

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
F a r m a c e u t i c k á   f a k u l t a  
v   H r a d c i   K r á l o v é  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

RŮSTOVÉ A PRODUKČNÍ CHARAKTERISTIKY KULTURY  
FAGOPYRUM ESCULENTUM IN VITRO – I.  
(DIPLOMOVÁ PRÁCE)

Hradec Králové, 2006

Markéta Píchová

180

Katedra  
farmakognozie  
Farmaceutická fakulta  
v Hradci Králové

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a veškeré informace a literární prameny, které jsem použila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Hradci Králové dne

Markéta Píchová

*Markéta Píchová*

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení v průběhu diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat pracovníkům katedry farmakognozie za pomoc a vytvoření dobrých pracovních podmínek.

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	6
1. ÚVOD .....	7
2. CÍL PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1 POHANKA OBECNÁ .....	9
3.1.1 <i>Botanický popis</i> .....	9
3.1.2 <i>Původ a výskyt</i> .....	9
3.1.3 <i>Charakteristika drogy</i> .....	10
3.1.4 <i>Obsahové látky</i> .....	10
3.1.5 <i>Použití pohanky</i> .....	11
3.2 FLAVONOIDY.....	12
3.2.1 <i>Charakteristika a rozdělení</i> .....	12
3.2.2 <i>Biosyntéza flavonoidů</i> .....	12
3.2.3 <i>Flavonoidy v terapii</i> .....	13
3.2.4 <i>Rutin</i> .....	14
3.3 ROSTLINNÉ KULTURY IN VITRO .....	16
3.3.1 <i>Explantátové kultury</i> .....	16
3.3.2 <i>Rozdělení explantátových kultur</i> .....	16
3.3.3 <i>Kalusové kultury</i> .....	17
3.3.4 <i>Podmínky při kultivaci</i> .....	17
3.3.5 <i>Růst kultury</i> .....	19
3.3.6 <i>Produkce kultury</i> .....	20
3.3.7 <i>Výhody a využití explantátových kultur</i> .....	21
3.4 RŮSTOVÉ REGULÁTORY .....	22
3.4.1 <i>Charakteristika</i> .....	22
3.4.2 <i>Rozdělení růstových regulátorů</i> .....	22
3.4.3 <i>Možnosti působení hormonů</i> .....	22
3.4.4 <i>Auxiny</i> .....	23
3.4.5 <i>Gibereliny</i> .....	24
3.4.6 <i>Cytokininy</i> .....	25
3.4.7 <i>Kyselina abscisová</i> .....	25
3.4.8 <i>Ethylen</i> .....	26
3.4.9 <i>Růstové regulátory použité v této práci</i> .....	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	28

4.1 MATERIÁL .....	28
4.1.1 Biologický materiál .....	28
4.1.2 Chemikálie.....	28
4.1.3 Pomůcky a přístroje.....	29
4.2 PRACOVNÍ POSTUP .....	30
4.2.1 Aseptická příprava pomůcek a pracovního prostředí .....	30
4.2.2 Příprava živného média.....	30
4.2.3 Odvození kalusové kultury <i>Fagopyrum esculentum</i> .....	31
4.2.4 Kultivace kalusové kultury <i>Fagopyrum esculentum</i> .....	31
4.2.5 Vyhodnocení růstu kultury.....	32
4.2.6 Stanovení ztráty sušením .....	32
4.2.7 Stanovení obsahu flavonoidů .....	33
4.2.8 Růstová a produkční křivka .....	34
4.2.9 Statistické zpracování.....	35
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>37</b>
5.1 TABULKY .....	37
5.2 GRAFY .....	60
<b>6. DISKUSE .....</b>	<b>69</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>73</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>74</b>

## SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
$\alpha$ -NAA	kyselina $\alpha$ -naftyloctová
ATP	adenosintrifosfát
BAP	6-benzylaminopurin
ČL 97	Český lékopis 1997
ČL 2002	Český lékopis 2002
ČSSR	Československá socialistická republika
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
EDTA	ethylendiamin-tetraoctová kyselina
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IgE	imunoglobulin E
K	6-furfurylaminopurin (kinetin)
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
MS médium	živné médium podle Murashigeho a Skooga
nsr	normální světelný režim denní fotoperiody
OF	obsah flavonoidů
RANK protein	transmembránový receptor na prekurzorech osteoklastů
RF	růstový faktor
RNA	ribonukleová kyselina

## 1. ÚVOD

Rostlinné sekundární metabolity se většinou získávají z intaktních rostlin nebo chemickou syntézou. Hlavním problémem získávání žádaných látek z intaktních rostlin je, že velká část druhů rostlin v současné době přichází o své životní prostředí. Dochází k jejich úbytku a s obtížnostmi při pěstování roste i cena obsahových látek. Nevýhodou při pěstování v přírodních podmínkách je i velká závislost obsahu žádaných látek na klimatických podmínkách, dále na postupu sušení a skladování rostlin.

Nevýhodou chemických syntéz je častá obtížnost provedení a finanční náročnost. U složitějších látek jsou chemické syntézy zatím neuskutečnitelné. (4)

V posledních desetiletích se v rostlinné biologii intenzivně rozvíjí a v některých oblastech i využívají metody explantátových kultur. Explantátové kultury umožňují rychlou regeneraci rostlin z různých částí orgánů, pletiv a buněk. Pro úspěšný průběh regenerace rostlin v umělých podmínkách (*in vitro*) je nutné zvolit nejen vhodné živné médium, tepelné a světelné podmínky, ale i zajistit sterilizaci prostředí a materiálu. (3)

Explantátové kultury rostlin se mohou v průmyslové produkci sekundárních metabolitů uplatňovat na několika úrovních. Především je možné explantátové kultury využívat k vlastnímu množení rostlin významných z hlediska produkce sekundárních metabolitů. Po zjištění, že rostlinné tkáňové kultury mohou sekundární metabolity produkovat, je snaha využívat je stejně jako kultury mikroorganismů. Pomocí explantátových kultur se mohou selektovat kultivary s vysokou produkcí sekundárních metabolitů.

Explantátové kultury rostlin se mohou využívat k biochemickým, fyziologickým, morfologickým a genetickým studiím. Jejich využití není omezeno pouze na oblast základního a aplikovaného výzkumu, ale v řadě vyspělých zemí se staly nedílnou součástí zemědělské produkce rostlin. (4)

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je seznámení s metodikou kultivace rostlinných kultur in vitro. Dále založení kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* a odvození růstové charakteristiky této kultury při růstu na médiu s obsahem různých růstových regulátorů při měnících se koncentracích. Zároveň stanovení obsahových látek - flavonoidů spektrofotometricky.



### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Pohanka obecná

##### 3.1.1 Botanický popis

Pohanka obecná je rostlina dvouděložná, patří do čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*) a rodu *Fagopyrum*. Český název je pohanka obecná nebo střelovitá či setá, latinský název je *Fagopyrum esculentum Moench*. (1) Příbuznou rostlinou je pohanka tatarská, *Fagopyrum tataricum Gaertner*. (9)

Pohanka obecná je jednoletá rostlina s lysou, zřídka pýřitou lodyhou, dorůstající přibližně půlmetrové výšky. V průběhu roku lodyha obvykle zčervená. Listy má dlouze řapíkaté, srdčité trojúhlé, celokrajné, špičaté. Květy vytváří úžlabní laty, jsou dlouze stopkaté, krátké, husté. (1) Květ tvoří pět okvětních lístků, bílých nebo řidčeji bledě růžových. (16) Zvláštností pohanky je tvorba dvou typů květů podle délky čnělek: dlouhočnělečné a krátkočnělečné. Tento jev se nazývá různočnělečnost (heterostylie). (1) Plodem jsou ostře hranaté nažky. (9)

##### 3.1.2 Původ a výskyt

Pohanka pochází z Asie, patrně z oblasti mezi Bajkalským jezerem a Mandžuskem. Patří k nejmladším kulturním rostlinám. Do Evropy se dostala až ve 13. století z východu. Na našem území se hojněji pěstovala asi od 16. století, a to zejména v horských oblastech na chudých půdách Beskyd, v karpatské oblasti a na východním Slovensku. V současné době se její pěstování na našem území opět obnovuje. (10)

Někteří autoři rozlišují dva typy odrůd. Jeden typ z oblasti Japonska, Koreje, jižní Číny, Nepálu a Indie, kde jsou rostliny vysokého vzrůstu, silně olistěné a později zrající. Tyto odrůdy potřebují k tvorbě generativních orgánů minimálně desetihodinovou délku dne. V Evropě a severní Číně je druhý typ odrůd, kde stačí devítihodinový den k nasazení generativních orgánů. Jsou to odrůdy ranější, méně vzrůstné a olistěné. (1)

### 3.1.3 Charakteristika drogy

Léčebně se využívá především kvetoucí nať (*Herba fagopyri*), případně i slupky. Z nati se získává rutin. Pohankové nažky (*Semen fagopyri*) tvoří hodnotnou potravinu s dostatkem vlákniny. (9)

### 3.1.4 Obsahové látky

Pohanka obsahuje flavonoidy rutin, isoorientin, orientin, vitexin. (30) Nejdůležitější obsahovou látkou v kvetoucí nati a ve slupkách plodů je rutin. V plodech nacházíme komplex vitaminů skupiny B, vitamin E a řadu prvků, především draslík, fosfor, hořčík, vápník a ve stopách železo, měď, mangan a zinek. Léčebně zajímavý je i obsah cholinu a skutečnost, že pohankové nažky obsahují řadu plnohodnotných bílkovin. Fagopyrin obsažený v pohance způsobuje přecitlivělost na světlo. (9) Obsah bílkovin v semenech pohanky je 10-14 %, obsah škrobu je od 55-70 %, olejnatost semen je 1,5-3,7 %, obsah celkové vlákniny v semenech je 3,4-5,2 %. Z vícenenasycených mastných kyselin je významný obsah kyseliny linolové. (34) Lipidy z pohanky obsahují 0,2 % fyziologicky aktivních rostlinných sterolů: sitosterol a campesterol. (33) Hlavní fenolické látky ve slupkách a mouce pohanky jsou rutin, 2-epikatechin, hyperosid a kvercetin. (29)

Semena pohanky obsahují proteiny, které mohou způsobit hypersenzitivní reakci. Hlavní alergizující protein je Fag e 1. Bylo identifikováno osm epitopů a rozhodující aminokyseliny pro vazbu s IgE. (11)

Ze semen pohanky byly izolovány čtyři nové proteinové kationické inhibitory serinové proteinázy (BWI - 1c, 2c, 3c, 4c). Tyto inhibitory mají inhibiční účinek na enzymy živočišného a bakteriálního původu. Inhibují extracelulární proteázu vláknitých hub a potlačují klíčení spór a růst hyf vláknitých hub. To může ukazovat na jejich účast při obranných reakcích rostlin proti napadení patogeny. (13)

Pohanka je i zdrojem selenu. Obsah selenu v semenech pohanky se zvýšil asi 8,5 krát po aplikaci roztoku selenu na listy ve fázi kvetení.

Tato metoda by z pohanky vytvořila bohatý zdroj selenu a užitečnou surovinu pro obohacení potravinářských výrobků. (14)

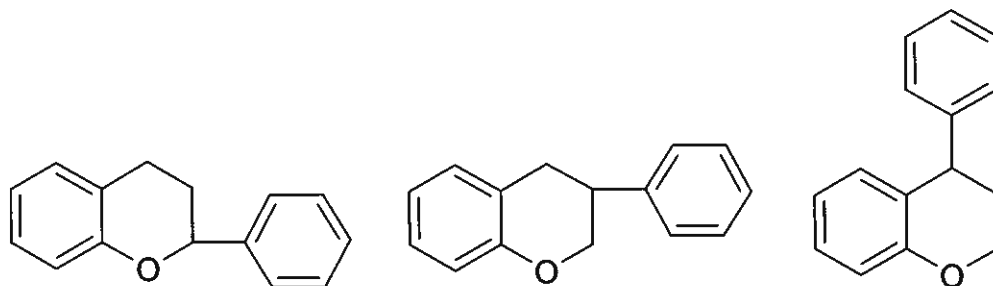
### **3.1.5 Použití pohanky**

Pohanková nať se podává pro zvýšení pevnosti a pružnosti cévních stěn. Využívá se při léčbě křečových žil, hemoroidů, bércových vředů, ale i při poruchách prokrvení končetin, charakterizovaných červenými nitkami a také jako prevence proti praskání cév uvnitř organismu (např. proti náhlým příhodám mozkovým). Nažky se léčebně využívají ke snižování cholesterolu, při chorobách střev a k detoxifikaci organismu. (9) Pohanka se užívá při artritidách (30), má posilující účinek na imunitní systém. (32) Pohanka je vhodná v těhotenství, pro diabetiky a protože neobsahuje lepek, je vhodná i pro nemocné s celiakií. Konzumace pohanky chrání před srdečními chorobami, protože snižuje LDL cholesterol a zvyšuje HDL cholesterol. (31)

## 3.2 Flavonoidy

### 3.2.1 Charakteristika a rozdělení

Flavonoidy (anthoxantiny) jsou žluté (flavus = žlutý) až oranžové látky obsažené v květech, listech a plodech převážně dvouděložných rostlin. Chemicky se flavonoidy odvozují od benzopyranu (chromanu). (2) Chroman je arylováný v poloze 2 (**flavany**), 3 (**isoflavany**), 4 (**neoflavany**). Vzorce jsou uvedeny na obrázku č. 1. V přírodě jsou hojně rozšířeny flavany. Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavany dělí na: flavany, flaveny, flavanony, flavanoly, flavanonoly, flavandioly, flavony a flavonoly. Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin. Flavonoidy se v rostlinách vyskytují většinou glykosidně vázané, rozpuštěné v buněčné šťávě ve vakuole. (7)

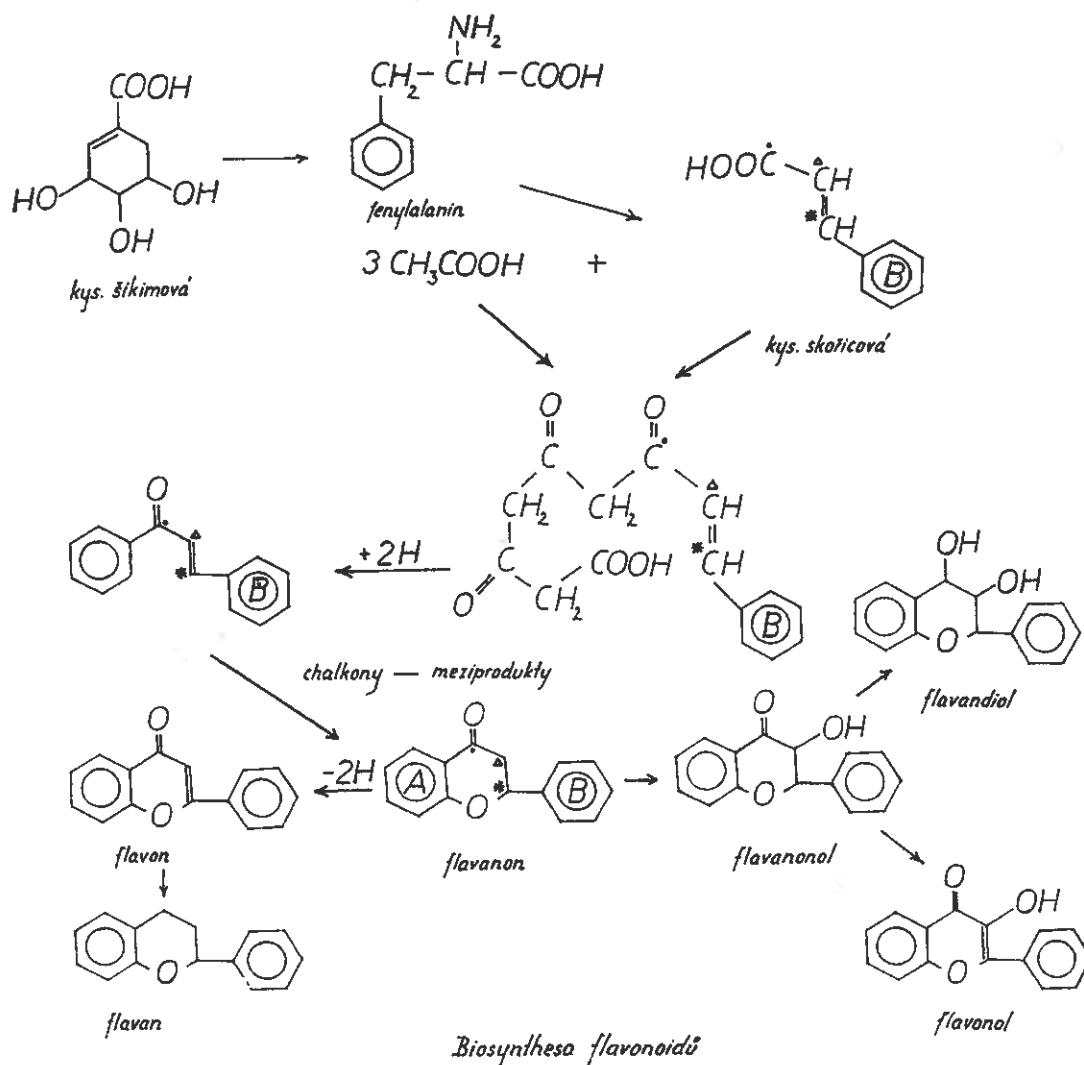


Obrázek č. 1: Vzorec flavanu, isoflavanu, neoflavanu. (7)

### 3.2.2 Biosyntéza flavonoidů

Aglykony flavonoidních glykosidů jsou produkty vznikající oběma hlavními cestami vedoucími k syntéze aromatických látek v biologických systémech. Schéma biosyntézy flavonoidů je uvedeno na obrázku č. 2. Jeden šestiuhlíkový fragment těchto  $C_6-C_3-C_6$  sloučenin se odvozuje z acetátového metabolismu a zbývající devítiuhlíková část z kyseliny šikimové (fenylpropanoid). Jednotka  $C_6-C_3$ , patrně ve formě kyseliny skořicové, se spojuje se třemi molekulami acetátu za vytvoření patnáctiuhlíkového meziproductu chalkonu, z něhož vzniká flavanon. Flavanonoly mají vztah k dalším skupinám flavonoidů a to k flavonům, chudším o dva atomy vodíku. Flavanonoly vznikají zavedením

hydroxylové skupiny do polohy tři, dehydrogenace poloh dvě a tři vede ke vzniku flavonolů. Deriváty flavonoidů se tvoří zavedením nebo odstraněním hydroxylových skupin. Glykosylace nastává v pozdním stádiu tvorby flavonoidu. (7)



Obrázek č. 2: Schéma biosyntézy flavonoidů. (7)

### 3.2.3 Flavonoidy v terapii

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemoragicky a antiedematózně (P-vitaminový účinek). Flavonoidy jsou inhibitory hyaluronidázy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi. Proto jsou podpůrnými prostředky při léčení infekčních onemocnění. Některé flavonoidy působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak.

