

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VLIV SELÉNU NA PRODUKCI SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ
V *IN VITRO* KULTUŘE LÉČIVÝCH ROSTLIN – II**

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

Pověřen vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, PhD.

Hradec Králové, květen 2018

Tereza Ošťádalová

Na úvod bych velice ráda poděkovala Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení, ochotu a cenné rady při vypracování této práce, PharmDr. Janu Martinovi, PhD. za pomoc při analýze vzorků pomocí HPLC a celému kolektivu Katedry farmakognozie za vstřícný přístup v průběhu laboratorní práce.

Tato práce byla vypracována za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260416.

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

Tereza Ošťádalová

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	CÍL PRÁCE.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1	Explantátové kultury rostlin.....	9
3.1.1	Rozdělení explantátových kultur a jejich charakteristika.....	9
3.1.2	Průběh kultivace.....	12
3.1.2.1	Kultivační (živná) média.....	12
3.1.3	Výhody a použití explantátových kultur.....	17
3.2	Sekundární metabolity rostlin.....	18
3.2.1	Možnosti zisku sekundárních metabolitů.....	18
3.2.2	Navyšování produkce sekundárních metabolitů v <i>in vitro</i> kulturách.....	19
3.3	Fyziologie rostlinného stresu.....	20
3.3.1	Definice stresu, stresové faktory.....	20
3.3.2	Mechanismy odolnosti rostlin.....	21
3.3.2.1	Společné mechanismy stresových reakcí.....	21
3.4	Elicitace.....	23
3.4.1	Dělení elicitorů.....	24
3.4.2	Mechanismus elicitace.....	25
3.5	Selen.....	27
3.5.1	Selen v lidském organismu.....	27
3.5.2	Selen v rostlinách.....	28
3.6	Pohanka obecná.....	30
3.6.1	Botanický popis.....	30
3.6.2	Odrůda Pyra.....	31

3.6.3	Původ pohanky a její využití	32
3.6.4	Lékopisná droga.....	32
3.6.5	Obsahové látky pohanky.....	33
3.6.5.1	Rutin	33
3.6.5.2	Ostatní obsahové látky	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1	Materiál, přístrojové vybavení a pomůcky.....	35
4.1.1	Rostlinný materiál.....	35
4.1.2	Chemikálie	35
4.1.3	Přístrojové vybavení a pomůcky.....	36
4.2	<i>In vitro</i> kultivace	37
4.2.1	Složení a příprava živného média.....	37
4.2.2	Zajištění aseptických podmínek.....	39
4.2.3	Odvození kalusové kultury	39
4.2.4	Kultivace a pasážování kalusové kultury.....	39
4.2.5	Odvození suspenzní kultury.....	40
4.3	Elicitace.....	40
4.3.1	Příprava elicitoru.....	40
4.3.2	Vlastní elicitace.....	41
4.4	Stanovení obsahu rutinu	42
4.4.1	Příprava vzorků k HPLC analýze	42
4.4.2	HPLC analýza	43
4.5	Statistické zpracování dat	45
5	VÝSLEDKY	46
5.1	Tabulky	46
5.2	Grafy	50

6	DISKUZE	53
7	ZÁVĚR	58
8	POUŽITÁ LITERATURA	59
9	ABSTRAKT	65
10	ABSTRACT.....	66

1 ÚVOD

Vyšší rostliny jsou nejen významným zdrojem obživy, ale také představují bohatou zásobárnu bioaktivních sloučenin, které nachází uplatnění mimo jiné i v oblasti farmaceutického průmyslu.

Uvádí se, že čtvrtina ze všech předepisovaných léčiv v průmyslově vyspělých zemích je přírodního nebo polosyntetického původu. Doposud nebyla pro mnohé přírodní látky nalezena jejich syntetická analoga, která by byla srovnatelně účinná a vykazovala obdobné farmakologické vlastnosti. Navíc jsou chemické syntézy obvykle drahé, obtížné na provedení a u některých složitějších struktur prozatím neuskutečnitelné.

Vhodnou alternativou pro získání sekundárních metabolitů je i jejich biotechnologická produkce explantátovými kulturami *in vitro*. Explantátové kultury mají oproti izolaci sekundárních metabolitů z intaktních rostlin a chemickým syntézám řadu výhod. Pouze v malém počtu explantátových kultur však bylo dosaženo vyšší produkce sekundárních metabolitů než v intaktní rostlině. Jednou z možností indukce nebo zvýšení tvorby sekundárních metabolitů je použití tzv. elicitorů. Elicitor představuje stresor, na který rostlinná buňka reaguje spuštěním obranné reakce založené na produkci sekundárních metabolitů. Mezi zkoumané elicitory se řadí i selen. [1, 2]

V této práci jsem se zabývala vlivem abiotického elicitoru selenu na produkci sekundárního metabolitu rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., varieta Pyra. Záměrem této práce je prohloubit a rozšířit dosavadní poznatky o navýšování produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* explantátových kulturách metodou elicitace.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je seznámení s metodikou kultivace rostlinných kultur *in vitro* a dále také sledování vlivu abiotického elicitoru selenu na produkci sekundárního metabolitu rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., varieta Pyra. Na základě stanovení obsahu rutinu HPLC metodou zjistit, zda uvedený elicitor v různých koncentracích může ovlivnit produkci této obsahové látky. Zároveň je sledováno případné vylučování rutinu do živného média.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Explantátové kultury rostlin

Rostlinný explantát je definován jako izolovaná část rostliny kultivovaná *in vitro* za aseptických podmínek. Pro odvození explantátové kultury se používají sterilně pěstované nebo povrchově sterilizované rostliny či jejich části. [2]

K odvození explantátové kultury je teoreticky možné použít jakoukoliv rostlinnou buňku s funkčním jádrem. Využívá se tzv. totipotence rostlinné buňky. Splynutím dvou haploidních buněk vzniká zygota, která ve svém jádře obsahuje kompletní genetickou informaci a v cytoplasmě funkční aparát, který tuto informaci umožňuje realizovat. Zygota je totipotentní a mitoticky se dělí na buňky dceřiné, které se dále vyvíjí a diferencují na stavební jednotky specializovaných pletiv. Diferencované buňky mají stejnou genetickou výbavu jako buňky meristematické a jsou schopny zpětné dediferenciace a následného dělení. Dediferenciaci a neorganizovaný růst je většinou možné vyvolat změnou podmínek, ve kterých se buňka nachází. Pokud není buněčné dělení organizované a není-li nastolena buněčná a orgánová polarita, vyvíjí se kalus. Totipotentní je tedy nejen zygota a meristematická buňka, ale i kterákoliv jiná specializovaná rostlinná buňka v rostlinném organismu. Některé vysoce funkčně specializované buňky schopnost totipotence ztratily. Jako příklad je možné uvést bezjaderné vodivé buňky v lýku. [2, 3, 4]

3.1.1 Rozdělení explantátových kultur a jejich charakteristika

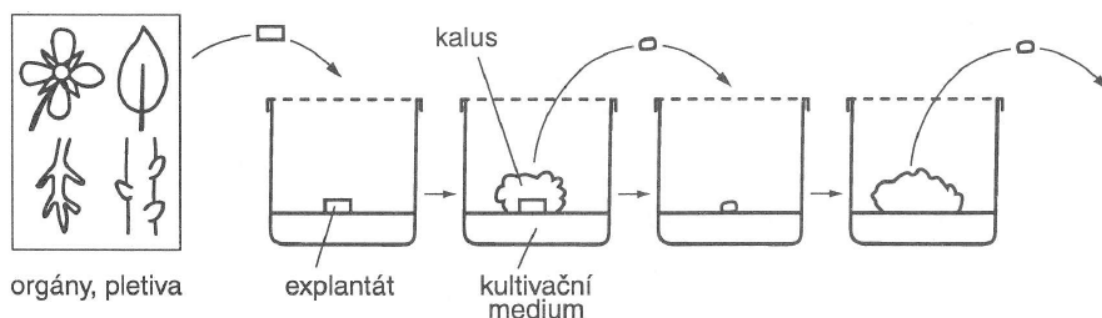
Podle morfologických znaků lze rostlinné explantáty rozdělit na kultury orgánové, tkáňové, suspenzní, buněčné a kultury buněčných protoplastů.

Kultury orgánové jsou tvořeny orgánovými systémy, jednotlivými orgány nebo jejich částmi. Buňky jsou diferencované a stavba orgánu i jeho funkce zůstávají zachovány.

Tkáňové (kalusové kultury) tvoří morfologicky neorganizované a pouze částečně soudržné mnohobuněčné agregáty. Pro kultivaci kalusových kultur se nejčastěji používají polotuhá nebo tuhá kultivační média. [5]

Buněčné dělení vedoucí ke tvorbě kalusu na výchozím explantátu lze vyvolat buď růstovými regulátory přítomnými ve vhodné koncentraci v živném médiu, především auxinem a cytokininem, nebo poraněním pletiva. Kalus se obvykle na výchozím explantátu vytváří za 2–6 týdnů. Z tohoto primárního kalusu se následně část odebere a přenese na čerstvé kultivační médium. Tento proces přenášení kalusu se označuje jako pasážování. U kalusové kultury se opakovaným pasážováním zvyšuje pravděpodobnost genetických změn a naopak klesá morfogenní schopnost. Rozpadavý kalus je možné dále využít pro tvorbu suspenzní kultury. [2, 6, 7]

Obrázek 1: Založení explantátové kultury, tvorba kalusu a jeho následné pasážování [6]

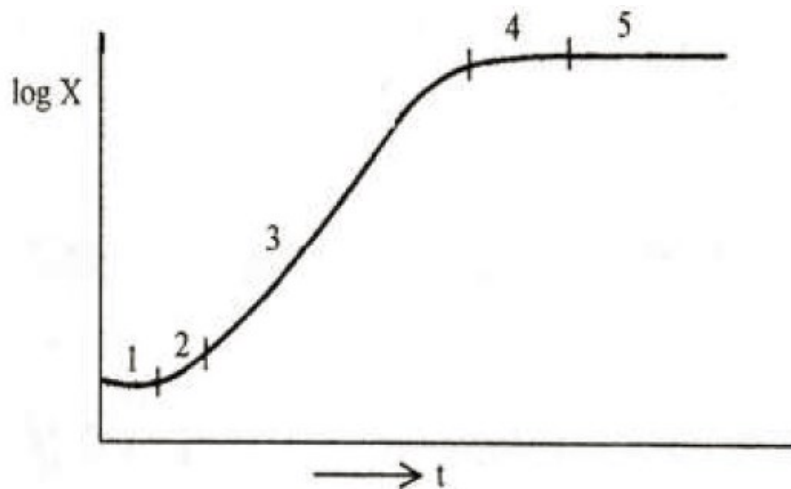


U dvouděložných rostlin se jako výchozí explantáty pro odvození kalusu používají například segmenty kořenů, stonků, listů, části zásobních orgánů, embrya, vzrostlé vrcholy aj. U jednoděložných rostlin lze pro tyto účely použít především velmi mladé listy, embrya, květní základy a nodální segmenty. [2]

Suspenzní kultury jsou tvořeny z jednotlivých buněk či malých buněčných shluků kultivovaných v tekutém pohybujícím se živném médiu. Tekutost živného média umožňuje buňkám snadnější přístup k živinám. Pohyblivost média přispívá k lepší výměně dýchacích plynů. V důsledku toho je růst suspenzní kultury rychlejší než růst kultury kalusové.

Růst suspenzní kultury lze charakterizovat růstovou křivkou, která představuje grafické znázornění některé z růstových charakteristik suspenze, jako je například počet buněk, čerstvá hmotnost, sušina aj., v závislosti na čase. [2]

Obrázek 2: Růstová křivka [8]



Na obrázku 2 je znázorněn průběh růstové křivky. Na ose x je vynesena čas (t), na ose y logaritmus hmotnosti buněk ($\log X$). Růstová křivka je dělena do několika fází:

- 1 – lag fáze
- 2 – akcelerační fáze
- 3 – exponenciální fáze
- 4 – deklinační fáze
- 5 – stacionární fáze
- 6 – odumírání buněk

Lag fáze představuje úvodní fázi růstové křivky. Naočkované buňky se přizpůsobují novému prostředí, což je provázeno prvotním mírným poklesem množství živých buněk. V následující akcelerační fázi rychlost množení buněk narůstá. Maximální konstantní rychlosti množení buněk je dosaženo v exponenciální fázi růstové křivky. V deklinační fázi je množení buněk zpomaleno následkem postupného odčerpání živin z média nebo hromadění toxických produktů buněčného metabolismu. Pro stacionární fázi je charakteristická rovnováha mezi množením a odumíráním buněk. Poslední fází je fáze odumírání, kdy je rychlost odumírání buněk vyšší než rychlost jejich množení. [8]

Rostoucí suspenzní kultura odčerpává z kultivačního média živiny, a tudíž je nezbytné provádět její pravidelné pasážování na čerstvé médium. Pasážování se provádí na konci exponenciální fáze růstu kultury.

Ideální je taková buněčná suspenzní kultura, které je biochemicky i morfologicky homogenní. Dlouhodobou kultivací se však suspenzní kultura stává značně heterogenní. Heterogenita je způsobena genetickými změnami. Ve starší suspenzní kultuře jsou přítomny různě velké shluky meristematických buněk a protáhlé, vakuolizované a nedělící se buňky. [2]

Buněčné kultury jsou tvořeny jednotlivými buňkami kultivovanými v tekutém nebo polotuhém živném médiu, případně na nosiči nasyceném živným médiem. [5]

Kultury buněčných protoplastů jsou tvořeny rostlinnými buňkami s odstraněnou buněčnou stěnou. Buněčnou stěnu je možné odstranit mechanicky nebo enzymaticky. Při enzymatické izolaci protoplastů se buňky umístí do roztoku obsahujícího kromě enzymů rozrušujících buněčnou stěnu také osmoticky aktivní látky, například sacharózu, glukózu či sorbitol, které snižují turgor buněk a zabraňují prasknutí cytoplasmatické membrány. [2, 9]

3.1.2 Průběh kultivace

Na explantát má vliv nejen složení kultivačního média, ale i další regulovatelné faktory, jako jsou teplota, kvalita a intenzita světla, fotoperioda, případně i plynná složka kultivačního média. [4]

3.1.2.1 Kultivační (živná) média

Složení kultivačního média je jeden z hlavních faktorů, který ovlivňuje růst a vývoj explantátových kultur. Byla připravena celá řada kultivačních médií pro různé účely kultivace a pro různé rostlinné druhy. Jako příklady lze uvést kultivační média, která popsali Murashige a Skoog (MS), Gamborg et al. (B₅), Linsmaier a Skoog (LS), Nitsch a Nitsch (NN), Shenk a Hildebrandt (SH) aj. [2, 10]

Kultivační médium je obvykle složeno z následujících komponent: makroelementy, mikroelementy, sacharidy, vitamíny, aminokyseliny a ostatní zdroje organického dusíku, růstové regulátory, zpevňující složky média, nedefinované složky

organického původu, redestilovaná voda a v některých případech i tlumivý roztok. [2, 11]

Makroelementy

Mezi makroelementy se řadí 6 prvků – dusík, draslík, vápník, hořčík, fosfor a síra. Optimální koncentrace jednotlivých prvků pro dosažení maximální růstové rychlosti se liší v závislosti na druhu rostliny. Dusík je pro život rostlin nepostradatelný. Vyskytuje se například v proteinech, nukleových kyselinách nebo v chlorofylu. Živné médium by mělo obsahovat přinejmenším 25–60 mM anorganického dusíku. Pro růst buněk je nezbytné, aby byl v kultivačním médiu přítomen dusík v nitrátové formě. Lepšího růstu je však obvykle dosaženo kombinací nitrátů (přidávaných převážně ve formě dusičnanu amonného a dusičnanu draselného) a amonných solí. Nitráty jsou do živného média dodávány v koncentraci 25–40 mM, amonné ionty v koncentraci 2–20 mM. Draslík se do živného média přidává ve formě chloridu nebo dusičnanu v koncentraci 20–30 mM. Optimální koncentrace vápníku, hořčíku, fosforu a síry se pohybuje mezi 1–3 mM. [2, 10, 11]

