

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

---

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

### **Ovlivnění produkce sekundárních látek deriváty pyrazinu v *in vitro* kulturách léčivých rostlin I.**

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

Vedoucí katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Hradec Králové, květen 2019

Jana Dvořáková

Děkuji své vedoucí diplomové práce doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení, vstřícnost při konzultacích a cenné rady v průběhu práce. Děkuji také PharmDr. Petrovi Kastnerovi, Ph.D. za pomoc při HPLC stanovení a pracovníkům katedry farmakognozie, zvláště Markétě Šimůnkové za pomoc při realizaci experimentální části mé práce.

Tato práce byla zpracována 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 zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Jana Dvořáková

# OBSAH

1.	ÚVOD .....	6
2.	CÍL PRÁCE.....	8
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
<b>3.1.</b>	<b><i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.....</b>	<b>9</b>
3.1.1.	Botanická charakteristika a taxonomické zařazení .....	9
3.1.2.	Výskyt a pěstování.....	10
3.1.3.	Využití .....	11
3.1.4.	Lékopisná droga.....	12
3.1.5.	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench., kult. <i>Bamby</i> .....	12
<b>3.2.</b>	<b>Obsahové látky .....</b>	<b>14</b>
3.2.1.	Flavonoidní glykosidy a jejich charakteristika .....	14
3.2.2.	Význam flavonoidních glykosidů .....	15
3.2.3.	Rutin .....	17
<b>3.3.</b>	<b>Produkce sekundárních metabolitů v <i>in vitro</i> kulturách .....</b>	<b>19</b>
3.3.1.	Explantátové kultury .....	19
3.3.2.	Produkce sekundárních metabolitů v <i>in vitro</i> kulturách .....	25
3.3.3.	Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů <i>in vitro</i> .....	26
<b>3.4.</b>	<b>Fyziologie stresu rostlin .....</b>	<b>28</b>
3.4.1.	Rostlinný stres .....	28
3.4.2.	Stresová reakce a její mechanismus.....	28
3.4.3.	Stresové faktory.....	32
<b>3.5.</b>	<b>Elicitace .....</b>	<b>34</b>
3.5.1.	Elicitory .....	34
3.5.2.	Reakce rostlin na elicitory .....	35
<b>3.6.</b>	<b>Pyraziny .....</b>	<b>36</b>
<b>3.7.</b>	<b>Pyraziny využívané jako elicitory .....</b>	<b>39</b>
3.7.1.	1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea.....	40
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	41
<b>4.1.</b>	<b>Použité chemikálie .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.</b>	<b>Použitý biologický materiál.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.</b>	<b>Přístrojové vybavení.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.</b>	<b>Složení a příprava živného média.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5.</b>	<b>Kultivace a pasážování .....</b>	<b>45</b>

4.5.1.	Kalusové kultury .....	45
4.5.2.	Suspenzní kultury .....	46
<b>4.6.</b>	<b>Elicitace <i>in vitro</i> kultur.....</b>	<b>46</b>
4.6.1.	Příprava roztoků elicitoru .....	46
4.6.2.	Průběh elicitace .....	47
<b>4.7.</b>	<b>Stanovení obsahu rutinu .....</b>	<b>48</b>
4.7.1.	Příprava extraktů .....	48
4.7.2.	HPLC analýza.....	48
<b>4.8.</b>	<b>Statistické zpracování výsledků .....</b>	<b>51</b>
4.8.1.	Aritmetický průměr .....	51
4.8.2.	Směrodatná odchylka.....	51
4.8.3.	T – test .....	52
5.	VÝSLEDKY.....	53
<b>5.1.</b>	<b>Tabulky.....</b>	<b>53</b>
5.1.1.	Kalusové kultury .....	53
5.1.2.	Suspenzní kultury .....	54
5.1.3.	Živné médium .....	55
<b>5.2.</b>	<b>Grafy.....</b>	<b>56</b>
5.2.1.	Suspenzní kultury .....	56
5.2.2.	Živné médium kalusových kultur .....	57
6.	DISKUZE .....	59
7.	ZÁVĚR .....	61
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	62
9.	ABSTRAKT .....	66
10.	ABSTRACT .....	67

# 1. ÚVOD

Používání léčivých rostlin má velmi dlouhou tradici. Důkazem této tradice může být už samotné odvození slova „*léčivo*“. Slovo *léčivo*, anglicky „*drug*“ pochází ze starogeremanského slova „*droge*“. To v překladu znamená sušina nebo usušený, ve smyslu usušené bylinky.