S ionty  $\text{Ca}^{2+}$  tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C. Flavonoidy mají též vlastnosti choleretické, cholagogní a spazmolytické. (7) Dalšími biologickými účinky jsou: antialergický, antiflogistický, antivirový a antiproliferativní účinek. (25) U mnoha flavonoidů bylo prokázáno, že mají antioxidační aktivitu, schopnost zamezit volné radikály, preventivní účinek na koronární srdeční onemocnění a antikancerogenní účinek. Některé flavonoidy mohou působit proti viru lidské imunodeficiency. (17)

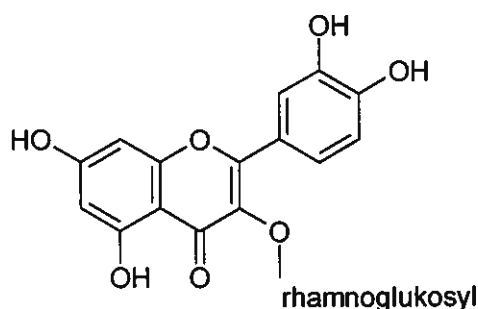
Mikronizovaná čištěná frakce flavonoidů použitá v kombinaci s běžnou antibiotickou a protizánětlivou léčbou může zmenšit trvání a rozsah pooperačních příznaků a krvácení rány po chirurgickém odstranění hemoroidů. (19)

Některé flavonoidy zesilují antioxidační účinek urátů v plazmě. K pokusu byla použita ředěná lidská plazma, kde byl sledován vliv flavonoidů na lipidovou peroxidaci podporovanou mědí a interakce flavonoidů s kyselinou močovou, jedním z nejdůležitějších antioxidantů plasmy. (18)

V práci, kde byl sledován vliv flavonoidů na růst a životaschopnost enterobakterií *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*, bylo prokázáno, že flavonoidy mají slabý baktericidní a zřetelný bakteriostatický účinek. Bakteriostatický účinek rostl za anaerobních podmínek. Možným mechanismem bakteriostatického působení flavonoidů je inhibice topoisomerázy II. (20)

### **3.2.4 Rutin**

Rutin je hojně rozšířený terapeuticky významný flavonolový glykosid (kvercetin-3-rhamnoglukosid, 3-rhamnoglukosid 5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavonolu). Vzorec rutinu je uveden na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Vzorec rutinu. (24)

Název rutinu pochází od rostliny routy *Ruta graveolens* L., z níž byl poprvé izolován. Dnes se rutin získává hlavně z pohanky *Fagopyrum vulgare* T. NESS (1 %) a *Fagopyrum tataricum* GAERTN. (2 %) (*Polygonaceae*). Vysoký obsah rutinu má *Flos sophorae*, pupeny stromu *Sophora japonica* L. (*Fabaceae*), domácího ve východní Asii a listy *Eucalyptus macrorhyncha* (*Myrtaceae*) sbírané v Austrálii. Rutin je také obsažen v oplodí pomeranče, černém rybízu a dalších rostlinách.

Rutin se používá k léčení hemoragií, alergií, hypertenze a jako adjuvans při infekčních onemocněních. (7)

Ve studii s buňkami kostní dřene vepřů bylo prokázáno, že flavonoly kvercetin a rutin snižují kostní resorpci in vitro poklesem vývoje a činnosti osteoklastů. Možným mechanismem inhibice kostní resorpce se jeví ovlivnění receptorů pro estrogény, inhibice RANK proteinu nebo aktivace apoptózy. (21)

Za hydrolýzu rutinu v pohance jsou zodpovědné dva enzymy FHG I a FHG II (flavonol-3-O-beta-heterodisacharid glukohydroláza I a II), které byly izolovány z pohankové nati. Po sklizni, během sušení a zpracování drogy může vést destrukce buněčných kompartmentů k odbourávání důležitých složek drogy, protože enzymy, které jsou stále aktivní, mohou pozměnit nebo dokonce odbourat obsahové látky v droze. (12)

### 3.3 Rostlinné kultury in vitro

#### 3.3.1 Explantátové kultury

Termín rostlinné explantáty použili poprvé v ČSSR Petrů a Řeřovský v roce 1956. Autoři rostlinným explantátem označili izolovanou, životaschopnou část rostlinného organismu, která se pěstuje v podmínkách in vitro. (3)

Explantátové kultury se kultivují asepticky z izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. Ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny se oddělí určitá část, umístí se do sterilního prostředí a kultivuje za definovaných podmínek.

Pro odvození explantátové kultury je teoreticky vhodné jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem: vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, kořene, reprodukční části jako mikrospory, vajíčka, embrya, semena nebo spory, jakož i jednotlivé buňky a protoplasty. Tyto rostlinné části mohou být krátkodobě kultivovány in vitro a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny. (4)

#### 3.3.2 Rozdělení explantátových kultur

Explantátové kultury se rozdělují podle morfologické, respektive anatomické charakteristiky:

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

**Kultura tkáňová (pletivová)** – jsou mnohobuněčné komplexy pletiva do určitého stupně soudržné a morfologicky dezorganizované, jsou pomnožované na polotuhých či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě.

**Kultura suspenzní** – jsou volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendované v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.



**Kultura buněčná (kultura volných buněk)** – jsou jednotlivé volné buňky pomnožené v tekuté či polotuhé půdě nebo na nosiči nasyceném půdou.

**Kultura protoplastů** – je kultura buněk zbavených buněčných stěn.  
(8)

### **3.3.3 Kalusové kultury**

Kalusová kultura je soubor neorganizovaně rostoucích buněk, které se po izolaci při pravidelném pasážování v určitých intervalech mohou kultivovat neomezeně dlouho.

Po uložení sterilní části rostliny do vhodného živného prostředí se začne meristematické pletivo dělit, roste neorganizovaně na všechny strany a vytváří kalus. Vytvořený kalus je možné rozdělit na několik částí, které se přesadí na čerstvé médium, kde pletiva opět neorganizovaně rostou. Tímto způsobem je možné za určité období získat libovolné množství kalusu. Po změně živného prostředí dochází v kalusu k organizovanému růstu a vytváří se listy a výhonky.

Regenerační schopnost rostlin se vyznačuje velkou rozdílností jednotlivých částí a vychází z totipotence živé rostlinné buňky. Totipotence znamená, že živá buňka, pletivo nebo jiná izolovaná část rostliny je schopná ve vhodném prostředí a za určitých podmínek vytvořit celou rostlinu. (3)

### **3.3.4 Podmínky při kultivaci**

#### **A. Živná média**

Pěstování explantátů v kulturách in vitro vyžaduje široké spektrum živných médií různého složení. Médium zabezpečuje přísun živin a energie pro dělení a diferenciaci buněk. Jednotlivé složky média mají specifickou funkci ve výživě nebo v regulaci fyzikálně-chemických procesů. (3)

Složení médií:

### **Makroelementy**

Makroelementy dodávané do kultivačních médií zahrnují šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu.

### **Mikroelementy**

Mezi mikroelementy nezbytné pro růst tkáňových kultur rostlin patří železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden.

### **Zdroj uhlíku**

Jako nejčastější zdroj uhlíku se používá sacharóza. V některých případech je možné nahradit sacharózu glukózou či fruktózou. V kultivačních médiích byly testovány i jiné sacharidy jako laktóza, galaktóza, rafinóza, maltóza a škrob, ale většinou byly méně efektivní než sacharóza a glukóza.

### **Vitaminy**

Normální rostlina sama syntetizuje vitaminy důležité k jejímu růstu a vývoji. Vitaminy jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Mezi vitaminy nejčastěji používané v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol.

### **Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku**

Aminokyseliny slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Dusík se v organické formě dodává do živných médií nejčastěji ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát). Velmi často se používá také L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin.

### **Nedefinované organické složky médií**

Růst explantátové kultury je možné často stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy.

### **Látky používané pro zpevnění média**

Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. Vedle agaru je možné používat ke zpevnění média také agarózu a syntetické látky

Phytigel a Gerlite. V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty „fixovat“ na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě, perforovaném celofánu atd. (4)

### **B. Biotické a abiotické podmínky kultivace**

Důležitým činitelem ovlivňujícím růst kalusových kultur v jednotlivých fázích růstového cyklu nebo regenerace je velikost inokula, schopnost proliferace, schopnost tvorby generací jednotlivých buněk a fáze růstového cyklu, z které se kalusová kultura odebrala na další kultivaci. (3)

K abiotickým podmínkám kultivace patří světelný režim, tj. intenzita a kvalita světla a fotoperioda. Významnou úlohu hraje i teplota, jejíž optimum pro in vitro kultury je zpravidla okolo 20 až 25 °C. Teplota a světlo ovlivňují explantátovou kulturu modifikováním nejrozličnějších biochemických a fyziologických procesů. (4)

Rostlinné buňky a explantáty v podmínkách in vitro vyžadují určitou koncentraci vodíkových iontů (pH) v prostředí, protože od acidity prostředí závisí funkce metabolismu bílkovin, růstových regulátorů, vitaminů a příjem sloučenin železa. Pro většinu kultur in vitro se doporučuje pH od 5,5 do 5,8. (3)

#### **3.3.5 Růst kultury**

Kalusová kultura během růstu prochází několika fázemi, které charakterizuje růstová křivka. Rozeznáváme pět fází růstového cyklu kalusové kultury. Laterální neboli lag-fázi, ve které se zpomaluje růst a uskutečňuje se aktivní proces spotřeby vody a minerálních látek jako příprava na dělení buněk, dále exponenciální fázi růstu, ve které se prudce zvyšuje intenzita růstu. Třetí je fáze zpomaleného růstu, ve které se intenzita růstu zpomaluje a následuje fáze stacionární, ve které se již intenzita růstu zastavuje. Poslední fázi - fázi odumírání buněk, charakterizuje úbytek čerstvé hmotnosti a sušiny s příznaky nekrózy.

Při přechodu buněk jednotlivými růstovými fázemi se nemění jen struktura, ale i metabolická aktivita. V lag-fázi značně narůstá počet polyribosomů a mitochondrií. V buňce se zvyšuje obsah RNA a bílkovin, jako i volných nukleotidů. V exponenciální fázi se zmenšuje obsah

škrobu, volných sacharidů, často v této fázi začíná syntéza sekundárních metabolitů. (3)

### **3.3.6 Produkce kultury**

Sekundární metabolismus, čili biosyntéza, transport, vzájemná přeměna, odbourávání, akumulace a případně exkrece značného počtu sekundárních metabolitů probíhá pouze během určitých omezených vývojových stádií organismu. Tyto procesy v intaktní rostlině podléhají složité regulaci. Jen zřídka jsou sekundární metabolity tvořeny ve všech orgánech a během celého životního cyklu rostliny. Převod do kultury *in vitro* představuje pro buňky nejprve šok z poranění tkáně a pak stres způsobený radikální změnou prostředí. Buňky v kultuře často odmítají aktivovat stejné metabolické dráhy jako v intaktní rostlině. Získat z izolovaných buněk v laboratoři tytéž látky, které produkují, rostou-li jako součást organizované rostliny, je zatím velmi náročné.

Mnoho důležitých sloučenin vzniká kombinací biosyntetických drah. Ve většině kultur je složité indukovat nadprodukcí, neboť několik metabolických drah musí mít současně nebo postupně změněnou regulaci. Objem produkce určité látky závisí do značné míry na přebytečných základních metabolických drah (primárního metabolismu), které jsou k dispozici. Toto biochemické soutěžení o klíčové meziprodukty nabízí částečné vysvětlení často se vyskytující nepřímé závislosti mezi růstem a produkcí. Posun metabolismu kýženým směrem lze docílit zvýšením stupně diferenciace buněk, snížením rychlosti růstu kultury. Existují však spontánní mutanty, které jsou vysokoprodukční i přes svůj rychlý růst. (22)

### 3.3.7 Výhody a využití explantátových kultur

Výhody explantátových kultur:

Rostliny *in vitro* v období mezi pasážemi nevyžadují prakticky žádnou péči jako např. zalivku, pletí, chemické ošetření, atd. Syntéza rostlinných metabolitů probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatu a půdních podmínkách, jsou vyloučeny negativní biologické vlivy v přírodě (mikroorganismy, hmyz), které mění produkci sekundárních metabolitů.

Možnosti využití explantátových kultur:

1. Kultivace vegetačních vrcholů a pupenů či indukce adventivních pupenů na izolovaných orgánech jako metody vegetativního množení rostlin.

2. Kultivace izolovaných meristémů jako metoda ozdravování rostlin od virových infekcí.

3. Regulace procesu oplození a jeho ovlivnění v podmínkách *in vitro*.

4. Spontánní výskyt a indukce genových a genomových mutací v buněčných a tkáňových kulturách a jejich selekce na úrovni regenerovaných rostlin.

5. Řízená fúze protoplastů s cílem vytvořit nové hybridy.

6. Uchovávání genofondu rostlinných druhů, které jsou ohrožené vyhynutím v důsledku destrukce jejich přirozených stanovišť nebo rostlinných druhů, které jsou ekonomicky významné a je možné je množit pouze vegetativně.

7. Selektive kultivarů s vyšší produkcí sekundárních metabolitů. (4)

### 3.4 Růstové regulátory

#### 3.4.1 Charakteristika

Koncem dvacátých let 20. století se výzkum růstové fyziologie rostlin zaměřil na růstové látky označované jako rostlinné hormony (fytohormony). Rostlinný hormon je organická sloučenina syntetizovaná v jedné části rostliny a přemístěná do jiné části rostliny, kde v malých koncentracích vyvolává fyziologickou reakci. V praxi se používají jak fytohormony (přirozené růstové regulátory), tak i syntetické regulátory růstu. (5)

#### 3.4.2 Rozdělení růstových regulátorů

Fytohormony a syntetické regulátory růstu rozdělujeme na regulátory stimulační (stimulátory) a regulátory inhibiční (inhibitory). Rozdělení podle funkce není zcela přesně ohraničené, neboť i „stimulátor“ může ve vyšší koncentraci růst inhibovat a naopak „inhibitor“ ve velmi nízké koncentraci může působit stimulačně. (5)

Rostlinné hormony se dělí na pět základních skupin: **auxiny**, **cytokininy**, **gibereliny**, **kyselina abscisová** a **ethylen**. K dalším skupinám látek s růstově regulačním působením patří: brassinosteroidy, kyselina jasmonová, polyaminy, oligosacharidy a některé typy fenolických látek. (5)

#### 3.4.3 Možnosti působení hormonů

Hormony mohou:

- působit na systémy buněčných stěn a tak umožnit průnik substrátů a vody
- kontrolovat koncentraci ATP a ADP
- ovlivnit využití různých koenzymů nebo být samy koenzymy po spojení s proteinem
- působit v mitochondriích na dýchání
- spolupůsobit při allosterické regulaci aktivity biologicky aktivních bílkovin

- působit na aparát syntetizující enzymy, tj. na replikaci, transkripci nebo translaci. (24)

#### 3.4.4 Auxiny

Mezi přirozené auxiny patří kyselina indolyl-3-octová (IAA), indolyl-3-máselná (IBA), 4-chlor-IAA, kyselina fenylloctová (PAA). Syntetické látky s účinkem auxinu se dělí na: 1. indolové kyseliny, 2. naftalenové kyseliny např.  $\alpha$ -naftyloctová kyselina ( $\alpha$ -NAA), 3. chlorfenoxykyseliny např. 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D), 4. benzoové kyseliny, 5. deriváty kyseliny pikolinové.