Mikroelementy

Prvky železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden jsou pro růst explantátové kultury nezbytné. Železo je do média dodáváno nejčastěji v chelátové formě. Některá živná média obsahují i kobalt, jód, sodík či chlór. Prvky jsou do média obvykle přidávány v následujících koncentracích: měď a kobalt 0,1 μM , jód 5 μM , zinek 5–30 μM , mangan 20–90 μM a bor 25–100 μM . [2, 10]

Sacharidy

Převážná část explantátů se vyživuje heterotrofně, z tohoto důvodu je nezbytné do kultivačního média dodávat sacharidy jako zdroj uhlíku a energie. Nejčastěji je přidávána sacharóza v koncentraci 2–3%. V některých případech může být nahrazena glukózou či fruktózou. Naopak použití laktózy, galaktózy, maltózy, rafinózy a škrobu bylo ve většině případů vyhodnoceno jako méně efektivní. Sacharidy mohou ovlivnit osmotické vlastnosti kultivačního média. [2, 11]

Vitamíny

Vitamíny slouží jako katalyzátory řady metabolických procesů a jsou nezbytné pro růst a vývoj rostliny. Nejčastěji je do kultivačního média dodáván thiamin, pyridoxin, kyselina nikotinová a myo-inositol. Thiamin je pro růst explantátové kultury nezbytný, obvykle se v kultivačním médiu používá v koncentraci 0,1–10,0 mg/l. Pyridoxin (0,1–10,0 mg/l) a kyselina nikotinová (0,1–5,0 mg/l) jsou součástí řady kultivačních médií, ale jejich přítomnost není nezbytně nutná. Do skupiny vitamínů je řazen i sacharid myo-inositol, který se v živném médiu používá v koncentraci 50–5000 mg/l. Myo-inositol stimuluje růst některých explantátů a také se s největší pravděpodobností účastní tvorby fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, což jsou látky spojované s procesem buněčného dělení. Dále lze přidat biotin, kyselinu askorbovou, riboflavin, kyselinu listovou aj. [2, 10]

Aminokyseliny

In vitro kultivované rostlinné buňky jsou schopny tvořit všechny potřebné aminokyseliny. Presto však přidavek některých aminokyselin do živného média může působit stimulačně na růst explantátu. Aminokyseliny představují dostupný zdroj dusíku a mohou sloužit k tvorbě nových proteinů. Do kultivačního média jsou přidávány jednotlivě nebo ve směsích. Jednotlivé aminokyseliny jsou nejčastěji přidávány v koncentraci 1–100 mg/l. Stimulaci růstu působí přidavek glycinu (2 mg/l), cysteinu (10 mg/l), L-argininu (10 mg/l), L-tyrozinu (100 mg/l) aj. Při vyšší koncentraci však mohou růst buněk naopak inhibovat. Příkladem směsi je hydrolyzát kaseinu používaný obvykle v koncentraci 0,05–0,1%. [2, 10]

Nedefinované složky organického původu

Některá živná média jsou obohacována přírodními látkami či extrakty. Jedná se o směsi různých aminokyselin, peptidů, mastných kyselin, vitamínů, látek regulujících růst, sacharidů aj. Z důvodu jejich nedefinovaného složení je však lepší použití těchto látek vynechat. V současné době se nejčastěji používá hydrolyzát kaseinu a kokosové mléko. Dalšími zástupci jsou kvasnicový, sladový a masový extrakt, rajčatová a pomerančová šťáva nebo aktivní uhlí. Aktivní uhlí se používá v koncentraci

0,5–1,0%. Aktivní uhlí může v médiu adsorbovat růstové regulátory a tím inhibovat růst explantátu. Naopak jeho stimulační účinek na růst explantátu je připisován jeho schopnosti vázat toxické látky produkované rostoucím explantátem. Využívá se také pro ztmavení kultivačního média. [2, 10, 11]

Zpevňující složky

Nejčastěji se pro zpevnění kultivačního média používá agar. Agar, polysacharid získávaný z mořských řas, je mísitelný s vodou a při teplotě 60–100 °C tvoří gel, který při ochlazení na 45 °C tuhne. Obsah agaru v živném médiu je obvykle 0,8–1,0 %. O tuhosti agarového gelu rozhoduje nejen koncentrace a druh agaru, ale i hodnota pH kultivačního média. Agar není rozkládán rostlinnými enzymy, nereaguje s ostatními složkami média a je stabilní při běžných teplotách kultivace. Mezi další zpevňující složky se řadí agaróza, Phytigel a Gerlite. Explantáty je možné v tekutém kultivačním médiu upevnit pomocí nosných můstků vyrobených např. z filtračního papíru, polyuretanové pěny nebo čedičové vaty. Byly vyrobeny i plastové nosiče potažené polypropylenovou membránou. [2, 11]

Růstové regulátory

Fytohormony jsou v rostlinách syntetizované, nízkomolekulární, organické látky. Již při velmi nízkých koncentracích jsou schopny regulovat procesy spojené zejména s růstem a vývojem rostliny. Slouží k endogenní signalizaci mezi rostlinnými buňkami, pletivy a orgány. Ve srovnání s živočišnými hormony působí méně specificky. Byla syntetizována celá řada látek strukturně podobných fytohormonům. Tyto synteticky připravené látky se společně s fytohormony označují jako růstové regulátory. Mezi růstové regulátory používané v explantátových kulturách patří auxiny, cytokininy, kyselina abscisová a etylen. [2, 3, 6]

Mezi auxiny přidávané do živných médií patří především kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolylmáselná (IBA), kyselina naftyloctová (NAA) a kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D). IAA se řadí mezi přirozené auxiny, ostatní uvedené látky jsou syntetického původu. Syntetické auxiny jsou slabé organické kyseliny, které mají ve své struktuře mezi aromatickým kruhem a karboxylovou funkcí minimálně

jeden atom uhlíku či kyslíku. Auxiny jsou látky poměrně termostabilní, schopné odolávat teplotě 110–120 °C až po dobu 1 hodiny. IAA je degradována působením světla, kyslíku, peroxidů či nízkého pH. Oproti IAA jsou syntetické auxiny stabilnější. Auxiny se do kultivačního média dodávají za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, indukce somatické embryogeneze, indukce tvorby a stimulace růstu prýtů. [2, 4, 12]

Většina cytokininů jsou deriváty adeninu substituovaného na aminoskupině v poloze N⁶. Do živného média jsou běžně dodávány následující cytokininy: benzylaminopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (IPA), zeatin a 6-furfurylaminopurin (kinetin). Zeatin a IPA patří mezi nativní cytokininy, zbylé dva jmenované jsou syntetického původu. Zeatin byl poprvé izolován z nezralého endospermu kukuřice. Cytokininy se do živného média přidávají ke stimulaci buněčného dělení a tvorby axilárních prýtů. [2, 3]

O charakteru růstu explantátové kultury rozhoduje nejen koncentrace růstových regulátorů, ale i jejich vzájemný poměr. Je-li poměr auxinu k cytokininu v živném médiu vysoký, je stimulována iniciace tvorby kořenů, embryogeneze a tvorba kalusu. Naopak při nízkém poměru je indukována tvorba axilárních a adventních prýtů. [2]

V současné době je známo více než 100 giberelinů, avšak pouze některé z nich jsou fyziologicky účinné. Ostatní jsou považovány za prekursory fyziologicky aktivních giberelinů nebo za produkty jejich degradace. Gibereliny se označují zkratkou GA a dolním indexem 1 až n, který odpovídá pořadí, v němž byly identifikovány. Z hlediska chemické struktury jsou gibereliny řazeny mezi cyklické diterpeny. Přítomnost giberelinů v kultivačním médiu není pro růst většiny explantátů nezbytná. Často se přidává giberelin GA₃, který stimuluje růst některých suspenzních kultur, kalusu a zakrslých rostlin. [2, 3, 6]

Kyselina abscisová je strukturně řazena mezi seskviterpeny. Jedná se o opticky aktivní látku, fyziologickou aktivitu však vykazuje pouze (+)-(S)-izomer. V rostlinách se podílí na řízení růstových a vývojových procesů a hraje roli i při ochraně rostliny před stresem. Normálně je přítomna pouze v nízkých koncentracích. Během stresu se však její produkce navyšuje. Stimuluje uzavírání průduchů při nedostatku vody, ukládání zásobních proteinů v embryích, účastní se procesu dormace embryí i pupenů, podporuje opad listů i květů a stárnutí pletiv. Přídavek kyseliny abscisové do živného

média může v závislosti na rostlinném druhu růst kalusu stimulovat nebo inhibovat. [2, 3, 4, 13]

K růstovým regulátorům se řadí i plynný uhlovodík etylen. Rostliny si ho syntetizují z aminokyseliny metioninu. Etylen hraje úlohu v procesu obrany před působením stresorů, urychluje zrání plodů a opad listů. Rychle rostoucí kalusové a suspenzní kultury mohou produkovat velké množství etylenu, který se následně kumuluje v kultivační nádobě a ovlivňuje růst a vývoj těchto systémů. Z tohoto důvodu je vhodné zajistit výměnu plynů mezi kultivační nádobou a okolním prostředím. [3,14]

3.1.3 Výhody a použití explantátových kultur

- Slouží jako alternativní zdroj produktů dříve získávaných pouze z intaktních rostlin [8]
- Explantátové kultury nejsou na rozdíl od polní produkce závislé na ročním období, klimatických ani půdních podmínkách. [8]
- Syntéza bioaktivních látek probíhá v řízených podmínkách, a není tudíž ovlivněna vnějšími biologickými vlivy, mezi které patří například mikroorganismy nebo hmyz. [15]
- Mohou být použity pro získání látek obsažených v obtížně pěstovatelných rostlinách. [8]
- Změnou metabolismu buněk rostlinného explantátu lze získat nové produkty, které nejsou obsaženy v mateřských rostlinách použitých pro odvození explantátu. [8]
- Explantátové kultury mohou biotransformovat exogenně dodané, levné a dostupné substráty na farmaceuticky významné látky. [8]
- Lze je využít k ozdravování rostlin a produkci rostlinného materiálu prostého virových, bakteriálních a houbových nákaz. [2]
- Explantátové kultury lze použít k produkci geneticky identických klonů cestou mikropropagace. [2]
- Uplatňují se v genovém inženýrství, ve šlechtitelských programech a v oblastech uchovávání genofondu rostlinných druhů metodou kryoprezervace. [2, 7]

3.2 Sekundární metabolity rostlin

Rostliny jsou zdrojem velkého množství strukturně rozmanitých látek. Kromě pro rostlinu nepostradatelných primárních metabolitů syntetizují vyšší rostliny také metabolity sekundární, které se s největší pravděpodobností nezapojují do procesů spojených s růstem a vývojem rostliny. Primární metabolity (aminokyseliny, vitamíny, nukleové báze aj.) si rostlina syntetizuje z živin. Sekundární metabolity jsou tvořeny z metabolitů primárních procesem, který se označuje jako sekundární metabolismus. [2, 16]

Sekundární metabolity lze z hlediska chemické příbuznosti rozdělit asi do 50 skupin. Obvykle lze v rámci jednoho taxonu nalézt dominantní skupinu chemicky příbuzných látek, která bývá doprovázena vedlejšími sloučeninami. V konkrétní rostlině se zastoupení jednotlivých sekundárních metabolitů může lišit v rámci jednotlivých orgánů, tkání či různých vývojových stádiích rostliny. Kolísání obsahu sekundárních metabolitů lze také zaznamenat i mezi jednotlivci a populacemi téže rostliny. [2, 17, 18]

Sekundární metabolity se v rostlině vyskytují buď v aktivní formě, nebo jako prekursory aktivující se poraněním či infekcí. Některé ze sekundárních metabolitů, například fytoalexiny, se mohou tvořit *de novo*. [17]

Funkce sekundárních metabolitů je stále předmětem diskuze. Některé z nich slouží jako signální molekuly, které lákají opylovače rostlin a další živočichy účastníci se přenosu semen. Hrají také roli v ochraně rostliny před predátory, viry, bakteriemi, houbami či konkurenčními rostlinami. Uvažuje se i o jejich regulační funkci v metabolismu. Někdy bývají sekundární metabolity považovány za produkty detoxikačního metabolismu. [2, 16, 17]

Mnohé ze sekundárních metabolitů mají význam ve farmacii, potravinářském či kosmetickém průmyslu. [2]

3.2.1 Možnosti zisku sekundárních metabolitů

Tradičním zdrojem sekundárních metabolitů jsou intaktní rostliny, ve kterých však obsah těchto látek kolísá v závislosti na faktorech vnějšího prostředí a může být ovlivněn i procesem sušení a skladování rostliny. Navíc řada rostlin v současné době

přichází o svá přirozená stanoviště, čímž se zvyšují nároky na jejich pěstování a s nimi roste i cena. [2]

Dále lze k získání sekundárních metabolitů použít chemické syntézy. Ty jsou však obvykle finančně velmi nákladné, obtížně proveditelné a v některých případech z důvodu složité struktury a specifických stereochemických požadavků sloučenin neproveditelné. [1, 2]

Vhodnou alternativou pro získání sekundárních metabolitů je i jejich biotechnologická produkce explantátovými kulturami. Snahou je získat takovou kulturu, která bude produkovat více sekundárních metabolitů, než kolik jich lze získat tradičními postupy. Tohoto cíle však bylo dosaženo pouze u malého počtu explantátových kultur. Ekonomicky výhodná a v průmyslu využívaná je například produkce sanguinarinu buněčnou kulturou *Papaver somniferum* nebo tvorba shikoninu *in vitro* kulturou *Lithospermum erythrorhizon*. [2, 15]

3.2.2 Navyšování produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách

Byla vyvinuta řada metod pro navyšování produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách rostlinných explantátů. [8]

Jako perspektivní metoda se jeví tzv. imobilizace buněk, jejíž podstatou je uzavření těchto buněk do nosného inertního materiálu. Buňky je možné imobilizovat dvěma způsoby – aktivně nebo pasivně. Při aktivní imobilizaci jsou buňky zachyceny v polymeru, k jehož polymeraci dochází až po smísení buněk s výchozími monomery. Nejčastěji se pro tyto účely používá alginát sodný, agar, agaróza, želatina a polyakrylamid. Pasivní imobilizace je založena na průniku buněk do porézního materiálu, například polyuretanové pěny. Imobilizované buňky se poté kultivují v bioreaktorech a lze je používat k biotransformačním reakcím nebo ke komplexním syntézám. [2]

Biotransformaci lze definovat jako proces, kterým jsou exogenně dodané organické substráty modifikovány buňkami explantátových kultur na chemicky odlišné produkty. Biotransformace tedy umožňuje dokončit syntézy finálních látek, které není možné tvořit uměle. V tomto případě se do živného média přidávají synteticky vyrobené prekursory těchto látek a rostlinná buňka provede úpravu na konečný produkt, a to hydroxylační, glykosylační, metylační či jinou reakcí. [2, 15]

Cílem výzkumu v oblasti produkce sekundárních metabolitů explantátovými kulturami je dosažení komplexní syntézy těchto látek z exogenně dodaných živin. [2]

Další metodou, kterou je možné dosáhnout zvýšené produkce sekundárních metabolitů, je i metoda elicitace. Elicitací vyvolaný stres aktivuje obrannou odpověď rostlinných buněk založenou, mimo jiné, na produkci sekundárních metabolitů. Elicitace je metoda jednoduchá na provedení, levná a prostorově nenáročná. [2, 19]

3.3 Fyziologie rostlinného stresu

3.3.1 Definice stresu, stresové faktory

Rostliny jsou během svého života vystavovány proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí, které mohou zpomalovat jejich životní funkce, poškozovat jednotlivé orgány či dokonce způsobit úhyn rostliny.

