
<b>2,4,5-T</b> kyselina 2,4,5-trichlorfenoxycetová	<b>CEPA</b> kyselina 2-chlorethylfosfonová (ethephon)
<b>MCPA</b> kyselina 4-chlor-2-methylfenoxycetová	
<b>IPA</b> izopentenyladenin	
<b>BA (BAP)</b> 6-benzyladenin (6-benzylamonipurin)	

### 3.3.1.1. Látky působící pozitivně na růst

#### 1. AUXINY

##### *A. PŘIROZENÉ*

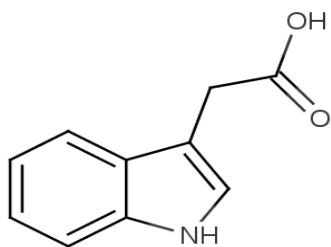
Auxin je prvním objeveným a dosud nejlépe prozkoumaným fytohormonem. Práce na jeho objevu začala na konci 19. století. V roce 1934 byla růstová látka extrahovaná, identifikovaná jako kyselina indolyl-3-octová a nazvaná auxin (z řeckého *auxein*, „růst“). I když dnes známe více auxinů u rostlin, kyselina indolyl-3-octová (*angl.* indolyl-3-acetic acid, **IAA**) je nejčastější z přírodních auxinů <sup>30</sup>.

- **IAA (= β-indolylloctová kyselina, indolyl-3-octová kyselina)**

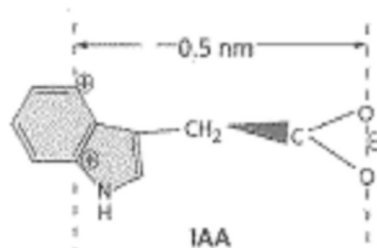
Představuje prioritní složku růstových látek vzrostného vrcholu. Šíří se v rostlině polárním bazipetálním transportem (v kořenech akropetálním) parenchymatickými buňkami rychlostí 5-15 mm/h. Prekurzorem auxinu je aminokyselina tryptofan; biosyntéza probíhá u všech rostlin a u většiny autotrofních protist a také u bakterií. Odbourávání je enzymem **auxinoxidázou** <sup>6)</sup>.

#### **Chemická struktura**

Všechny auxiny jsou látky indolového typu, které mají při neutrálním pH silný záporný náboj na karboxylové skupině postranního řetězce, který je vzdálen 0.5 nm od slabšího pozitivního náboje na kruhové struktuře. Toto oddělení náboje je zásadní pro auxinovou aktivitu <sup>30</sup>.



Obr. 1. Kyselina indolyl-3-octová (IAA)  
- přírodní auxin <sup>30)</sup>



Obr. 2. Rozdělení náboje na molekule  
auxinu <sup>30)</sup>

### Zdroje auxinů

Auxiny jsou syntetizovány ve vrcholu koleoptile, v malých listech, květních orgánech a vyvíjejících se plodech, zejména v semenech <sup>32)</sup>.

### Hlavní účinky IAA

#### 1. Podpora prodlužovacího růstu <sup>6)</sup>.

Auxiny stimulují prodlužovací růst a s tím souvisí i jejich úloha v regulaci tropizmu <sup>32)</sup>. Součástí prodlužování buněk, a objemového růstu buněk vůbec, je zvýšení ireverzibilní roztažnosti buněčné stěny. Nerovnoměrná distribuce auxinu a různá reakce pletiv na auxin vyvolávají ohyby rostlin, **tropizmy**. Fototropismus (růst za světlem) zabezpečuje optimální příjem záření listy. Gravitropismus zabezpečuje vertikální růst prýtu a kořene správným směrem. Tigmotropismus je růst kolem překážek a vyskytuje se u popínavých rostlin <sup>30)</sup>.

#### 2. Vyvolává nebo zesiluje mitotickou aktivitu pletiva <sup>6)</sup> a reguluje buněčný cyklus <sup>30)</sup>.

#### 3. Podněcuje diferenciaci zdřevnatělých elementů cév <sup>6)</sup>.

Význam auxinu dokazují pokusy s poraněním stonku, při kterém vodivá pletiva jsou přerušena. Je-li nad poraněním přítomen zdroj auxinu (rostoucí pupen nebo auxin nanesený na rostlinu) nastává diferenciacie nových vodivých pletiv kolem rány <sup>30)</sup>.

#### 4. Podporuje tvorbu adventivních, či postranních kořenů a cibulí <sup>6)</sup>.

#### 5. Potlačuje rašení úžlabních pupenů rostoucím vrcholovým pupenem

= **apikální dominance**.

Apikální dominance se projevuje jako bránění v růstové aktivitě podrážených pupenů, zatímco vrcholový pupen je silně aktivní. V případě zániku vzrostného vrcholu, přebírá funkci řídicího pupenu nejbližší níže postavený pupen <sup>6)</sup>.

6. Brání opadávání listů a plodů a podporuje růst plodů <sup>6)</sup>.

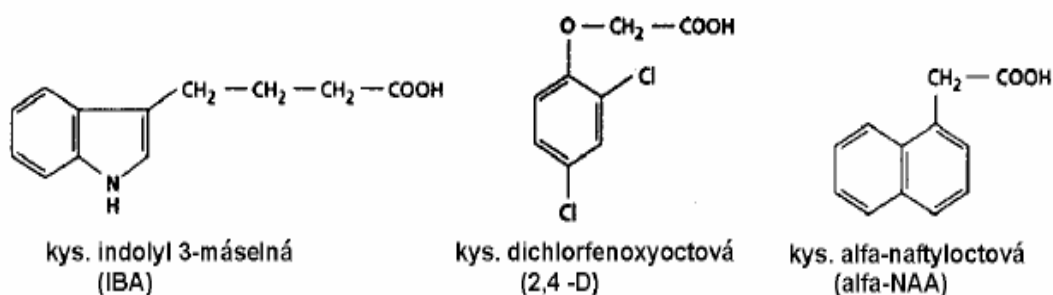
7. Ovlivňuje viskozitu protoplazmy a stupňuje příjem vody <sup>6)</sup>.

### B. SYNTETICKÉ

Vedle nativních auxinů je známo i několik uměle syntetizovaných látek (auxinoidů) s podobným účinkem na rostliny jako auxiny <sup>31)</sup>. Mezi nejznámější patří kyselina indolyl-3-máselná (**IBA**),  $\alpha$ -naftylactová (**NAA**) a 2,4-dichlorfenoxyoctová (**2,4-D**) <sup>22)</sup>. Syntetické látky s účinky IAA nejsou enzymově rozkládány, proto nacházejí stále častější cílené použití v produkci a ochraně rostlin <sup>6)</sup>.

### Chemická struktura

Jedná se o slabé organické kyseliny. Po izolaci jsou to krystalické látky, špatně rozpustné ve vodě. Dobře se rozpouštějí v organických rozpouštědlech a ve vodném alkalickém prostředí <sup>33)</sup>.



Obr. 3. Některé syntetické auxiny (= auxinoidy) <sup>30)</sup>

### Komerční využití auxinů

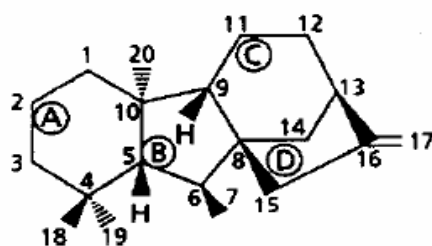
Auxiny (zejména syntetické) se využívají v zemědělství a zahradnictví již přes 50 let <sup>30)</sup>. Jako herbicidy se nyní již nepoužívají, protože jsou toxické pro živočichy <sup>31)</sup>. Uplatňují se při zakořeňování řízků, při množení rostlin, indukci kvetení, prevenci nebo indukci opadu plodů a indukci partenokarpních plodů. Velké uplatnění mají v biotechnologiích <sup>30)</sup>. Spolu s cytokininy jsou základní složkou médií pro tkáňové kultury <sup>31)</sup>.

## 2. GIBERELINY

Tyto látky jsou známy pouze jako nativní, vyrábějí se fermentací houby *Gibberella fujikuroi*<sup>31)</sup>. V 30tých letech 20.století se japonským vědcům podařilo získat z této nižší houby látku nazvanou giberellin A a B. Aktivní látka byla izolována a popsána v padesátých letech jako **kyselina giberelová** (*angl.* gibberellic acid, **GA**) a v roce 1958 byly gibereliny poprvé identifikovány u vyšších rostlin. Gibereliny byly číslovány dolním indexem podle pořadí jejich objevování<sup>30)</sup>.

### Chemická struktura

Gibereliny jsou tetracyklické diterpenoidy. Podmínkou aktivity je tetracyklický *ent*-giberelanový skelet a karboxylové skupiny v poloze 7 a 19. Všechny gibereliny jsou slabé organické kyseliny málo rozpustné ve vodě. Jen některé gibereliny mají biologickou aktivitu. Nejvýznamnější z nich jsou GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>. Přitom u vyšších rostlin převládá GA<sub>1</sub>, zatímco u jednobuněčné *Gibberelly* převládá GA<sub>3</sub><sup>30)</sup>.



Obr. 4. Struktura *ent*-giberelanového skeletu<sup>30)</sup>

### Zdroje a transport giberelinů

Gibereliny jsou syntetizovány u cévnatých rostlin ve vrcholech prýtu a kořene a také v mladých listech a embryích<sup>6)</sup>. Transportují se do celé rostliny floémem ve formě aktivní, neaktivní nebo ve formě konjugované<sup>30)</sup>. Jejich transport je obousměrný – bazipetální i akropetální<sup>31)</sup>.

### Hlavní účinky

Gibereliny stimulují dělení buněk a hlavně jejich prodlužovací růst zvýšením roztažitelnosti buněčné stěny<sup>31)</sup>. Nižší koncentrace podporují rovnoměrný růst, vyšší koncentrace vyvolávají převahu prodlužovacího růstu nad tloušťnutím<sup>6)</sup>. Tyto látky také ovlivňují klíčení semen, nástup kvetení, podílí se při determinaci pohlaví, regulují vývoj plodů<sup>30)</sup>. Brzdí tvorbu adventivních kořenů a podporují syntézu IAA<sup>6)</sup>.

### Komerční využití

Gibereliny se využívají pro stimulaci růstu plodů, při úpravě morfologie plodů (hroznové víno, jablka), ve šlechtitelském procesu pro zkrácení vegetační doby u dvouletých rostlin. Byla vyvinuta řada inhibitorů biosyntézy giberelinů, které se používají proti nežádoucímu prodlužování v okrasném zahradnictví<sup>30)</sup>.

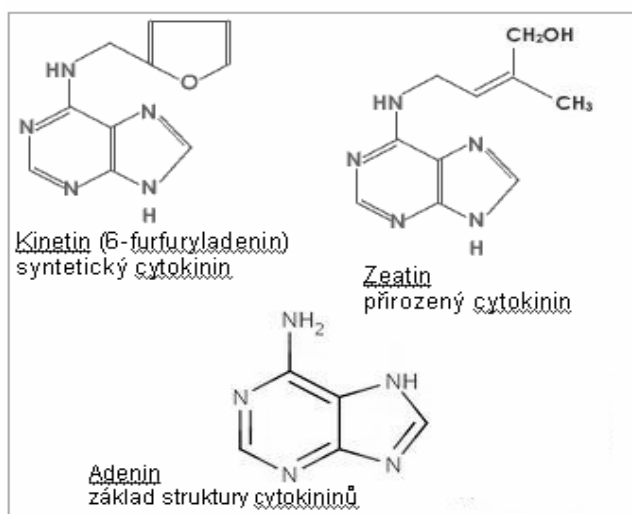
Gibereliny se při přípravě živných médií ale všeobecně nepoužívají z důvodu jejich nízké tepelné stability<sup>26)</sup>.