Biosyntéza IAA vychází z aminokyseliny L-tryptofanu a může probíhat několika drahami: indolylpyruvátovou, tryptaminovou či indolylacetaldoximovou (glukobrassicinovou). Auxin je syntetizován v apexu, v mladých listech, květních orgánech a vyvíjejících se plodech, zejména v semenech. Obsah IAA závisí na stáří orgánů, bývá vysoký v mladých, intenzivně rostoucích orgánech a se stářím klesá. Je ovlivňován i vnějšími faktory, zejména světlem a to jeho kvalitou, intenzitou i dobou působení, fotoperiodou.

Nejlépe prostudovaným účinkem auxinů je stimulace dlouhivého růstu. S růstovou stimulací souvisí i úloha auxinu v regulaci tropismů (gravitropismus, fototropismus). Pod vlivem gravitace či jednostranného osvětlení dochází k nerovnoměrné laterální distribuci IAA a v důsledku toho k nerovnoměrnému růstu a ohybu. Další z výrazných růstových účinků auxinů je stimulace tvorby kořenů. Auxiny stimulují nejen dlouhivý růst buněk, ale i jejich dělení. Auxiny hrají rovněž důležitou úlohu v diferenciaci buněk tím, že ovlivňují jejich polaritu. Nezralá semena syntetizují IAA. IAA se hromadí v plodu a zvyšuje jeho schopnost atrahovat asimiláty.

V praxi se používají auxiny syntetické, protože IAA je nestabilní. V zahradnictví se auxiny používají zejména ke stimulaci zakořeňování řízků. (5)

### 3.4.5 Gibereliny

Gibereliny jsou diterpeny s devatenácti či dvaceti atomy uhlíku. Charakteristickým zástupcem je kyselina giberelová ( $GA_3$ ).

Biosyntéza giberelinů vychází z kyseliny mevalonové, která vzniká kondenzací tří molekul acetyl-koenzymu A. (5) Některé gibereliny jsou produkty houby *Fusarium moniliforme* (askosporové stádium *Gibberella fujikuroi*), některé se vyskytují také u vyšších rostlin. (24) Gibereliny vznikají pravděpodobně ve všech rostlinných orgánech. Nejvyšší hladiny se nachází v místech aktivního růstu a v nově se tvořících orgánech.

Gibereliny, podobně jako auxiny, významně stimulují dlouhivý růst. Na rozdíl od auxinů se jejich účinek uplatňuje pouze v nadzemních částech rostlin, růst kořenů není gibereliny obvykle ovlivněn. Kromě prodlužování stimulují i buněčné dělení. V důsledku jejich působení se zvětšuje velikost i počet buněk. (5) Exogenní aplikace giberelinů stimuluje přírůstek biomasy, zkracuje nebo prodlužuje odpočinek a zabraňuje procesům stárnutí. V kulturách *in vitro* inhibují dělení buněk, existují však studie i o jejich stimulačních účincích, zvláště na subapikální pletiva. (3) Aplikace giberelinů může zkrátit juvenilní periodu a urychlit tak přechod do stádia kvetení. Gibereliny se pravděpodobně účastní determinace pohlaví květů. Při aplikaci giberelinů se zvýšila tvorba květů samčích a silně se potlačila tvorba květů samičích (např. u okurky, špenátu, jehličnanů). Aplikace giberelinů urychluje a zvyšuje nasazení plodů a jejich růst. Semena mnohých rostlinných druhů vyžadují pro klíčení po určité období sluneční svit nebo působení nízké teploty. U většiny semen lze dormanci překonat aplikací giberelinů. Podrobnější studium tohoto jevu prokázalo, že gibereliny jsou významným endogenním regulátorem klíčení a tedy i dormance rostlin.

Gibereliny se nejvíce využívají v ovocnářství ke zvýšení nasazení plodů a v případě vinné révy i k získání větších plodů. U cukrové třtiny zvyšují výnos i obsah cukru v důsledku zvýšené elongace internodií. (5)



### 3.4.6 Cytokininy

Mezi přirozené cytokininy se řadí např. kyselina traumatinová, difenylmočovina, zeatin a jeho analoga. Syntetickými cytokininy jsou 6-furfurylaminopurin (kinetin), 6-benzylaminopurin (BAP), 6-aminopurin.

Isoprenový charakter radikálu v pozici N-6 přírodních cytokininů ukazuje, že biosyntéza této části je součástí biosyntézy terpenoidních látek. Syntéza purinového jádra vychází pravděpodobně z 5-fosforibosylpyrofosfátu. (24) Cytokininy jsou převážně syntetizovány v kořenových vrcholech.

Endogenní cytokininy a exogenně aplikované cytokininy vykazují shodné účinky na řadu biologických procesů, jako je stimulace buněčného dělení, iniciace růstu adventivních pupenů, redukce dlouhivého růstu stonků, inhibice diferenciaci a růstu kořenů. Cytokininy prodlužují období fotosyntetické produktivity rostlin a zvyšují celkovou produkci biomasy. Cytokininy stimulují větvení stonků a odnožování rostlin při potlačení dominance apikálního pupene, respektive hlavního stonku, zpomalují stárnutí (senescenci) rostlinných pletiv a orgánů, stimulují diferenciaci plastidů, tvorbu chlorofylu a škrobu, zvyšují rezistenci rostlin vůči extrémním podmínkám prostředí (vysoké teplotě, zasolení a zaplavení kořenů) a podněcují tvorbu semen. Vysoký poměr koncentrací cytokininu k auxinu v kultivačním médiu stimuluje diferenciaci pupenů, zatímco opačný poměr je příznivý pro iniciaci kořenů. (5)

### 3.4.7 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je seskviterpen a podobně jako ostatní terpeny vzniká z kyseliny mevalonové. U vyšších rostlin vzniká též od štěpného produktu xantofylu. (5) ABA je přítomna v plodech, semenech, odpočívajících pupenech, hlízách, cibulích, ve stárnoucích a žloutnoucích listech. (24)

ABA ovlivňuje stárnutí plodů a zrání plodů, opad listů, květů a plodů, dormanci pupenů (má inhibiční účinek na rašení), dormanci semen (je inhibitorem klíčení), vodní režim rostliny, stres, geotropismus

kořenů, růst rostlin a kvetení. (24) Univerzální reakcí rostlinných buněk na ABA je inhibice růstu. (5)

### 3.4.8 Ethylen

Ethylen je jediný dosud známý plynný hormon. Ethylen vzniká u vyšších rostlin a u většiny nižších rostlin z aminokyseliny L-methioninu.

Velmi nízké koncentrace ethylenu (cca 0,1-1 ppm) působí inhibiči dlouhivého růstu, stimulaci radiálního růstu a ztrátu gravitropické reakce. Ethylenem je rovněž silně inhibován růst kořenů. Nejvýraznějším účinkem ethylenu je stimulace dozrávání některých plodů. Při zrání se mnohonásobně zvýší tvorba ethylenu, který indukuje biochemické procesy zrání, např. degradaci celulózy, pektinů a škrobu. Podobně jako zrání stimuluje ethylen stárnutí a opad listů, květů a plodů.

Zvýšení tvorby ethylenu je jednou z prvních reakcí rostlin na působení stresorů. Zvýšenou tvorbu ethylenu vyvolává nedostatek nebo nadbytek vláhy, anaerobióza, teplotní výkyvy, poranění, zasolení, napadení patogeny i toxické látky. (5)

### 3.4.9 Růstové regulátory po užití v této práci

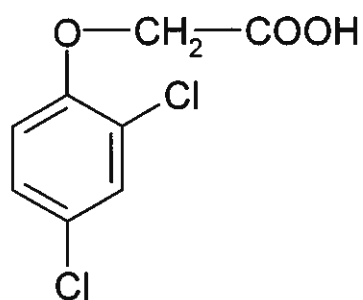
V této práci byly jako regulátory růstu použity:

**Kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová.** Vzorec je uveden na obrázku č. 4. Kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová je bílá krystalická látka, téměř bez zápachu. Je dobře rozpustná v alkoholu, etheru, acetonu i dalších organických rozpouštědlech. Špatně se rozpouští ve vodě a minerálních olejích. (5)

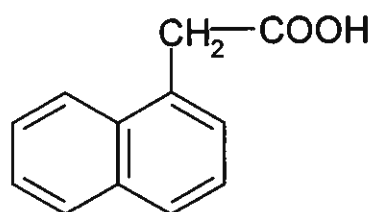
**Kyselina  $\alpha$ -naftylacetová.** Vzorec je uveden na obrázku č. 5. Kyselina  $\alpha$ -naftylacetová je velmi stálá látka. Slabě se rozpouští ve studené vodě, lépe v teplé, v ethylalkoholu, benzenu a kyselině octové. (24)

**6-furfurylaminopurin (kinetin).** Vzorec je uveden na obrázku č. 6. 6-furfurylaminopurin je rozpustný ve zředěných kyselinách a alkoholu, nerozpustný ve vodě. (24)

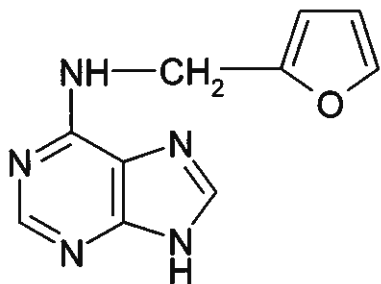
**6-benzylaminopurin.** Vzorec je uveden na obrázku č. 7.



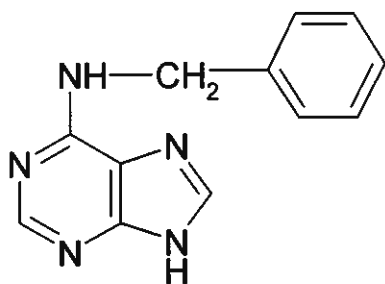
Obrázek č. 4: Vzorec kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové. (24)



Obrázek č. 5: Vzorec kyseliny  $\alpha$ -naftylactové. (24)



Obrázek č. 6: Vzorec 6-furfurylaminopurinu. (24)



Obrázek č. 7: Vzorec 6-benzylaminopurinu. (24)

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

K vypěstování klíčnicích rostlin in vitro jsem použila 30-50 semen rostliny *Fagopyrum esculentum* vypěstované v zahradě léčivých rostlin Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Pro pokus jsem použila kalusovou kulturu, kterou jsem odvodila z kořenové části klíčnicích rostlin *Fagopyrum esculentum* v 3-10 pasáži.

#### 4.1.2 Chemikálie

Chloramin, čistý

Ethanol 70 %, 96 %

Ajatin 10 %

Methenamin, čistý

Aceton, p.a.

Kyselina chlorovodíková 35 %, p.a.

Ethylacetat, čistý

Síran sodný, čistý

Chlorid hlinitý, čistý

Kyselina octová ledová 5 % (V/V) v methanolu

Čištěná voda

Složení živného média podle Murashigeho a Skooga (MS médium)

(mg/l) (23):

##### **Makroelementy**

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440

##### **Mikroelementy**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	11,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
KI	0,83
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,84
Na <sub>2</sub> EDTA	37,34

#### **Vitaminy**

Thiamin hydrochlorid	0,1
Pyridoxin hydrochlorid	0,5
Kyselina nikotinová	0,5
Myo-inositol	100

**Sacharóza** 30 000

#### **Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku**

Glycin	2,0
Hydrolyzát kaseinu	1000

#### **4.1.3 Pomůcky a přístroje**

Erlenmayerovy baňky 100 ml

Laboratorní sklo

Pinzety

Laboratorní analytické váhy, Sartorius, Göttingen

Předvážky EK 1200 A, Helago, Žilina

Autokláv PS 20 A, Chirana, Brno

Horkovzdušný sterilizátor SVS 9/1, Chirana, Brno

Elektrická sušárna HS 31 A, Chirana, Brno

Box s laminárním prouděním Fatran, Výrobné družstvo Pokrok, Žilina

Spektrofotometr Cecil CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge

Vodní lázeň GFL 1042, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Lampa 100 W

Germicidní UV zářivka

## 4.2 Pracovní postup

### 4.2.1 Aseptická příprava pomůcek a pracovního prostředí

Kalusové kultury jsem kultivovala ve 100 ml Erlenmayerových baňkách z varného skla. Baňky byly vymyty horkou vodou se saponátem, vypláchnuty nejdříve pitnou a následně čištěnou vodou a sušeny v horkovzdušném sterilizátoru při 200 °C. K pasážování jsem použila kovové pinzety, které byly omyty roztokem 96 % ethanolu, obaleny hliníkovou fólií a sterilizovány 2 h při 200 °C v horkovzdušném sterilizátoru. Stěny boxu s laminárním prouděním jsem otřela roztokem 10 % Ajatinu. Pracovní prostředí jsem nechala 20 minut sterilizovat germicidní UV zářivkou. Box s laminárním prouděním jsem uvedla do provozu 15 minut před zahájením práce, aby došlo k ustálení proudu vzduchu.

### 4.2.2 Příprava živného média

Pro kultivaci kalusové kultury jsem použila MS médium. (23) V odměrné baňce jsem v čištěné vodě rozpustila navážené množství sacharózy, myo-inositolu a hydrolyzát kaseinu. Napipetovala jsem potřebné množství zásobních roztoků vitaminů, glycinu, železa, makro a mikroelementů a příslušný objem zásobního roztoku růstového regulátoru. Zásobní roztoky jsem uchovávala v chladničce a temnu. Roztok jsem promíchala a doplnila čištěnou vodou na celkový objem.

Jako růstové regulátory jsem použila:

**6-benzylaminopurin (BAP) v koncentracích 0,1, 1, 10 mg/l**

**kyselinu  $\alpha$ -naftyloctovou ( $\alpha$ -NAA) 0,1, 1, 10 mg/l**

**kyselinu 2,4-dichlorfenoxyoctovou (2,4-D) 0,1, 1 mg/l**

kombinace růstových regulátorů:

**kyselinu 2,4-dichlorfenoxyoctovou 0,1 a 6-furfurylaminopurin (K) 0,1 mg/l**

**kyselinu 2,4-dichlorfenoxyoctovou 0,1 a 6-furfurylaminopurin 1 mg/l**

**kyselinu 2,4-dichlorfenoxyoctovou 1 a 6-furfurylaminopurin 0,1 mg/l**

**kyselinu 2,4-dichlorfenoxyoctovou 1 a 6-furfurylaminopurin 1 mg/l**

Pro každou koncentraci růstových regulátorů jsem zvolila 6 nebo 7 Erlenmayerových baněk, do kterých jsem vložila můstek z filtračního papíru. Živné MS médium s růstovým regulátorem jsem rozlila do baněk po 30 ml a baňky uzavřela dvojitou hliníkovou fólií. Baňky se sterilizovaly 15 min při 121 °C a 100 kPa v autoklávu.

#### **4.2.3 Odvození kalusové kultury *Fagopyrum esculentum***

Semena *Fagopyrum esculentum* jsem za aseptických podmínek povrchově sterilizovala. Nejdříve jsem semena vložila do 70 % ethanolu, po třech minutách jsem je vyndala a opláchla sterilní vodou. Dále jsem semena vložila do 10 % vodného roztoku chloraminu na dvě minuty a následně opláchla sterilní vodou. Nakonec jsem je vložila do 2 % vodného roztoku chloraminu na deset minut a opět opláchla sterilní vodou. (22) Sterilní pinzetou jsem přenesla 3-5 semen do Erlenmayerových baněk na můstky z filtračního papíru a sterilním MS médiem obsahujícím kyselinu 2,4-dichlorfenoxyoctovou 1 mg/l. Erlenmayerovy baňky se semeny jsem opět uzavřela dvojitou hliníkovou fólií a uložila v kultivační místnosti za normálního světelného režimu denní fotoperiody (16 h světlo, 8 h tma). Kultivace probíhala při 25 °C. Semena během kultivace klíčila a vytvořila kalus. Kalus jsem za aseptických podmínek přenesla sterilní pinzetou do nových baněk s čerstvým MS médiem a 2,4-D 1 mg/l. Pasážování kalusu jsem opakovala po pěti týdnech. K pokusu jsem použila kalusovou kulturu z 3-10 pasáže.

#### **4.2.4 Kultivace kalusové kultury *Fagopyrum esculentum***

Baňky se sterilním MS médiem obsahujícím růstové regulátory jsem zvažila a povrch baněk otřela roztokem 10 % Ajatinu. Za aseptických podmínek v laminárním boxu jsem baňky otevřela, pomocí sterilní pinzety vložila inokulum z odvozené kalusové kultury a baňky opět zavřela. Po pasážování jsem baňky zvažila. Kultura rostla 5 týdnů při 25 °C za různých světelných podmínek. Jako světelné podmínky jsem

zvolila: **normální světelný režim** denní fotoperiody (16 h světlo a 8 h tma), dále **tmu**, kdy byla kultura během celého růstu zatemněna a **světlo**, kdy byla kultura vystavena stálému světlu lampy 100 W 1 m nad kulturou. Po pěti týdnech kultivace jsem baňky zvažila a vyjmula kalusy. Baňky bez kalusu jsem opět zvažila. Kalusy se sušily při pokojové teplotě na filtračním papíře.