V rostlinné fyziologii je stres definován jako stav, ve kterém se rostlina nachází, pokud na ni působí nepříznivý vliv prostředí – stresový faktor (stresor). Stresory, se kterými se rostliny v přírodě běžně setkávají, lze rozčlenit do následujících skupin:

Stresory abiotické

- Fyzikální
 - Mechanické účinky větru
 - Nadměrné záření (viditelné, UV)
 - Extrémní teploty (mráz, chlad, horko)
- Chemické
 - Nedostatek vody (sucho)
 - Nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
 - Toxické plyny ve vzduchu
 - Nedostatek živin v půdě
 - Toxické kovy a organické látky v půdě
 - Nadbytek iontů vodíku a solí v půdě

Stresory biotické

- Býložravci (spásání a poranění rostlin)

- Patogeny (houby, bakterie, viry)
- Vzájemné ovlivňování rostlin (aleopatie, parazitismus)

Studium stresu rostlin, které rostou v přírodních podmínkách, je komplikováno tím, že na rostlinu obvykle působí více stresorů současně. [4]

3.3.2 Mechanismy odolnosti rostlin

Přisedlý způsob života neumožňuje rostlinám aktivní únik před stresory. Mechanismy odolnosti rostlin proti stresu lze obecně rozčlenit do dvou skupin. První mechanismus zabraňuje tomu, aby byla rostlina stresu vystavena. Jako příklad lze uvést mechanickou bariéru v podobě silné kutikuly na listech. Tento způsob obrany má pasivní a dlouhodobý charakter. Druhou skupinu tvoří mechanismy aktivní odolnosti, které omezují negativní dopad stresorů až po jejich průniku k plasmatické membráně rostlinných buněk a do symplastu. Dochází ke spuštění stresové reakce. [4, 20]

Stresová reakce začíná poplachovou fází, při které jsou vlivem stresoru narušeny buněčné struktury a funkce. Pokud není intenzita stresoru pro rostlinu letální, následuje fáze restituční, při níž dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů vedoucích k navýšení odolnosti rostliny proti stresovému faktoru – nastává fáze rezistence. Pokud však stresor působí dlouhodobě a s vysokou intenzitou, dochází k poklesu odolnosti rostliny – fáze vyčerpání. [4]

O průběhu této reakce a jejím výsledku rozhoduje nejen délka a intenzita působení stresoru na danou rostlinu, ale také adaptační schopnosti, vývojové stádium, vitalita a genotyp rostliny. [4, 20]

3.3.2.1 Společné mechanismy stresových reakcí

Jednotný model stresové reakce rostlin s největší pravděpodobností neexistuje. Přesto se však u rostlin vyskytují jisté dílčí komplexy společných reakcí, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresorům současně. Lze mezi ně zařadit tvorbu stresových proteinů, tvorbu a odstraňování aktivních forem kyslíku, syntézu stresových fytohormonů a produkci osmoregulačních sloučenin. [4]

Tvorba stresových proteinů

Jedná se o proteiny, které nejsou za normálních okolností v rostlinné buňce detekovatelné. Syntéza většiny z nich je specificky vázána na určitý stresový faktor. Tvorba zbylé části stresových bílkovin může být indukována nesespecificky, tedy různými typy stresových faktorů. Většina z těchto proteinů se řadí do některé z následujících funkčních skupin:

- Molekulární chaperony
- Proteázy
- Ubikvitin

Jsou to převážně konstitutivní proteiny patřící k pravidelné výbavě buněk všech genotypů, ale při stresové reakci se jejich tvorba mnohonásobně zvyšuje. [4]

Chaperony řídí změny prostorového uspořádání bílkovin při jejich transportu přes membrány a také upravují konformaci mírně poškozených proteinů. Pokud je však poškození nevrátelné, je takový protein označen ubikvitinem a poté rozložen protézami na jednotlivé aminokyseliny, které jsou následně použity k tvorbě nových proteinů. [4, 21]

Tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku

Reaktivita molekulárního kyslíku, který je složkou zemské atmosféry, je poměrně nízká. Rostliny ho ovšem mohou některými procesy přeměnit na mnohem aktivnější formy. Působení stresorů může u rostlin vyvolat oxidativní stres, pro který je charakteristická přechodná produkce velkého množství aktivních forem kyslíku. Tyto reaktivní molekuly, zejména však hydroxylový radikál, poškozují lipidy, nukleové kyseliny i proteiny.

Rostliny si vytvořily obranné systémy odstraňující aktivní formy kyslíku a chránící rostlinné buňky proti oxidačnímu poškození. Řadí se mezi ně jak enzymové, tak i neenzymové antioxidanty.

Na druhou stranu je však známa i protistresová úloha aktivních forem kyslíku. Z tohoto důvodu je žádoucí udržovat jejich koncentraci na jisté úrovni. [4, 20]

Syntéza stresových fytohormonů

Fytohormony jsou látky, které rostliny využívají k šíření signálů na delší vzdálenosti. Kyselina abscisová a etylen představují klasické zástupce fytohormonů, jejichž produkce rostlinou se při působení většiny stresových faktorů zvyšuje. Fytohormony mohou nejen stimulovat, ale i inhibovat tvorbu některých enzymů, což se projeví například zpomalením růstu a zrychleným stárnutím rostliny. Dále se mezi stresové fytohormony řadí i kyselina jasmonová, metyljasmonát či polyaminy – především spermin, spermidin a putrescin. [21, 22]

Produkce osmoregulačních sloučenin

Mezi osmoregulační sloučeniny náleží cukry, jednoduché dusíkaté látky a polyalkoholy. [21]

3.4 Elicitace

Rostliny a *in vitro* kultivované rostlinné buňky vykazují morfologické a fyziologické reakce na faktory, které jsou souhrnně označovány jako tzv. elicitory. Zavedení elicitoru o nízké koncentraci do živých buněčných linií vede k iniciaci tvorby či navýšení produkce specifických látek – sekundárních metabolitů. [23]

Produkcí sekundárních metabolitů lze posílit volbou elicitoru o vhodné koncentraci, který bude přidán ve správné růstové fázi kultury a také vhodnou kombinací média a elicitoru. Při elicitaci kultury v časně fázi jejího růstu se zvýší produkce sekundárních metabolitů, naopak výtěžek biomasy bude snížen. Pokud však bude elicitor přidán ke konci exponenciální růstové fáze kultury, dojde k navýšení produkce sekundárních metabolitů a zároveň se zvýší i výtěžek biomasy. Mezi další faktory ovlivňující efektivitu elicitace se řadí i specifita elicitoru, doba působení elicitoru, složení živného média, přítomnost růstových regulátorů aj. [23, 24]

Namdeo et al. se ve své studii zabývali elicitací suspenzních kultur *Catharanthus roseus*. Jako elicitory byly použity extrakty z hub *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* a *Fusarium moniliforme*. Byly sledovány změny produkce sekundárního metabolitu ajmalicinu závislosti na koncentraci použitého elicitoru, době působení tohoto elicitoru a stáří kultury. Navýšení produkce ajmalicinu bylo znatelnější při použití elicitoru

o 5% koncentraci než při koncentraci 0,5%. Při zkoumání závislosti mezi dobou expozice elicitoru a obsahem ajmalicinu bylo zjištěno, že po 48 hodinách od elicitace extraktem z *Trichoderma viride* došlo k trojnásobnému navýšení produkce ajmalicinu v suspenzní kultuře, zatímco po přidavku elicitoru z *Aspergillus niger* a *Fusarium moniliforme* byla produkce ajmalicinu navýšena pouze dvakrát. Produkce ajmalicinu byla ovlivněna i stářím kultury. Nejvyšší výtěžek ajmalicinu byl zaznamenán při elicitaci kultury staré 20 dní. [25]

3.4.1 Dělení elicitorů

Elicitory se klasifikují na biotické, abiotické a rostlinné hormony. Biotické elicitory mají biologický původ. Abiotické elicitory jsou dále členěny na fyzikální faktory a chemické substance. V některých případech se jako elicitor používá látka komplexní povahy, u které není její přesná molekulární struktura známa. Jako příklad lze uvést kvasnicový extrakt či mikrobiální buněčnou stěnu. [26]

Elicitory abiotické [26]

- Fyzikální
 - Ozón
 - Poranění
 - Sucho
 - UV záření
 - Oxid uhličitý
 - Extrémní teploty, mráz
 - Vysoká či nízká osmolarita
- Chemické
 - Kyselina octová
 - Ethanol
 - Ethen
 - Benzothiadiazol
 - Ionty kovů – Co^{+2} , Fe^{+2} , Al^{+3} , Ag^{+} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Cd^{+2}
 - Anorganické soli – chlorid rtuťnatý (HgCl_2), síran měďnatý (CuSO_4), chlorid vápenatý (CaCl_2), síran vanadnatý (VSO_4)

Elicitory biotické [26]

- Lipopolysacharidy
- Polysacharidy – pektin, celulóza, chitosan, alginát, glukany, kvasnicový extrakt, arabská klovatina
- Oligosacharidy – galakturonidy, mannan
- Proteiny – laktoferrin, hydrolyzáty rybích proteinů
- Komplexní látky – mikrobiální buněčná stěna, spóry hub
- Patogenní toxiny

Rostlinné hormony [26]

- Kyselina jasmonová
- Kyselina salicylová
- Methyljasmonát
- Metylsalicylát
- Etylen
- Cytokinin
- Giberelin GA₃

Elicitory mohou mít exogenní či endogenní původ. Exogenní elicitory vznikají mimo buňku a řadí se mezi ně například polysacharidy (glukany, chitosan), polyaminy, glykoproteiny, některé enzymy (celulóza) či mastné kyseliny (kyselina arachidonová). Endogenní elicitory vznikají v buňce prostřednictvím sekundárních reakcí, které jsou vyvolány signálem abiotické nebo biotické povahy. [1]

3.4.2 Mechanismus elicítace

Každá rostlinná buňka je schopna reagovat na patogeny a environmentální vlivy spuštěním obranné reakce. Odpověď rostlin je dána několika faktory, zejména však závisí na jejich genetické výbavě a fyziologickém stavu. Rezistence rostlin vůči chorobám je řízena geneticky pomocí genů rezistence rostlin a patogen avirulentních genů. Obrannou reakci rostlin lze spustit procesem elicítace.

Rostliny na elicitor reagují aktivací řady obranných mechanismů, jako jsou:

- Tvorba enzymů chránících buňku před oxidačním stresem

- Hypersenzitivní reakce vedoucí až k smrti buněk nacházejících se v blízkosti místa působení patogenu
- Produkce reaktivních forem kyslíku
- Produkce reaktivních forem dusíku
- Aktivace genů spojených s obranou rostliny
- Změny v potenciálu plasmatické membrány buňky, zvýšená propustnost membrány pro ionty (influx Ca^{+2} , eflux K^{+} a Cl^{-})
- Fosforylace proteinů, oxidace lipidů
- Vyztužení a zpevnění buněčné stěny ukládáním dřeva

Kromě uvedených obranných mechanismů dochází také k aktivaci a nové biosyntéze transkripčních faktorů, které přímo regulují expresi genů zapojených do produkce sekundárních metabolitů. [26]

Přenos signálu v rostlině

Vazba elicitoru na receptor vede k aktivaci signální dráhy, která sestává z následujících kroků:

- Vazba elicitoru na receptor lokalizovaný v plasmatické membráně
- Aktivace trimerních G-proteinů
- Aktivace fosfolipáz
- Zvýšení koncentrace Ca^{+2} iontů v cytosolu (zprostředkované aktivací iontových kanálů plasmatické membrány a také uvolňováním kalciových iontů z endoplasmatického retikula)
- Depolarizace plasmatické membrány
- Aktivace antiportových $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$ membránových kanálů, což vede k acidifikaci cytoplasmy
- Aktivace NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) oxidázy a produkce reaktivních forem kyslíku
- Aktivace MAPK (mitogenem aktivované protein kinázy) a fosforylace transkripčních faktorů regulujících expresi genů kódujících enzymy, které se podílí na biosyntéze specifických sekundárních metabolitů a sekundárních signálních látek, jako jsou kyselina salicylová, kyselina jasmonová a etylen [27]

Přesný mechanismus elicitace je stále předmětem výzkumu. [1]

3.5 Selen

Selen, latinsky *Selenium*, je prvek nesoucí chemickou značku Se. Objevil ho v roce 1817 švédský chemik Berzelius. Název tohoto prvku byl odvozen z řeckého výrazu pro měsíc. Selen má atomové číslo 34 a relativní atomovou hmotnost 78,96. Svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi leží na pomezí mezi kovy a nekovy. Selen je součástí řady organických i anorganických sloučenin. Mezi organické sloučeniny selenu se řadí hlavně aminokyseliny selenocystein a selenometionin. V anorganických sloučeninách nabývá oxidačních čísel – II, +IV, +VI. Vyskytuje se i v elementárním stavu s oxidačním číslem 0. [28, 29]

Selen je předmětem intenzivního výzkumu v technických i biologických oborech. Nachází uplatnění v elektronickém průmyslu, ve sklářství, přidává se jako výživový doplněk do krmiv hospodářských zvířat a drůbeže, používá se jako pigment, insekticid a fungicid. [30, 31]

3.5.1 Selen v lidském organismu

Selen je esenciální stopový prvek mající vliv na zdraví mnoha živočichů včetně člověka. Po dlouhou dobu byl považován za prvek jedovatý, kancerogenní, mutagenní a teratogenní, kterým ve vysokých koncentracích skutečně je. V šedesátých letech minulého století byla zjištěna souvislost mezi nedostatkem selenu a dvěma endemicky se vyskytujícími onemocněními – Keshanskou chorobou, která se manifestuje jako kardiomyopatie a onemocněním Kashina a Bekové, což je chronická osteoartropatie u dětí. [30, 32]

Selen v lidském organismu působí prostřednictvím metaloenzymů. Selen ve formě selenocysteinu je součástí enzymů glutationperoxidázy a 5'-deiodinázy. Glutationperoxidáza chrání organismus před škodlivým působením reaktivních forem kyslíku a před lipoperoxidací nenasycených mastných kyselin. Enzym 5'-deiodináza katalyzuje přeměnu tyroxinu na aktivní hormon trijodtyronin. [30, 33]

Selen hraje roli v ochraně organismu před chorobami kardiovaskulárního systému, zánětlivými a neurodegenerativními nemocemi, rakovinou a také zpomaluje stárnutí. Další poznatky poukazují na vliv selenu na psychiku a náladu, dále na plodnost mužů

i žen a na průběh těhotenství. Selen ochraňuje buňky před bakteriálními a virovými infekcemi a působí příznivě na imunitu. [32, 34]

Selen je prvek pro lidský organismus nepostradatelný, proto je nezbytný jeho příjem potravou. Selen se do potravního řetězce dostává skrze rostliny. Doporučený denní příjem selenu pro dospělé osobu se pohybuje mezi 40–80 µg/den. Doporučený bezpečný maximální příjem selenu je mezi 400–600 µg/den. [30, 34]

Dlouhodobý vysoký příjem selenu má na lidský organismus toxické účinky. Prvotním indikátorem vysokého příjmu selenu je kovová pachů v ústech a dech zapáchající po česneku. Mezi klinické příznaky chronického vysokého příjmu selenu patří lámavost vlasů a jejich vypadávání, křehkost a lomivost nehtů, skvrny na zubech, únava, vyrážka na kůži, nauzea, průjem či poruchy nervového systému. [35]

3.5.2 Selen v rostlinách

Rostliny mohou přijímat selen z půdy, atmosféry nebo z vody, a to kořeny nebo přes plochy listů. Na území České republiky se množství selenu v půdě pohybuje obvykle v rozmezí 0,14–1,65 mg/kg. O využitelnosti tohoto prvku rostlinami však rozhoduje nejen jeho obsah v půdě, ale především chemická forma selenu a ostatní půdní faktory, jako jsou pH půdního roztoku, obsah vody, kyslíku, hliníku a oxidů železa v dané půdě. Selenany (SeO_4^{2-}) představují pro rostliny dostupnější zdroj selenu než seleničitany (SeO_3^{2-}), a to z důvodu jejich větší rozpustnosti v půdě. [36]

Selenany vykazují vysokou afinitu k transportéru, který přenáší sírany (SO_4^{2-}) z půdy přes cytoplasmatickou membránu buněk kořene. Selenany kompetují se sírany o vazebné místo na transportéru. Pokud je obsah síranů v půdě vysoký, příjem selenanů poklesne. Výjimkou jsou rostliny označované jako tzv. selenové akumulátory, které preferenčně přenášejí selenany než sírany. [29]

Rostliny se podle schopnosti hromadit selen ve svých tkáních dělí na selenové neakumulátory, sekundární selenové akumulátory a primární selenové akumulátory. Selenové neakumulátory obsahují méně než 25 mg Se/kg sušiny. Sekundární akumulátory obvykle rostou na půdách s nízkou až střední koncentrací selenu a obsahují 25–100 mg Se/kg sušiny. Selen je v nich přítomen převážně ve formě organické sloučeniny selenometioninu. Primární akumulátory inkorporují přijatý selen

do aminokyselin jako metylselenocystein, selenocystation a selenocystin. Obsahují 100–10000 mg Se/kg sušiny. [30, 37]

Akumulace selenu může vést ke snížení obsahu síry, dusíku či fosforu v rostlinných tkáních. Selen působí jako inhibitor absorpce těžkých kovů, zejména kadmia, mědi, zinku a železa. [37]

Při vysokém obsahu selenu v rostlinách dochází k tzv. volatilizaci, při které se uvolňuje sloučenina dimetyldiselenid, která intenzivně zapáchá po česneku. Míra volatilizace je ovlivněna obsahem selenu v rostlinných tkáních a také chemickou formou selenu, která je přidána do živného média. [30, 37]

Byla publikována celá řada prací pojednávajících o vlivu selenu na rostliny i explantátové kultury *in vitro*.