### 3. CYTOKININY

Objev cytokininů byl vyvolán velkým rozvojem studia tkáňových kultur a potřebou najít náhradu za kokosové mléko používané ve 30tých letech 20.století v tkáňových kulturách rostlin pro iniciaci buněčného dělení<sup>30)</sup>. První poznanou látkou tohoto typu byl **kinetin**, derivát adeninu, izolovaný z DNA kvasinek v roce 1955<sup>6)</sup>. Zjistilo se, že podobné deriváty adeninu jsou přirozenými látkami v rostlinách. Nejrozšířenější přirozený cytokinin je **zeatin**. Nejpoužívanějším syntetickým cytokininem je benzylaminopurin (**BAP**)<sup>30)</sup>.

### Chemická struktura

Přirozené cytokininy jsou deriváty adeninu se substitucí v poloze N<sup>6</sup> a s dvojnou vazbou na postranním řetězci. Cytokininy se mohou vázat s cukrem ribosou na ribosidy, které se dále mohou fosforylovat na ribotidy a mohou se také konjugovat s glukosou na glukosidy. Vázané cytokininy mají podstatně nižší cytokininovou aktivitu než volné<sup>30)</sup>.



Obr. 5. Struktura vybraných cytokininů

### Zdroje a transport cytokininů

K intenzivní syntéze cytokininů dochází v kořenových špičkách, odkud jsou rozváděny xylémem do ostatních orgánů (akropetálně). Mohou vznikat i v pupenech, odkud proudí floémem bazipetálně<sup>31)</sup>.

Pozoruhodná je schopnost kultur některých tkání, pocházejících z nadzemních orgánů "naučit se" syntetizovat vlastní cytokinin a stát se nezávislymi na přidání cytokininu do živné půdy. Tomuto jevu se říká **habituace**. U habituovaných kultur probíhá v přítomnosti auxinu dělení buněk i bez přidání cytokininů do živného média<sup>30)</sup>.

### Hlavní účinky

Cytokininy stimulují buněčné dělení a snižují apikální dominanci (mohou probudit spící úžlabní pupeny nebo urychlit růst v nepříliš aktivních pupenech). Cytokininy zpomalují degradaci bílkovin, prodlužují životnost chloroplastů a oddalují stárnutí listů. Aktivují mimo jiné enzym nitrátreduktasu a tím zvyšují příjem a využití dusíku z půdy. V nadměrném množství zpomalují ontogenezi a oddalují stárnutí celých rostlin.

Interakce cytokininu s auxinem v tkáňových kulturách umožňuje regeneraci celých rostlin z izolovaných částí<sup>30)</sup>.

### Komerční využití

Je především v biotechnologiích při množení rostlinného materiálu<sup>30)</sup>.

## 4. DALŠÍ LÁTKY PODPORUJÍCÍ RŮST

**Brassinosteroidy (brassinolid, castasteron, typhasterol aj.)** jsou steroidní látky, které stimulují růst<sup>30)</sup>. Byly izolovány jako směs v 70. letech z pylu řepky<sup>6)</sup>. Jsou hojně zastoupeny v plodech, v pylu, ale také v rostoucích vegetativních orgánech. Interagují s fytohormony při vyvolávání fyziologických reakcí růstu, např. zvyšují množství IAA a snižují množství ABA (kys. abscisové) v rostlinách<sup>30)</sup>.

**Polyamidy (putrescin, spermidin, spermin)** jsou hojně zastoupeny v rostlinách, hlavně tam, kde se odehrává buněčné dělení. Stimulují klíčení, růst klíčnicích rostlin, růst



kalusu, květní diferenciaci, tuberizaci apod. Obsah polyaminů stoupá při aktivaci růstu a při stresu <sup>30)</sup>.

**Kyselina tuberonová** stimuluje zakládání hlíz u brambor <sup>17)</sup>.

### **Ostatní látky**

K jejich poznání přispěla především práce z rostlinnými kulturami pěstovanými *in vitro*, tvoří totiž nutné přísady do živných půd. Patří mezi ně: **thiamin, riboflavin, pyridoxol, kyselina nikotinová** (ve formě amidu), **kyselina pantothenová, myoinositol, biotin, kyselina p-aminobenzoová a cyanocobalamin** <sup>6)</sup>.

## **3.3.1.2. Látky působící negativně (inhibičně) na růst**

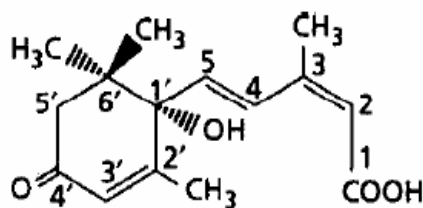
### **A. PŘIROZENÉ**

#### **1. KYSELINA ABSCISOVÁ** (dormin)

Kyselina abscisová (*angl.* abscisic acid - **ABA**) je přirozeným inhibitorem rozšířeným zejména u krytosemenných rostlin. Byla objevena v roce 1963 při studiu opadu plodů bavlníku <sup>31)</sup>. Znalosti o tomto fytohormonu se od té doby značně rozšířily a zahrnují zejména reakce, spjaté s odolností rostlin vůči nepříznivým faktorům <sup>30)</sup>.

### **Chemická struktura**

Chemickou podstatou se jedná o seskviterpenickou kyselinu <sup>6)</sup>. Kyselina abscisová má asymetrický uhlík v poloze 1', který umožňuje výskyt ve dvou enantiomerních formách: S (+) a R (-). Přirozeně se v rostlinách vyskytuje forma S ve dvou konformačních izomerech: *cis* a *trans*, které mohou do sebe navzájem přecházet, ale fyziologicky aktivní je pouze *cis*- izomer <sup>30)</sup>.



Obr. 6. (S)-*cis*-ABA – přirozeně se vyskytující aktivní forma <sup>30)</sup>

### **Zdroje a transport ABA**

Nejvíce kyseliny abscisové se tvoří v dormantních orgánech (pupenech, semenech, hlízách), ale i v mladých rychle rostoucích pletivech–listech. Dále je syntetizována v plodech a vysokou aktivitu má i v kořenovém vrcholu<sup>31)</sup>. Transportuje se xylémem a hlavně floémem všemi směry, pohyb v buňkách je závislý na pH buněčných struktur<sup>30)</sup>.

### **Hlavní účinky**

ABA snižuje transpiraci při nedostatku vody. Zvyšuje alkalitu buněk a odolnost cytoplazmy vůči ztrátě vody při dlouhodobém suchu, a také při zasolení, chladu, či jiném poškození. Stimuluje růst laterálních kořenů a tím podporuje tvorbu mohutnější kořenové soustavy a inhibuje růst nadzemní části rostliny. V tom je účinek ABA opačný než účinek gibberelinu. ABA se účastní regulace embryogeneze a zrání semen, indukuje také biosyntézu zásobních proteinů v semeni. Spoluúčastní se regulace stárnutí a opadu (abscission) listů a květů. Odtud pochází její název<sup>30)</sup>.

## **2. ETHYLEN**

Etylén je jedna z nejjednodušších chemických látek s biologickou aktivitou. Jeho funkce jako regulátoru rostlinného růstu je známa přibližně 100 let<sup>34)</sup>.

### **Chemická struktura**

Etylén je plynný uhlovodík produkovaný téměř všemi částmi rostlin. Biologicky aktivní je i v malých koncentracích. Biosyntéza vychází z aminokyseliny L-methioninu<sup>30)</sup>.

### **Tvorba a transport**

Etylén se tvoří ve všech tkáních rostliny, ale v různých množstvích<sup>35)</sup>. V rostlině se transportuje prekurzor etylénu, ACC (kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová), a ten může konjugovat a z konjugátu se zase uvolňovat<sup>30)</sup>.

### **Hlavní účinky**

Etylén reguluje zrání plodů a stárnutí rostlin. Ve velkých množstvích se tvoří při fyziologickém stresu (zaplavení, poranění), kde vyvolává obranné reakce. Ovlivňuje

utváření anatomické a morfologické struktury<sup>30)</sup>. IAA stimuluje jeho tvorbu, naopak ethylen brzdí syntézu IAA<sup>6)</sup>.

Z uměle připravených etylénotvorných látek je nejznámější 2-chlorethylfosfonová kyselina (**CEPA**), která dovede uvolňovat ethylen do prostředí<sup>31)</sup>.

### 3. KYSELINA JASMONOVÁ

**Jasmonová kyselina** inhibuje klíčení a růst, účastní se zavírání průduchů a indukce tuberizace. Obsah jasmonové kyseliny v rostlině stoupá během stárnutí a při stresu<sup>30)</sup>. Bylo prokázáno, že kyselina jasmonová (JA) a její methylester methyljasmonát jsou signálními molekulami při působení biotických a abiotických stresových faktorů<sup>4)</sup>.

4. OLIGOSACHARIDY jsou fragmenty buněčné stěny, které inhibují dlouhivý růst a slouží jako obrana při napadení patogenem<sup>17)</sup>.

#### *B. SYNTETICKÉ (retardanty)*

**CCC (chlorcholinchlorid)** se považuje za antigiberelin. V rostlině brzdí syntézu GA a auxinů - omezuje růst lodyhy a podporuje růst kořenů, (*podporuje větvení, odnožování, zkracuje stéblo*)<sup>31)</sup>.

**Ethrel (kyselina 2-chlorethylfosfonová)** je morforegulátor, který podporuje uvolňování ethyleny a tak inhibuje prodlužovací růst a urychluje dozrávání plodů. Nezanechává toxická rezidua<sup>31)</sup>.

**Herbicidy** - maleinhydrazid (MH) - brzdí růst.

- kyselina 2,3,5-trijódbenzoová (TIBA) - antiauxin, zeslabuje růst vrcholu, podporuje větvení lodyhy, urychluje tvorbu květů a hlíz<sup>31)</sup>.

**Další látky** - fenolické kyseliny (kyselina salicylová, deriváty kyseliny benzoové)

- morfaktiny (chlorflurenol)

- anticytokininy a kumariny aj.<sup>6)</sup>.

## 3.4. Další faktory ovlivňující produkci sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami

Teoreticky je možné produkovat v tkáňové kultuře jakoukoliv látku, syntetizovanou intaktní rostlinou v přírodě. Je to umožněno totipotencí rostlinných buněk v kultuře, protože každá buňka obsahuje kompletní genetickou informaci výchozí rostliny. Převod do kultury však představuje pro buňky nejprve šok z poranění a pak stres způsobený radikální změnou prostředí. Buňky v kultuře odmítají aktivovat stejné metabolické dráhy jako v intaktní rostlině. Působení vnějších faktorů může modifikovat, indukovat nebo brzdit nejen proliferaci kultury, ale i biosyntetickou aktivitu buněk kultury. Dosáhnout dostatečné diferenciaci biochemické bez diferenciaci morfologické je složité, a proto jsou výtěžky různých látek z tkáňových kultur velmi odlišné <sup>36)</sup>.