V důsledku nových životních trendů zažívá samoléčení léčivými bylinami renesanci. U populace roste zájem o vlastní zdravotní stav, přiklání se více k alternativním léčebným metodám na úkor vyspělých technologií. Roste také zájem o ochranu životního prostředí. Lidé by si ale měli dát pozor na to, že léčba bylinami neznamena automaticky bezpečná léčba. I u ní se objevují vedlejší účinky a interakce. Nebezpečím je také hrozba alergických reakcí u citlivějších jedinců a toxické účinky při překročení denní dávky. Na pozoru by se měli mít všichni lidé trpící nějakým chronickým onemocněním, těhotné a kojící ženy. Tyto skupiny pacientů by se měly vždy poradit s ošetřujícím lékařem o tom, jestli je pro ně léčba konkrétními bylinami vhodná. <sup>1)</sup>

Léčivé rostliny jsou nejvýznamnějším zdrojem život zachraňujících léků pro většinu světové populace. Podle odhadu Světové zdravotnické organizace se při onemocnění uchyluje k rostlinné léčbě jako k léčbě první volby dvě třetiny světové populace. Kritici přírodní léčby to považují za zastaralé řešení. Ale i v USA dodnes lékaři hojně předepisují aktivní složky léčivého původu (25 % celkové preskripce). <sup>1) 2)</sup>

Rostliny jsou důležitým zdrojem pro objev a vývoj nových léčivých přípravků. Několik chemických látek pocházejících z rostlin je dnes významnými léky. Dokonce se uvádí, že 25-28 % moderních léků a více než 60 % protirakovinových léčivých přípravků je odvozeno z rostlin. Přírodní produkty jsou spotřebiteli vnímány jako bezpečná léčiva, zatímco syntetické látky jsou obecně považovány za toxické. Roste tedy zájem o sekundární rostlinné metabolity, o jejich výzkum a produkci. <sup>2)3)</sup>

Studie přírodních produktů stimulovaly vývoj separačních technik k objasnění jejich struktury a syntézy. Rozvoj těchto metod je spojen s využitelností přírodních produktů (sekundárních metabolitů rostlin) jako barviv, polymerů, vláken, lepidel, olejů, vosků, ochucovadel, parfémů a léků. <sup>2)</sup>

Při produkci sekundárních metabolitů rostlin se využívají i metody rostlinné biotechnologie. Jsou to techniky explantátových kultur, které se stále rychle rozvíjejí. Tyto *in vitro* metody slouží nejen k výrobě farmaceuticky důležitých rostlinných produktů, ale je to také důležitá metoda při rozmnožování a šlechtění rostlin. <sup>4)</sup>

Produkce látek explantátovými kulturami není nijak vysoká. Hledají se různé způsoby, jak ji zvyšovat. Jeden z možných přístupů je použití elicitorů. Elicitory zvyšují produkci sekundárních metabolitů tím, že působí na rostlinu jako stresový faktor a spustí obrannou reakci rostlinného organismu. Problematice elicitace se bude tato práce věnovat podrobněji.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo seznámit se s metodou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále zjistit vliv abiotického elicitoru 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea na produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby*. Na základě stanovení obsahu metodou HPLC zjistit, jestli je daný elicitor schopen ovlivnit produkci obsahových látek pohanky, zejména rutinu.



## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1. *Fagopyrum esculentum* Moench.

#### 3.1.1. Botanická charakteristika a taxonomické zařazení

*Fagopyrum esculentum* (pohanka obecná) je krytosemenná kvetoucí rostlina (*Angiospermophyta*), která taxonomicky spadá do oddělení *Magnoliophyta*, třídy vyšší dvouděložné rostliny (*Magnoliopsida*), řádu *Polygonales* a čeledi *Polygonaceae* (rdesnovité).<sup>5)</sup>

Pohanka setá je cizosprašná rostlina převážně opylovaná hmyzem, nejvíce včelou medonosnou. V některých případech byla zjištěna i fakultativní samosprašnost (samoopylení).<sup>6) 7)</sup>