- Stibilj et al. zaznamenali 8,5násobné navýšení obsahu selenu v semenech pohanky (*Fagopyrum esculentum* Moench.) a 3,5násobné navýšení obsahu selenu v semenech dýně (*Cucurbita pepo* L.) po předchozí aplikaci vodného roztoku selenu (Se^{+VI}) na listy ve fázi kvetení. [38]
- V další studii byl sledován vliv selenu ve formě listového postřiku aplikovaného v době kvetení na obsah selenu, aminokyselin, cukrů a vybraných bioaktivních látek v plodech rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* var. Provence). U kontrolní skupiny byla místo selenu aplikována voda. V plodech ošetřených rostlin bylo zaznamenáno 18násobné zvýšení obsahu selenu oproti kontrole. Zvýšil se také obsah glukózy, fruktózy, některých aminokyselin, glutationu, flavonoidů, vitamínu E a vitamínu C. [39]
- V jiné studii byla zkoumána možná úloha selenu v ochraně sazenic slunečnice (*Helianthus annuus*) před toxicitou kadmia. Předchozí namočení semen slunečnice v roztoku selenu zmírnilo negativní účinek kadmia na růst rostliny a vedlo ke zvýšení aktivity antioxidantních enzymů glutationreduktázy, katalázy a askorbátperoxidázy, a tím ke zmírnění oxidačního poškození rostliny. [40]
- Využitím selenu jako elicitoru v *in vitro* tkáňových a orgánových kulturách česneku kuchyňského (*Allium sativum*) se zabývala studie autorů Kapoor et al. Jako elicitor byl použit roztok Na_2SeO_3 o třech odlišných koncentracích (0,5, 1,2 a 4 mg/l). S rostoucí koncentrací elicitoru rostla produkce sekundárního

metabolitu alliinů s maximem při koncentraci 4 mg/l. Po přidavku roztoků o koncentracích 2 a 4 mg/l do živného média došlo také k výraznému navýšení obsahu aminokyselin, proteinů a prolinu. [41]

3.6 Pohanka obecná

3.6.1 Botanický popis

Pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum* Moench.) je jednoletá, dvouděložná bylina patřící do čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*). [17]

Lodyha pohanky je přímá, podélně rýhovaná, uvnitř dutá, dělena kolénky. Zbarvení lodyhy je zelené nebo červené. Červená barva je dána přítomností antokyanů. Hlavní stonek se dále rozvětňuje do 2–8 větví prvního řádu, které se mohou dále větvit do vyšších řádů. Pohanka obvykle dorůstá výšky 50–140 cm.

Postavení listů na stonku je střídavé. Pro pohanku je typická heterofylie, což znamená přítomnost listů různého tvaru a velikosti na téže rostlině. Listy ve spodní části rostliny jsou dlouze řapíkaté se srdčitou čepelí, která má vroubkovaný okraj. Listy rostoucí v horních částech rostliny mají řapíky krátké nebo jsou téměř přisedlé s šípovitou, vejčitou, kopinatou a dlouze zašpičatělou čepelí. Děložní listy mají tvar ledvinovitý.

Květy pohanky jsou oboupohlavné, bílé, narůžovělé nebo červené barvy. Květy jsou drobné, o velikosti 5–10 mm. Okvětních lístků je 5 a jsou většinou volné. Květ obsahuje 8 tyčinek a pestík. Semeník je svrchní. Čnělka je trojdílná a nese bliznu, která má knoflíkovitý tvar. Květenství obvykle sestává ze 7–9 kvítků, které vytváří úžlabní hrozny či vrcholové chocholíky. Na jedné rostlině se může vytvořit v době kvetení až 1500 květů, nicméně pouze 10–12 % z nich se přetvoří ve zralou nažku. Pohanka je rostlina cizosprašná a hmyzosnubná. Hlavním opylovačem této rostliny je včela medonosná (*Apis mellifera*). [42, 43]

Plodem pohanky je moučnatá nažka trojbokého tvaru. Hrany nažky jsou celokrajné a tvoří se na nich křídla. Zbarvení nažek je nejčastěji hnědé, u některých odrůd pohanky může být i šedé nebo černé. Semena jsou obklopena oplodím, které tvoří 15–30 % celkové hmotnosti plodu. Oplodí se semenem nesrůstá a lze ho odstranit loupáním. [17, 42]

Kořen pohanky je tvaru kúlového a pouze málo se větví. Míra větvení se odvíjí od vlhkosti, provzdušnění a úrodnosti půdy. Kořen proniká do půdy jen mělce a tvoří pouze 3–4 % celkové hmotnosti rostliny. I přes to, že pohanka netvoří rozsáhlý kořenový systém, je intenzita jeho činnosti 12krát vyšší než u pšenice. Kořen pohanky produkuje kyselinu šťavelovou, citronovou, octovou a mravenčí, pomocí kterých rostlina přijímá živiny, zejména fosfor, z obtížně dostupných forem. [42, 43]

3.6.2 Odrůda Pyra

Pyra je odrůda pohanky, která byla vyšlechtěna na území České republiky. Do listiny registrovaných odrůd byla zapsána v roce 1990. Jedná se o poměrně ranou odrůdu dorůstající středního vzrůstu. Počáteční růst odrůdy je pomalý. Vyznačuje se poléhavostí a produkcí středně velkých nažek, které jsou šedohnědé barvy s černým mramorováním. Hodí se pro pěstování v méně příznivých podmínkách, ve kterých je výnosově stabilnější než moderní zahraniční odrůdy. [42, 44]

Autoři Bystrická et al. sledovali změny obsahu těžkých kovů kadmia, olova a chromu v konzumních částech pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum* Moench.) v období vegetace. Celkem bylo analyzováno 6 odrůd: Pyra, Jana C1, Kasho, Emka, Špačinská a Hrusowska. U všech odrůd byl zaznamenán nejvyšší obsah těžkých kovů v listech. V průběhu vegetačního období se obsah těžkých kovů v listech a ve stoncích u všech odrůd navyšoval. Nejvíce byl obsah kadmia překročen u odrůdy Pyra na konci vegetační doby, kdy ho bylo detekováno 1,38 mg/kg. Potravinový kodex Slovenské republiky stanovuje nejvyšší přípustné množství (NPM) kadmia 0,1 mg/kg. NPM olova (0,2mg/kg) bylo také překročeno. U odrůdy Kasho byl na konci vegetační doby zjištěn obsah olova 7,30 mg/kg. U chromu nebylo ani u jedné z odrůd zaznamenáno překročení NPM. Nadlimitní množství obsahu kadmia i olova bylo detekováno i v nažkách pohanky. [45]

V jiné studii byly zkoumány změny celkového obsahu polyfenolů v různých anatomických částech odrůd Pyra, Špačinská, Emka, Kasho, Jana C1 a Hrusowska během období jejich růstu. V průběhu růstu se celkový obsah polyfenolů u všech odrůd zvyšoval. Nejvyšší množství polyfenolů obsahovaly květy a listy, méně nažky a stonky. [46]

3.6.3 Původ pohanky a její využití

Pohanka pochází ze severní Číny, ve které se pěstuje více než 3 tisíce let. Z této oblasti se pravděpodobně rozšířila do Bhútánu, Nepálu, severního Pakistánu a severní Indie. Do Evropy se pohanka dostala nejspíš společně s mongolskými, tureckými a dalšími vojsky, která ji využívala jako jeden ze zdrojů obživy.

První písemnou zmínku o pohance na našem území lze nalézt v Klaretově veršovaném slovníku *Glosář*, který pochází z 2. poloviny 14. století. Mattioliho herbář z roku 1596 popisuje pohanku jako hojně se vyskytující plodinu. Pohanka se pěstovala zejména v horských oblastech a v podhůří a byla součástí stravy chudých obyvatel. V 16. a 17. století představovala pohanka oblíbenou plodinu. Později začalo její pěstování upadat, převážně kvůli vzrůstu konzumace pečiva z bílé mouky. Během 2. světové války se pohanka na našem území prakticky nepěstovala. Od 90. let minulého století byl zaznamenán návrat k pěstování a konzumaci této plodiny. V současné době se pohanka pěstuje v mnoha zemích převážně severní polokoule. Mezi největší producenty pohanky se řadí Rusko a Čína. [42, 43]

Pohanka nachází uplatnění v různých oblastech. V zemědělství se využívá jako meziplodina a rostlina zamezující erozi půdy. Dále může být použita jako zelené hnojivo nebo krmivo pro hospodářská zvířata. Odstraněním slupek z pohankových zrn získáme kroupy a jejich mletím mouku, ze které se vyrábí pečivo a těstoviny. Vařené pohankové kroupy působí v organismu podobně jako vláknina. Zvyšují pocit sytosti a působí příznivě na hladinu glykémie. Pohanková zrna neobsahují lepek, proto jsou vhodná i pro pacienty trpící celiakií. Konzumuje se i mladá zelená nať, listy nebo pohankové klíčky, které obsahují více rutinu a lyzinu než zrna. Vyrábí se i pohankové víno a pivo. Slupky a zelené části rostliny se používají pro přípravu pohankového čaje. Pohanka je plodina medonosná. Pohankový med má ze všech druhů medu nejvyšší obsah bioflavonoidů. Dále je pohanka využívána ve farmaceutickém průmyslu, zejména kvůli obsahu flavonoidu rutinu. [42, 47]

3.6.4 Lékopisná droga

Lékopisnou drogou je celá nebo rozlámaná pohanková nať (*Fagopyri herba*) získaná z druhu *Fagopyrum esculentum* Moench. Nať se sbírá v rané fázi kvetení

před tvorbou plodů a poté se ihned suší. Pohanková nat' obsahuje nejméně 3 % rutinu, počítáno na vysušenou drogu. [48]

3.6.5 Obsahové látky pohanky

3.6.5.1 Rutin

Pohanka je významným zdrojem flavonoidu rutinu. Rutin (kvercetin-3-rhamnoglukosid) je flavonolový glykosid, jehož název je odvozen od routy vonné (*Ruta graveolens* L. (*Rutaceae*), ze které byl poprvé izolován. Dále ho lze získat z poupát stromu *Sophora japonica* L. (*Fabaceae*) a z listů druhu *Eucalyptus macrorhyncha* (*Myrtaceae*). Je obsažen i v oplodí pomeranče (*Pericarpium aurantii*), v listech černého rybízu (*Folium ribes nigri*) a dalších rostlinách. [49, 50]

Lidské tělo si rutin nedokáže syntetizovat, proto musí být přijímán potravou. Doporučená denní dávka rutinu je 100–200 mg. Rutin je často kombinován s kyselinou askorbovou. Antioxidačního účinku rutinu se hojně využívá v potravinářství, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Rutin působí příznivě na cévní systém, snižuje fragilitu a permeabilitu kapilár, používá se při léčbě hemoroidů a křečových žil. Vykazuje účinky antiedematózní, protizánětlivé, antimutagenní, protinádorové a ochraňuje před UV zářením. Kombinace trypsinu, bromelainu a rutinu se využívá při léčbě osteoartritidy. Rutin nachází uplatnění i při léčbě zánětlivých střevních onemocnění. Působí příznivě na hladinu glukózy a také ovlivňuje hladinu cholesterolu v krvi. [51, 52]

Obsah rutinu v rostlině kolísá v závislosti na jejím genotypu, vývojovém stádiu a také podmínkách pěstování. Je různý i v jednotlivých orgánech téže rostliny. [53]

Kreft et al. sledovali vliv různých úrovní UV-B záření na obsah rutinu v pohance obecné (*Fagopyrum esculentum* Moench.). Nejvyšší obsah rutinu byl detekován u rostlin pěstovaných při běžných úrovních UV-B záření – listy těchto rostlin obsahovaly o 97 % více rutinu než listy rostlin, které byly vystaveny pouze redukované hladině UV-B záření. [54]

3.6.5.2 Ostatní obsahové látky

Kromě rutinu jsou v pohance zastoupeny i další látky typu polyfenolů – kvercetin, isovitexin, vitexin, isoorientin a orientin. [55]

Bai et al. srovnávali obsah rutinu, kvercetin a aminokyselin v semenech dvou druhů pohanky (*Fagopyrum esculentum* a *Fagopyrum tataricum*), které byly pěstovány v různých oblastech. Obsah rutinu v semenech se pohyboval mezi 0,05–1,35 % a byl vyšší než obsah kvercetin. V semenech pohanky tatarské (*Fagopyrum tataricum*) bylo zjištěno vyšší množství rutinu, kvercetin i aminokyselin než v semenech pohanky obecné. [55]

Plody pohanky obsahují vitamín E a komplex vitamínů skupiny B, zejména vitamín B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin) a B₃ (niacin). Také jsou bohaté na prvky draslík, hořčík, fosfor, vápník a ve stopách zinek, mangan, měď, železo a selen. Semena pohanky obsahují 3,4–5,2 % vlákniny, 55–70 % škrobu a 10–14 % bílkovin. Olejnatost semen se pohybuje mezi 1,5–3,7 %. Z vícenenasycených mastných kyselin je významná přítomnost kyseliny linolové. Dále jsou v plodech zastoupeny i organické kyseliny, fenolické sloučeniny, fosforylované cukry, nukleotidy a také třísloviny, které mají příznivý vliv na čerstvost a trvanlivost nažek. [43, 56]

Pohanka obsahuje naftodiantron fagopyrin, který způsobuje přecitlivělost na světlo, tzv. fagopyrismus. [56]

Autoři Eguchi et al. hodnotili obsah fagopyrinu v květech, listech, stoncích, slupkách plodů a kroupách pohanky obecné a pohanky tatarské (*Fagopyrum esculentum* a *Fagopyrum tataricum*). U obou druhů bylo nejvíce fagopyrinu detekováno v květech a v listech, zatímco stonky a slupky plodů obsahovaly fagopyrinu pouze malé množství. V kroupách pohanky obecné nebyl fagopyrin zjištěn vůbec. Obecně vyšší hodnoty obsahu fagopyrinu byly nalezeny u pohanky tatarské. [57]

Kreft et al. uvádí, že denní příjem 30 g čerstvých pohankových klíčků může v závislosti na tělesné hmotnosti, výšce a expozici slunečním zářením způsobit závažnou fototoxicitu. [58]

V souvislosti s konzumací semen pohanky se u citlivých jedinců může vyskytnout hypersenzitivní reakce manifestující se jako kopřivka, alergická rýma, astma, angioedém a anafylaktický šok. Jako alergeny byly identifikovány nízkomolekulární proteiny a glykoproteiny. [47]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál, přístrojové vybavení a pomůcky

4.1.1 Rostlinný materiál

Jako výchozí explantát, z něhož byla později odvozena vlastní kultura, byla použita klíčnická rostlina získaná ze semen druhu *Fagopyrum esculentum* Moench., varieta Pyra. Semena poskytl Výzkumný ústav rostlinné výroby v Piešťanech, Slovensko. K vlastnímu experimentu byla použita kalusová a suspenzní kultura z 13.–18. pasáže.