Pokud potřebujeme získat větší množství materiálu, připadá v úvahu buď několikanásobná kultivace většího počtu buněk nebo využití některého z možných typů fermentorů (bioreaktorů). Je ovšem nutné si uvědomit, že rostlinné buňky mají ve srovnání s mikrobiálními, u kterých je kultivace větších objemů již propracována, podstatně delší dobu zdvojení biomasy, vyšší požadavky na sterilitu, menší mechanickou odolnost a vyžadují komplexnější, tedy i dražší živná média <sup>5)</sup>.

Obměna vnějších faktorů kultivace, jako např. teploty, kvality, intenzity a střídání světla, výživy, změny v typu a hladině růstových hormonů, nabízí do určité míry možnost ovlivňovat, případně i řídit růst, tak i metabolické procesy <sup>37)</sup>.

Pro překonání těchto potíží a získání vysoce produkčních kultur bylo vypracováno několik obecných postupů, kterými je možné dosáhnout zvýšení produkce a akumulace sekundárních metabolitů v buněčných kulturách *in vitro* <sup>5), 19)</sup>.

### 3.4.1. Elicitory

Zvýšení produkce a akumulace sekundárních přírodních látek v kulturách *in vitro* je možné působením elicitorů. Elicitory jsou agens biologického původu, které jsou ve vztahu k akumulaci sekundárních látek označovány také jako nosiče mikrobiálního stresu (biotické elicitory) např. používané kompletní homogenáty inaktivovaných kultur mikroorganismů, a to hub, bakterií, případně jejich frakce. Jako abiotické elicitory se označují stresoví činitelé jako UV záření, ionty těžkých kovů, změny osmotického tlaku, změny pH a další <sup>19)</sup>.

Elicitory mohou v rostlinných pletivových a buněčných kulturách iniciovat aktivitu specifických genů, které vedou ke zvýšení hladiny určitých enzymů a následně k biosyntéze látek, které předtím buňka netvořila <sup>10)</sup>. Buněčné kultury jsou v mnohých případech citlivé na elicitor během růstové fáze, částečně ve fázi sníženého růstu <sup>19)</sup>.

Poznátky o procesu elicítace, který podmiňuje tvorbu a akumulaci sekundárních přírodních látek v rostlinných buněčných kulturách, lze shrnout následovně:

- tvorba sekundárních metabolitů po působení elicitoru se vyskytuje především v buňkách, které se nacházejí na konci růstové fáze;
- nastává v průběhu několika hodin po působení elicitoru (12-48 hodin);
- probíhá v buňkách suspendovaných v růstovém médiu i v kalusu;
- sekundární přírodní látky se nacházejí v buňkách i v médiu;
- elicítaci můžeme opakovat, aniž nastává poškození buňky <sup>19)</sup>.

Tab. 3. Příklady elicitorů sekundárních metabolitů <sup>16)</sup>

elicitor (filtrát z houby)	kultura	produkt
<i>Phytophthora megasperma</i>	Glycine max	glykolin
houbové homogenáty	Ruta graveolens	epoxydy
<i>Phytium aphanidermatum</i>	Catharanthus roseus	ajmalicin katharanthin
<i>Botrytis</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Verticillium</i> <i>Alternaria</i>	Papaver somniferum	sanguinarin

### Fytoalexiny

Jako fytoalexiny se označují nízkomolekulární látky, které jsou charakteristické pro daný rostlinný druh a představují součást obranné reakce rostliny na napadnutí patogenem <sup>10)</sup>.

Biosyntéza fytoalexinů je indukovaná různými elicitory, mezi něž patří ty přírodního původu jako polysacharidy, proteiny nebo fragmenty buněčných stěn z bakterií, hub nebo samotných rostlin <sup>38)</sup>.

Fytoalexiny tak představují jednu z možností, jak iniciovat genovou aktivitu a dosáhnout tvorby sekundárních přírodních látek s dobrou výtěžností u takových kultur,

kteřé doposud v buněčné suspenzní kultuře tvořily tyto látky jen ve velmi malých množstvích <sup>10)</sup>.

### 3.4.2. Imobilizace

K ekonomickému zvýhodnění produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami může významně přispět imobilizace rostlinných buněk případně imobilizace klíčového enzymu v biosyntetické cestě <sup>10) a 19)</sup>.

Z produkčního hlediska je výhodné imobilizovat buňky při jejich maximální produkční aktivitě a uchovat je co nejdéle v produkční fázi. Imobilizované buňky je možné použít jak k syntéze metabolitů *de novo*, tak k biotransformacím. Rostlinné buňky mohou být imobilizovány zapouzdřením do gelu, vazbou na povrch pevného nosiče nebo inkapsulací pomocí dialyzačních membrán <sup>19)</sup>.

### 3.4.3. Optimalizace kultivačních podmínek

Každý druh rostlinného explantátu má své specifické nároky na optimální poměr hlavních živin. Úspěšných výsledků ve zvýšení produkce sekundárních látek bylo dosaženo manipulacemi se složením živného média zejména s růstovými regulátory <sup>19)</sup>.

Produkce sekundárních látek je různě ovlivněna i dalšími složkami média: ionty vápníku, železa, draslíku, stopovými prvky a vitamíny. Vliv mají i příměsi a nečistoty složek média, které jsou častou příčinou neúspěchů při předávání kultur z jednoho pracoviště na jiné <sup>7)</sup>.

### 3.4.4. Aplikace prekurzorů

Znalost metabolických drah usnadní nalezení vhodných (buňkám přijatelných a cenově výhodných) prekurzorů, které umožní prudce zvýšit syntézu žádané látky <sup>7)</sup>.

V mnohých případech vede dodání exogenních prekurzorů ke zvýšení biosyntézy produktu, na druhé straně ale u mnoha kultur zůstane přidání prekurzoru bez odezvy. V případě použití prekurzorů je nutno ověřit jejich akceptovatelnost, zjistit jejich optimální hladinu, kdy působí a použít je přesně v té růstové fázi, kdy jsou účinné, protože některé kultury produkují požadované metabolity v pozdní stacionární fázi, jiné v lag-fázi nebo v rané exponenciální fázi růstu <sup>37)</sup>.

### 3.4.5. Selekce vysoce produkčních rostlin a buněčných linií

Cílem je vybrat rostlinu, produkující co největší množství žádaných látek nebo pro případ biotransformace, rostlinu s co největší rychlostí přeměny žádaných metabolitů <sup>5)</sup>.

Pro získání vysoce produkčních tkáňových kultur je nutné selektovat i vhodné kmeny. Přitom se postupuje dle selekčních schémat, která vycházejí už z výběru produkční rostliny, z ní odvozují kalus a poté suspenzi, umožňující přímý rozsev buněk na pevnou půdu <sup>7)</sup>.

Selekce kmenů klade velké nároky na screeningové metody (chemická analýza, biologické testy, RIA - radioimunoanalýza). U selektovaných kmenů musí být potvrzeno, že zvýšení produkce je založeno geneticky. K udržení geneticky definované tkáňové kultury přispívá vhodná délka kultivační periody mezi pasážemi nebo hormonální složení půdy. Uchovávání vybraných kmenů je možné např. rediferenciací rostlin, které se pak množí vegetativně nebo metodou kryoprezervace za velmi nízkých teplot <sup>7)</sup>.

### 3.4.6. Mutace a selekce mutantů

Řízené změny *in vitro* jsou významné pro šlechtitelské účely a pro vytváření nové variability rostlin <sup>19)</sup>. K mutacím se využívá celé řady chemických činidel a UV záření. Zásah do metabolismu je bohužel velmi komplexní a možnost uspokojivého výsledku je tudíž malá <sup>5)</sup>.

Experimentální práce z této oblasti jsou především zaměřeny na tvorbu biologických materiálů rezistentních proti různým druhům patogenů, zasolení půdy, suchu a proti totálním herbicidům <sup>19)</sup>.

### 3.4.7. Metody genového inženýrství

Genové inženýrství umožňuje především detailní studium dědičné hmoty včetně úrovně primárního pořadí bází v DNA <sup>19)</sup>.

Základem genetických manipulací je integrace cizího genetického materiálu (DNA) do rostlinného organismu a vznik transgenní rostliny s novými vlastnostmi <sup>16)</sup>. Jedná se například o vnášení nových genů do rostlinného genomu prostřednictvím vektorů na bázi bakterií rodu *Agrobacterium* nebo prostřednictvím přímého vnášení DNA do rostlinných protoplastů či buněk pletiva <sup>19)</sup>.

Techniky genového inženýrství umožňují řešení taxonomických a fylogenetických otázek na molekulární úrovni, studium organizace rostlinného genomu, studium chloroplastové a mitochondriální DNA. Ve šlechtění rostlin je snaha využít komplex těchto technik pro konstrukci sond pro detekci viroidů, virů a dalších obtížně detekovatelných patogenů a pro vnášení cizích genů do genomu kulturních rostlin <sup>12)</sup>.

### 3.4.8. Diferenciace a morforegulace

V celé řadě případů se potlačení morfologické diferenciace v tkáňových kulturách projeví snížením produkce sekundárních metabolitů. Pokud je tkáňové kultuře dovoleno dosáhnout jistého stupně diferenciace (například tvorby výhonků nebo kořenů u kalusu), může dojít ke zvýšení produkce <sup>5)</sup>.

Řízením morfogeneze můžeme navodit žádané metabolické dráhy. K morforegulačním zásahům se používají především rostlinné regulátory růstu <sup>7)</sup>.

### 3.4.9. Vliv ploidie

Ploidie je počet homologních sad chromozomů v živé buňce. Syntéza sekundárních metabolitů je často v úzkém vztahu k ploidii rostliny i tkáňové kultury. I v případech, kdy je explantát odebrán z rostliny o známé a pro produkci výhodné ploidii, je nutné počítat s tím, že pasážírováním kultur ploidie často kolísá a spolu s tím klesá i morfogenetický potenciál a produkce. Jejich vzájemný vztah však často není úplně jasný <sup>7)</sup>.

### 3.4.10. Biotransformace

Biotransformace organických látek mikroorganismy je známa již dlouho a průmyslově se využívá k produkci steroidních hormonů (kortizonu, prednizonu). V posledních letech došlo k pokusům s využitelností biosyntetické kapacity tkáňových kultur nejen k produkci, ale i k biotransformaci jak přírodních, tak syntetických látek <sup>19)</sup>.

Jako substráty mohou sloužit:

1. Látky rostlině obvykle nedostupné, tj. syntetické látky, chemické analogy či sekundární metabolity jiných rostlinných druhů. Jejich transformaci lze zřejmě vysvětlit jako detoxikační reakce.

2. Přirozené substráty, tj. látky běžně se v rostlinách vyskytující.



Biotransformace může být realizována i kulturou, v níž je biosyntetická sekvence určité látky porušena, ale enzym schopný zprostředkovat žádanou dílčí reakci je tvořen v dostatečném množství. Tento přístup má zásadní význam pro zavádění moderních technologií ve farmaceutickém průmyslu, kde umožňuje přípravu nových analogů známých léčiv, které by mohly mít sníženou toxicitu a zvýšený terapeutický účinek <sup>19)</sup>.