#### 4.2.5 Vyhodnocení růstu kultury

Vyhodnocení růstu kultury jsem provedla na základě zjištění přírůstku hmotnosti kultury během kultivace a vypočítala jsem růstový faktor. Hmotnost inokula jsem určila z rozdílu hmotnosti kultivačních baněk před a po inokulaci. Hmotnost kalusu jsem zjistila po kultivaci z rozdílu hmotnosti baněk s kalusem a bez kalusu. Přírůstek hmotnosti v gramech jsem vypočítala z rozdílu hmotnosti kalusu a hmotnosti inokula. Přírůstek hmotnosti jsem vyjádřila i v procentech. Růstový faktor jsem vypočítala podle vzorce:

$$\frac{F_W - F_{WO}}{F_{WO}}$$

$F_W$ ...hmotnost narostlého kalusu v gramech

$F_{WO}$ ...hmotnost inokula v gramech (26)

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1-36. Růstový faktor je zobrazen v grafu č. 1-15.

#### 4.2.6 Stanovení ztráty sušením

Ztrátu sušením jsem provedla podle ČL 2002. Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech (m/m). (28) Do předem vysušené váženky jsem navážila 1,0003 g usušených práškových kalusů. Sušení probíhalo v elektrické sušárně 2 h při 105 °C do konstantní hmotnosti. Hmotnost po sušení jsem odečetla od hmotnosti navážky a vyjádřila v procentech.



hmotnost navážky	1,0003 g
hmotnost po sušení	0,9198 g
ztráta sušením	8,05 % (m/m)

#### 4.2.7 Stanovení obsahu flavonoidů

Stanovení obsahu flavonoidů jsem provedla spektrofotometricky podle ČL 97. Před stanovením jsem usušené kalusy upráškovala v třecí misce a zvažila.

##### **Princip stanovení:**

Reakcí flavonoidů s chloridem hlinitým se tvoří barevné chelátové komplexy s kovovými kationty. Barevné komplexy lze stanovit spektrofotometricky. (6)

##### **Postup stanovení:**

Základní roztok 0,006 g práškováný usušených kalusů jsem ve 100 ml baňce smíchala s 1,0 ml roztoku methenaminu R (5g/l), 20,0 ml acetonu R, 2 ml kyseliny chlorovodíkové RS a vařila 30 min pod zpětným chladičem. Výluh jsem zfiltrovala přes chomáček vaty do 100 ml odměrné baňky. Drogu i chomáček vaty jsem vařila 10 min ještě dvakrát s 20 ml acetonu R pod zpětným chladičem. Po ochlazení jsem výluh zfiltrovala přes filtrační papír do téže odměrné baňky. Roztok v odměrné baňce jsem zředila acetonem R, který jsem předem použila k promytí baňky a filtru, na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku jsem převedla do dělicí nálevky, přidala 20 ml vody R a protřepávala nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml ethylacetatu R. Spojené horní vrstvy jsem protřepávala dvakrát 50 ml vody R a zfiltrovala přes 10 g síranu sodného bezvodého R do 50 ml odměrné baňky. Roztok v baňce jsem zředila ethylacetatem R na 50,0 ml.

Zkoušený roztok 10,0 ml základního roztoku jsem smíchala s 1 ml roztoku chloridu hlinitého RS 1 a zředila roztokem kyseliny octové ledové R 5 % (V/V) v methanolu R na 25,0 ml.

Porovnávací roztok 10,0 ml základního roztoku jsem zředila roztokem kyseliny octové ledové R 5 % (V/V) v methanolu R na 25,0 ml.

Po 30 min jsem změřila absorbanci zkoušeného roztoku v maximu při 425 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní tekutiny.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřen jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ), jsem vypočítala podle vzorce:

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

A...absorbance roztoku v maximu při 425 nm

m...navážka drogy v gramech (27)

Provedla jsem tři souběžná stanovení a vypočítala obsah flavonoidů. Obsah flavonoidů jsem přepočítala na vysušenou drogu ze stanovení ztráty sušením. Ze získaných hodnot jsem vypočítala aritmetický průměr. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1-36 a zobrazeny v grafu č. 1-15.

#### 4.2.8 Růstová a produkční křivka

Pro sledování růstových a produkčních charakteristik kultury *Fagopyrum esculentum* jsem sestrojila růstovou a produkční křivku u jedné pasáže. Po vyhodnocení růstu kultury a stanovení obsahu flavonoidů při kultivaci na MS médiu s různými regulátory růstu byla jako optimální pro růst kultury a produkci flavonoidů kultivace na MS médiu s kyselinou 2,4-dichlorfenoxycetovou 1 mg/l v kombinaci s 6-furfurylaminopurinem 1 mg/l za normálního světelného režimu.

Padesát čtyři baněk se sterilním MS médiem s růstovými regulátory jsem zvažila a povrch otřela roztokem 10 % Ajatinu. Za aseptických podmínek v laminárním boxu jsem baňky otevřela a sterilní pinzetou vložila inokulum. Baňky jsem opět zavřela a zvažila. Kultura rostla 50 dní při pokojové teplotě za normálního světelného režimu. V pravidelných intervalech jsem odebírala vždy šest baněk s narostlým kalusem: 10., 15., 20., 25., 30., 35., 40., 45. a 50. den kultivace. Baňky jsem zvažila, kalusy vyjmula. Baňky bez kalusu jsem zvažila. Kalusy se sušily při pokojové teplotě na filtračním papíře. Vyhodnotila jsem růst kultury a stanovila obsah flavonoidů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 37-45. Sestrojila jsem růstovou a produkční křivku. Růstová a produkční křivka je zobrazena v grafu č. 16.

#### 4.2.9 Statistické zpracování

Statistické zpracování naměřených hodnot jsem vypočítala podle vzorců:

##### Aritmetický průměr

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

##### Směrodatná odchylka

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

n...rozsah souboru

$x_i$ ...naměřené hodnoty

$\bar{x}$ ...aritmetický průměr

s...směrodatná odchylka (35)

Pro zjištění statistické významnosti obsahu flavonoidů jsem použila t-test rozdílu dvou průměrů.

Vzorec pro testovací kritérium:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

t...testovací kritérium  
 $\bar{x}$ ...aritmetický průměr kontrolního souboru  
 $\bar{x}$ ...aritmetický průměr pokusného souboru  
 $s_1$ ...směrodatná odchylka kontrolního souboru  
 $s_2$ ...směrodatná odchylka pokusného souboru  
 $n_1$ ...počet členů kontrolního souboru  
 $n_2$ ...počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu  $t$  přísluší  $t$ -rozdělení s  $v=n_1+n_2-2$  stupni volnosti.

Vypočtená hodnota testovacího kritéria se porovná s příslušnou tabulkovou kritickou hodnotou  $t(v)_p$  pro vypočtený stupeň volnosti  $v$  a zvolenou hladinu významnosti  $p$ . Je-li hodnota  $t$  větší než hodnota  $t(v)_p$ , je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti  $p$ . (15)

Provedla jsem tři souběžná stanovení obsahu flavonoidů. Z toho vyplývá, že počet členů souboru  $n_1=n_2=3$  a počet stupňů volnosti je  $v=4$ . Pro zvolenou hladinu významnosti  $p=0,05$  a čtyři stupně volnosti je tabulková kritická hodnota  $t(v)_p=2,78$ . Výsledky jsou statisticky významné, je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než tabulková kritická hodnota. Statistické zhodnocení významnosti obsahu flavonoidů kalusové kultury jsem provedla srovnáním experimentálních výsledků se standardem rostoucím na půdě s obsahem 2,4-D za normálního světelného režimu. Směrodatná odchylka a hodnoty testovacího kritéria jsou uvedeny v tabulce č. 1-45.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Tabulky

Tabulka č. 1: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP 0,1 mg/l.

Normální světelný režim BAP 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,39	2,08	1,69	433,33	1,931
2	0,31	0,33	0,02	6,45	Obsah flavonoidů 0,020 %
3	0,35	0,66	0,31	88,57	
4	0,39	1,15	0,76	194,87	
5	*	*	*	*	
6	*	*	*	*	Směrodatná odchylka 0,003
Součet	1,44	4,22	2,78	723,22	Testovací kritérium 4,025
Průměr	0,36	1,06	0,70	180,81	

\* kultura napadená plísní

Tabulka č. 2: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP 1 mg/l.

Normální světelný režim BAP 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,33	0,62	0,29	87,88	0,852
2	0,39	0,89	0,50	128,21	Obsah flavonoidů 0,014 %
3	0,46	0,76	0,30	65,22	
4	0,29	0,63	0,34	117,24	
5	0,45	0,81	0,36	80,00	
6	0,51	0,79	0,28	54,90	Směrodatná odchylka 0,001
Součet	2,43	4,50	2,07	533,45	Testovací kritérium 3,000
Průměr	0,41	0,75	0,35	88,91	

Tabulka č. 3: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP 10 mg/l.

Normální světelný režim BAP 10 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přirůstek (g)	Přirůstek (%)	Růstový faktor
1	0,40	0,68	0,28	70,00	0,433
2	0,47	0,68	0,21	44,68	Obsah flavonoidů 0,022 %
3	0,33	0,36	0,03	9,09	
4	*	*	*	*	Směrodatná odchylka 0,001
5	*	*	*	*	
6	*	*	*	*	
Součet	1,20	1,72	0,52	123,77	Testovací kritérium
Průměr	0,40	0,57	0,17	41,26	11,000

\* kultura napadená plísní

Tabulka č. 4: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA 0,1 mg/l.

Normální světelný režim $\alpha$ -NAA 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přirůstek (g)	Přirůstek (%)	Růstový faktor
1	0,43	0,50	0,07	16,28	0,605
2	0,47	0,67	0,20	42,55	Obsah flavonoidů 0,015 %
3	0,39	0,46	0,07	17,95	
4	0,26	0,40	0,14	53,85	Směrodatná odchylka 0,001
5	0,27	0,81	0,54	200,00	
6	0,23	0,39	0,16	69,57	
7	0,23	0,43	0,20	86,96	Testovací kritérium
Součet	2,28	3,66	1,38	487,16	4,000
Průměr	0,33	0,52	0,20	69,59	

Tabulka č. 5: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA 1 mg/l.

Normální světelný režim $\alpha$ -NAA 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,23	0,41	0,18	78,26	<b>0,451</b>
2	0,32	0,44	0,12	37,50	Obsah flavonoidů <b>0,008 %</b>
3	0,26	0,35	0,09	34,62	
4	0,27	0,36	0,09	33,33	
5	0,28	0,61	0,33	117,86	Směrodatná odchylka <b>0,003</b>
6	0,29	0,33	0,04	13,79	
7	0,30	0,33	0,03	10,00	
Součet	1,95	2,83	0,88	325,36	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,28</b>	<b>0,40</b>	<b>0,13</b>	<b>46,48</b>	<b>1,342</b>

Tabulka č. 6: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA 10 mg/l.

Normální světelný režim $\alpha$ -NAA 10 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,26	0,34	0,08	30,77	<b>0,891</b>
2	0,27	0,82	0,55	203,70	Obsah flavonoidů <b>0,031 %</b>
3	0,37	0,47	0,10	27,03	
4	0,27	0,28	0,01	3,70	
5	0,30	0,84	0,54	180,00	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
6	0,27	0,65	0,38	140,74	
7	0,37	0,59	0,22	59,46	
Součet	2,11	3,99	1,88	645,40	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,30</b>	<b>0,57</b>	<b>0,27</b>	<b>92,20</b>	<b>20,000</b>

Tabulka č. 7: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l.

Normální světelný režim 2,4-D 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,38	0,38	0,00	0,00	<b>0,430</b>
2	0,43	0,53	0,10	23,26	Obsah flavonoidů <b>0,014 %</b>
3	0,37	0,55	0,18	48,65	
4	0,43	0,67	0,24	55,81	
5	0,27	0,35	0,08	29,63	
6	0,49	0,99	0,50	102,04	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
7	0,49	0,62	0,13	26,53	
Součet	2,86	4,09	1,23	285,92	Testovací kritérium <b>3,000</b>
Průměr	<b>0,41</b>	<b>0,58</b>	<b>0,18</b>	<b>40,85</b>	

Tabulka č. 8: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,27	0,43	0,16	59,26	<b>0,592</b>
2	0,35	0,39	0,04	11,43	Obsah flavonoidů <b>0,015 %</b>
3	0,36	0,87	0,51	141,67	
4	0,36	0,41	0,05	13,89	
5	0,41	0,87	0,46	112,20	
6	0,55	0,62	0,07	12,73	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
7	0,30	0,55	0,25	83,33	
Součet	2,60	4,14	1,54	434,51	Testovací kritérium <b>4,000</b>
Průměr	<b>0,37</b>	<b>0,59</b>	<b>0,22</b>	<b>62,07</b>	



Tabulka č. 9: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l a K 0,1 mg/l.

Normální světelný režim 2,4-D 0,1 mg/l+K 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,21	0,32	0,11	52,38	<b>0,509</b>
2	0,38	0,56	0,18	47,37	Obsah flavonoidů <b>0,007 %</b>
3	0,33	0,49	0,16	48,48	
4	0,26	0,41	0,15	57,69	
5	0,31	0,49	0,18	58,06	
6	0,44	0,76	0,32	72,73	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
7	0,31	0,35	0,04	12,90	
Součet	2,24	3,38	1,14	349,62	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,32</b>	<b>0,48</b>	<b>0,16</b>	<b>49,95</b>	<b>2,530</b>

Tabulka č. 10: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l a K 1 mg/l.

Normální světelný režim 2,4-D 0,1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,34	0,64	0,30	88,24	<b>0,774</b>
2	0,19	0,37	0,18	94,74	Obsah flavonoidů <b>0,054 %</b>
3	0,31	0,43	0,12	38,71	
4	0,33	0,74	0,41	124,24	
5	0,30	0,47	0,17	56,67	
6	0,22	0,36	0,14	63,64	Směrodatná odchylka <b>0,003</b>
7	0,26	0,45	0,19	73,08	
Součet	1,95	3,46	1,51	539,32	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,28</b>	<b>0,49</b>	<b>0,22</b>	<b>77,04</b>	<b>19,230</b>

Tabulka č. 11: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K 0,1 mg/l.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,21	0,46	0,25	119,05	1,773
2	0,28	0,64	0,36	128,57	Obsah flavonoidů 0,017 %
3	0,23	1,01	0,78	339,13	
4	0,28	0,77	0,49	175,00	
5	0,12	0,32	0,20	166,67	
6	0,20	0,46	0,26	130,00	Směrodatná odchylka 0,002
Součet	1,32	3,66	2,34	1058,42	Testovací kritérium
Průměr	0,22	0,61	0,39	176,40	3,795

Tabulka č. 12: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K 1 mg/l.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,22	1,13	0,91	413,64	1,503
2	0,21	0,21	0,00	0,00	Obsah flavonoidů 0,069 %
3	0,30	0,78	0,48	160,00	
4	0,38	0,76	0,38	100,00	
5	0,45	1,08	0,63	140,00	
6	0,35	0,82	0,47	134,29	Směrodatná odchylka 0,002
Součet	1,91	4,78	2,87	947,93	Testovací kritérium
Průměr	0,32	0,80	0,48	157,99	36,682

Tabulka č. 13: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP 0,1 mg/l.

<b>Tma BAP 0,1 mg/l</b>					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,20	0,40	0,20	100,00	<b>0,645</b> Obsah flavonoidů <b>0,022 %</b> Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
2	0,20	0,27	0,07	35,00	
3	0,22	0,31	0,09	40,91	
4	0,28	0,50	0,22	78,57	
5	0,24	0,37	0,13	54,17	
6	0,30	0,58	0,28	93,33	
7	0,28	0,40	0,12	42,86	
Součet	1,72	2,83	1,11	444,84	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,25</b>	<b>0,40</b>	<b>0,16</b>	<b>63,55</b>	<b>11,000</b>

Tabulka č. 14: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP 1 mg/l.

<b>Tma BAP 1 mg/l</b>					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,29	0,33	0,04	13,79	<b>0,819</b> Obsah flavonoidů <b>0,007 %</b> Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
2	0,36	0,54	0,18	50,00	
3	0,21	0,89	0,68	323,81	
4	0,27	0,57	0,30	111,11	
5	0,26	0,34	0,08	30,77	
6	0,33	0,52	0,19	57,58	
7	0,32	0,52	0,20	62,50	
Součet	2,04	3,71	1,67	649,56	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,29</b>	<b>0,53</b>	<b>0,24</b>	<b>92,79</b>	<b>2,530</b>

Tabulka č. 15: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP 10 mg/l.

Tma BAP 10 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,22	0,36	0,14	63,64	<b>0,656</b>
2	0,24	0,69	0,45	187,50	
3	0,25	0,41	0,16	64,00	Obsah flavonoidů <b>0,008 %</b>
4	0,26	0,41	0,15	57,69	
5	0,36	0,55	0,19	52,78	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
6	0,38	0,62	0,24	63,16	
7	0,41	0,47	0,06	14,63	
Součet	2,12	3,51	1,39	503,40	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,30</b>	<b>0,50</b>	<b>0,20</b>	<b>71,91</b>	<b>1,897</b>

Tabulka č. 16: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA 0,1 mg/l.

Tma $\alpha$ -NAA 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,44	0,58	0,14	31,82	<b>0,421</b>
2	0,48	0,57	0,09	18,75	
3	0,37	0,55	0,18	48,65	Obsah flavonoidů <b>0,009 %</b>
4	0,46	0,75	0,29	63,04	
5	0,34	0,52	0,18	52,94	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
6	0,43	0,61	0,18	41,86	
Součet	2,52	3,58	1,06	257,06	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,42</b>	<b>0,60</b>	<b>0,18</b>	<b>42,84</b>	<b>1,265</b>

Tabulka č. 17: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA 1 mg/l.