4.1.2 Chemikálie

- Agar, Oxoid, Velká Británie
- Ajatin plus roztok 10%, Profarma – produkt s.r.o., ČR
- Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema, ČR
- Dusičnan amonný p.a., Penta, ČR
- Dusičnan draselný p.a., Lachema, ČR
- Edetan sodný p.a., Sigma–Aldrich, USA
- Etanol 96%, Lachema, ČR
- Glycin p.a., Penta, ČR
- Hydrolyzát kaseinu, Imuna, Slovensko
- Chloramin, Bochemie, ČR
- Chlorid kobaltnatý hexahydrát p.a., Lachema, ČR
- Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Penta, ČR
- Jodid draselný p.a., Penta, ČR
- Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová č., Lachema, Brno
- Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR
- Kyselina nikotinová, Sigma–Aldrich, USA
- Metanol p.a., Penta, ČR
- Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta, ČR
- Myo-inositol, Fluka, Švýcarsko

- Oxid seleničitý 98% p.a., Sigma–Aldrich, USA
- Pyridoxin, Plant Cell Culture, Sigma–Aldrich, USA
- Sacharóza p.a., Lachema, ČR
- Savo, vyrobeno v EU, sklad FaF UK HK
- Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR
- Síran manganatý monohydrát p.a., Lachema, ČR
- Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema, ČR
- Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR
- Síran železnatý heptahydrát p.a., Lachema, ČR
- Standardy pro HPLC analýzu – rutin, Sigma–Aldrich, USA
- Thiamin, Plant Cell Culture, Sigma–Aldrich, USA
- Ultračistá voda, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR

4.1.3 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Analytické váhy PRLT A13, Sartorius, Německo
- Autokláv PS 20 A, Chirana, ČR
- Autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, Slovensko
- Čerpadlo Jasco PU-2089 Plus, Japonsko
- Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko
- Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko
- Horkovzdušný sterilizátor SVS 9/1, Chirana, ČR
- Kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m), Merck, Německo
- Mikrofiltry (0,20 μ m), Corning NY 14831, Německo
- Pipetovací balónek, Filip, Německo
- Předkolona, Merck, Německo
- Sušárna HS 61A, Chirana, ČR
- Termostat kolony Jetsream 2 Plus, Japonsko
- Těsnění na vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR
- Třepačka KS 15 A Control, Edmund Bühler, Německo
- Ultrazvuková lázeň, typ RX 255H Bandelin Sonorex, Německo

- Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR
- Vodní lázeň GFL, typ 1042

4.2 *In vitro* kultivace

4.2.1 Složení a příprava živného média

V experimentu bylo ke kultivaci kalusových i suspenzních kultur použito živné médium připravené podle Murashigeho a Skooga (MS). Složení MS média je uvedeno v tabulce 1. [59]

Tabulka 1: Složení živného média

Makroelementy (mg/l)	
KNO ₃	1900,000
NH ₄ NO ₃	1650,000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000
Mikroelementy (mg/l)	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,900
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,500
H ₃ BO ₃	6,200
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Železnatý komplex (mg/l)	
Na ₂ EDTA	37,340
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,840

Vitamíny (mg/l)	
Kyselina nikotinová	0,500
Pyridoxin	0,500
Thiamin	0,100
Sacharóza (mg/l)	30000,000
Hydrolyzát kaseinu (mg/l)	1000,000
Myo-inositol (mg/l)	100,000
Glycin (mg/l)	2,000

Pro substance přítomné v živném médiu pouze v nízkých koncentracích byly připraveny zásobní roztoky, které zajistily snadnější manipulaci a větší přesnost odměrování. Požadovaný objem zásobního roztoku byl odebrán pomocí pipety.

Do odměrné baňky na 1000 ml byla postupně vpravena předepsaná množství následujících zásobních roztoků:

- 100 ml makroelementů
- 10 ml železnatého komplexu
- 1 ml mikroelementů
- 1 ml glycinu
- 1 ml vitamínů

Následně byl přidán 1 ml roztoku růstového regulátoru kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové (2,4-D) o koncentraci 1 mg/l živného média.

Odměrná baňka byla doplněna přibližně do 60 % objemu destilovanou vodou. Na analytických vahách bylo naváženo a do odměrné baňky přidáno:

- 30,0 g sacharózy
- 0,100 g myo-inositolu
- 1,000 g hydrolyzátu kaseinu

Vzniklá směs byla intenzivně promísena a po rozpuštění všech substancí doplněna destilovanou vodou po rysku.

Takto připravené živné médium bylo za použití odměrného válce rozděleno přibližně po 30 ml do předem vysterilizovaných 100 ml Erlenmeyerových baněk. Pro účely kultivace kalusové kultury byl do každé baňky vložen můstek z filtračního

papíru. Hrdlo baňky se překrylo aluminiovou folií. Baňky se pečlivě označily a byly sterilizovány v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa.

4.2.2 Zajištění aseptických podmínek

Veškerá manipulace s výchozím explantátem, kalusovou i suspenzí kulturou probíhala za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Před vlastní prací byl box dezinfikován zředěným roztokem Ajatinu (1:10) a následně ozářen ultrafialovým zářením z germicidní lampy.

Kultivační baňky i s hliníkovými zátkami byly očištěny 96% etanolem. K manipulaci s rostlinným materiálem byly použity sterilní pinzety a při vlastní práci se postupovalo tak, aby byly zachovány aseptické podmínky.

4.2.3 Odvození kalusové kultury

Semena byla podrobena povrchovému sterilizačnímu procesu, který sestával z následujících kroků:

- Opláchnutí sterilní destilovanou vodou
- Ponoření do 70% etanolu na dobu 1–2 minut a promytí sterilní destilovanou vodou
- Ponoření do 10% roztoku chloraminu na dobu 10–15 minut a promytí sterilní destilovanou vodou
- Ponoření do 10% roztoku Sava na dobu 10–15 minut a promytí sterilní destilovanou vodou
- Závěrečné propláchnutí 70% etanolem

Poté byla semena přenesena na povrch živné půdy, která byla zpevněna agarem (10 g agaru na 1 l média). Baňky byly uzavřeny hliníkovou folií. Kultivace probíhala v kultivační místnosti při teplotě 25 °C v periodicky se opakujícím režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Po 4–6 týdnech kultivace se vytvořil kalus.

4.2.4 Kultivace a pasážování kalusové kultury

Vytvořený kalus byl pomocí sterilní pinzety přenesen na můstek umístěný v čerstvém, tekutém kultivačním médiu. Baňky byly opatřeny aluminiovou zátkou.

Kultivace probíhala v kultivační místnosti při teplotě 25 °C v periodicky se opakujícím režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

Po 4–5 týdnech bylo provedeno pasážování kultury, při kterém se postupovalo následujícím způsobem – z kalusové kultury byly vybrány světlejší, nově vytvořené části kalusu a pomocí sterilní pinzety byly přeneseny do baněk s čerstvým živným médiem na můstky z filtračního papíru. Kultivační baňky byly opatřeny hliníkovými zátkami a přeneseny do kultivační místnosti.

4.2.5 Odvození suspenzní kultury

Pro odvození suspenzní kultury byla využita kultura kalusová. Části kalusu byly pomocí sterilní pinzety přeneseny do tekutého živného média. V médiu byl kalus pomocí pinzety mechanicky rozmělněn na jednotlivé buňky či malé buněčné shluky. Tímto procesem vznikla kultura suspenzní. Kultivační baňka byla uzavřena aluminiovou folií a umístěna do kultivační místnosti na třepačku. Frekvence třepání byla nastavena na 120 otáček za minutu. Kultivace probíhala za teploty 25 °C v periodicky se opakujícím režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Maxima růstu dosáhla kultura po 3–4 týdnech kultivace.

4.3 Elicitace

4.3.1 Příprava elicitoru

V experimentu byl jako elicitor použit roztok oxidu seleničitého SeO_2 ve třech odlišných koncentracích. Příprava roztoků probíhala za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Před vlastní prací byl box vydezinfikován zředěným roztokem Ajatinu (1:10) a následně ozářen ultrafialovým zářením z germicidní lampy. Odměrné baňky a pipety byly před použitím vysterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru.

Roztok o koncentraci c_1 (100 mg/100 ml) byl získán navážením 100 mg čisté substance SeO_2 . Navážka se kvantitativně převedla do odměrné baňky na 100,0 ml a byla doplněna sterilní destilovanou vodou po rysku. Roztok byl důkladně promísen a sterilizován v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa. Koncentrace roztoku c_1 byla $9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

K přípravě roztoku o koncentraci c_2 (10 mg/100 ml) byl využit roztok o koncentraci c_1 . 10,0 ml roztoku o koncentraci c_1 bylo pomocí pipety přeneseno do odměrné baňky na 100,0 ml, doplněno sterilní destilovanou vodou po rysku a obsah baňky byl důkladně promísen. Koncentrace připraveného roztoku c_2 byla $9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Pro přípravu roztoku o koncentraci c_3 (1 mg/100 ml) byl využit roztok o koncentraci c_2 . Do odměrné baňky na 100,0 ml bylo pipetou vpraveno 10,0 ml roztoku o koncentraci c_2 , doplněno sterilní destilovanou vodou po rysku a vzniklý roztok byl důkladně promísen. Koncentrace roztoku c_3 činila $9,012 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

4.3.2 Vlastní elicítace

Elicítace byla provedena u kalusové kultury po 4 týdnech od pasáže. Suspenzní kultura byla elicítována po 3 týdnech od jejího založení.

Před vlastní prací byly kultivační baňky i s hliníkovými zátkami očištěny 96% etanolem. Pracovalo se za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Box byl předem vydezinfikován zředěným roztokem Ajatinu (1:10) a vysvícen ultrafialovým zářením z germicidní lampy.

Pro pokus se odebralo 36 kultivačních baněk buď s kulturou kalusovou, nebo s kulturou suspenzní. Baňky byly rozděleny do dvou skupin po 12 a 24 baněk. Do každé jednotlivé baňky ze souboru 24 baněk bylo za pomoci sterilní pipety přeneseno po 1 ml roztoku elicitoru o dané koncentraci (c_1 , c_2 nebo c_3). Zbylých 12 baněk sloužilo jako kontrolní soubor. Do každé z těchto 12 baněk bylo sterilní pipetou přeneseno po 1 ml sterilní destilované vody. V rámci experimentu bylo tedy celkem provedeno 6 dílčích pokusů.

Baňky byly překryty aluminiovou folií, náležitě označeny a přeneseny do kultivační místnosti. Kultivace probíhala při teplotě 25 °C v periodicky se opakujícím režimu 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Suspenzní kultury byly umístěny na třepačku o frekvenci třepání 120 otáček za minutu.

Elicítované vzorky se odebíraly po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách od přidání elicitoru. Kontrolní vzorky kultury kalusové byly odebírány po 6, 24, 72 a 168 hodinách od přidání sterilní destilované vody. U suspenzní kultury probíhal odběr kontrolních vzorků po 24, 72 a 168 hodinách od přidavku sterilní destilované vody.

Následně byl obsah každé jednotlivé kultivační baňky přefiltrován přes filtrační papír. Ulpělý kalus či buňky suspenzní kultury byly přeneseny na čistý filtrační papír a sušeny při laboratorní teplotě. Vzorky sušiny byly uchovány k dalšímu zpracování. Filtrát živného média byl jímán do lékovky, v níž byl následně zamrazen a uchován k dalšímu zpracování. Všechny vzorky byly náležitě označeny.

4.4 Stanovení obsahu rutinu

4.4.1 Příprava vzorků k HPLC analýze

Způsob úpravy vzorků byl převzat z Českého lékopisu 2017, v postupu byly provedeny drobné úpravy. [48]

Usušené vzorky získané předchozím zpracováním suspenzních a kalusových kultur byly jednotlivě za pomoci třetky pečlivě rozdrobeny v třecí misce a zváženy na analytických vahách.

Následně byl každý jednotlivý vzorek vpraven do varné baňky. Přidalo se 10,0 ml 80% metanolu R, který sloužil jako extrakční činidlo. Varné baňky byly opatřeny zpětným chladičem a jejich obsah byl zahříván na vodní lázni při teplotě 60 °C po dobu 30 minut. Poté byla provedena filtrace za horka, při které se obsah varné baňky přefiltroval přes chomáček vaty do 25,0 ml odměrné baňky. Vata s ulpělým zbytkem rostlinného materiálu byla umístěna zpět do varné baňky, bylo přidáno 5,0 ml 80% metanolu R a byla provedena opětovná extrakce v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut. Obsah varné baňky se přefiltroval přes chomáček vaty do 25,0 ml odměrné baňky k prvnímu filtrátu. 25,0 ml odměrná baňka byla následně doplněna 80% metanolem R po rysku a promísena.

Získaný roztok byl na závěr převeden přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,20 µm. 1,7 ml tohoto filtrátu bylo vpraveno do čistých, náležitě označených vialek.

U vzorků kultivačních médií bylo postupováno následovně – nejprve byl každý jednotlivý zmražený vzorek rozpuštěn při laboratorní teplotě a poté odpařen do sucha na vodní lázni při teplotě 60 °C. Odparek se rozpustil v 10,0 ml 80% metanolu R a byl krátce zahříván na vodní lázni. Následovalo přefiltrování vzorku přes chomáček vaty a poté přes mikrofiltr (0,20 µm). Do čistých, náležitě označených vialek bylo převedeno 1,7 ml takto získaného filtrátu.

Vialky byly před vlastním provedením HPLC analýzy skladovány v chladničce.

4.4.2 HPLC analýza

Obsah sekundárního metabolitu rutinu ve vzorcích, který byly připraveny výše popsaným způsobem, byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Analýza probíhala na kapalinovém chromatografu JASCO, jehož součástí bylo:

- Čerpadlo PU-2089
- Detektor MD-2015
- Autosampler AS-2055

Uvedená chromatografická sestava byla vybavena předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 µm) s ochrannou předkolonou. Objem nástřiku byl 20 µl. Mobilní fáze protékala kolonou rychlostí 1,0 ml/min. Teplota kolony byla 25 °C.

Složení mobilní fáze:

- Eluent A: 5% acetonitril a 0,15% H₃PO₃ ve vodě
- Eluent B: 100% acetonitril

Eluce mobilní fáze probíhala nejprve po dobu prvních 6 minut isokraticky, poté gradientově, jak lze vidět v níže uvedené tabulce 2.

Tabulka 2: Eluce mobilní fáze

Čas [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	96	4
6	96	4
16,5	80	20
22	65	35
23	60	40

Detekce byla provedena pomocí diodového detektoru (DAD) v rozmezí vlnových délek 200–450 nm.

Obsah rutinu byl vypočten z píků při vlnové délce 350 nm a kvantifikován pomocí metody normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou. Kalibrační křivka byla vytvořena pomocí měření standardu téže látky.