## 3.5. Rod Datura

### Botanické zařazení

**říše:** *Plantae* – rostliny

**oddělení:** *Magnoliophyta* – krytosemenné rostliny

**třída:** *Magnoliopsida* – dvouděložné rostliny

**podtřída:** *Lamiidae*

**řád:** *Solanales* – lilkotvaré

**čeleď:** *Solanaceae* – lilkovité

**rod:** *Datura* – durman

**druh:** *Datura meteloides* <sup>39)</sup>

### Popis intaktní rostliny



Obr. 7. *Datura meteloides*

Rod *Datura* zahrnuje více jak 25 druhů. Jedná se o jednoleté i víceleté až 1 metr vysoké byliny s vřetenovitým kořenem a silnou vidlanovitě rozkladitou lodyhou. Listy jsou řapíkaté, podlouhle vejčité a chobotnatě zubaté. Jsou až přes 20 cm velké a nepříjemně páchnou. Květy mají trubkovitý pětizubý kalich a nálevkovitou pěticípou korunu až 8 cm dlouhou. Rostlina kvete od června do září. Plodem je silně ostnitá, asi jako ořech velká, mnohosemenná tobolka. Některé odrůdy mají plody bez ostnů <sup>40)</sup>. Semena ledvinitá, černá nebo šedá až nahnědle šedá <sup>39)</sup>.

Přestože se tento druh ze Střední Ameriky, rostoucí jako keřovitá trvalka, někdy řadí do rodu *Brugmansia*, ve skutečnosti jde o pravý durman (*Datura*). Má růžové nebo bílé květy a bělokvětý se podobá durmanu obecnému (*Datura stramonium*) <sup>41)</sup>.

## Výskyt

Za domovinu durmanu se pokládá východní oblast USA nebo střední Amerika, odkud se rozšířil, hlavně činností člověka, postupně do dalších světadílů. V Evropě se objevil nejdříve ve Španělsku, dále po Evropě se rozšířil pěstováním pro ozdobu v zahradách <sup>42)</sup>.

Dnes je rozšířený po celé Evropě, Asii a Severní Americe. U nás roste na rumišťích a úhorech <sup>40)</sup>.

## Užívaná část a obsahové látky

Drogou jsou listy, mladá nať, výjimečně semena. Listy a nať se sbírají v době kvetení, semena pak, jakmile se začnou otvírat tobolky <sup>42)</sup>.

Drogy obsahují především alkaloidy (až 0,5%), hlavně hyoscyamin, dále atropin a skopolamin <sup>40)</sup>. Kromě alkaloidů obsahuje droga flavonoidy a ve stopách siličné a pryskyřičné látky. V semenech je asi 20 % oleje <sup>42)</sup>.

Druhy durmanu a brugmansie (víceleté durmany) je nutné chápat jako zdroje tropanových alkaloidů, které jsou významně jedovaté <sup>39)</sup>. Intoxikace se manifestuje zčervenáním tváří, suchými sliznicemi, intenzivní žízní, ztíženým polykáním, tachykardií a mydriázou. Vysoké dávky působí hypertermii, centrální excitaci, halucinace a spasmy následované hlubokým kómatem. Smrt nastává respirační paralýzou <sup>43)</sup>.

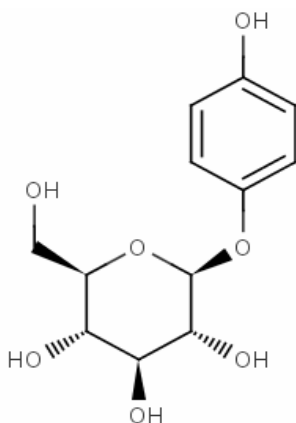
## Terapeutické využití

Látky v droze obsažené mají antiastmatický, mydriatický, spasmolytický a parasympatolytický účinek<sup>40)</sup>. V ČSL 2 bylo oficiální použití durmanu obecného do antiastmatických cigaret.

Lékopisnou surovinou je list (*Stramonii folium*), zařazený mezi separanda, s obsahem tropanových alkaloidů<sup>39)</sup>.

## 3.6. Arbutin

$C_{12}H_{16}O_7$   $M_r$  272,3



Obr. 8. Arbutosid, 4-hydroxyfenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid<sup>44)</sup>

## Přirozený výskyt

Fenolický glykosid arbutin se přirozeně nachází jako sekundární metabolit v mnoha rostlinách. Mezi nejvýznamnější patří *Arctostaphylos uva-ursi* (= medvědice lékařská) čeledi *Ericaceae*<sup>45)</sup>. Drogou jsou listy (*Uvae ursi folium*). Účinnou látkou drogy je arbutin (5-14%) hydrolyzující se na hydrochinon a D-glukózu. Arbutin provází menší množství metylarbutinu (poměr k arbutinu je 1:3). V droze je dále arbutinester kyseliny galové, 6 – 19 % tříslovin, indolové alkaloidy, asi 1,5 % flavonoidů s kvercetinem a myricetinem jako aglykony<sup>42)</sup>.

Dalším významným zdrojem je *Rhodococcus vitis-idaea* (= brusinka obecná) čeledi *Vacciniaceae*<sup>45)</sup>. Drogou jsou také listy (*Vitis-idaea folium*), sbírané výhradně z přírodních porostů. Výrazně účinnou obsahovou látkou je arbutin (4-9%) doprovázený

metylarbutinem v množství závislém spíše na způsobu sušení než na původu rostlin. Další obsahové látky jsou pyrosid (6-O-acetylarbutin) v množství kolem 3%, salidosid (0,5%), hydrochinongenciobiosid, hyperosid, třísloviny (do 0,5%) a organické kyseliny<sup>42)</sup>.

## Biosyntéza

Arbutin je syntetizován vyššími rostlinami z tyrosinu přes kyselinu *p*-kumarovou a 4-hydroxybenzoovou, která přechází oxidativní dekarboxylací a glukosylací na arbutin<sup>37)</sup>. Lze jej získat izolací z intaktní rostliny nebo několikastupňovou chemickou syntézou. Obě cesty jsou časově a ekonomicky náročné. Pokrokem při získávání biologicky aktivních látek je využití biomasy rostlinných buněk *in vitro* jako suroviny pro jejich izolaci<sup>46)</sup>.

## Popis izolované látky

Dle ČL 2009 jsou to jemné bílé nebo téměř bílé lesklé jehličky, snadno rozpustné ve vodě, velmi dobře rozpustné v horké vodě a dobře rozpustné v ethanolu 96%. Teplota tání je asi 200 °C<sup>44)</sup>.

Arbutin byl zařazen do nejuznávanějšího lékopisu U.S. Pharmacopoeia už v r. 1926 a je samozřejmě také součástí oficiálního Českého lékopisu<sup>47)</sup>.

## Farmakologické účinky

Arbutin působí při infekcích močových cest zasažených mikroby, jako *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus aureus* aj. Je dobrým lékem při chronických zánětech močovodů, močového měchýře, ledvinových pánviček a při obtížích po ledvinových kolikách<sup>42)</sup>.

Bylo potvrzeno, že po vnitřním podání arbutinu je jeho molekula transformována uvnitř buňky sliznice střeva na hydrochinon a po jeho absorpci se dostává krevním oběhem do ledvin, kde se váže na složky moče (je-li moč alkalická) a vytváří tak methyalarbutin a hydrochinon, které inhibují nebo zabíjejí bakterie v močovém traktu<sup>47)</sup>. Minimální baktericidní koncentrace arbutinu se pohybuje, v závislosti na druhu mikroorganismu, od 0,4 % do 0,8 %<sup>48)</sup>. Byly prokázány jeho další účinky jako antimikrobiální a antitusický<sup>46)</sup>.

Japonští výzkumní pracovníci zjistili v roce 1991 při studiu procesu melanogeneze, že arbutin má také selektivní působení na melanocyty a velmi účinně inhibuje tvorbu melaninu. Používá se k odstraňování získaných hyperpigmentací<sup>47)</sup>.

### Způsoby užití a nežádoucí účinky

Droga se užívá samotná (ve formě kapslí, tablet, tinktury nebo čaje) nebo v diuretických čajových směsích. V případě čajů musí být droga hrubě práškováná, protože celé nebo málo drcené listy se těžko vyluhují. K nálevu se používá jen vlažná voda. Horkou vodou by se z drogy vyloužily třísloviny, které se špatně snášejí a způsobují nevolnost, zvracení a zácpy.

Po dlouhodobém užívání vysokých dávek hrozí nebezpečí otravy, při které jsou zasažena játra a která působí glykosurii<sup>42)</sup>.

# 4. Experimentální část

## 4.1. Přístroje

- Laboratorní analytické váhy AND Helago s.r.o.
- Přesné váhy Kern 572
- Horkovzdušný sterilizátor Chirana IP 21
- Box s laminárním prouděním Holten LaminAir (HV MINI)
- Sušárna Memmett
- Silufol UV 254, sklárny Kavalier, podnik Votice
- UV/VIS detektor PU 4110 Philips
- Multichannel detektor DAD PU 4021 Philips
- Pumpa PU 4110 Philips
- Předkolona 30 x 3 mm CGC SGX C, velikost částic 5 µm (Tessek Praha)
- Kolona 250 x 4 Purospher Star RP – 18 endcapped, velikost částic 5 µm (Merck, Darmstadt)
- Vakuová odparka Heidolph, LABORATA 4001
- Třepačka Heidolph Unimax 2010

## 4.2. Chemikálie

- 4-aminoantipyrin čistý, Chemapol
- Agar noble difco laboratories, Detroit
- Vodný roztok amoniaku 10 % p.a., Lachema
- Arbutin pro laboratorní účely, Roth
- Dihydrát chloridu vápenatého, Sigma
- Dihydrát molybdenanu sodného, Sigma
- Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma
- Dusičnan amonný, Lachema
- Dusičnan draselný, Lachema
- Ethanol 96 %, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie na FaF UK

- Glycin p.a., Lachema
- Heptahydrát síranu hořečnatého, Lachema
- Heptahydrát síranu zinečnatého, Lachema
- Heptahydrát síranu železnatého, Lachema
- Hexahydrát chloridu kobaltnatého, Lachema
- Hexakvanoželezitan draselný p.a., Lachema
- Hydrochinon p.a., Lachema
- Hydrolyzát kaseinu, Sigma
- Chloroform p.a., Lachema
- Jodid draselný, Merck
- Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová, Merck
- Kyselina indolyl-3-máselná, Sigma
- Kyselina indolyl-3-octová, Sigma
- Kyselina boritá, Penta
- Kyselina chlorovodíková, Lachema
- Kyselina nikotinová čistá, Lachema
- Methanol gradient grade for liquid chromatography
- Methanol p.a., Lachema
- Methylarbutin izolovaný na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie
- Myo-inositol, Sigma
- N-benzyladenin, Merck
- Pentahydrát síranu měďnatého
- Pyridoxin hydrochlorid DAB 6, Loba Chemie
- Sacharosa p.a., Lach – Ner
- Sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA)
- Tetrahydrát síranu manganatého, Merck
- Thiamin hydrochlorid B.P., U.S.P., Koch – Light Laboratories Ltd.