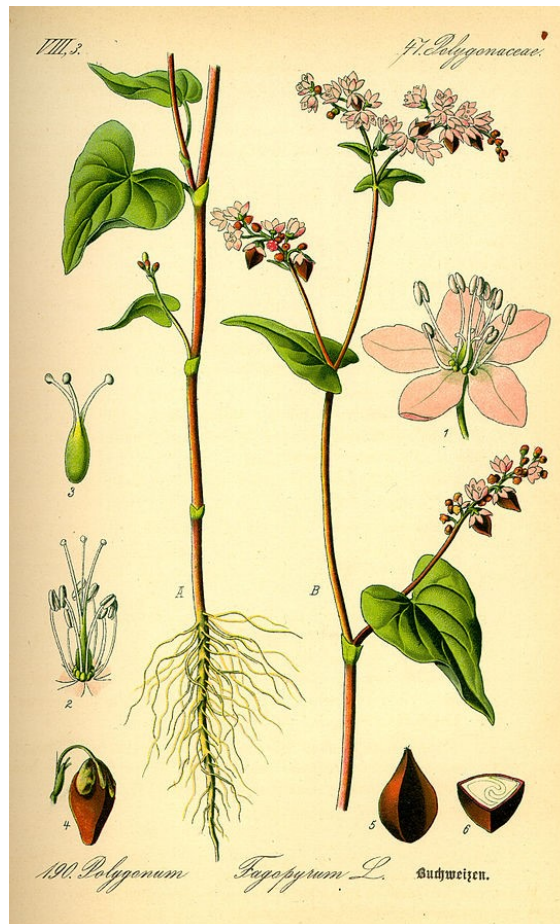
Pohanka je jednoletá bylina, která je vysoká 50–120 cm. Dutá vzpřímená lodyha s kolénky má načervenalou barvu a v horní třetině se větví. Střelovité listy mají na stonku střídavé postavení. Je pro ně typický jev, který se nazývá heterofylie. To znamená, že se svou stavbou liší spodní a horní listy. Spodní listy srdčitého tvaru mají dlouhý řapík, horní listy jsou šípovité, bez řapíku. Každý list je opatřen botkou.<sup>5) 6) 7) 8)</sup>

Z úžlabí listu vyrůstají květenství, úžlabní hrozny nebo vrcholové chocholíky. Květenství tvoří 7-9 drobných bílých či narůžovělých až červených kvítků. V květu je osm tyčinek a svrchní semeník, který obsahuje jedno vajíčko. Čnělka je trojdílná. Dimorfní (oboupohlavné) květy pohanky jsou heterostylní (různočleněné). To znamená, že na jedné rostlině se vyskytují dva typy květů, které se liší se v délce pylových tyčinek a pestíků. První typ květu (krátkočleněné) má delší pylové tyčinky a kratší blizny, druhý typ (dlouhočleněné květy) má kratší pylové tyčinky a delší blizny. Díky cizosprašnosti pohanky je poměr výskytu obou typů květů 1:1.<sup>6) 9)</sup>

Přibližně jenom deset procent květů tvoří plody. Plodem pohanky je trojboká moučnatá nažka, která připomíná bukvice. Je dlouhá 2-6 mm. Plně zralé trojboké nažky jsou černé, šedé nebo hnědé. Oloupané nažky jsou zelené a stárnutím hnědnou. Na průřezu jsou bílé.<sup>5) 7) 10)</sup>

Mělký kulovitý kořen proniká maximálně jeden metr do půdy. Pohanka nemá příliš mohutný kořenový systém, ale jeho předností je vysoká intenzivní činnost v přijímání živin. Činnost kořenového systému pohanky je například dvanáctkrát vyšší než u pšenice. Negativum této schopnosti je, že takto může pohanka přijímat i větší množství těžkých kovů (kadmia, arzenu a rtuti).<sup>6) 9)</sup>

Rod *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) zahrnuje 15 druhů rostlin. Tři nejdůležitější druhy pohanky jsou *Fagopyrum esculentum* (*F. esculentum*) Moench., *Fagopyrum tataricum* (*F. tataricum*) (L.) Gaertn. a *Fagopyrum dibotrys* (*F. dibotrys*) (D. Don) Hara. <sup>11)</sup>



Obrázek 1: *Fagopyrum esculentum* Moench. <sup>12)</sup>

### 3.1.2. Výskyt a pěstování

Rod *Fagopyrum* pochází ze střední Asie, z Číny. Do Evropy se pohanka dostala při mongolských nájazdech. U nás byla známá už ve dvanáctém století, v té době byla pěstována jako významná plodina na Těšínsku, Valašsku a v Beskydech. Dnes je pohanka rozšířená po celém světě. <sup>6) 13) 14) 15)</sup>

*Fagopyrum esculentum* vyžaduje mírné klima. Optimální teplota pro pěstování této rostliny je 15 °C, nižší teploty jí neprospívají. Zvláště mladé klíčící rostlinky jsou velmi citlivé na změny teploty na podzim a na jaře, kdy může docházet k přizemním mrazíkům. Při teplotě -4 °C mladé pohanky úplně mrznou. Při teplotách vyšších než 30 °C a nižší vlhkosti vzduchu opadávají pohance květy. Pohanka potřebuje dostatek vláhy a světla. Proto má raději vyšší polohy, kde

bývá dostatek srážek. Pohanka obecná kvete v červenci a v srpnu, její vegetační doba je 80–120 dní.