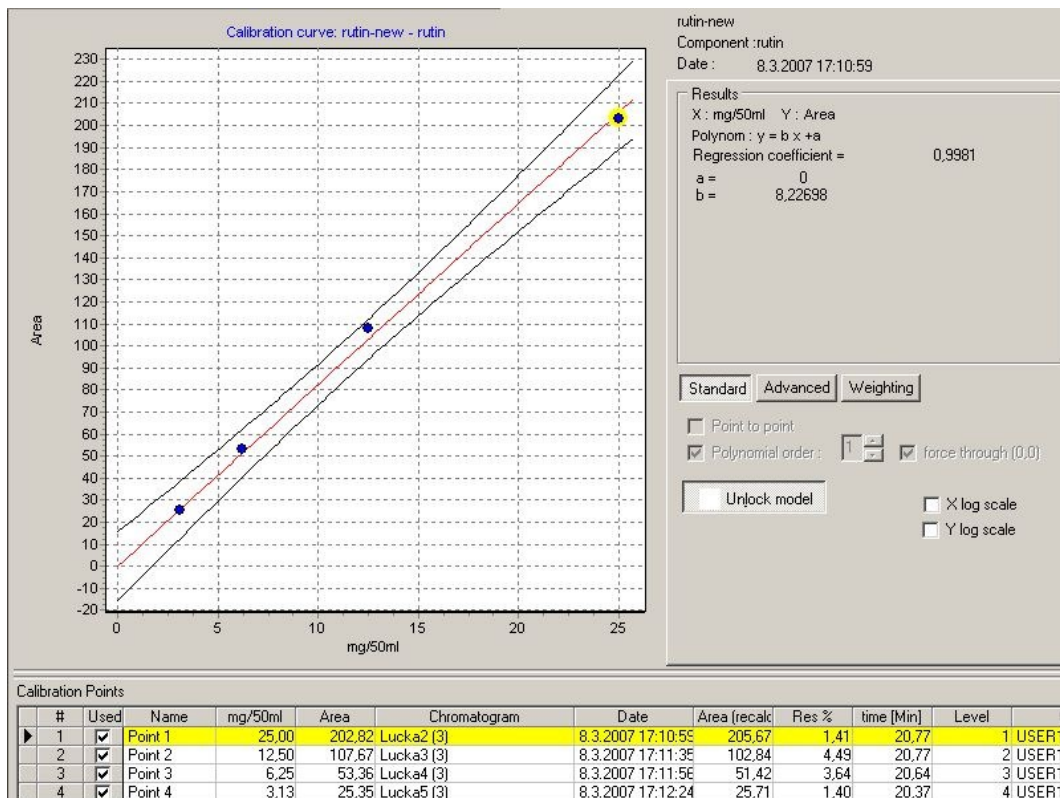
Standard rutinu, který byl zakoupený u firmy Sigma–Aldrich, byl pro účely měření přímo rozpuštěn v metanolu. Použité roztoky měly následující koncentrace: 25 mg/100 ml, 12,5mg/100 ml, 6,25 mg/100 ml a 3,125mg/100 ml.

Proměřením standardních roztoků o známých koncentracích (25 mg/100 ml, 12,5 mg/100 ml, 6,25 mg/100 ml a 3,125 mg/100 ml) byla získána kalibrační křivka, kterou lze vidět na obrázku 3.

Kalibrační křivka byla popsána pomocí matematické rovnice přímky $y = bx + a$.

- y : plocha pod křivkou
- x : koncentrace v mg/50 ml
- $a = 0$
- b : hodnota odpovídající rutinu

Obrázek 3: Kalibrační křivka



4.5 *Statistické zpracování dat* [60]

Získané výsledky obsahu rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., var. Pyra byly dále statisticky zpracovány.

- Směrodatná odchylka

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

s – směrodatná odchylka, n – počet členů souboru, x – hodnota sledované veličiny, \bar{x} – průměrná hodnota sledované veličiny

- Testovací kritérium

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

t – testovací kritérium, \bar{x}_1 – aritmetický průměr kontrolního souboru, \bar{x}_2 – aritmetický průměr pokusného souboru, n_1 – počet členů kontrolního souboru, n_2 – počet členů pokusného souboru, s_1 – směrodatná odchylka kontrolního souboru, s_2 – směrodatná odchylka pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t rozdělení se stupněm volnosti v . Stupeň volnosti lze vypočítat dle vzorce $v = n_1 + n_2 - 2$. Vypočítaná hodnota testovacího kritéria se porovnává s tabelovanou kritickou hodnotou $t(v)_p$ pro vypočítaný stupeň volnosti v a zvolenou hladinu významnosti p .

Pokud je vypočtená hodnota testovacího kritéria t vyšší než tabelovaná kritická hodnota $t(v)_p$, lze tento výsledek považovat za statisticky významný na hladině významnosti p .

Stanovené obsahu rutinu bylo provedeno pro každý vzorek třikrát, z čehož vyplývá že, počet členů souboru byl $n_1 = n_2 = 3$ a stupeň volnosti $v = 4$. Hladina významnosti byla zvolena $p = 0,05$. Pro tyto parametry platí, že $t(v)_p = 2,78$.

Pro výpočet hodnoty testovacího kritéria skupiny pokusných vzorků odebraných po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách byly jako kontrolní hodnoty použity odběry po 6, 24, 72 a 168 hodinách u kalusové kultury a po 24, 72 a 168 hodinách u kultury suspenzní.

5 VÝSLEDKY

5.1 Tabulky

V tabulkách 3–8 je zaznamenám průměrný obsah rutinu [mg/g DW] v jednotlivých vzorcích. Zkratka „DW“ označuje sušinu. Písmenem „K“ je v tabulkách označen vzorek kontrolní, tedy vzorek bez elicitoru.

Číselné hodnoty, které jsou v tabulkách vyznačeny tučně, jsou statisticky významné, v těchto vzorcích došlo k prokazatelnému nárůstu obsahu rutinu.

Tabulka 3: Obsah rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře po elicitaci oxidem seleničitým v koncentraci c_1 .

Doba působení elicitoru [hod]	Průměrný obsah rutinu [mg/g DW]	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
6	0,2	0,023	3,7411
6K	0,3	0,030	–
12	0,2	0,019	3,9825
24	0,2	0,025	5,1778
24K	0,3	0,011	–
48	0,5	0,049	5,6321
72	0,2	0,012	4,1380
72K	0,3	0,032	–
168	0,2	0,026	3,4954
168K	0,3	0,031	–

Tabulka 4: Obsah rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře po elicitaci oxidem seleničitým v koncentraci c₂.

Doba působení elicitoru [hod]	Průměrný obsah rutinu [mg/g DW]	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
6	0	0	0
6K	0	0	–
12	0	0	0
24	0	0	0
24K	0	0	–
48	0,1	0,018	7,8567
72	0,1	0,033	0
72K	0,1	0,020	–
168	0,1	0,028	0
168K	0,1	0,016	–

Tabulka 5: Obsah rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře po elicitaci oxidem seleničitým v koncentraci c₃.

Doba působení elicitoru [hod]	Průměrný obsah rutinu [mg/g DW]	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
6	0	0	0
6K	0	0	–
12	0	0	0
24	0,1	0,036	0
24K	0,1	0,028	–
48	0,1	0,016	0
72	0,1	0,046	0
72K	0,1	0,025	–
168	0	0	7,8567
168K	0,1	0,018	–

Tabulka 6: Obsah rutinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře po elicitaci oxidem seleničitým v koncentraci c_1 .

Doba působení elicitoru [hod]	Průměrný obsah rutinu [mg/g DW]	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
6	0	0	0
12	0	0	0
24	0	0	0
24K	0	0	–
48	0,2	0,025	11,3137
72	0,1	0,028	5,0508
72K	0	0	–
168	0	0	0
168K	0	0	–

Tabulka 7: Obsah rutinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře po elicitaci oxidem seleničitým v koncentraci c_2 .

Doba působení elicitoru [hod]	Průměrný obsah rutinu [mg/g DW]	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
6	0,3	0,034	5,4666
12	0,1	0,012	13,8633
24	0,7	0,067	3,6484
24K	0,5	0,039	–
48	0,2	0,022	9,4750
72	0,1	0,019	7,4432
72K	0	0	–
168	0,1	0,015	9,4281
168K	0	0	–

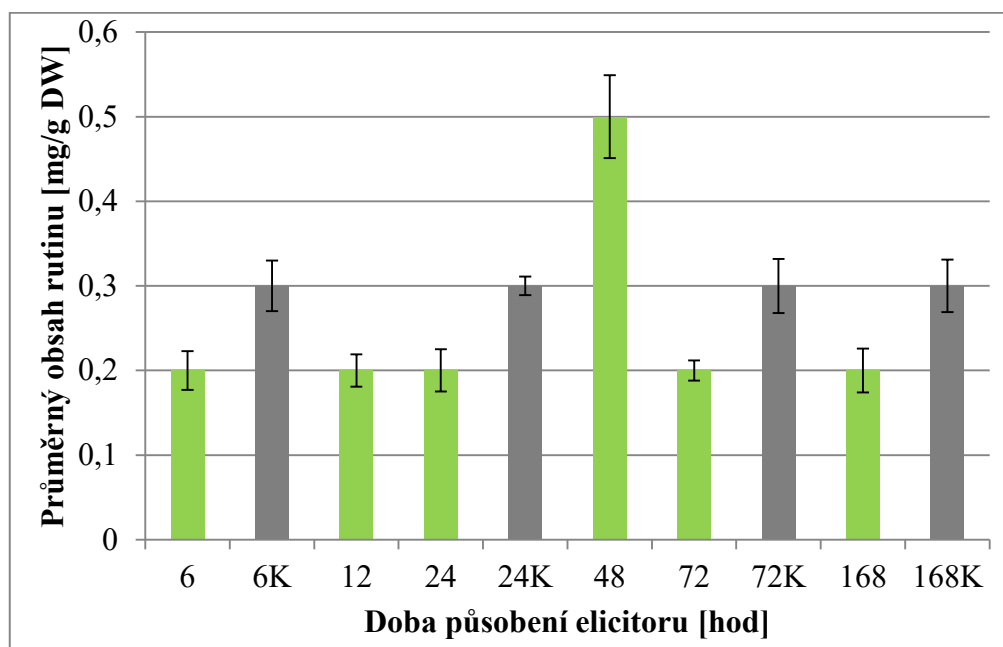
Tabulka 8: Obsah rutinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře po elicitaci oxidem seleničitým v koncentraci c_3 .

Doba působení elicitoru [hod]	Průměrný obsah rutinu [mg/g DW]	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
6	0	0	14,1421
12	0	0	14,1421
24	0,4	0,022	3,8014
24K	0,3	0,030	–
48	0,1	0,031	6,5565
72	0	0	0
72K	0	0	–
168	0,2	0,011	0
168K	0,2	0,026	–

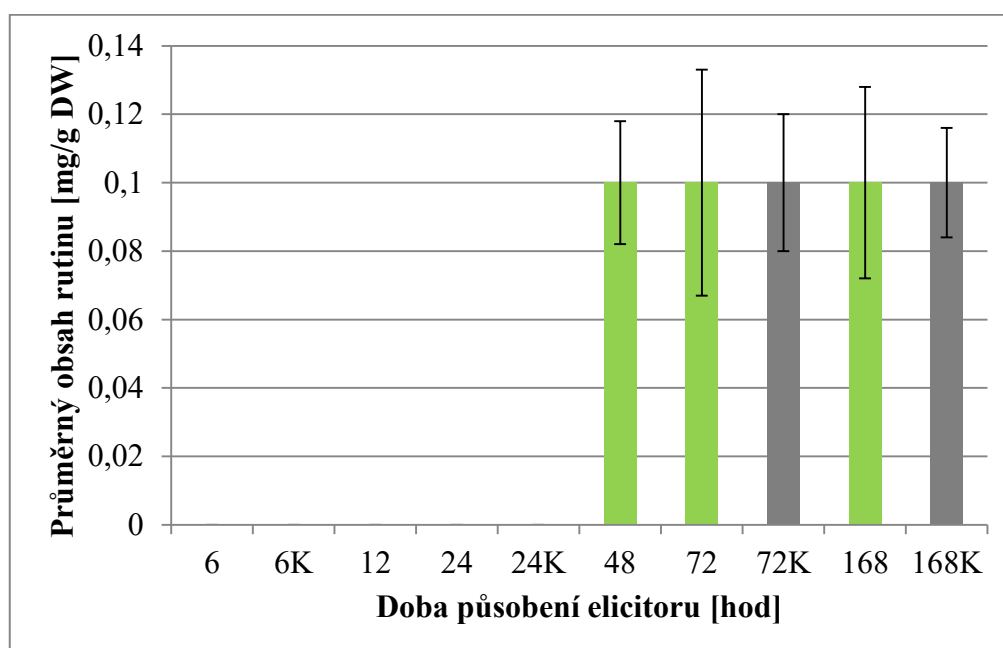
Uvolňování rutinu do živného média se neprokázalo, z toho důvodu pro něj tabulky nebyly vypracovány.

5.2 Grafy

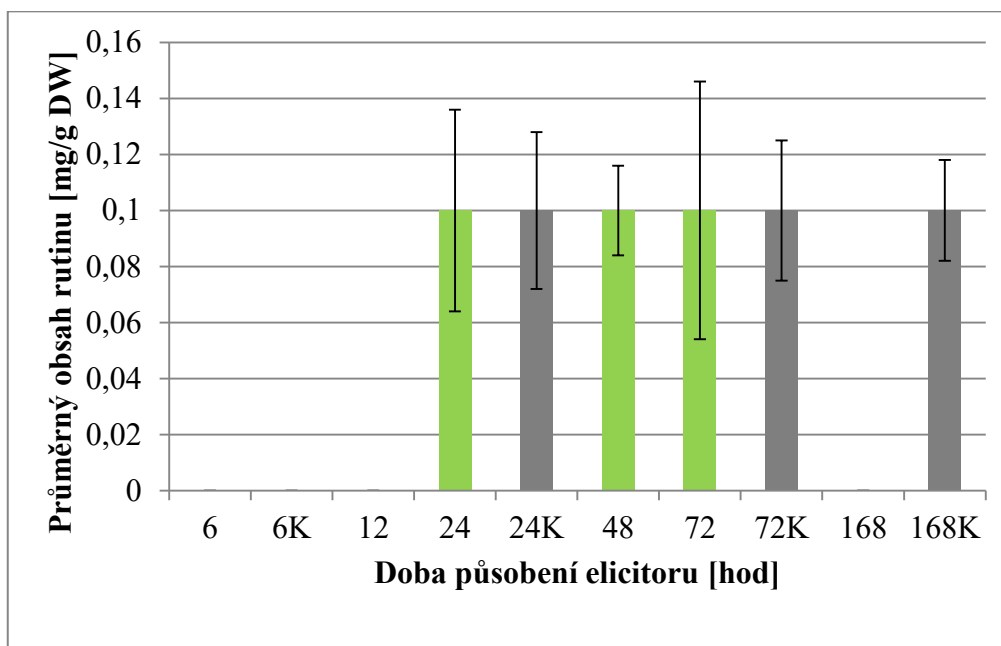
Graf 1: Obsah rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře v závislosti na době působení elicitoru [hod] o koncentraci c_1 .