## Medium podle Murashigeho a Skooga ( M+S ) – složení a příprava:

### 1. MAKROPRVKY

		<u>Zásobní roztok</u>	
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1 650 mg/l	16,5 g	
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1 900 mg/l	19,0 g	doplnit vodou do 1000 ml
<b>CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O</b>	440 mg/l	4,4 g	z toho 100 ml/l média
<b>MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O</b>	370 mg/l	3,7 g	
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170 mg/l	1,7 g	

### 2. ROZTOK KOMPLEX.SOLÍ ŽELEZA

<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	37,3 mg/l	3,73 g	doplnit vodou do 500 ml
<b>FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O</b>	27,8 mg/l	2,78 g	z toho 5 ml/l média

### 3. MIKROPRVKY

<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6,2 mg/l	6,2 g	doplnit vodou do 1000 ml
<b>MnSO<sub>4</sub>·4 H<sub>2</sub>O</b>	22,3 mg/l	22,3 g	z toho 1 ml/l média
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O</b>	11,5 mg/l	11,5 g	
<b>KI</b>	0,83 mg/l	0,83 g	
<b>CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O</b>	0,025 mg/l	0,025 g	
<b>CoCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O</b>	0,025 mg/l	0,025 g	
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O</b> (rozpustit zvlášť)	0,25 mg/l	0,25 g	

### 4. VITAMÍNY

<b>Kys. nikotinová</b>	0,5 mg/l	25,0 mg	doplnit vodou do 50 ml
<b>Pyridoxin·HCl</b>	0,5 mg/l	25,0 mg	z toho 1 ml/l média
<b>Thiamin·HCl</b>	0,5 mg/l	25,0 mg	
<b>Glycin</b>	2,0 mg/l	200,0 mg	do 100 ml, z toho 1 ml

### 5. DALŠÍ PŘÍSADY

<b>Sacharosa</b>	30,0 g/l	naváží se na předvážkách
<b>Agar</b>	10,0 g/l	
<b>Hydrolyzát kaseinu</b>	1000,0 mg/l	naváží se na anal. vahách, stejně i inositol
<b>Inositol</b>	100,0 mg/l	

### 6. RŮSTOVÉ LÁTKY (použité v mé práci) - nepatří ke standardnímu složení

<b>IAA</b> (= indolyl-3-octová kys.)	2,0 mg/l	100 mg/100 ml, z toho
<b>IBA</b> (= indolyl-3-máselná kys.)	2,0 mg/l	2 ml/na 1 l média
<b>2,4 D</b> (= 2,4-dichlorfenoxyoctová kys.)	2,0 mg/l	

- tekuté živné médium se připraví stejným způsobem bez přídavku agaru <sup>28)</sup>.



### 4.3. Použitý biologický materiál

K biotransformačním pokusům byly použity kalusové kultury získané z embryí *Datura meteloides* DC. ex Dunal, které jsou udržovány na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Kultury byly kultivovány na agarovém médiu dle Murashigeho a Skooga s přidavkem auxinového analogu kyseliny 2,4-dichlofenoxyoctové (2,4-D) v koncentraci 1 mg/l a v pravidelném intervalu 4 týdnů pasážovány. K pokusům byla použita pasáž 59.-69.

### 4.4. Pokusné varianty

Pro biotransformační pokusy byly kalusové kultury převedeny na kultury suspenzní kultivované v tekutém živném médiu. Do média byly přidány testované růstové regulátory IAA (3-indolyloctová kyselina) nebo IBA (3-indolylmáselná kyselina) v koncentraci 0,1; 1,0 nebo 10,0 mg/l. Jako prekurzor arbutinu byl používán hydrochinon v koncentraci 100 mg/l a 200 mg/l. Vzorky byly upevněny v Erlenmayerových baňkách na třepačku (frekvence pohybu 120 kmitů za minutu) a k analýze odebírány v intervalu 24, 48 a 168 hodin.

### 4.5. Analýza obsahových látek

#### Příprava extraktu

Kalusy byly odděleny od tekutého živného média a usušeny při pokojové teplotě na skleněných Petriho miskách vyložených filtračním papírem. Pak byly rozetřeny v třecí misce pomocí tloučku. Navážka o hmotnosti cca 0,250 g byla v označených zkumavkách extrahována v 5 ml ethanolu 96% za studena po dobu 48 hodin. Vzniklý extrakt byl následně zfiltrován a odpařen na vodní lázni.

Samotná analýza obsahových látek byla prováděna pomocí dvou chromatografických metod TLC a HPLC.

### 4.5.1. TLC analýza

Na start TLC chromatogramu se vedle sebe nanese roztok vzorku analyzovaného léčiva a roztok vzorku ověřeného standardu léčiva<sup>49</sup>). Pomocí této metody byla provedena kvalitativní analýza extraktů i suspenzního živného média.

**Použité standardy:** 0,1 % methanolický roztok hydrochinonu,  
0,1 % methanolický roztok arbutinu.

**Stacionární fáze (sorbent):** Silufol<sup>®</sup> UV 254 - silikagelové (oxid křemičitý) desky

**Vyvíjecí soustava (mobilní fáze):** chloroform : methanol (75 : 25)

**Detekce:** Po uschnutí chromatogramu se k detekci provedl postupný postřik:

- 4-aminoantipyrinem (0,02 M vodný roztok),
- amoniakem (10% vodný roztok),
- hexakynoželezitanem draselným  $K_3Fe(CN)_6$  (1% vodný roztok).

### 4.5.2. HPLC analýza

Pomocí této metody byla provedena kvantitativní analýza vzorků, které byly před vlastní analýzou rozpuštěny v 1 ml methanolu.

**Parametry přístroje:**

**pumpa:** Philips PU 4110

**detektor:** Philips PU 4110 UV/VIS

**kolona:** Merck, Purospher Star RP-18e, 250x4 mm, 5  $\mu$ m

**vlnová délka:** 285 nm

**průtoková rychlost mobilní fáze:** 1,0 ml/min

**fáze:** 0 - 10min 5% acetonitril / 95% kys. octová 0,5%

10 - 12min 5 - 45% acetonitril / 95 - 55% kys. octová 0,5%

12 - 15min 45% acetonitril / 55% kys. octová 0,5%

**nástřik:** 20  $\mu$ l

# 5. Výsledky

## 5.1. Seznam použitých zkratek

- použité chromatografické metody

TLC ..... Thin-Layer Chromatography  
(Tenkovrstvá chromatografie)

HPLC ..... High-Performance Liquid Chromatography  
(Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

- sledované látky, prekurzory a růstové látky

A ..... Arbutin

H ..... Hydrochinon

IAA ..... Kyselina indolyl-3-octová

IBA ..... Kyselina indolyl-3-máselná

- interpretace výsledků

+ ..... pozitivní výsledek přítomnosti sledované látky na  
TLC chromatogramu nebo HPLC chromatogramu

- ..... negativní výsledek přítomnosti sledované látky na  
TLC chromatogramu nebo HPLC chromatogramu

## 5.2. Výsledky TLC analýzy

### ANALÝZA EXTRAKTŮ KALUSŮ

**Tab. 4.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s **přídavkem IAA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
24 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
24 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	+
24 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 5.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s **přídavkem IAA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
48 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
48 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	+
48 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 6.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s **přídavkem IAA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
168 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
168 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	+
168 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 7.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem IAA

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
24 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	+
24 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
24 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 8.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem IAA

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
48 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	+
48 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
48 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 9.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem IAA

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
168 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	+
168 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
168 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	-

**Tab. 10.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s přísávkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
24 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
24 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	+
24 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 11.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s přísávkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
48 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
48 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	+
48 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 12.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s přísávkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
168 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
168 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	-
168 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	-

**Tab. 13.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
24 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	+
24 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
24 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 14.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
48 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	+
48 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
48 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 15.** Výsledky TLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
168 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	+
168 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
168 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	-	+

## ANALÝZA ŽIVNÉHO MÉDIA

**Tab. 16.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s přídavkem **IAA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
24 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	-
24 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	-
24 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	-

**Tab. 17.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s přídavkem **IAA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
48 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
48 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	+
48 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 18.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s přídavkem **IAA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
168 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
168 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	+
168 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	+



**Tab. 19.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem **IAA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
24 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	-
24 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	-
24 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	-

**Tab. 20.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem **IAA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
48 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	-
48 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
48 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 21.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem **IAA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IAA	hydrochinon	arbutin
168 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	+
168 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
168 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 22.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s přídavkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
24 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	-
24 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	-
24 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	-

**Tab. 23.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s přídavkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
48 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
48 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	+
48 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 24.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l na médiu s přídavkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
168 hodin	100 mg/l	0,1 mg/l	+	+
168 hodin	100 mg/l	1,0 mg/l	+	+
168 hodin	100 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 25.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
24 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	-
24 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	-
24 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	-

**Tab. 26.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
48 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	+
48 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
48 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	+

**Tab. 27.** Výsledky TLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 200 mg/l na médiu s přídavkem **IBA**

čas odběru	koncentrace prekursoru hydrochinonu	koncentrace růstového regulátoru IBA	hydrochinon	arbutin
168 hodin	200 mg/l	0,1 mg/l	+	+
168 hodin	200 mg/l	1,0 mg/l	+	+
168 hodin	200 mg/l	10,0 mg/l	+	+

## 5.3. Výsledky HPLC analýzy

Fri, 12th Feb, 2010 10:37:00

ARB1009

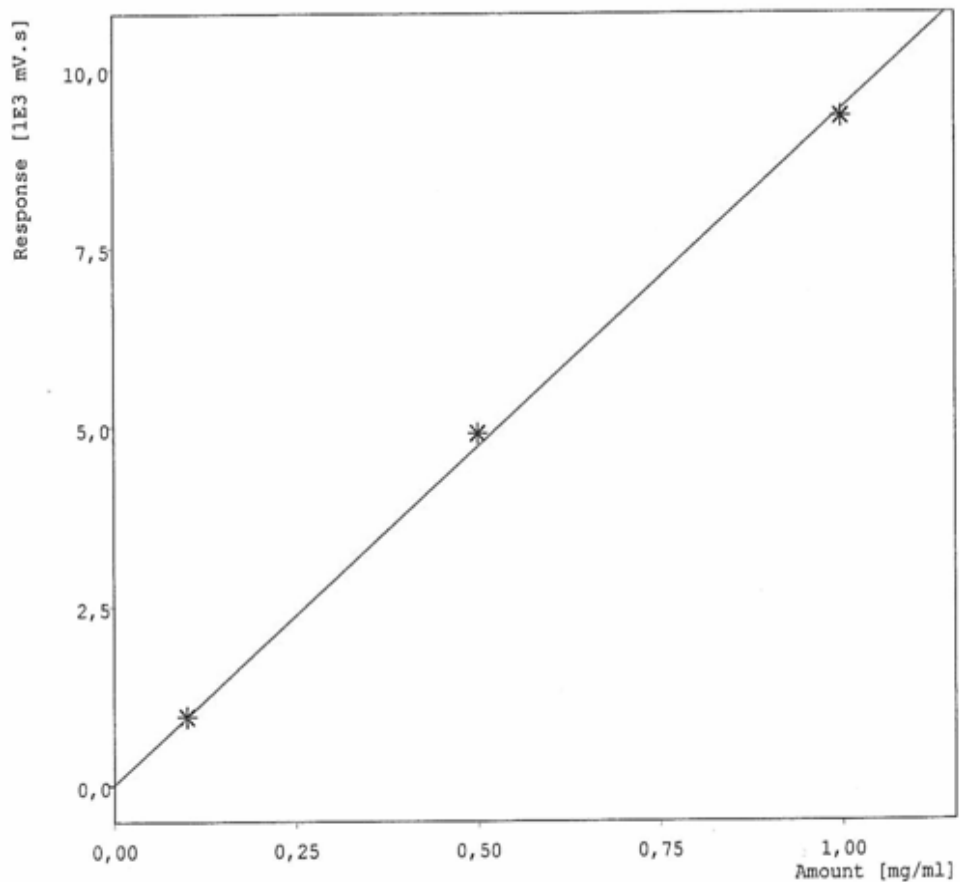
Page 1

arbutin - 4,988 min.