Tma $\alpha$ -NAA 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,28	0,42	0,14	50,00	0,915
2	0,44	1,08	0,64	145,45	Obsah flavonoidů 0,018 %
3	0,30	0,60	0,30	100,00	
4	0,42	0,76	0,34	80,95	
5	0,36	0,76	0,40	111,11	Směrodatná odchylka 0,002
6	0,80	1,36	0,56	70,00	
Součet	2,60	4,98	2,38	557,51	Kritická hladina
Průměr	0,43	0,83	0,40	92,92	4,427

Tabulka č. 18: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA 10 mg/l.

Tma $\alpha$ -NAA 10 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,31	0,75	0,44	141,94	0,316
2	0,53	0,65	0,12	22,64	Obsah flavonoidů 0,006 %
3	0,52	0,52	0,00	0,00	
4	0,50	0,59	0,09	18,00	
5	0,40	0,47	0,07	17,50	Směrodatná odchylka 0,004
6	0,56	0,73	0,17	30,36	
Součet	2,82	3,71	0,89	230,44	Testovací kritérium
Průměr	0,47	0,62	0,15	38,41	1,715

Tabulka č. 19: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l.

Tma 2,4-D 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,34	0,38	0,04	11,76	<b>0,333</b>
2	0,55	0,82	0,27	49,09	Obsah flavonoidů <b>0,020 %</b>
3	0,52	0,69	0,17	32,69	
4	0,37	0,56	0,19	51,35	
5	0,52	0,66	0,14	26,92	
6	0,36	0,51	0,15	41,67	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
7	0,49	0,58	0,09	18,37	
Součet	3,15	4,20	1,05	231,85	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,45</b>	<b>0,60</b>	<b>0,15</b>	<b>33,12</b>	<b>9,000</b>

Tabulka č. 20: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l.

Tma 2,4-D 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,82	1,30	0,48	58,54	<b>0,764</b>
2	0,37	1,15	0,78	210,81	Obsah flavonoidů <b>0,065 %</b>
3	0,60	1,17	0,57	95,00	
4	0,68	1,22	0,54	79,41	
5	1,06	2,00	0,94	88,68	
6	0,76	1,22	0,46	60,53	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
7	0,75	0,83	0,08	10,67	
Součet	5,04	8,89	3,85	603,64	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,72</b>	<b>1,27</b>	<b>0,55</b>	<b>86,23</b>	<b>34,153</b>

Tabulka č. 21: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l a K 0,1 mg/l.

Tma 2,4-D 0,1 mg/l+K 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,66	0,95	0,29	43,94	<b>0,343</b>
2	0,62	0,89	0,27	43,55	Obsah flavonoidů <b>0,013 %</b>
3	1,13	1,31	0,18	15,93	
4	1,16	1,56	0,40	34,48	
5	0,63	1,07	0,44	69,84	
6	1,05	1,20	0,15	14,29	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
7	0,70	1,01	0,31	44,29	
Součet	5,95	7,99	2,04	266,32	Testovací kritérium <b>2,000</b>
Průměr	<b>0,85</b>	<b>1,14</b>	<b>0,29</b>	<b>38,05</b>	

Tabulka č. 22: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l a K 1 mg/l.

Tma 2,4-D 0,1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,64	1,06	0,42	65,63	<b>0,427</b>
2	0,86	1,33	0,47	54,65	Obsah flavonoidů <b>0,020 %</b>
3	0,91	1,38	0,47	51,65	
4	0,58	1,09	0,51	87,93	
5	0,54	0,75	0,21	38,89	
6	0,99	1,05	0,06	6,06	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
7	0,80	0,93	0,13	16,25	
Součet	5,32	7,59	2,27	321,06	Testovací kritérium <b>5,692</b>
Průměr	<b>0,76</b>	<b>1,08</b>	<b>0,32</b>	<b>45,87</b>	

Tabulka č. 23: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K 0,1 mg/l.

Tma 2,4-D 1 mg/l+K 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přirůstek (g)	Přirůstek (%)	Růstový faktor
1	0,28	0,49	0,21	75,00	1,037
2	0,24	0,51	0,27	112,50	Obsah flavonoidů 0,012 %
3	0,30	0,67	0,37	123,33	
4	0,19	0,41	0,22	115,79	
5	0,16	0,39	0,23	143,75	Směrodatná odchylka 0,001
6	0,19	0,30	0,11	57,89	
Součet	1,36	2,77	1,41	628,26	Testovací kritérium
Průměr	0,23	0,46	0,24	104,71	1,000

Tabulka č. 24: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K 1 mg/l.

Tma 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přirůstek (g)	Přirůstek (%)	Růstový faktor
1	0,22	0,64	0,42	190,91	1,364
2	0,20	0,34	0,14	70,00	Obsah flavonoidů 0,036 %
3	0,36	0,81	0,45	125,00	
4	0,23	0,62	0,39	169,57	
5	0,22	0,41	0,19	86,36	Směrodatná odchylka 0,003
6	0,20	0,56	0,36	180,00	
Součet	1,43	3,38	1,95	821,84	Testovací kritérium
Průměr	0,24	0,56	0,33	136,97	11,180



Tabulka č. 25: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP 0,1 mg/l.

Světlo BAP 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,42	0,45	0,03	7,14	<b>0,390</b>
2	0,32	0,51	0,19	59,38	Obsah flavonoidů <b>0,009 %</b>
3	0,25	0,33	0,08	32,00	
4	0,71	1,14	0,43	60,56	
5	0,43	0,67	0,24	55,81	
6	0,33	0,33	0,00	0,00	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
7	0,21	0,28	0,07	33,33	
Součet	2,67	3,71	1,04	248,22	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,38</b>	<b>0,53</b>	<b>0,15</b>	<b>35,46</b>	<b>2,000</b>

Tabulka č. 26: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP 1 mg/l.

Světlo BAP 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,58	0,61	0,03	5,17	<b>0,464</b>
2	0,22	0,45	0,23	104,55	Obsah flavonoidů <b>0,028 %</b>
3	0,41	0,55	0,14	34,15	
4	0,40	0,50	0,10	25,00	
5	0,30	0,50	0,20	66,67	
6	0,26	0,38	0,12	46,15	Směrodatná odchylka <b>0,003</b>
7	0,59	1,05	0,46	77,97	
Součet	2,76	4,04	1,28	359,66	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,39</b>	<b>0,58</b>	<b>0,18</b>	<b>51,38</b>	<b>7,603</b>

Tabulka č. 27: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP 10 mg/l.

Světlo BAP 10 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,32	0,47	0,15	46,88	<b>0,242</b>
2	0,19	0,26	0,07	36,84	Obsah flavonoidů <b>0,015 %</b>
3	0,51	0,62	0,11	21,57	
4	0,28	0,37	0,09	32,14	
5	0,60	0,70	0,10	16,67	
6	0,33	0,42	0,09	27,27	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
7	0,33	0,34	0,01	3,03	
Součet	2,56	3,18	0,62	184,40	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,37</b>	<b>0,45</b>	<b>0,09</b>	<b>26,34</b>	<b>4,000</b>

Tabulka č. 28: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA 0,1 mg/l.

Světlo $\alpha$ -NAA 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,23	0,31	0,08	34,78	<b>0,299</b>
2	0,46	0,49	0,03	6,52	Obsah flavonoidů <b>0,050 %</b>
3	0,34	0,42	0,08	23,53	
4	0,27	0,34	0,07	25,93	
5	0,19	0,24	0,05	26,32	
6	0,37	0,45	0,08	21,62	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
7	0,25	0,49	0,24	96,00	
Součet	2,11	2,74	0,63	234,70	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,30</b>	<b>0,39</b>	<b>0,09</b>	<b>33,53</b>	<b>24,666</b>

Tabulka č. 29: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA 1 mg/l.

Světlo $\alpha$ -NAA 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,32	0,40	0,08	25,00	<b>0,562</b>
2	0,42	0,72	0,30	71,43	Obsah flavonoidů <b>0,041 %</b>
3	0,57	0,58	0,01	1,75	
4	0,30	0,50	0,20	66,67	
5	0,44	0,69	0,25	56,82	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
6	0,32	0,80	0,48	150,00	
7	0,53	0,84	0,31	58,49	
Součet	2,90	4,53	1,63	430,16	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,41</b>	<b>0,65</b>	<b>0,23</b>	<b>61,45</b>	<b>18,974</b>

Tabulka č. 30: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA 10 mg/l.

Světlo $\alpha$ -NAA 10 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,37	0,79	0,42	113,51	<b>1,087</b>
2	0,27	0,80	0,53	196,30	Obsah flavonoidů <b>0,017 %</b>
3	0,68	1,44	0,76	111,76	
4	0,53	1,15	0,62	116,98	
5	0,24	0,45	0,21	87,50	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
6	0,28	0,65	0,37	132,14	
7	0,39	0,48	0,09	23,08	
Součet	2,76	5,76	3,00	781,27	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,39</b>	<b>0,82</b>	<b>0,43</b>	<b>111,61</b>	<b>3,795</b>

Tabulka č. 31: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l.

Světlo 2,4-D 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přirůstek (g)	Přirůstek (%)	Růstový faktor
1	0,33	0,33	0,00	0,00	<b>0,386</b>
2	0,35	0,69	0,34	97,14	Obsah flavonoidů <b>0,021 %</b>
3	0,25	0,26	0,01	4,00	
4	0,40	0,57	0,17	42,50	
5	0,36	0,42	0,06	16,67	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
6	0,40	0,51	0,11	27,50	
7	0,37	0,63	0,26	70,27	
Součet	2,46	3,41	0,95	258,08	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,35</b>	<b>0,49</b>	<b>0,14</b>	<b>36,87</b>	<b>10,000</b>

Tabulka č. 32: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l.

Světlo 2,4-D 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přirůstek (g)	Přirůstek (%)	Růstový faktor
1	0,30	0,67	0,37	123,33	<b>0,972</b>
2	0,29	0,53	0,24	82,76	Obsah flavonoidů <b>0,007 %</b>
3	0,27	0,54	0,27	100,00	
4	0,32	0,71	0,39	121,88	
5	0,22	0,26	0,04	18,18	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
6	0,41	0,80	0,39	95,12	
7	0,36	0,77	0,41	113,89	
Součet	2,17	4,28	2,11	655,16	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,31</b>	<b>0,61</b>	<b>0,30</b>	<b>93,59</b>	<b>2,530</b>

Tabulka č. 33: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l a K 0,1 mg/l.

Světlo 2,4-D 0,1 mg/l+K 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,35	0,65	0,30	85,71	<b>0,488</b>
2	0,38	0,86	0,48	126,32	Obsah flavonoidů <b>0,019 %</b>
3	0,65	0,91	0,26	40,00	
4	0,43	0,49	0,06	13,95	
5	0,34	0,35	0,01	2,94	
6	0,32	0,54	0,22	68,75	Směrodatná odchylka
7	0,38	0,44	0,06	15,79	<b>0,001</b>
Součet	2,85	4,24	1,39	353,46	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,41</b>	<b>0,61</b>	<b>0,20</b>	<b>50,49</b>	<b>8,000</b>

Tabulka č. 34: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l a K 1 mg/l.

Světlo 2,4-D 0,1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,40	0,63	0,23	57,50	<b>0,468</b>
2	0,35	0,58	0,23	65,71	Obsah flavonoidů <b>0,028 %</b>
3	0,36	0,80	0,44	122,22	
4	0,37	0,57	0,20	54,05	
5	0,41	0,67	0,26	63,41	
6	0,49	0,51	0,02	4,08	Směrodatná odchylka
7	0,61	0,63	0,02	3,28	<b>0,002</b>
Součet	2,99	4,39	1,40	370,25	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,43</b>	<b>0,63</b>	<b>0,20</b>	<b>52,90</b>	<b>10,752</b>

Tabulka č. 35: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K 0,1 mg/l.

Světlo 2,4-D 1 mg/l+K 0,1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,19	0,49	0,30	157,89	<b>2,109</b>
2	0,16	0,37	0,21	131,25	Obsah flavonoidů <b>0,021 %</b>
3	0,17	0,25	0,08	47,06	
4	0,15	0,32	0,17	113,33	Směrodatná odchylka <b>0,003</b>
5	0,27	1,36	1,09	403,70	
6	0,25	0,91	0,66	264,00	Testovací kritérium <b>4,472</b>
Součet	1,19	3,70	2,51	1117,23	
Průměr	<b>0,20</b>	<b>0,62</b>	<b>0,42</b>	<b>186,21</b>	

Tabulka č. 36: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K 1 mg/l.

Světlo 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,31	0,52	0,21	67,74	<b>0,551</b>
2	0,39	0,56	0,17	43,59	Obsah flavonoidů <b>0,034 %</b>
3	0,49	0,52	0,03	6,12	
4	0,34	0,60	0,26	76,47	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
5	0,28	0,45	0,17	60,71	
6	0,26	0,56	0,30	115,38	Testovací kritérium <b>23,000</b>
Součet	2,07	3,21	1,14	370,01	
Průměr	<b>0,35</b>	<b>0,54</b>	<b>0,19</b>	<b>61,67</b>	

Tabulka č. 37: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* 10. den růstové a produkční křivky.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,35	0,41	0,06	17,14	<b>0,305</b>
2	0,28	0,38	0,10	35,71	
3	0,30	0,39	0,09	30,00	Obsah flavonoidů <b>0,020 %</b>
4	0,30	0,43	0,13	43,33	
5	0,53	0,66	0,13	24,53	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
6	0,27	0,38	0,11	40,74	
Součet	2,03	2,65	0,62	191,45	Testovací kritérium <b>9,000</b>
Průměr	<b>0,34</b>	<b>0,44</b>	<b>0,10</b>	<b>31,91</b>	

Tabulka č. 38: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* 15. den růstové a produkční křivky.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,21	0,43	0,22	104,76	<b>0,458</b>
2	0,30	0,51	0,21	70,00	
3	0,46	0,55	0,09	19,57	Obsah flavonoidů <b>0,030 %</b>
4	0,26	0,26	0,00	0,00	
5	0,35	0,51	0,16	45,71	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
6	0,43	0,67	0,24	55,81	
Součet	2,01	2,93	0,92	295,85	Testovací kritérium <b>12,017</b>
Průměr	<b>0,34</b>	<b>0,49</b>	<b>0,15</b>	<b>49,31</b>	

Tabulka č. 39: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* 20. den růstové a produkční křivky.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,25	0,35	0,10	40,0	<b>0,486</b>
2	0,29	0,44	0,15	51,72	Obsah flavonoidů <b>0,019 %</b>
3	0,31	0,36	0,05	16,13	
4	0,28	0,43	0,15	53,57	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
5	0,40	0,70	0,30	75,00	
6	0,32	0,47	0,15	46,88	Testovací kritérium <b>8,000</b>
Součet	1,85	2,75	0,90	283,30	
Průměr	<b>0,31</b>	<b>0,46</b>	<b>0,15</b>	<b>47,22</b>	

Tabulka č. 40: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* 25. den růstové a produkční křivky.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,35	0,93	0,58	165,71	<b>0,822</b>
2	0,26	0,39	0,13	50,00	Obsah flavonoidů <b>0,008 %</b>
3	0,31	0,42	0,11	35,48	
4	0,36	0,54	0,18	50,00	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
5	0,42	0,69	0,27	64,29	
6	0,44	0,93	0,49	111,36	Testovací kritérium <b>1,897</b>
Součet	2,14	3,90	1,76	476,84	
Průměr	<b>0,36</b>	<b>0,65</b>	<b>0,29</b>	<b>79,47</b>	



Tabulka č. 41: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* 30. den růstové a produkční křivky.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,28	0,43	0,15	53,57	<b>0,397</b>
2	0,32	0,58	0,26	81,25	Obsah flavonoidů <b>0,031 %</b>
3	0,54	0,59	0,05	9,26	
4	0,37	0,40	0,03	8,11	
5	0,35	0,57	0,22	62,86	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
6	0,33	0,49	0,16	48,48	
Součet	2,19	3,06	0,87	263,53	Testovací kritérium <b>12,649</b>
Průměr	<b>0,37</b>	<b>0,51</b>	<b>0,15</b>	<b>43,92</b>	

Tabulka č. 42: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* 35. den růstové a produkční křivky.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,27	0,57	0,30	11,11	<b>0,834</b>
2	0,42	1,14	0,72	171,43	Obsah flavonoidů <b>0,042 %</b>
3	0,50	0,93	0,43	86,00	
4	0,57	0,80	0,23	40,35	
5	0,22	0,38	0,16	72,73	Směrodatná odchylka <b>0,003</b>
6	0,31	0,38	0,07	22,58	
Součet	2,29	4,20	1,91	404,20	Testovací kritérium <b>13,864</b>
Průměr	<b>0,38</b>	<b>0,70</b>	<b>0,32</b>	<b>67,37</b>	

Tabulka č. 43: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* 40. den růstové a produkční křivky.

Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,34	0,60	0,26	76,47	1,306
2	0,33	1,05	0,72	218,18	Obsah flavonoidů <b>0,048 %</b>
3	0,47	0,85	0,38	80,85	
4	0,51	1,08	0,57	111,76	
5	0,22	1,12	0,90	409,10	
6	0,45	0,65	0,20	44,44	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
Součet	2,32	5,35	3,03	940,80	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,39</b>	<b>0,89</b>	<b>0,51</b>	<b>156,80</b>	<b>37,000</b>

Tabulka č. 44: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* 45. den růstové a produkční křivky.