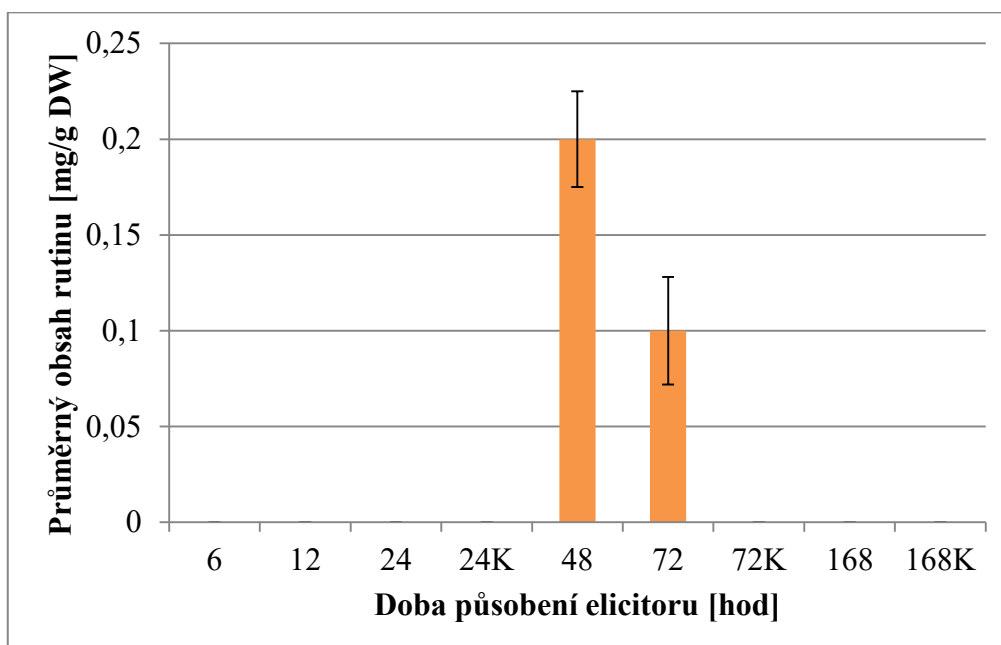
Graf 2: Obsah rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře závislosti na době působení elicitoru [hod] o koncentraci c_2 .



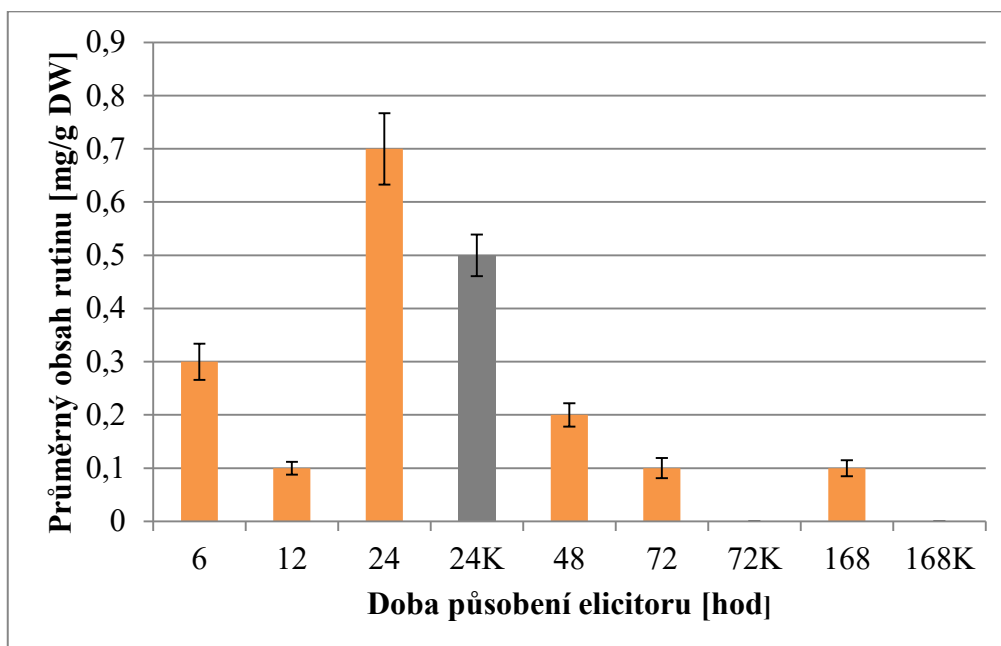
Graf 3: Obsah rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře v závislosti na době působení elicitoru [hod] o koncentraci c_3 .



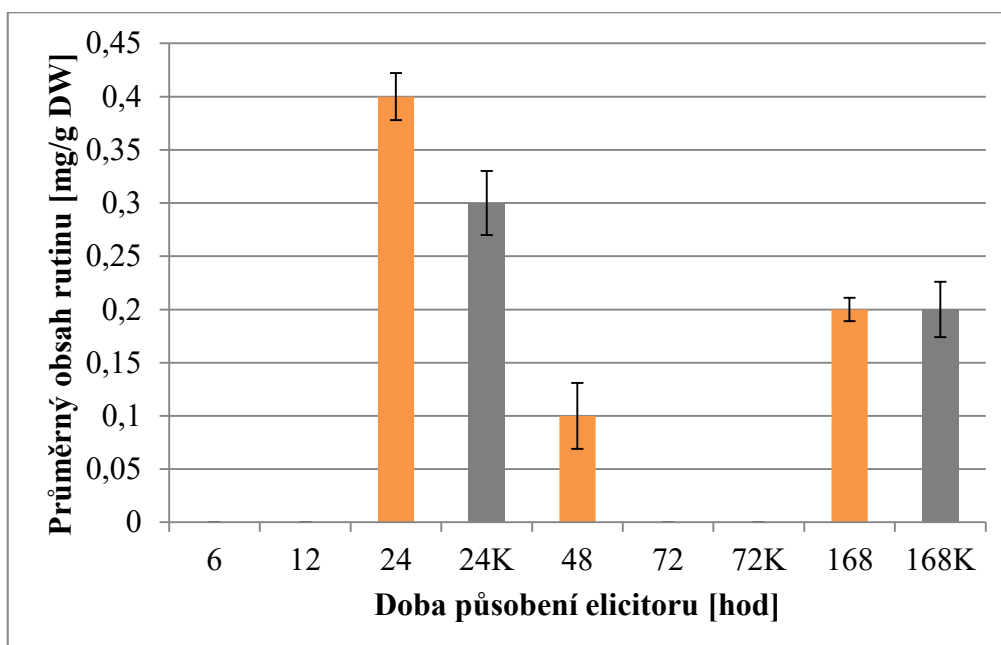
Graf 4: Obsah rutinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře v závislosti na době působení elicitoru [hod] o koncentraci c_1 .



Graf 5: Obsah rutinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře v závislosti na době působení elicitoru [hod] o koncentraci c₂.



Graf 6: Obsah rutinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře v závislosti na době působení elicitoru [hod] o koncentraci c₃.



6 DISKUZE

Rostliny jsou zdrojem velkého množství strukturně rozmanitých látek. Kromě pro rostlinu nepostradatelných primárních metabolitů produkují také metabolity sekundární, které mají široké uplatnění, a to zejména v oblastech farmacie, potravinářského průmyslu a kosmetiky. Některé sekundární metabolity lze získat často finančně nákladnými chemickými syntézami. Další možností je využití explantátových kultur rostlin. Explantátové kultury však obvykle produkují menší množství sekundárních metabolitů než intaktní rostliny. Obsah sekundárních metabolitů je možné navýšit pomocí vhodně zvoleného elicitoru. Elicitor představuje pro rostlinu stresový faktor, který vyvolá obrannou odpověď buněk založenou na produkci sekundárních metabolitů. [2]

Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv abiotického elicitoru oxidu seleničitého SeO_2 ve třech odlišných koncentracích na produkci sekundárního metabolitu rutinu v kalusové a suspenzní kultuře pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum* Moench., varieta Pyra). Dále bylo sledováno uvolňování rutinu do živného média kalusové a suspenzní kultury.

Pro odvození kalusové a suspenzní kultury byla jako výchozí explantát použita klíčící rostlina získaná ze semen druhu *Fagopyrum esculentum* Moench., varieta Pyra. V pokusu byly použity kultury z 13.–18. pasáže. Kultivace probíhala na živném médiu připraveném podle Murashigeho a Skooga (MS). Médium bylo obohaceno růstovým regulátorem kyselinou 2,4-dichlorfenoxycetovou (2,4-D) o koncentraci 1 mg/l živného média. Veškerá manipulace s kulturami probíhala za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Kultivace probíhala v kultivační místnosti při konstantní teplotě 25 °C v periodicky se opakujícím režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

Kalusová a suspenzní kultura byla elicitována roztokem oxidu seleničitého SeO_2 o třech odlišných koncentracích: $c_1 = 9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$ mol/l).

Elicitované vzorky byly odebírány po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách. Paralelně s elicitovanými vzorky byly odebírány i vzorky kontrolní po 6, 24, 72 a 168 hodinách

u kultury kalusové a po 24, 72 a 168 hodinách u kultury suspenzní. Společně se vzorky bylo odebíráno i živné médium.

Vzorky kultur i médií byly následně zpracovány a z nich získané extrakty analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Obsah sekundárního metabolitu rutinu byl zaznamenán v tabulkách 3–8 a následně graficky vyjádřen v grafech 1–6.

Kalusová kultura

Nejvýznamnější nárůst produkce rutinu v kalusové kultuře byl zaznamenán po použití elicitoru o koncentraci c_1 . Po 48 hodinách od elicitace byl zjištěn obsah rutinu 0,5 mg/g DW, což představuje nárůst obsahu rutinu o 66,67 % oproti vzorku kontrolnímu 24K. Vzorky odebrané po 6, 12, 24, 72 a 168 hodinách vykazovaly shodný obsah rutinu – 0,2 mg/g DW, který byl o třetinu nižší než obsah ve vzorcích kontrolních 6K, 24K, 72K a 168K, což značí statisticky významný pokles produkce rutinu po působení elicitoru. Vzorek odebraný po 12 hodinách byl srovnáván s kontrolou 6K. (Tabulka 3, Graf 1)

Elicitor o koncentraci c_2 ovlivnil produkci rutinu v jediném případě. Po 48 hodinách od elicitace byl zaznamenán obsah rutinu 0,1 mg/g DW, což představuje nárůst ve srovnání se vzorkem kontrolním 24K (0 mg/g DW). Vzorky odebrané po 72 a 168 hodinách od elicitace obsahovaly shodná množství rutinu (0,1 mg/g DW) jako k nim provedené kontroly 72K a 168K. (Tabulka 4, Graf 2)

Po elicitaci roztokem o nejnižší koncentraci c_3 nebyl zaznamenán statistický nárůst produkce rutinu. Ve vzorcích odebraných v čase 24, 48 a 72 hodin od elicitace byl detekován shodný obsah rutinu jako ve vzorcích kontrolních 24K a 72K. Vzorek odebraný po 48 hodinách od elicitace byl porovnáván s kontrolním vzorkem 24K. Po 168 hodinách od elicitace nebyl v elicitovaném vzorku rutin detekován vůbec, došlo ke statisticky významnému poklesu produkce rutinu oproti kontrole 168K (0,1 mg/g DW). (Tabulka 5, Graf 3)

Suspenzní kultura

Elicitace roztokem o koncentraci c_1 ovlivnila obsah rutinu ve dvou případech. Statisticky významný nárůst produkce rutinu oproti kontrole byl zaznamenán ve vzorcích odebraných po 48 a 72 hodinách od přidavku elicitoru. Po 48 hodinách byl zjištěn obsah rutinu 0,2 mg/g DW, po 72 hodinách obsah rutinu klesl na 0,1 mg/g DW. Vzorek odebraný po 168 hodinách již rutin neobsahoval. Rutin nebyl přítomen v žádném z kontrolních vzorků. (Tabulka 6, Graf 4)

Statisticky významný pokles produkce rutinu oproti kontrole 24K byl zaznamenán po 6 a 12 hodinách od elicitace roztokem o koncentraci c_2 . Obsah rutinu ve vzorku odebraném po 6 hodinách (0,3 mg/g DW) a po 12 hodinách (0,1 mg/g DW) byl nižší než ve vzorku kontrolním 24K (0,5 mg/g DW). Po 24 hodinách od přidavku elicitoru o koncentraci c_2 byl detekován obsah rutinu 0,7 mg/g DW, což představuje nárůst obsahu rutinu o 40 % oproti vzorku 24K. Po 48 hodinách od elicitace obsah rutinu klesl na 0,2 mg/g DW. Po 72 a 168 hodinách od elicitace byl obsah v obou odebraných vzorcích shodný (0,1 mg/g DW), paralelně provedená kontrola 72 K a 168K rutin neobsahovala (0 mg/g DW). (Tabulka 7, Graf 5)

Po 24 hodinách od elicitace roztokem o koncentraci c_3 byl pozorován statisticky významný nárůst produkce rutinu (0,4 mg/g DW) oproti kontrole 24K (0,3 mg/g DW). Poté po 48 hodinách od elicitace obsah rutinu klesl na 0,1 mg/g DW a po 72 hodinách již rutin nebyl detekován vůbec. Po 168 hodinách byl obsah rutinu shodný jak ve vzorku elicitovaném, tak ve vzorku kontrolním (0,2 mg/g DW). (Tabulka 8, Graf 6)

Živná média kalusových a suspenzních kultur

Uvolňování sekundárního metabolitu rutinu do živného média kalusových a suspenzních kultur se neprokázalo u žádného z testovaných vzorků.

Srovnání výsledků

Z výsledků vyplývá, že abiotický elicitor oxid seleničitý je schopen ovlivnit produkci rutinu jak v kalusových, tak i v suspenzních kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench., varieta Pyra. Jako výhodnější se ukazuje použití kultur suspenzních, u kterých byl prokázán nárůst obsahu rutinu po přidavku elicitoru ve všech třech koncentracích.

Po elicitaci bylo u suspenzních kultur zaznamenáno více statisticky významných dat než u kultur kalusových a zároveň v nich byl naměřen nejvyšší obsah rutinu – po 24 hodinách od elicitace roztokem o koncentraci $c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l byl detekován obsah rutinu 0,7 mg/g DW. Vysoký obsah rutinu (0,4 mg/g DW) byl u suspenzních kultur zjištěn i po 24 hodinách od přidavku elicitoru o koncentraci $c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

U kalusových kultur byla produkce rutinu ovlivněna nejvíce přidavkem roztoku elicitoru o koncentraci $c_1 = 9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 48 hodinách od elicitace byl zjištěn obsah rutinu 0,5 mg/g DW, což představuje nárůst obsahu rutinu o 66,67 % oproti vzorku kontrolnímu 24K a zároveň se jedná o nejvyšší detekovaný obsah rutinu v rámci kalusových kultur. Elicitace kalusových kultur nižšími koncentracemi elicitorů nebyla ve srovnání s elicitací kultur suspenzních příliš efektivní. Roztok elicitoru o koncentraci c_2 navýšil produkci rutinu v kalusové kultuře oproti kontrole jen nepatrně, a to ve vzorku odebraném po 48 hodinách. Elicitor o koncentraci c_3 obsah rutinu neovlivnil.