Substance Levels

Lv	Response	Amount	Lvl Res Factor
1	9329,6531	1,000	1,1E-04
2	4899,9910	5,000E-01	1,0E-04
3	948,6812	1,000E-01	1,1E-04
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Peak Type : **Ordnr**  
 Left Window : **0,6 min.**  
 Right Window : **0,6 min.**  
 Response Base : **Area**  
 Curve Fit Type : **Linear**  
 Zero Type : **Curve from Zero**  
 Subst. Equation :  **$Y = 9424,21 * X$**   
 Correlation Coef. : **0,999552**  
 Saved Resp. Fact. : **0,000107185**



Obr. 9. Kalibrační křivka arbutinu

## ANALÝZA EXTRAKTŮ KALUSŮ

**Tab. 28.** Výsledky HPLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přidavkem růstového regulátoru **IAA**

koncentrace růstového regulátoru <b>IAA</b>	koncentrace prekursoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	24 hodin	6,84 %
1,0 mg/l	100 mg/l	24 hodin	7,16 %
10,0 mg/l	100 mg/l	24 hodin	5,26 %
0,1 mg/l	200 mg/l	24 hodin	8,11 %
1,0 mg/l	200 mg/l	24 hodin	7,01 %
10,0 mg/l	200 mg/l	24 hodin	6,72 %

**Tab. 29.** Výsledky HPLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přidavkem růstového regulátoru **IAA**

koncentrace růstového regulátoru <b>IAA</b>	koncentrace prekursoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	48 hodin	4,49 %
1,0 mg/l	100 mg/l	48 hodin	4,13 %
10,0 mg/l	100 mg/l	48 hodin	1,70 %
0,1 mg/l	200 mg/l	48 hodin	6,49 %
1,0 mg/l	200 mg/l	48 hodin	6,65 %
10,0 mg/l	200 mg/l	48 hodin	0,85 %

**Tab. 30.** Výsledky HPLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přidavkem růstového regulátoru **IAA**

koncentrace růstového regulátoru <b>IAA</b>	koncentrace prekursoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,26 %
1,0 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,37 %
10,0 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,08 %
0,1 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,71 %
1,0 mg/l	200 mg/l	168 hodin	2,92 %
10,0 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,01 %

**Tab. 31.** Výsledky HPLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 24 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přidavkem růstového regulátoru **IBA**

koncentrace růstového regulátoru <b>IBA</b>	koncentrace prekursoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	24 hodin	2,27 %
1,0 mg/l	100 mg/l	24 hodin	1,65 %
10,0 mg/l	100 mg/l	24 hodin	2,14 %
0,1 mg/l	200 mg/l	24 hodin	1,90 %
1,0 mg/l	200 mg/l	24 hodin	7,15 %
10,0 mg/l	200 mg/l	24 hodin	4,02 %

**Tab. 32.** Výsledky HPLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přidavkem růstového regulátoru **IBA**

koncentrace růstového regulátoru <b>IBA</b>	koncentrace prekursoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	48 hodin	4,10 %
1,0 mg/l	100 mg/l	48 hodin	3,68 %
10,0 mg/l	100 mg/l	48 hodin	4,25 %
0,1 mg/l	200 mg/l	48 hodin	1,82 %
1,0 mg/l	200 mg/l	48 hodin	1,32 %
10,0 mg/l	200 mg/l	48 hodin	1,97 %

**Tab. 33.** Výsledky HPLC analýzy extraktů kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekursoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přidavkem růstového regulátoru **IBA**

koncentrace růstového regulátoru <b>IBA</b>	koncentrace prekursoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,05 %
1,0 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,14 %
10,0 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,01 %
0,1 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,04 %
1,0 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,02 %
10,0 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,23 %

## ANALÝZA ŽIVNÉHO MÉDIA

**Tab. 34.** Výsledky HPLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekurzoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přídavkem růstového regulátoru **IAA**

koncentrace růstového regulátoru <b>IAA</b>	koncentrace prekurzoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	48 hodin	0,068 %
1,0 mg/l	100 mg/l	48 hodin	0,084 %
10,0 mg/l	100 mg/l	48 hodin	0,121 %
0,1 mg/l	200 mg/l	48 hodin	—
1,0 mg/l	200 mg/l	48 hodin	0,063 %
10,0 mg/l	200 mg/l	48 hodin	0,066 %

**Tab. 35.** Výsledky HPLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekurzoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přídavkem růstového regulátoru **IAA**

koncentrace růstového regulátoru <b>IAA</b>	koncentrace prekurzoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,384 %
1,0 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,292 %
10,0 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,268 %
0,1 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,641 %
1,0 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,260 %
10,0 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,042 %

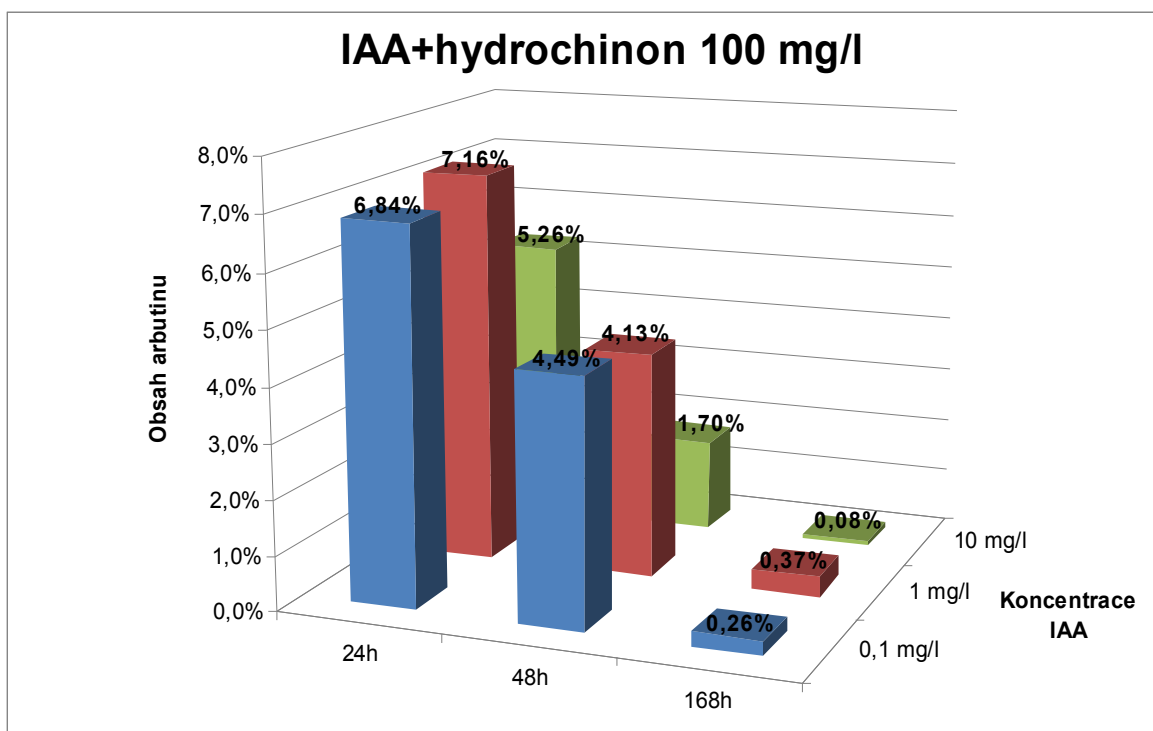


**Tab. 36.** Výsledky HPLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 48 hodinách kultivace s koncentrací prekurzoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přidavkem růstového regulátoru **IBA**

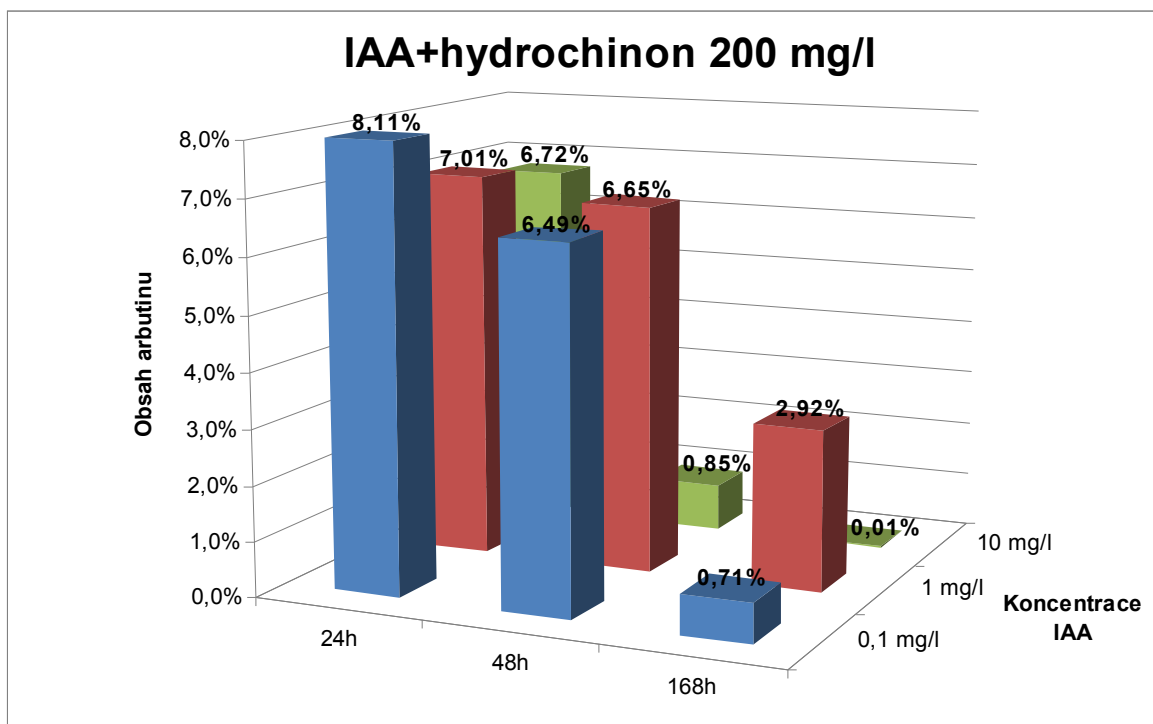
koncentrace růstového regulátoru <b>IBA</b>	koncentrace prekurzoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	48 hodin	0,117 %
1,0 mg/l	100 mg/l	48 hodin	0,091 %
10,0 mg/l	100 mg/l	48 hodin	0,151 %
0,1 mg/l	200 mg/l	48 hodin	0,089 %
1,0 mg/l	200 mg/l	48 hodin	0,034 %
10,0 mg/l	200 mg/l	48 hodin	0,065 %

**Tab. 37.** Výsledky HPLC analýzy živného média kultury *Datura meteloides* po 168 hodinách kultivace s koncentrací prekurzoru hydrochinonu 100 mg/l a 200 mg/l na médiu s přidavkem růstového regulátoru **IBA**