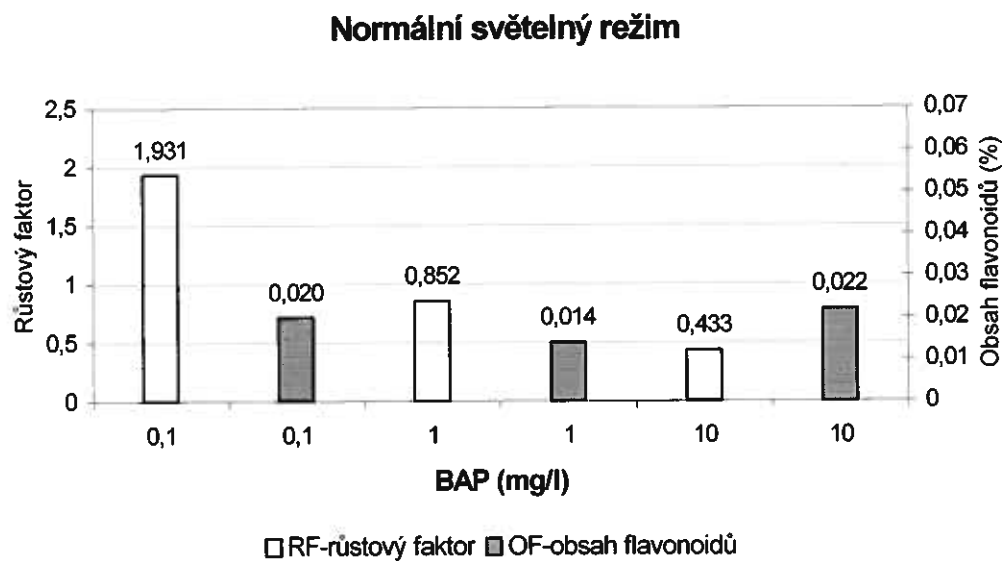
Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,26	0,27	0,01	3,85	0,430
2	0,22	0,29	0,07	31,82	Obsah flavonoidů <b>0,045 %</b>
3	0,30	0,58	0,28	93,33	
4	0,24	0,42	0,18	75,00	
5	0,27	0,28	0,01	3,70	
6	0,20	0,29	0,09	45,00	Směrodatná odchylka <b>0,001</b>
Součet	1,49	2,13	0,64	252,70	Testovací kritérium
Průměr	<b>0,25</b>	<b>0,36</b>	<b>0,11</b>	<b>42,12</b>	<b>34,000</b>

Tabulka č. 45: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* 50. den růstové a produkční křivky.

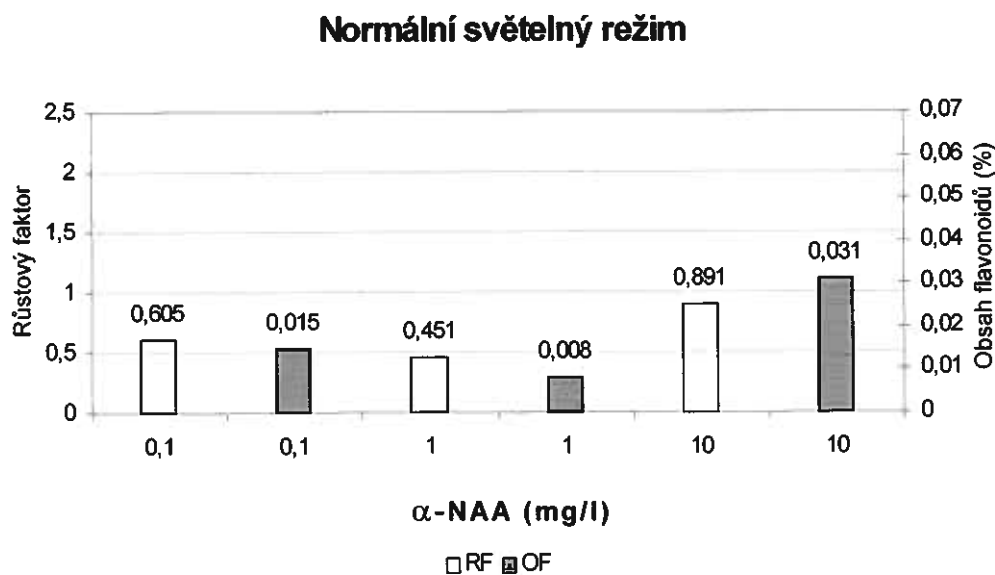
Normální světelný režim 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l					
Číslo baňky	Hmotnost inokula (g)	Hmotnost kalusu (g)	Přírůstek (g)	Přírůstek (%)	Růstový faktor
1	0,38	0,45	0,07	18,42	<b>1,115</b>
2	0,38	0,65	0,27	71,05	Obsah flavonoidů <b>0,033 %</b>
3	0,50	1,19	0,69	138,00	
4	0,33	0,91	0,58	175,76	
5	0,42	1,02	0,60	142,86	Směrodatná odchylka <b>0,002</b>
6	0,33	0,73	0,40	121,21	
Součet	2,34	4,95	2,61	667,30	Testovací kritérium <b>13,914</b>
Průměr	<b>0,39</b>	<b>0,83</b>	<b>0,44</b>	<b>111,22</b>	

## 5.2 Grafy

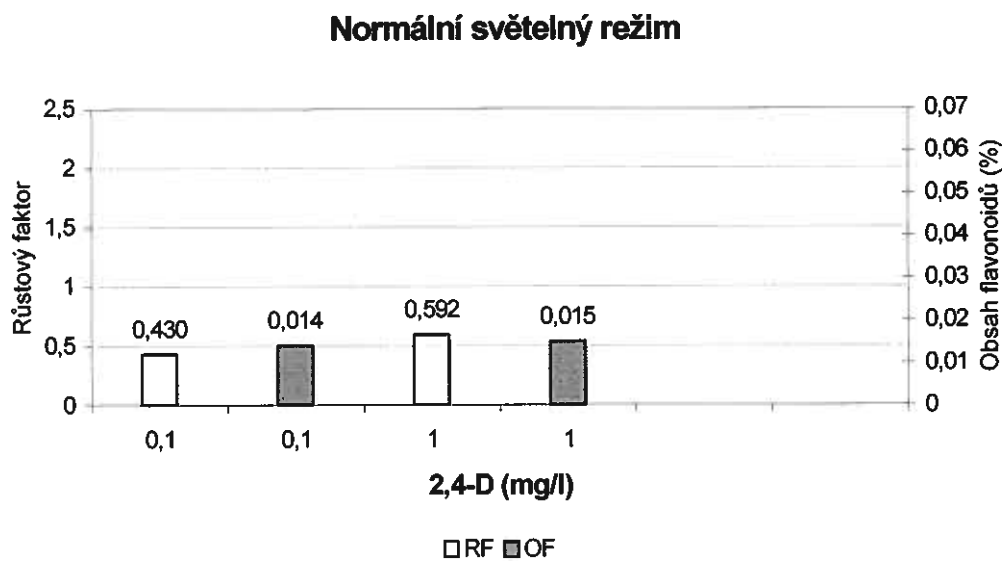
Graf č. 1: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP mg/l.



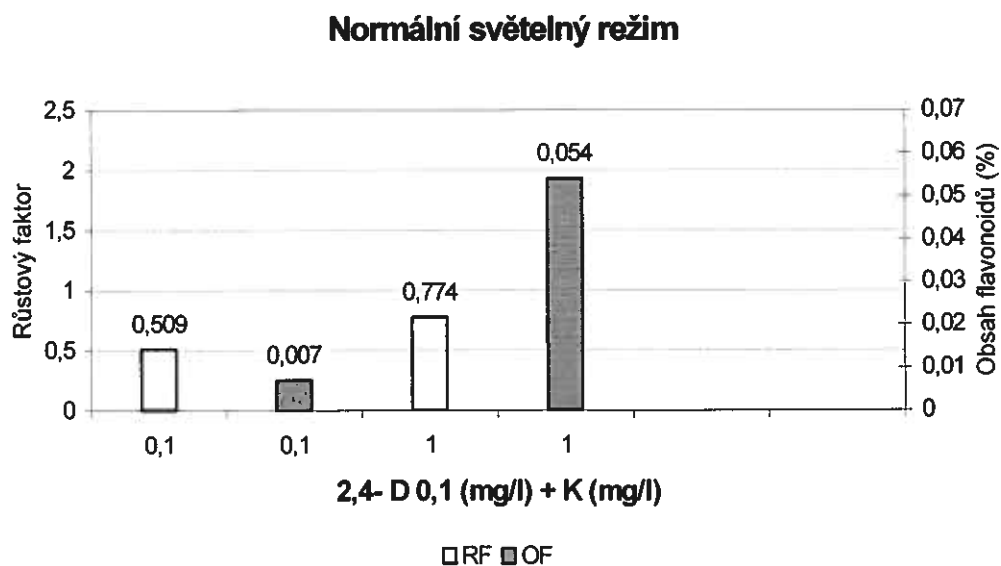
Graf č. 2: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA mg/l.



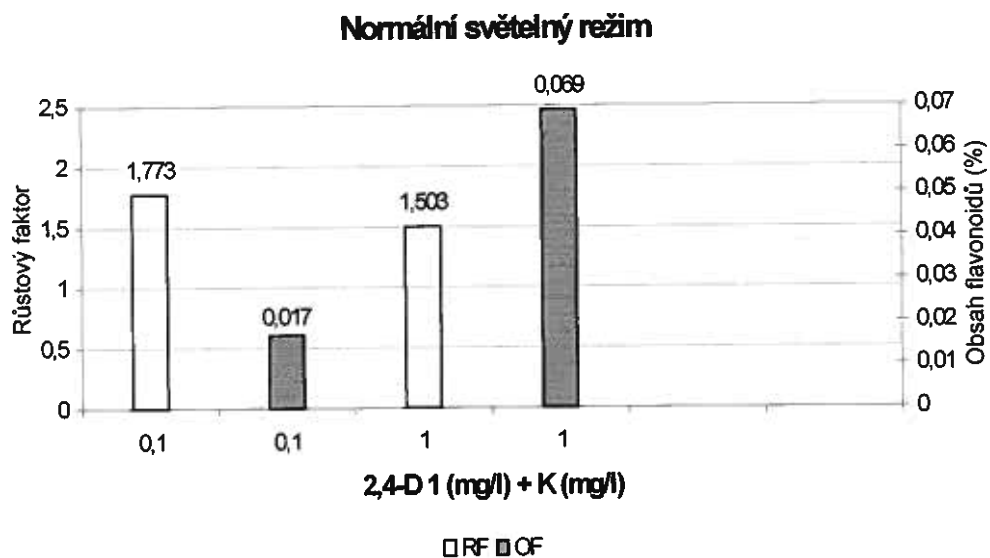
Graf č. 3: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D mg/l.



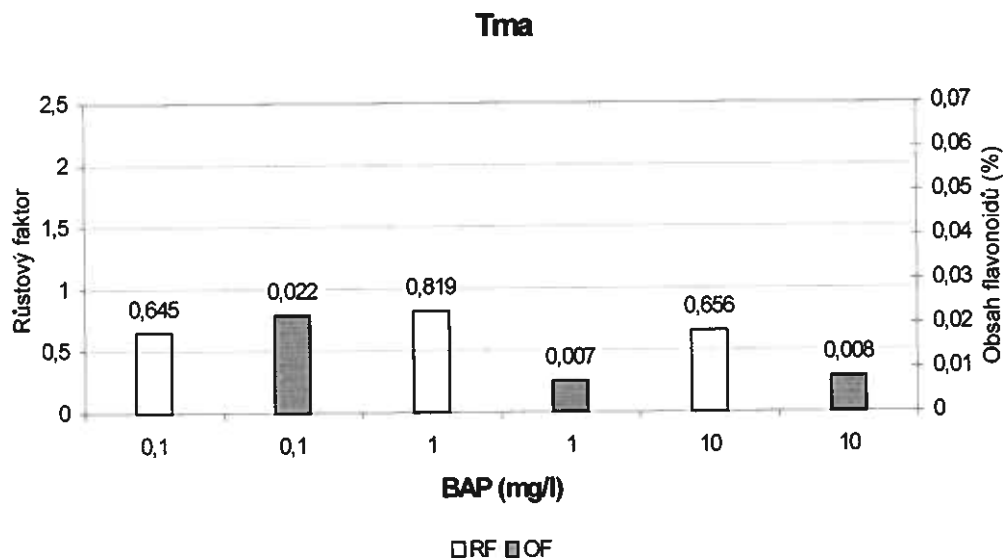
Graf č. 4: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l a K mg/l.



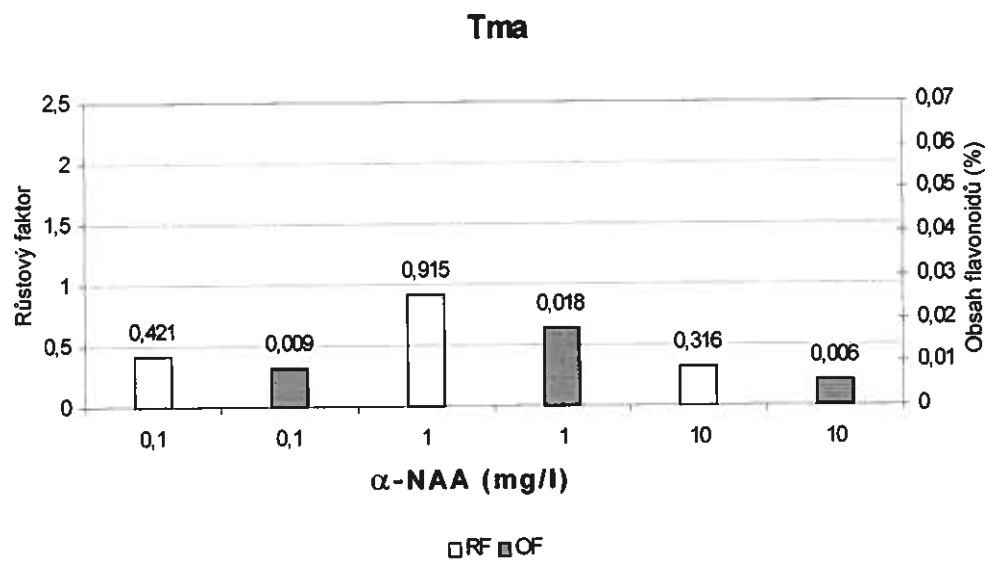
Graf č. 5: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K mg/l.



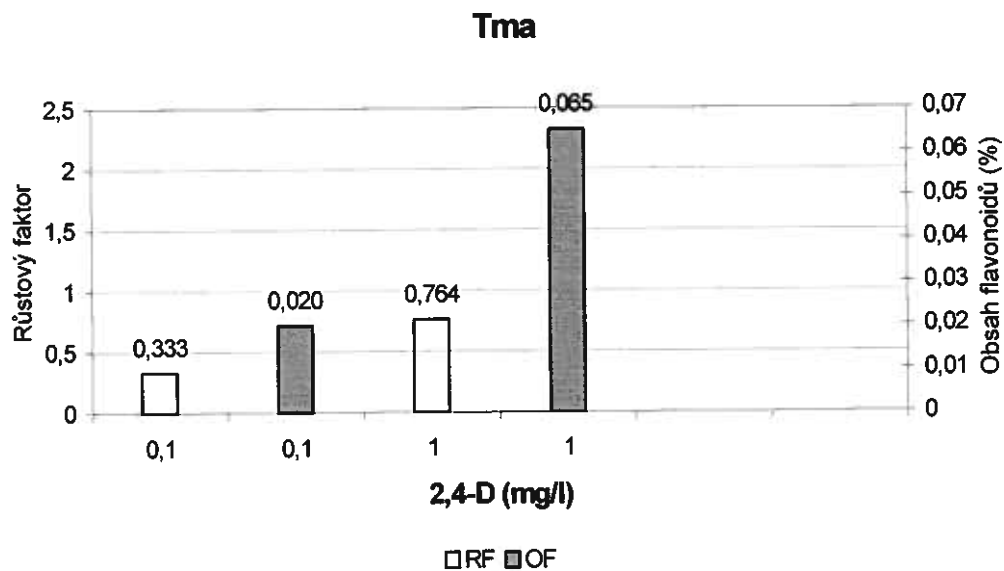
Graf č. 6: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP mg/l.



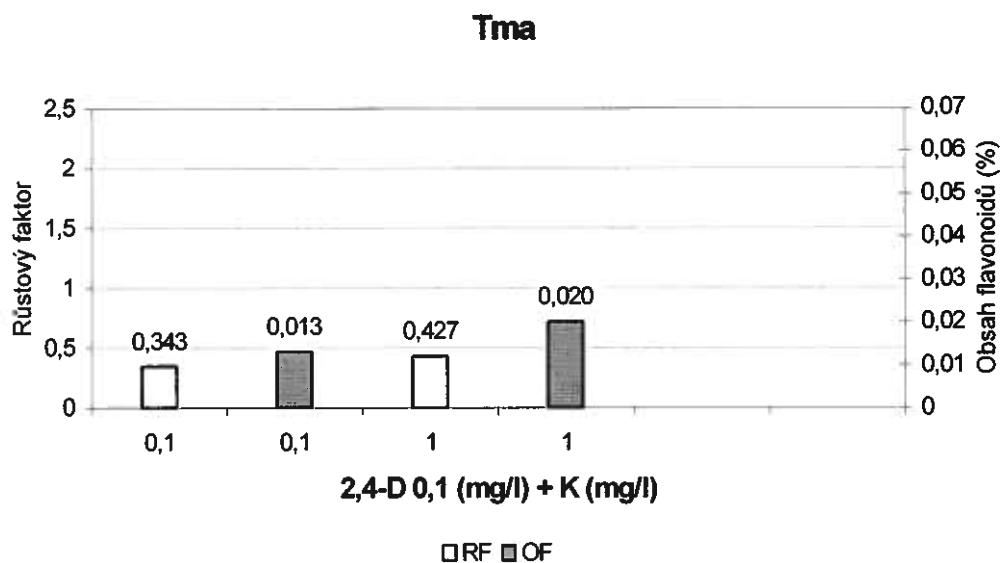
Graf č. 7: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA mg/l.