Pohanka obecná byla předmětem zájmu mnoha prací:

- Černé P. ve své diplomové práci sledovala vliv abiotického elicitoru oxidu seleničitého o třech odlišných koncentracích na produkci rutinu v kalusových a suspenzních kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench., varieta Špačinská. Navýšení produkce rutinu vlivem elicitoru bylo pozorováno jak u kalusových, tak i u suspenzních kultur. Výraznějších výsledků však bylo dosaženo u kultur kalusových. Nejvyšší nárůst produkce rutinu byl zaznamenán u kalusové kultury po přidavku elicitoru o koncentraci $c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Ve vzorku odebraném po 12 hodinách po působení tohoto elicitoru byl zjištěn obsah rutinu 0,6 mg/g DW. [61]
- Maliňáková L. ve své diplomové práci vyhodnotila vliv iontů ceru na produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. následovně – bez přidavku elicitoru nedošlo k produkci rutinu v kalusové ani suspenzní kultuře. Rutin byl detekován v kalusové kultuře po elicitaci

roztokem o koncentraci $c_1 = 4,057 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Suspenzní kultura ani po přidavku elicitoru rutin neprodukovala. [62]

- Majerová J. v diplomové práci hodnotila vliv ultrazvuku jako elicitoru na produkci rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. a došla k tomuto závěru – ultrazvuk jako abiotický elicitor nevedl k produkci rutinu v suspenzní kultuře a zároveň po elicitaci nebyl zaznamenán rutin ani v živném médiu. [63]

Vlivem abiotického elicitoru oxidu seleničitého na produkci sekundárních metabolitů se zabývaly i následující práce:

- Chreňová K. se ve své diplomové práci zabývala vlivem oxidu seleničitého SeO_2 na produkci isoflavonoidů v kalusových a suspenzních kulturách *Genista tinctoria* L. Uvádí, že efektivnější reakci na elicitor vykazovala kultura suspenzní, ve které došlo k navýšení obsahu isoflavonoidů genisteinu a daidzeinu, než kultura kalusová, v níž byl navýšen pouze obsah genisteinu a to v nižších hodnotách. V rámci práce nebylo prokázáno uvolňování isoflavonoidů do živného média. [64]
- Vliv abiotického elicitoru iontů selenu na produkci taxifolinu a silymarinového komplexu v kalusových a suspenzních kulturách *Silybum marianum* byl zkoumán v diplomové práci Seidlové M. U obou druhů kultur byla po elicitaci zjištěna pouze minimální produkce taxifolinu. Hodnoty obsahu silymarinového komplexu byly v kalusových i suspenzních kulturách nulové. Taxifolin a téměř všechny složky silymarinového komplexu však byly uvolněny do živného média. [65]

7 ZÁVĚR

Výsledky této diplomové práce lze shrnout následovně:

- Rutin byl detekován jak v kalusových, tak i v suspenzních kulturách.
- Nejvyšší nárůst produkce rutinu v kalusové kultuře byl pozorován po přidavku elicitoru o koncentraci $c_1 = 9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 48 hodinách od elicitace byl detekován obsah rutinu 0,5 mg/g DW, což představuje nárůst obsahu rutinu o 66,67 % oproti kontrole 24K.
- Jako výhodnější se však jeví použití kultur suspenzních, u kterých byl prokázán nárůst obsahu rutinu po přidavku elicitoru o koncentraci $c_1 = 9,012 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l i $c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$ mol/l.
- V suspenzní kultuře byly obecně zaznamenány vyšší hodnoty obsahu rutinu a bylo zde více statisticky významných dat.
- Nejvyšší obsah rutinu (0,7 mg/g DW) byl zaznamenán u kultury suspenzní ve vzorku, který byl odebrán 24 hodin po přidavku elicitoru o koncentraci $c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$ mol/l.
- V některých případech vykazovaly testované vzorky nižší obsah rutinu než vzorky kontrolní. Nejvíce patrné to bylo u kultury kalusové při použití elicitoru o koncentraci c_1 .
- Nebylo prokázáno uvolňování rutinu do živného média kalusových ani suspenzních kultur.

Z výsledků experimentu vyplývá, že abiotický elicitor oxid seleničitý může za určitých podmínek zvýšit produkci rutinu jak v kalusových, tak i v suspenzních kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench., varieta Pyra.

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Namdeo A. G.: Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews* 2007; 1(1), 69–79.
2. Kováč J.: Explantátové kultury rostlin. 1. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého 1995; 142 s.
3. Pavlová L., Fischer L.: Růst a vývoj rostlin. 1. vyd. Praha: Karolinum 2011; 15, 87–88, 96, 102, 106, 109, 111–112.
4. Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol.: Fyziologie rostlin. 1. vyd. Praha: Academia 1998; 245, 265–269, 328–329, 412–413, 426–430.
5. Tůma J., Tůmová L.: Fyziologie rostlin. 1. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus 1998; 242–244.
6. Luštinec J., Žárský V.: Úvod do fyziologie vyšších rostlin. 1. vyd. Praha: Karolinum 2005; 216–217, 191–194.
7. Mustafa N. R., de Winter W., van Iren F., Verpoorte R.: Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols* 2011; 6(6), 715–742.
8. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty. 3. vyd. Praha: Karolinu 2001; 24, 75–83.
9. Bhatia S., Sharma K., Dahiya R., Bera T.: Modern applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. Boston: Academic Press 2015; 60–62.
10. Saad A. I. M., Elshahed A. M.: Plant Tissue Culture Media. In: Leva A. ed.: *Recent Advances in Plant *in vitro* Culture*. Winchester: InTech 2012; 29–40.
11. George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J.: Plant Propagation by Tissue Culture. 3. vyd. Dordrecht: Springer 2008; 65, 68, 119, 124, 153.
12. Smith R. H.: Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. 3. vyd. Amsterdam: Academic Press 2013; 35.
13. Xiong L., Zhu J. K.: Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology* 2003; 133(1), 29–36.
14. Biddington N. L.: The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 1992; 11(2), 173–187.

15. Smetanska I.: Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. In: Stahl U., Donalies U. E., Nevoigt E. eds.: Food Biotechnology. Berlin: Springer 2008; 187–228.
16. Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G.: Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchan B. B., Grisse W., Jones R. eds.: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists 2000; 1250–1318.
17. Jahodář L.: Farmakobotanika: semenné rostliny. vyd. 3. upr. a dopl. Praha: Karolinum 2011; 9–13, 63–64.
18. Wink M.: Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry 2003; 64(1), 3–19.
19. Tůmová L., Tůma J.: Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přísávkem elicitoru paraquat. Chemické Listy 2009; 103, 503–510.
20. Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P.: Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. Chemické Listy 2005; 99, 455–466.
21. Soudek P.: Fytoremediace III. Oxidativní stres. Laboratoř rostlinných biotechnologií ÚEB AV ČR <http://www.petrsoudek.eu/pdf/Fytoremediace03-oxidativni%20stres.pdf> [Online] [citováno 30. 4. 2018]
22. http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/part_04.pdf [Online] [citováno 30. 4. 2018]
23. Chandra S., Chandra R.: Engineering secondary metabolite production in hairy roots. Phytochemistry Reviews 2011; 10(3), 371–395.
24. Patel H., Krishnamurthy R.: Elicitors in Plant Tissue Culture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2013; 2(2), 60–65.
25. Namdeo A., Patil S., Fulzele D. P.: Influence of Fungal Elicitors on Production of Ajmalicine by Cell Cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology Progress 2002; 18(1), 159–162.
26. Baenas N., García-Viguera C., Moreno D. A.: Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. Molecules 2014; 19(9), 13541–13563.

27. Ferrari S.: Biological Elicitors of Plant Secondary Metabolites: Mode of Action and Use in the Production of Nutraceuticals. In: Giardi M. T., Rea G., Berra B. eds.: Bio-Farms for Nutraceuticals Boston: Springer 2010; 152–166.
28. Mehdi Y., Hornick J. L., Istasse L., Dufrasne I.: Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules* 2013; 18(3), 3292–3311.
29. Terry N., Zayed A. M., de Souza M. P., Tarun A. S.: Selenium in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 2000; 51(1), 401–432.
30. Dastych M.: Selen – esenciální stopový prvek. *Labor Aktuell* 2004; 3, 29–31.
31. Selenium & compounds: National Pollutant Inventory <http://www.npi.gov.au/resource/selenium-compounds> [Online] [citováno 20. 4. 2018]
32. Kvíčala J.: Zvýšení příjmu mikronutrientu selenu – utopie, fikce, prozřetelnost či nutnost? – I. část. *Interní medicína pro praxi* 2003; 5(6), 295–300.
33. Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.: *Biochemie pro studující medicíny. 2. díl. 2. vyd. Praha: Karolinum 2009; 522.*
34. Kvíčala J.: Zvýšení příjmu mikronutrientu selenu – utopie, fikce, prozřetelnost či nutnost? – II. část. *Interní medicína pro praxi* 2003; 5(7), 354–359.
35. Selenium. Fact Sheet for Health Professionals. National Institutes of Health <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/> [Online] [citováno 30. 4. 2018]
36. Klognerová K., Vosmanská M., Száková J., Mestek O.: Vliv pěstebních podmínek na speciaci selenu v tkáních řepky olejky. *Chemické Listy* 2015; 109, 216–222.
37. Barker A. V., Pilbeam D. J.: *Handbook of plant nutrition. Boca Raton: CRC press/ Taylor & Francis 2007; 517–520.*
38. Stibilj V., Kreeft I., Smrkolj P., Osvald. J: Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilisation. *European Food Research and Technology* 2004; 219(2), 142–144.

39. Zhu Z., Zhang Y., Liu J., Chen Y., Zhang X.: Exploring the effects of selenium treatment on the nutritional quality of tomato fruit. *Food Chemistry* 2018; 252, 9–15.
40. Saidi I., Chtourou Y., Djebali W.: Selenium alleviates cadmium toxicity by preventing oxidative stress in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Plant Physiology* 2014; 171(5), 85–91.
41. Kapoor R., Nasim S. A., Dhir B., Mahmooduzzafar M. A.: Selenium treatment alters phytochemical and biochemical activity of *in vitro*-grown tissues and organs of *Allium sativum* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 2012; 48(4), 411–416.
42. Janovská D., Kalinová J., Michalová A.: Metodika pěstování pohanky obecné v ekologickém a konvenčním zemědělství. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby 2008; 2–7.
43. Moudrý J., Kalinová J., Petr J., Michalová A.: Pohanka a proso. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací 2005; 20–109.
44. Polák E.: Perspektívy šľachtenia pohánky na Slovensku. *Agris* <http://www.agris.cz/clanek/110789/perspektivy-slachtenia-pohanky-na-slovensku> [Online] [citováno 2. 4. 2018]
45. Bystrická J., Vollmannová A., Čičová I., Musilová J.: Dynamika obsahu ťažkých kovov v anatomických častiach Pohánky jedlej (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Chemické Listy* 2010; 104, 572–581.
46. Bystricka J., Musilova J., Tomas J., Vollmannova A., Lachman J., Kavalcova P.: Changes of Polyphenolic Substances in the Anatomical Parts of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) during Its Growth Phases. *Foods* 2014; 3(4), 558–568.
47. Danihelová M., Šturdík E.: Nutritional and health benefits of buckwheat. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* 2012; 6(3), 1-9.
48. Kolektiv autorů.: Český lékopis 2017. Praha: Grada Publishing 2017; 4022–4023.
49. Tomko J. et al.: Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty. 2. opr. vyd. Martin: Osveta 1999; 183.
50. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: Farmakognozie. 1. vyd. Praha: Karolinum 2016; 106.

51. Opletal L.: Přírodní látky a jejich biologická aktivita. 3. sv. Nutraceutika: Sekundární metabolity rostlin. 1.vyd. Praha: Karolinum 2016; 463–464.
52. Chua L. S.: A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 150(3), 805–817.
53. Ahmed A., Khalid N., Ahmad A., Abbasi N. A., Latif M. S. Z., Randhawa M. A.: Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat: a review. *The Journal of Agricultural Science* 2014; 152(3), 349–369.
54. Kreft S., Štrukelj B., Gabersčik A., Kreft I.: Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany* 2002; 53(375), 1801–1804.
55. Bai C. Z., Feng M. L., Hao X. L., Zhong Q. M., Tong L. G., Wang Z. H.: Rutin, quercetin, and free amino acid analysis in buckwheat (*Fagopyrum*) seeds from different locations. *Genetics and Molecular Research* 2015; 14(4), 19040–19048.
56. Tůmová L., Píchová M., Dušek J.: Pohanka obecná a její terapeutické využití. *Praktické Lékařství* 2007; 3(4), 190.
57. Eguchi K., Anase T., Osuga H. Development of a High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine the Fagopyrin Content of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) and Common Buckwheat (*F. esculentum* Moench). *Plant Production Science* 2009; 12(4), 475–480.
58. Kreft S., Janeš D., Kreft I.: The content of fagopyrin and polyphenols in common and tartary buckwheat sprouts. *Acta Pharmaceutica* 2013; 63(4), 553-560.
59. Murashige T., Skoog F.: A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 1962; 15(3), 473-497.
60. Klemra P., Klemrová V.: Základy aplikované statistiky pro studující farmacie. 2. přeprac. vyd. Praha: Karolinum 1997; 27, 37–39.
61. Černá P.: Vliv selénu na produkci sekundárních metabolitů v *in vitro* kultuře léčivých rostlin – I. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2017.

62. Maliňáková L.: Kultury léčivých rostlin *in vitro* – X. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2010.
63. Majerová J.: Kultury léčivých rostlin *in vitro* – XIV. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2013.
64. Chreňová K.: Kultury léčivých rostlin *in vitro* – XX. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2016.
65. Seidlová M.: Kultury léčivých rostlin *in vitro* – IXX. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2014.

9 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Kandidát: Tereza Ošťádalová

Školitel: Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Název diplomové práce: Vliv selénu na produkci sekundárních metabolitů v *in vitro* kultuře léčivých rostlin – II

Klíčová slova: kalus, suspenzní kultura, abiotický elicitor, selén, pohanka

Rostlinné kultury *in vitro* obvykle produkují pouze malá množství sekundárních metabolitů. Metoda elicítace představuje jednu z možností, jak zvýšit produkci těchto látek.

V této práci byl sledován vliv abiotického elicitoru selenu na produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., odrůda Pyra. Dále bylo zkoumáno i uvolňování rutinu do živného média. Kultivace probíhala v živném médiu připraveném podle Murashigeho a Skooga (MS), které bylo obohaceno o kyselinu 2,4-dichlorfenoxyoctovou (2,4-D) o koncentraci 1 mg/l. Jako elicitor byl použit roztok selenu o třech odlišných koncentracích ($c_1 = 9.012 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $c_2 = 9.012 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $c_3 = 9.012 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Vzorky byly odebírány po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách od přidání elicitoru. Obsah rutinu byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Elicítace vedla k navýšení obsahu rutinu jak v kalusové, tak i v suspenzní kultuře. Statisticky významnější výsledky ve zvýšení obsahu rutinu však byly zaznamenány u kultury suspenzní. Nejvyšší obsah rutinu (0.7 mg/g DW) byl naměřen u kultury suspenzní, konkrétně po 24 hodinách od přidání elicitoru o koncentraci c_2 . U kalusové kultury byla nejvyšší produkce rutinu zaznamenána po 48 hodinách od elicítace roztokem o koncentraci c_1 . Uvolňování rutinu do živného média nebylo zjištěno.

Elicitor selen je schopen zvyšovat produkci rutinu v kalusových i v suspenzních kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench., variety Pyra.

10 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Tereza Ošťádalová

Supervisor: Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Title of diploma thesis: The selenium effect on secondary metabolites production in *in vitro* cultures of medicinal plants – II.

Key words: callus, suspension culture, abiotic elicitor, selenium, *Fagopyrum*

In vitro plant cultures usually produce only a small amount of secondary metabolites. The method of elicitation is one of the options how to increase the production of these substances.

The effect of selenium as abiotic elicitor on rutin production in callus and suspension culture of *Fagopyrum esculentum* Moench., variety Pyra was observed in this study. The release of rutin into the nutrient medium was studied as well. The cultivation was performed in Murashige and Skoog (MS) nutrient medium which was enriched with 1 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. The solution of selenium in three different concentrations ($c_1 = 9.012 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $c_2 = 9.012 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $c_3 = 9.012 \cdot 10^{-5}$ mol/l) was used. The samples were taken after 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours of elicitor treatment. The rutin content was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC).

The elicitation led to increasing of rutin amount in callus and also in suspension cultures. Statistically more significant results were reached in suspension culture. The highest amount of rutin (0.7 mg/g DW) was detected in the suspension culture, especially after 24 hours treatment of the elicitor in c_2 concentration. The best rutin production in callus culture was reached after 48 hours of selenium treatment in c_1 concentration. The release of rutin into the nutrient medium was not detected.

The selenium as elicitor is able to increase rutin production in callus and suspension cultures of *Fagopyrum esculentum* Moench., variety Pyra.