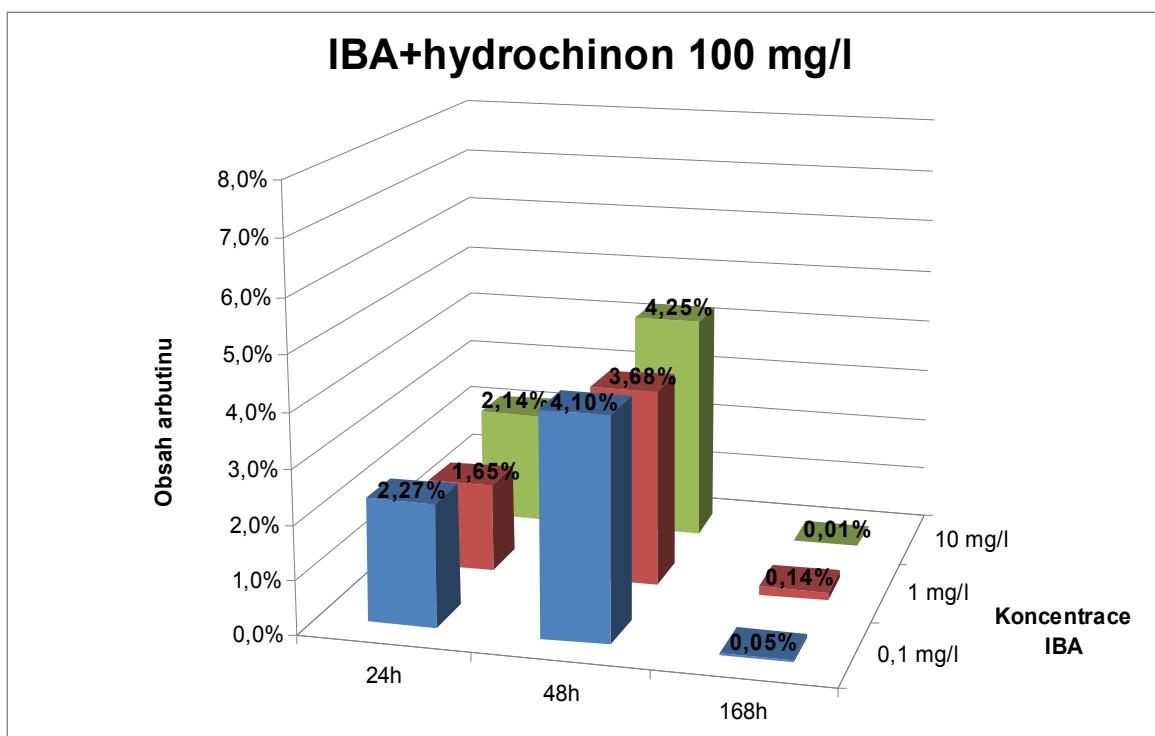
koncentrace růstového regulátoru <b>IBA</b>	koncentrace prekurzoru hydrochinonu	čas odběru	procentuální obsah arbutinu
0,1 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,523 %
1,0 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,684 %
10,0 mg/l	100 mg/l	168 hodin	0,256 %
0,1 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,634%
1,0 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,086 %
10,0 mg/l	200 mg/l	168 hodin	0,287 %



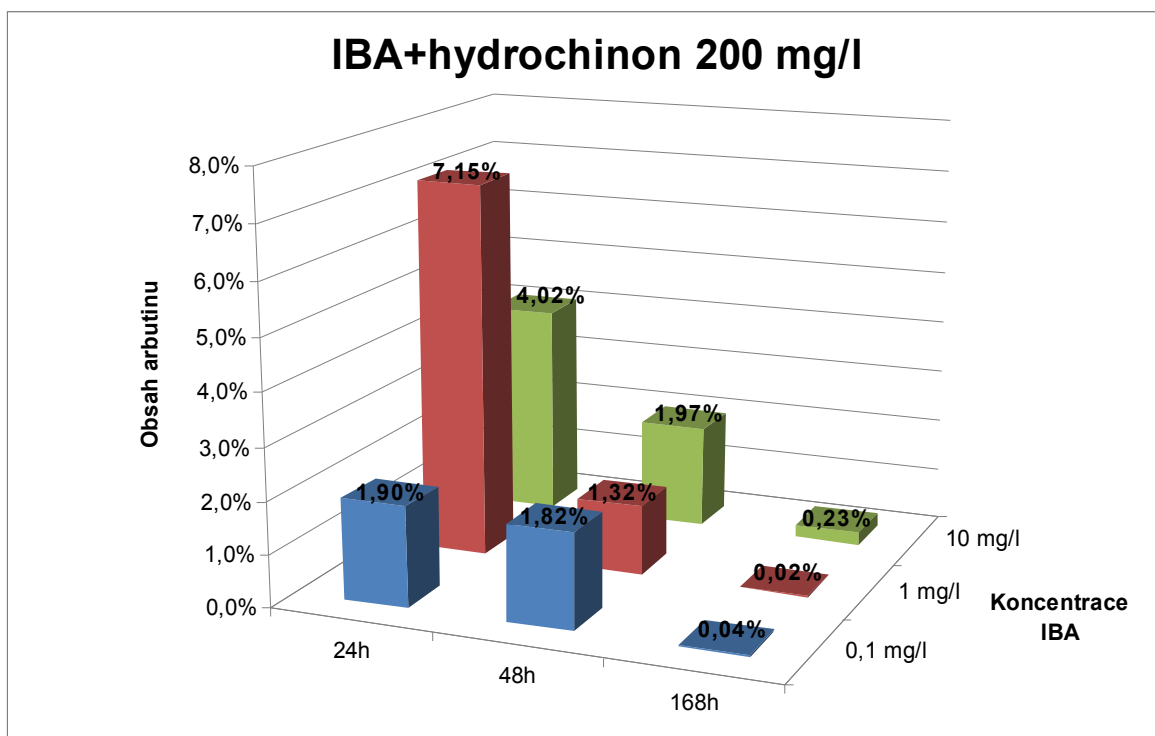
Obr. 10. Graf závislost obsahu arbutinu (%) na koncentraci hydrochinonu, růstového regulátoru IAA a době kultivace u extraktů suspenzní kultury *Datura meteloides*



Obr. 11. Graf závislosti obsahu arbutinu (%) na koncentraci hydrochinonu, růstového regulátoru IAA a době kultivace u extraktů suspenzní kultury *Datura meteloides*



Obr. 12. Graf závislosti obsahu arbutinu (%) na koncentraci hydrochinonu, růstového regulátoru IBA a době kultivace u extraktů suspenzní kultury *Datura meteloides*



Obr. 13. Graf závislosti obsahu arbutinu (%) na koncentraci hydrochinonu, růstového regulátoru IBA a době kultivace u extraktů suspenzní kultury *Datura meteloides*

## 6. Diskuze

Explantátové kultury jsou již celou řadu let úspěšně využívány k produkci sekundárních metabolitů, k rozmnožování a šlechtění rostlin. Význam a úkoly šlechtění spočívají v zajišťování produkce potravin pro lidskou populaci, v obohacování flóry Země o nové genotypy, ať už jde o nové kultivary, hybridy či nové druhy<sup>50)</sup>. Vyprodukované sekundární metabolity se využívají zejména ve farmaceutickém průmyslu.

Úkolem mé diplomové práce bylo zjistit biotrasformační aktivitu tkáňové kultury *Datura meteloides* DC. ex Dunal po přidání exogenního prekurzoru arbutinu (hydrochinon) v přítomnosti dvou různých typů růstových regulátorů v tekutém živném médiu. Výchozí kalusová kultura použitá k pokusům byla dlouhodobě kultivována na médiu dle Murashigeho a Skooga s přidavkem auxinového analogu 2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetová kyselina) v koncentraci 1 mg/l. Pro biotrasformační pokusy byla kalusová kultura převedena na kulturu suspenzní. Hydrochinon byl používán v koncentraci 100 mg/l a 200 mg/l. Jako růstové regulátory byly použity IAA (indolyl-3-octová kyselina) a IBA (indolyl-3-máselná kyselina) v koncentraci 0,1; 1,0 a 10,0 mg/l. Pokusy byly prováděny za světla, vzorky k analýze se odebíraly v časovém intervalu po 24, 48 a 168 hodinách.

Produkce sekundárního metabolitu arbutinu byla hodnocena v extraktech kultur a v tekutém živném médiu pomocí kontrolně - analytické metody tenkovrstvé chromatografie (TLC) a následně ověřována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), díky níž bylo stanoveno i procentuální zastoupení arbutinu ve vzorcích.

Má práce navazuje na diplomovou práci Hanky Mrákové, která prováděla pokusy s růstovými látkami 2,4-D (kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová) a NAA (kyselina  $\alpha$ -naftylacetová) a prekurzorem hydrochinonem ve stejných koncentracích a časech odběru<sup>11)</sup>.

Provedenými pokusy byla v obou případech prokázána schopnost suspenzní kultury *Datura meteloides* DC. ex Dunal biotransformovat prekurzor hydrochinon na arbutin bez ohledu na typ a koncentraci růstové látky, koncentraci prekurzoru a délku prováděného pokusu. V extraktech kultur byla TLC analýzou zjištěna přítomnost arbutinu a množství nezmetabolizovaného hydrochinonu u všech vzorků.

TLC i HPLC analýza prokázala přítomnost arbutinu a hydrochinonu také v tekutých živných médiích u pokusů v časech odběru 48 a 168 hodin u obou typů růstových regulátorů IAA a IBA.

Nejvyšší procentuální obsah arbutinu v extraktu kultury (8,11 %) byl zjištěn u vzorku s 24 hodinovou kultivací s hydrochinonem o koncentraci 200 mg/l a růstovým regulátorem IAA o koncentraci 0,1 mg/l.

Nejvyšší obsah arbutinu v živném médiu (0,68 %) byl u vzorku v čase 168 hodin s koncentrací hydrochinonu 100 mg/l a koncentrací růstového regulátoru IBA 1,0 mg/l, kdy byl naopak v extraktu kultury zaznamenán výrazný pokles arbutinu. U vzorků s delší dobou kultivace (168 hodin) byl tento pokles koncentrace arbutinu v extraktu kultury způsoben pravděpodobně transportem arbutinu z kultury do živného média.

Ve většině případů kultury s koncentrací prekurzoru hydrochinonu 200 mg/l produkovaly více arbutinu než kultury s obsahem prekurzoru hydrochinonu 100 mg/l. Při použití růstového regulátoru IAA byly získány vyšší výtěžky arbutinu oproti růstovému regulátoru IBA.

Neprokázala jsem, že by zvyšující se koncentrace růstového regulátoru, jak v případě IAA tak i IBA, viditelně zvyšovala procentuální obsah arbutinu v extraktu kultury, což bylo publikováno v některých pracích mých kolegů a kolegyně <sup>11), 53)</sup>. U kultury kultivované na médiu s IAA byl procentuální obsah arbutinu vyšší u koncentrace 0,1 a 1,0 mg/l než u koncentrace 10,0 mg/l. Koncentrace IBA procentuální obsah arbutinu výrazně neovlivnila.

Nejvyšší výtěžky u vzorků z extraktů kultur jsem získala po 24 hodinové kultivaci. S délkou kultivace obsah arbutinu klesal. Zde je odlišnost od pokusů Hany Mrákové, která prokázala, že při použití růstových regulátorů 2,4-D a NAA za stejných podmínek se zvyšoval procentuální obsah arbutinu s délkou kultivační doby, tudíž nejvyšší obsah arbutinu zaznamenala po 168 hodinové kultivaci (u NAA - 1,81 % a u 2,4-D - 1,42 %) <sup>11)</sup>. Obsah arbutinu při použití růstových látek 2,4-D a NAA byl podstatně nižší než při použití růstových regulátorů IAA a IBA, které byly použity v mých pokusech.

Provedenými pokusy jsem získala obdobné výtěžky arbutinu (8,11 %) jako byly v minulosti získány na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie s kulturou *Datura meteloides*, která po přidání hydrochinonu a týdenní kultivaci produkovala až 7,4 % arbutinu, což odpovídá přibližně množství v intaktní rostlině *Arctostaphylos uva-ursi*, kde se pohybuje mezi 3-12 % <sup>51)</sup>.