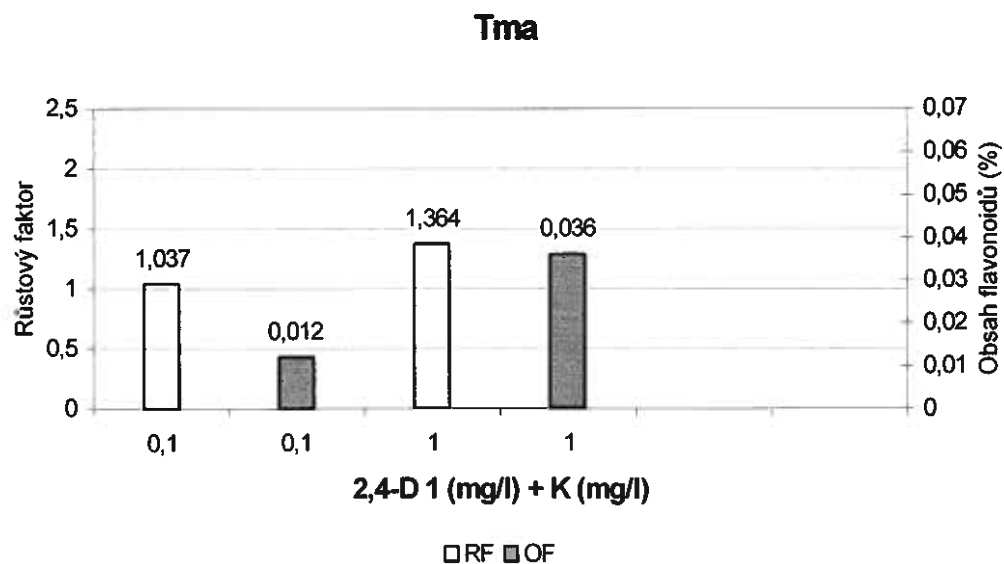
Graf č. 8: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D mg/l.



Graf č. 9: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l a K mg/l.

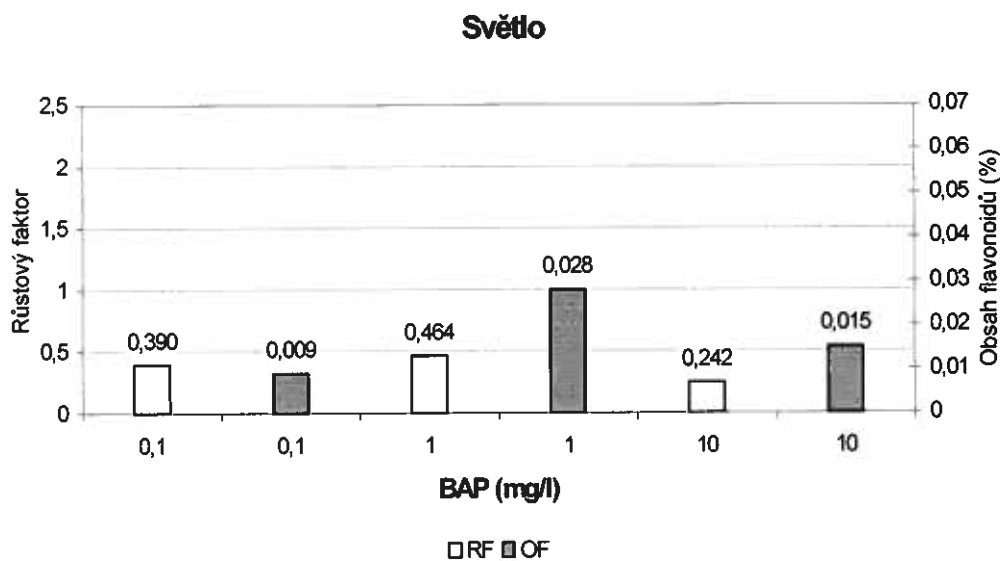


Graf č. 10: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K mg/l.

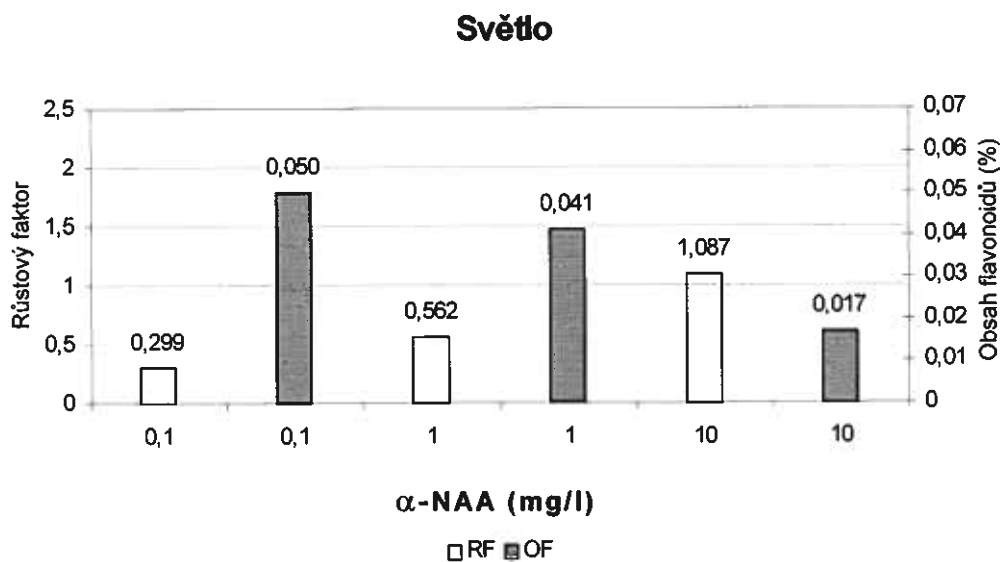




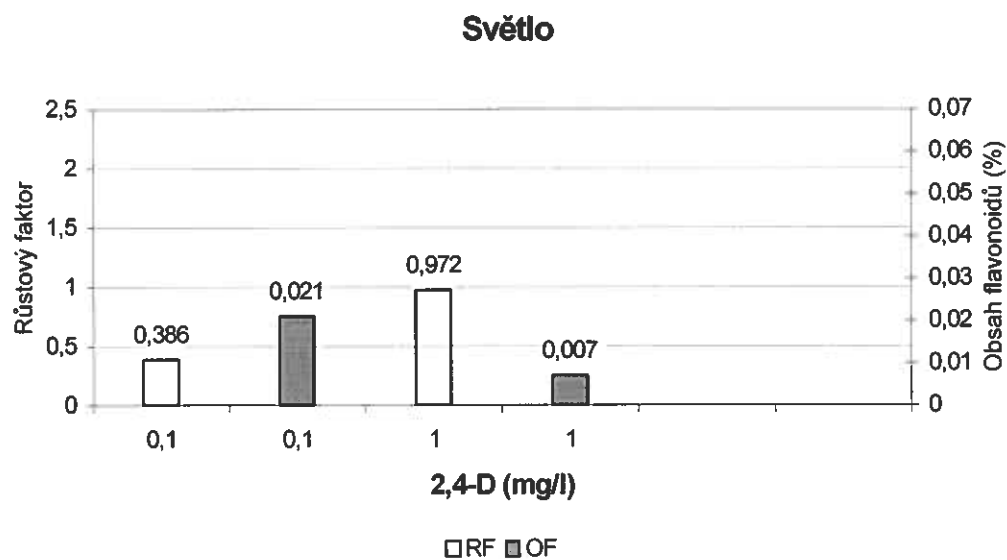
Graf č. 11: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s BAP mg/l.



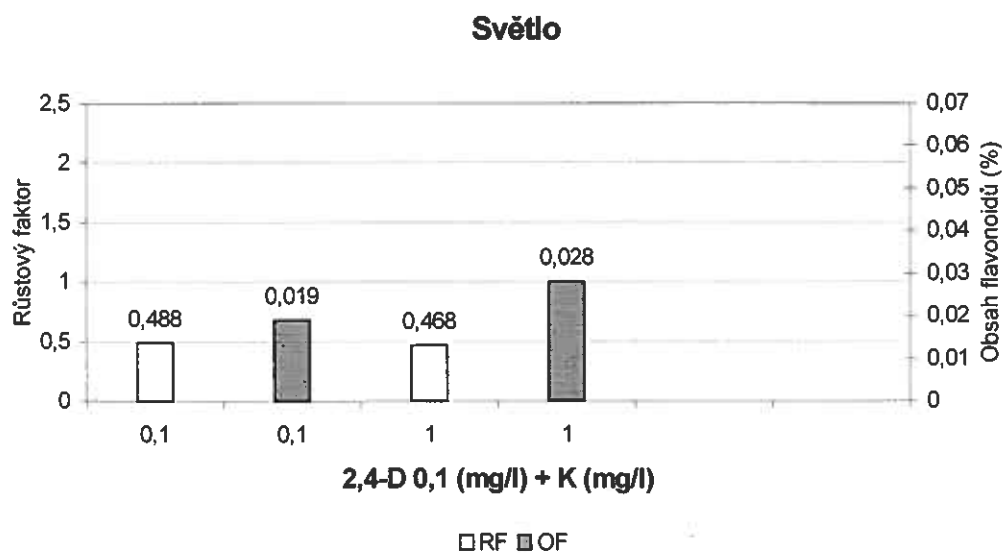
Graf č. 12: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s  $\alpha$ -NAA mg/l.



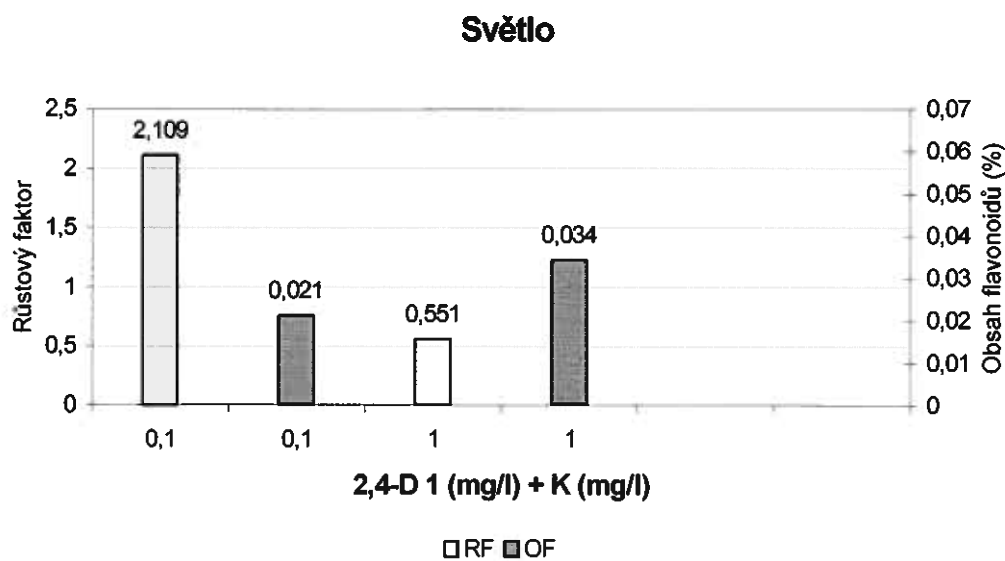
Graf č. 13: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D mg/l.



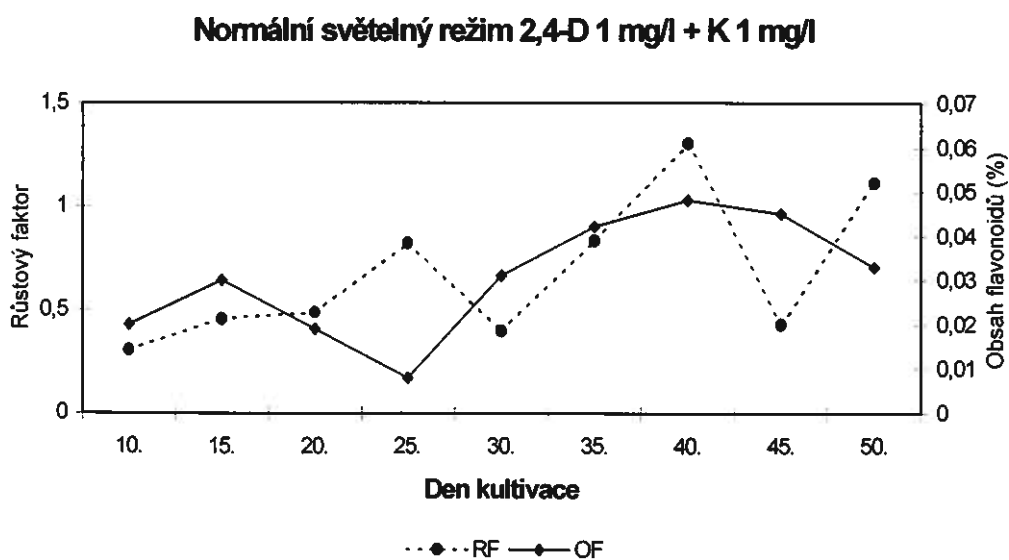
Graf č. 14: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 0,1 mg/l a K mg/l.



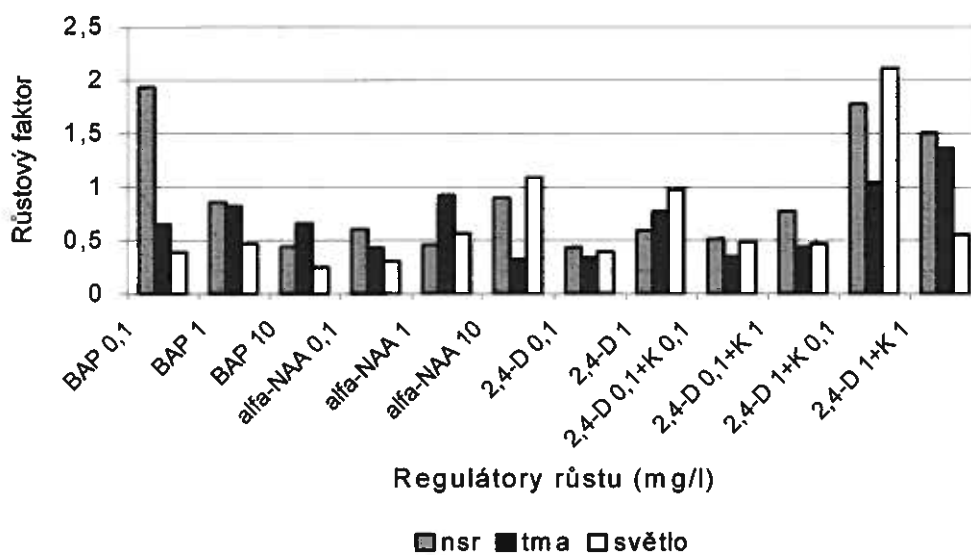
Graf č. 15: Růst a produkce kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K mg/l.



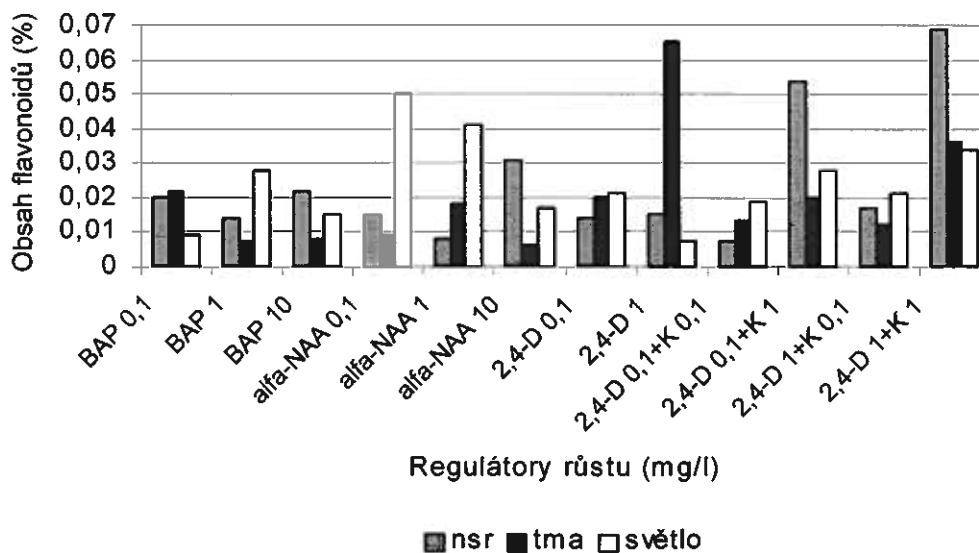
Graf č. 16: Růstová a produkční křivka kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s 2,4-D 1 mg/l a K 1 mg/l.