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, byly provedeny i biotransformační pokusy s kulturami *Schisandra chinensis*, *Coronilla varia* a *Leuzea carthamoides*, u kterých byla zjišťována možnost produkce arbutinu a salicinu. K těmto kulturám byly přidávány prekurzory arbutinu a salicilinu (fenylalanin, kyselina skořicová, p-kumarová, p-anisová, o-kumarová, kyselina salicylová, salicylaldehyd, helicin a hydrochinon). Testované prekurzory byly použity vždy v koncentraci 100 mg/l a doba jejich působení byla 6, 12, 24, 48 a 168 hodin. Pozitivní výsledky byly prokázány TLC a HPLC analýzou u kultury *Schisandra chinensis* při použití hydrochinonu, přičemž největší koncentrace arbutinu byla po týdenní kultivaci (5,08 %) a zároveň docházelo i k uvolňování arbutinu do živného média <sup>46)</sup>.

Transformační pokusy se suspenzní kulturou *Rauwolfia serpentina* přinesly zajímavé výsledky. Kontinuální přidávání hydrochinonu v koncentraci 200 mg/l vedlo po 168 hodinové kultivaci k zisku arbutinu v množství 18 g/l <sup>52)</sup>.

Závěrem lze konstatovat, že předmětem dalších pokusných variant s cílem zvýšit produkci arbutinu by mohlo být použití dalších růstových regulátorů, případně jejich kombinací, nově odvozené kultury, další zvýšení koncentrace hydrochinonu nebo změny ve složení živného média <sup>53)</sup>.

## 7. Závěr

- 1) Byla prokázána schopnost suspenzní kultury *Datura meteloides* DC. ex Dunal biotransformovat prekurzor hydrochinon na arbutin.
- 2) Přítomnost arbutinu v extraktu kultury byla zjištěna pomocí TLC a následně HPLC při použití obou růstových látek IAA a IBA a jejich tří testovaných koncentracích (0,1; 1,0; 10,0 mg/l), obou koncentrací prekurzoru hydrochinonu (100 a 200 mg/l) a všech sledovaných intervalech odběru kultury (24, 48, 168 hodin).
- 3) Nejvyšší procentuální obsah arbutinu v extraktu kultury (8,11 %) byl zjištěn po 24 hodinové kultivaci s hydrochinonem o koncentraci 200 mg/l a růstovým regulátorem IAA o koncentraci 0,1 mg/l.
- 4) Přítomnost arbutinu byla prokázána i v živném médiu a to v čase odběru 48 a 168 hodin. Vyšší množství arbutinu v živném médiu bylo u vzorků v čase odběru 168 hodin, kdy byl naopak v extraktech kultury zaznamenán výrazný pokles arbutinu.
- 5) Nejvyšší obsah arbutinu v živném médiu (0,68 %) byl u vzorku v čase odběru 168 hodin s koncentrací hydrochinonu 100 mg/l a koncentrací IBA 1,0 mg/l.
- 6) Vyšší produkci arbutinu ve většině případů vykazovaly kultury při použití prekurzoru hydrochinonu v koncentraci 200 mg/l.
- 7) Při použití růstového regulátoru IAA byly získány vyšší výtěžky arbutinu oproti růstovému regulátoru IBA.

## 8. Použitá literatura

1. Fytoterapie - přírodní medicína [online]. Arkokapsle, [cit. 2009-10-21].  
[www.arkokapsle.cz/O-fytoterapii.aspx](http://www.arkokapsle.cz/O-fytoterapii.aspx)
2. Grubcov V. G., Beneš K.: Zelená lékárna. 2. vyd., Lidové nakladatelství, Praha 1985
3. Stöckigt J., Koblitz P., Falkenhagen H., Lutterbach R., Endeß S.: Natural products and enzymes from plant cell cultures. Springer Netherlands, Amsterdam 1995
4. Sudha G., Ravishankar G. A. : Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71. Kluwer Academic Publishers, Netherland 2002
5. Vaněk T.: Produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami vyšších rostlin. Chem. listy 83, 1989, 287-300
6. Jahodář L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty. Karolinum, Praha 2000
7. Barešová H.: Produkce sekundárních metabolitů v tkáňových kulturách rostlin. Biol. listy 51, 1986, 103-117
8. Yeoman M. M., Miedzybrodzka M. B., Lindsey K., McLauchlan W. R.: Production of some secondary products from date palm tissue cultures (semi cultivar) using some precursor 2 – Embryogenesis stage. In Sala F., Parisi B., Cella R., Cifferi O. (eds.), Plant cell cultures. Results and perspectives, Elsevier, Amsterdam 1980 cit. dle [7] a dle [5]
9. Staba J. E.: Tissue culture and pharmacy. In Reinert J., Bajaj S. P. Y.: Plant cell, tissue and organ culture. Springer Verlag, Berlin 1977
10. Nádaská M.: Využití rostlinných bunkových kultur pro produkciu a získavanie sekundárnych prírodných látok. Biol. listy 56, 1991, 81-91
11. Mráková H.: Explantátové kultury vyšších rostlin 31. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2009
12. Genetika rostlinných explantátových kultur *in vitro* [online]. [cit. 2010-01-03].  
<http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/prednasky/Metody-kultivace-tkani-a-bunek---BLS-6c3eb74cee.doc>



13. Opatrný Z.: Množení a šlechtění rostlin metodou explantátových kultur. Zemědělská škola č. 6/XXXV, 1985, 82-84
14. Řeřábek J., Opatrný Z.: Kultury rostlinných explantátů in vitro (Historie, problematika a návrh terminologie). Biol. listy 36, 1971, 206-222
15. Novák J. F.: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Academia, Praha 1990
16. Dubová J., Smíšková A.: Od rostlinné kultury „in vitro“ k biotechnologiím. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Ústav experimentální biologie, Oddělení fyziologie a anatomie rostlin [online]. [cit. 2010-01-02]. <http://svp.muni.cz/ukazat.php?docId=592>
17. Navrátilová B.: Techniky explantátových kultur [online]. [cit. 2009-12-21]. <http://botany.upol.cz/prezentace/navratil/explant.pdf>
18. [http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/rosl\\_explant/1\\_EXPL.ppt#258,5](http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/rosl_explant/1_EXPL.ppt#258,5), Snímek 5 [online]. [cit. 2009-12-26].
19. Dušek J., Dušková J., Tůmová L., Spilková J.: Biotechnologické využití kultur vyšších rostlin in vitro. Čes. a Slov. Farm. 45, 1996, 204-212
20. Kováč J.: Tkáňové kultury a jejich využití k mikropropagaci rostlin. Přír. vědy 42, 1991, 122-125
21. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty. 3. vyd., Karolinum, Praha 2001
22. Rakouský S.: Rostlinné explantáty. České Budějovice 2000 [cit. 2010-03-16]. [http://cs.wikipedia.org/wiki/Rostlinn%C3%A9\\_explant%C3%A1ty](http://cs.wikipedia.org/wiki/Rostlinn%C3%A9_explant%C3%A1ty)
23. Kohno H., Yoshida F.: Cultures of chlorophyllous tobacco-cell not requiring any organic additives except sucrose in the medium I. Effect of light and temperature on the growth of the cells. Plant Cell Physiol. 18, 1977, 907
24. Martin S. M.: Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Raton 1980 cit. dle [7]
25. Kouba M.: Krása TC [online]. [cit. 2010-02-23]. [http://www.foxcpng.com/clanky/Michal%20Kouba\\_Krasa%20TC\\_6.pdf](http://www.foxcpng.com/clanky/Michal%20Kouba_Krasa%20TC_6.pdf)
26. Partlová I.: Studium druhu *Drosophyllum lusitanicum* Link. v kultuře in vitro a možnosti produkce naftochinonového derivátu plumbaginu. Disertační práce, Univerzita Komenského, Farmaceutická fakulta, Bratislava 1995

27. Sikyta B.: Biotechnologie ve farmacii. Avicenum, Praha 1987
28. Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 1962, 473-497
29. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 1968, 151-158
30. Šetlík I., Seidlová F., Šantrůček J.: Fyziologie rostlin. Učební texty Biologické fakulty Jihočeské univerzity, Jihočeská univerzita, České Budějovice 2004
31. Stud. materiály Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity [online]. [cit. 2010-01-23]. [http://home.zf.jcu.cz/public/departments/kbd/fyzroaek/fyzro\\_1\\_zem/5c\\_Fytohormony.pdf](http://home.zf.jcu.cz/public/departments/kbd/fyzroaek/fyzro_1_zem/5c_Fytohormony.pdf)
32. Pracoviště molekulární biologie, Ústav molekulární biologie a radiobiologie, Brno [online]. [cit. 2010-01-24]. <http://molecularbiology.deg.cz/oblasti-vyzkumu/auxiny>
33. Procházka S., Šebánek J.: Regulátory rostlinného růstu. Academia, Praha 1997
34. Chae H. S., Kieber J. J.: Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trend Plant Sci.* 10, 2005, 291-296
35. Stearns J. C., Glick B. R.: Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnol. Adv.* 21, 2003, 193-210
36. Dušková J., Dušek J., Opatrná J.: Vliv orgánového původu explantátu a stupně diferenciaci tkáňové kultury *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. A cv. *Arbuta* na produkci metabolitů. *Čes. a Slov. Farm.* 40, 1991, 83-85
37. Dušková J., Jahodář L., Dušek J.: *Arctostaphylos uva-ursi* (L.), Spreng. a cv. *Arbuta* in vitro – studium vlivu prekurzorů. *Čes. a Slov. Farm.* 39, 1990, 52-54
38. Mühlbach P. H.: Use of plant cell cultures in biotechnology. *Biotechnol. Ann. Rev.* 4, 1998, 113-176
39. Jahodář L.: Farmakobotanika. Karolinum, Praha 2009
40. Korbelář J., Endris Z.: Naše rostliny v lékařství. 6.vyd., Avicenum, Praha 1981
41. Rood T. a kol.: Botanika. 1.vyd., Slovart s.r.o., Praha 2007
42. Jirásek V., Starý F.: Atlas léčivých rostlin. 2.vyd., Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989

43. Hrdina V. a kol.: Přírodní toxiny a jedy. Galén, Karolinum, Praha 2004
44. Kol. autorů: Český lékopis 2009. Grada Publishing, a.s., Praha 2009
45. Tomko J. a kol.: Farmakognózia. Osveta, Martin 1999
46. Dušková J., Dušek J., Jahodář L., Poustka F.: Arbutin, salicin – možnosti jejich biotechnologické produkce. Čes. a Slov. Farm. 54, 2005, 78-81
47. Kratochvil F.: Arbutin - bezpečné řešení pigmentových skvrn. Pharma News 6, 2007, 23-26
48. Jahodář L., Jílek P., Pátková M., Dvořáková V.: Antimikrobiální působení arbutinu a extraktu z listů medvědice léčivé in vitro. Čes. a Slov. Farm. 34, 1985, 174-178
49. Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I. Karolinum, Praha 2006
50. Graman J., Čurn V.: Šlechtění rostlin – obecná část. Učební texty Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity, Jihočeská univerzita, České Budějovice 1998
51. Dušková J., Dušek J., Jahodář L.: Zur Biotransformation von Hydrochinon zu Arbutin in den in vitro Kulturen. Herba Pol. 45, 1999, 23-26
52. Lutterbach R., Stöckigt J.: High-yield formulation of arbutin from hydroquinone by cell-suspension cultures of *Rauwolfia serpentina*. Hel. Chim. Acta 75, 1992, 2009
53. Kostřiba J.: Explantátové kultury vyšších rostlin 27. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2007