Graf č. 17: Přehled růstových faktorů kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s různými regulátory růstu a za měnících se světelných podmínek.



Graf č. 18: Přehled obsahu flavonoidů kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* na MS médiu s různými regulátory růstu za měnících se světelných podmínek.



## 6. DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo seznámení s metodikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále založit kalusovou kulturu *Fagopyrum esculentum* a odvodit růstové a produkční charakteristiky této kultury. Kultura rostla na médiu Murashigeho a Skooga se zvolenými koncentracemi různých růstových regulátorů a za měnících se světelných podmínek.

Jednou z důležitých podmínek při kultivaci rostlinných kultur *in vitro* je zvolení vhodného živného média s optimální kombinací a koncentrací růstových regulátorů. Dále je nutné nastavit podmínky růstu jako je světlo, teplota, pH a dodržovat zásady aseptické práce.

Kalini a kol. poukazují na vzájemné vztahy mezi intenzitou růstu kalusu a velikostí explantátu. Autoři zjistili, že čím je explantát větší, tím je různorodější složení buněk. Intenzita růstu kalusu toho samého druhu může být rozdílná. Tato variabilita je způsobená tím, že inokulum se odebírá nejen z různých částí neorganizovaně rostoucích buněk kalusu, ale i z různých kalusů. (3)

Při cytodiferenciaci, buněčné agregaci a morfologické organizaci dochází ke zpomalení růstu, což přímo koreluje se vzestupem syntézy sekundárních metabolitů v tkáňové kultuře. Ukazuje se, že faktory zpomalující růst buněčných kultur působí také často stimulačně na produkci sekundárních metabolitů, především cestou primárního metabolismu. Tento poznatek naznačuje určitý antagonismus primárního a sekundárního metabolismu, což na molekulární úrovni představuje rozdílné využívání společných prekurzorů. Za podmínek rychlého růstu a dělení jsou tyto látky využívány např. k syntéze proteinů, ale za podmínek inhibice růstu jsou využity k syntéze sekundárních metabolitů. (4)

V předložené práci jsem se zabývala kultivací kalusové kultury *Fagopyrum esculentum*. Kalusovou kulturu jsem pěstovala na můstcích z filtračního papíru v Erlenmayerových baňkách s živným médiem Murashigeho a Skooga za zvolených světelných podmínek. Jako světelné

podmínky jsem zvolila normální světelný režim denní fotoperiody, tmu a světlo. Do živného média jsem přidala různé regulátory růstu v měnících se koncentracích. Jako regulátory růstu jsem použila: BAP (0,1; 1; 10 mg/l),  $\alpha$ -NAA (0,1; 1; 10 mg/l), 2,4-D (0,1; 1 mg/l) a kombinaci 2,4-D a K (0,1+0,1; 0,1+1; 1+0,1; 1+1 mg/l). Po pěti týdnech kultivace jsem vyhodnotila růst kultury a stanovila obsah sekundárních metabolitů - flavonoidů spektrofotometricky podle ČL 97. Obsah flavonoidů jsem statisticky vyhodnotila. Pro kultivaci na živném médiu s 2,4-D 1 mg/l v kombinaci s K 1 mg/l za normálního světelného režimu jsem sestrojila růstovou a produkční křivku.

Z výsledků experimentální práce vyplývá, že maximální růst kultury nastal při kultivaci za světla s regulátorem 2,4-D 1 mg/l+K 0,1 mg/l (RF 2,109) (tabulka č. 35). Maximální produkce flavonoidů dosáhla kultura při kultivaci za normálního světelného režimu s 2,4-D 1 mg/l+K 1 mg/l (0,069 %) (tabulka č. 12).

Při použití růstového regulátoru BAP jsem zaznamenala nejvyšší růst u koncentrace BAP 0,1 mg/l za normálních světelných podmínek (graf č. 1). Růstový faktor zde vzrostl asi 3,5 krát. Významný byl i růst kultury u BAP 1 mg/l za normálního světelného režimu (graf č. 1) a za tmy (graf č. 6). Při použití  $\alpha$ -NAA byl nejvyšší růst zaznamenán u koncentrace  $\alpha$ -NAA 10 mg/l za normálního světelného režimu (graf č. 2) a za světla (graf č. 12) a u koncentrace  $\alpha$ -NAA 1 mg/l za tmy (graf č. 7). Růstové faktory za těchto podmínek byly asi 2 krát vyšší než u  $\alpha$ -NAA 0,1 mg/l (graf č. 2, 7, 12). Při použití růstového regulátoru 2,4-D dosahovala vyššího růstu koncentrace 2,4-D 1 mg/l oproti 2,4-D 0,1 mg/l (graf č. 3, 8, 13). Při kombinaci růstových regulátorů jsem zjistila nejvyšší růst kultury u kombinace 2,4-D 1+K 0,1 mg/l a 2,4-D 1+K 1 mg/l (graf č. 5, 10, 15), kde růstový faktor vzrostl asi 3 krát oproti kombinacím 2,4-D 0,1+K 0,1 mg/l a 2,4-D 0,1+K 1 mg/l (graf č. 4, 9, 14). Z výsledků vyplývá, že zvolené růstové regulátory měly významný vliv na růst kultury.

Podle výsledků v přehledu růstových faktorů (graf č. 17) jsem dospěla k tomu, že kultura *Fagopyrum esculentum* nejlépe rostla za

normálního světelného režimu. Nejvyššího růstu za normálního světelného režimu dosáhla kultura při kultivaci s regulátory BAP 0,1 mg/l; 2,4-D 1+K 0,1 mg/l a 2,4-D 1+K 1mg/l. Za těchto podmínek vzrostl růstový faktor asi 3 krát. Za světla byl dosažen nejvyšší růst s regulátory 2,4-D 1+0,1 K mg/l a za tmy s 2,4-D 1+K 1 mg/l.

Z výsledků uvedených v tabulkách v kapitole Výsledky vyplývá, že k statisticky významnému zvýšení obsahu flavonoidů za normálního světelného režimu došlo při kultivaci s růstovými regulátory BAP 0,1, 1, 10 mg/l;  $\alpha$ -NAA 0,1, 10 mg/l; 2,4-D 0,1, 1 mg/l; 2,4-D 0,1+K 1; 2,4-D 1+K 0,1; 2,4-D 1+K 1 mg/l. Při kultivaci za tmy jsem zaznamenala statisticky významné zvýšení obsahu flavonoidů při kultivaci s obsahem BAP 0,1 mg/l;  $\alpha$ -NAA 1 mg/l; 2,4-D 0,1, 1 mg/l; 2,4-D 0,1+K 1; 2,4-D 1+K 1 mg/l. Statisticky významné zvýšení obsahu flavonoidů při kultivaci za světla jsem pozorovala při použití těchto regulátorů růstu: BAP 1, 10 mg/l;  $\alpha$ -NAA 0,1, 1, 10 mg/l; 2,4-D 0,1 mg/l; 2,4-D 0,1+K 0,1; 2,4-D 0,1+K 1; 2,4-D 1+K 0,1; 2,4-D 1+K 1 mg/l. Z výsledků vyplývá, že zvolené růstové regulátory měly významný vliv na produkci kultury (tabulka č. 10, 12, 20, 28, 29).

Podle přehledu obsahu flavonoidů (graf č. 18) kultura *Fagopyrum esculentum* nejlépe produkovala flavonoidy za světla. Za normálního světelného režimu s 2,4-D 1+K 1 mg/l (tabulka č. 12) a za tmy s 2,4-D 1 mg/l (tabulka č. 20) se produkce zvýšila asi 3,5 krát. Za normálního světelného režimu s 2,4-D 0,1+K 1 mg/l (tabulka č. 11) a za světla s  $\alpha$ -NAA 0,1 mg/l (tabulka č. 28) vzrostla produkce flavonoidů asi 2,5 krát a s  $\alpha$ -NAA 1 mg/l za světla (tabulka č. 29) asi 2 krát.

V mé práci jsem zjistila průměrnou produkci flavonoidů kalusovou kulturou *Fagopyrum esculentum* 0,023 %. Rostlinné kalusové kultury produkují většinou oproti matečné rostlině nižší množství sekundárních metabolitů. Různí autoři uvádějí následující obsahy flavonoidů v pohance. Ohsawa a Tsutsumi pěstovali různé odrůdy pohanky. Při stanovení obsahu rutinu pomocí HPLC v mletých semenech byl průměrný obsah rutinu v rostlinách pěstovaných za dlouhodobých podmínek 0,147 mg/g. V rostlinách pěstovaných za krátkodobých podmínek byl obsah

rutinu 0,064 mg/g. (38) Watanabe uvádí celkovou koncentraci flavonoidů v pohankových semenech a slupkách 18,8 mg/100 g a 74 mg/100 g. (37) Při stanovení obsahu rutinu kapilární elektroforézou v mletých semenech pohanky, stoncích, listech a květech byly zjištěny tyto hodnoty koncentrace rutinu: v otrubách 131-476 ppm, v mouce 19-168 ppm a ve slupkách 29 ppm. V listech, stoncích a květech bylo průměrně okolo 300, 1000 a 46000 ppm rutinu. (36)

Na základě vyhodnocení výsledků růstu a produkce kultury jsem dospěla k tomu, že z použitých růstových regulátorů se nejlépe pro růst kultury i produkci flavonoidů osvědčila kombinace růstových regulátorů 2,4-D 1+K 1 mg/l při kultivaci za normálního světelného režimu (tabulka č. 12). Pro kultivaci kultury na MS médiu s obsahem 2,4-D 1 mg/l v kombinaci s K 1 mg/l za normálního světelného režimu jsem sestrojila růstovou a produkční křivku. Na růstové křivce (graf č. 16) jsou viditelná dvě maxima 25. a 40. den růstu. Produkční křivka vykazuje první maximum produkce flavonoidů 15. den, produkce pak klesá, znovu stoupá od 25. dne a dosahuje druhého maxima 40. den růstu. Po 40. dni produkce opět klesá.



## 7. ZÁVĚR

Kalusová kultura dosáhla maximálního růstu při kultivaci za světla při použití růstového regulátoru kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové 1 mg/l v kombinaci s 6-furfurylaminopurinem (kinetin) 0,1 mg/l.

Maximální produkce flavonoidů kalusovou kulturou byla zaznamenána při kultivaci za normálního světelného režimu s obsahem kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové 1 mg/l v kombinaci s 6-furfurylaminopurinem 1 mg/l.

Optimální pro růst i produkci flavonoidů je kultivace za normálního světelného režimu s obsahem kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové 1 mg/l v kombinaci s 6-furfurylaminopurinem 1 mg/l.

Průměrná produkce flavonoidů kalusovou kulturou je 0,023 %.

Kalusová kultura rostla nejlépe za normálních světelných podmínek a flavonoidy produkovala nejlépe za světla. Použité růstové regulátory významně ovlivňují růst i produkci kalusové kultury.

## 8. SEZNAM LITERATURY

1. Petr J., Hradecká J.: Základy pěstování pohanky a prosa. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství České republiky, 1997, s. 5, 6.
2. Macholán L.: Sekundární metabolity. Masarykova univerzita, Brno, 1998, s. 76.
3. Kamenická A., Rypák M.: Explantáty v rozmnožování dřevín. VEDA, Slovenská akademie věd, Bratislava, 1989, s. 10-20, 38, 44, 45, 72-79, 121.
4. Kováč J.: Explantátové kultury rostlin. Univerzita Palackého, Olomouc, 1995, s. 1-16, 76-81, 151, 153.
5. Procházka S., Šebánek J. a kol.: Regulátory rostlinného růstu. Academia, Praha, 1997, s. 17-19, 31-47, 51-65, 76-77, 81-99, 103, 126.
6. Dušek J. a kol.: Praktická cvičení z farmakognosie. Univerzita Karlova, Praha, 2002, s. 22.
7. Hubík J. a kol.: Obecná farmakognosie II. sekundární látky. Univerzita Karlova, Praha, 1989, s. 31-34.
8. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty. Karolinum, Praha, 1992, s. 84-93.
9. Janča J., Zentrich J. A.: Herbář léčivých rostlin 4. díl. Eminent, Praha, 1996, s. 28-30.
10. Mladá J., Procházka F.: Atlas cizokrajných rostlin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1987, s. 250.
11. Yoshiokaa H., Ohmotoa T. et al.: Expression and epitope analysis of the major allergenic protein Fag e 1 from buckwheat. *Journal of Plant Physiology* 161 (7), (2004), s. 761-767.
12. Baumgertel A., Grimm R. et al.: Purification and characterization of a flavonol 3-O-beta-heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum* Moench. *Phytochemistry* 64 (2), (2003), s. 411-418.

13. Tsybina T., Dunaevsky Y. et al.: New protease inhibitors from buckwheat seeds: properties, partial amino acid sequences and possible biological role. *Biological chemistry* 385 (5), (2004), s. 429-434.
14. Stibilj V., Kreft I. et al.: Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilisation. *European food Research and Technology* 219 (2), (2004), s. 142-144.
15. Raisenauer R.: *Metody matematické statistiky*. SNTL, Praha, 1970, s. 78-81, 207.
16. Podlech D.: *Kapesní atlas léčivé rostliny*. Slovart, Praha, 2002, s. 130.
17. Yao L. H., Jiang Y. M. et al.: Flavonoids in Food and Their Health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59, (2004), s. 113-122.
18. Filipe P., Lanca V. et al.: Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry* 221, (2001), s. 79-87.
19. La Torre F., Nicolai A. P.: Clinical Use of Micronized Purified Flavonoid Fraction for Treatment of Symptoms After Hemorrhoidectomy. *Diseases of the Colon and Rectum* 47, (2004), s. 704-710.
20. Maksimov A. Yu., Remezovskaya N. B. et al.: Effect of Flavonoids on the Ecology of Enterobacteria. *Russian Journal of Ecology* 34 (2), (2003), s. 110-113.
21. Rassi C. M., Lieberherr M. et al.: Modulation of osteoclastogenesis in porcine bone marrow cultures by quercetin and rutin. *Cell and Tissue Research* 319, (2005), s. 383-393.
22. Macek T.: *Produkce sekundárních metabolitů kulturami rostlinných buněk in vitro*. Blažek J.: *Nezbytné předpoklady pro práci s tkáňovými kulturami vyšších rostlin in vitro*. *Biotechnologické využití tkáňových a buněčných kultur vyšších rostlin*, Pobočka ČSVTS, Praha, 1985, s. 38-40, 63, 64.

23. Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15 (47), (1962), s. 473.
24. Kutina J.: Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1988, s. 12, 13, 24-27, 58, 75-81, 98, 104, 108.
25. Ren W., Quian Z. et al.: Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Revue* 23 (4), (2003), s. 519-534.
26. Dušek J.: Studium pesticidů jako exogenních faktorů ovlivňujících jakost drog. Kandidátská disertační práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 1993.
27. Kolektiv autorů: Český lékopis 1997. Grada Publishing, Praha, 1997, s. 1491, 1492.
28. Kolektiv autorů: Český lékopis 2002. Grada Publishing, Praha, 2002, s. 154.
29. Peng Y. Y., Liu F. H. et al.: Determination of Phenolic Compounds in the Hull and Flour of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Analytical letters* 37 (13), (2004), s. 2789-2803.
30. Feedmark: Herbář léčivých rostlin. [online] [cit. 26.2.2006] Dostupné z WWW:  
<http://equi-herbs.wz.cz/New1/lecivebyliny.htm#pohanka>
31. Asociace věd esoterických: Zdravá strava. [online] [cit. 26.2.2006] Dostupné z WWW:  
<http://www.ikona.cz/slunecnice/pohanka3.htmlv>
32. Výzkumný ústav rostlinné výroby: Alternativní plodiny. [online] [cit. 26.2.2006] Dostupné z WWW:  
<http://www.vurv.cz/altercrop/pohsetchar.htm>
33. Stránky chirurgické ambulance v Blansku: O pohance. [online] [cit. 26.2.2006] Dostupné z WWW:  
[http://chirurgieblansko.cz/chirurgie/hemoroidy/hem\\_pohanka.htm](http://chirurgieblansko.cz/chirurgie/hemoroidy/hem_pohanka.htm)
34. Česká asociace sester: Minoritní obiloviny a pseudoobiloviny a jejich uplatnění ve zdravé a dietní výživě. [online] [cit. 26.2.2006] Dostupné z WWW:

[http://www.cnaa.cz/doc/sekce/minoritni\\_obilniny.php?PHPSESSID=19da061ca108fbc6f9a05ccd341afa03](http://www.cnaa.cz/doc/sekce/minoritni_obilniny.php?PHPSESSID=19da061ca108fbc6f9a05ccd341afa03)

35. Klemra P., Klemrová V.: Základy aplikované statistiky pro studující farmacie. Karolinum, Praha, 1993, s. 30, 31.
36. Kreft S., Knapp M. et al: Extraction of Rutin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds and Determination by Capillary Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, (1999), s. 4649-4652
37. Sun T., Ho C.-T.: Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* 90, (2005), s. 743-749.
38. Ohsawa R., Tsutsumi T.: Inter-varietal variations of rutin content in common buckwheat flour (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Euphytica* 86, (1995), s. 183-189.