Nejvíce se pohance daří na provzdušněných písčitých půdách. Nesnáší přebytek vápníku a je nenáročná na živiny. Vyhovují jí kyselé půdy (i pH 5), naopak zásadité půdy nesnáší. Neutrální půdy jí nevdají. Sklízí se koncem srpna nebo v září, kdy je většina nažek dozralá.

Ve vyšších polohách nahrazuje pohanku setou (*Fagopyrum esculentum*) pohanka tatarská (*Fagopyrum tataricum*), která se lidově nazývá tatarka. Je více odolná vůči nepříznivým vnějším podmínkám.<sup>6) 7)</sup>

### 3.1.3. Využití

Pohanka je mnohostranně využívaná rostlina. Významné je využití pohanky v medicíně a farmacii, v potravinářství a v zemědělství, kde je využívána jako krmivo pro hospodářská zvířata.

Pohanka se pěstuje pro trojboké moučnaté nažky. Dieteticky jsou velmi cenné, řadí se mezi skupinu potravin nazývané pseudocereálie. Pohanka je vhodná pro diabetiky a pro pacienty trpící celiakií, protože neobsahuje lepek. Doporučuje se pacientům při onemocněních trávicího ústrojí.<sup>13) 16)</sup>

Díky rostoucí poptávce po nutričně hodnotných a bezpečných výrobcích na bázi obilovin se popularita dříve zapomenuté pohanky zvyšuje. Nažky se zpracovávají na pohankovou krupici lámanku, mouku nebo kroupy (jádro). Pohanka je navíc i medonosná plodina.<sup>6) 7) 17)</sup>

Zájem o pseudocereálie (pohanka, amarant a quinoa) ve výživě roste i v důsledku negativních změn v životním prostředí a životním stylu moderní civilizace (nevhodné složení stravy, nevhodné stravovací návyky, nadměrný energetický příjem, nedostatečný příjem vlákniny a vitamínů). Pseudocereálie obsahují mnoho pozitivně působících biologických látek – vlákniny, vitamínů a minerálů. Pohanka funguje i jako probiotická potravina. Na zvířecích modelech je dokázáno zvýšení obsahu mléčných bakterií ve střevě při její pravidelné konzumaci. Nažky se zbavují slupek spařením vodní párou, kroupy jsou tak připravené k vaření. Listy se používají jako salátová zelenina, podobně jako špenát.<sup>17) 18) 19)</sup>

Označení plodin jako pseudocereálie vychází z jejich porovnání s obilninami. Mají podobné chemické složení a podobné využití i přesto, že patří do rozdílných taxonomických skupin (čeledí).<sup>20)</sup>

Pohanka má přesvědčivý léčivý potenciál. *In vitro* i *in vivo* vědecké studie ukazují pohanku jako rostlinu s antioxidačními, antialergickými, antiaterogenními a neuroprotektivními účinky. Má cytotoxickou (protinádorovou) aktivitu a inhibiční účinky vůči angiotenzin-konvertujícímu enzymu (podstata hypotenzního účinku). Obsahuje látky, které snižují hladinu cholesterolu v krvi a tím snižují riziko aterosklerózy, posilují pružnost cévních stěn a snižují krevní tlak. Z těchto látek je nejvýznamnější flavonoid rutin, který se vyskytuje hlavně v nadzemních částech rostlin (listy obsahují až 8 % rutinu).<sup>5) 11) 17)</sup>

Extrakty snižují aktivitu cyklooxygenázy II (jeden z mechanismů protizánětlivého účinku), ale méně než nesteroidní antiflogistika. Extrakty z květů a listů *F. esculentum* průkazně inhibují proliferaci nádorových buněk a indukují jejich apoptózu.<sup>17)</sup>

Výtažky získané ze semen pohanky snižují hladinu cholesterolu a podporují správnou funkci trávicího systému tím, že povzbuzují funkci sleziny. V Britském bylinném lékopise (British Herbal Pharmacopoeia) jsou semena *F. esculentum* uvedena jako antihemoragická a hypotenzní droga. Podle tradiční korejské medicíny extrakty z pohanky dokáží snížit horečku, mají protizánětlivou a detoxikační funkci.<sup>11) 17)</sup>

Ethanolové i vodné extrakty se semen průkazně udržují normální hladinu glukózy v krvi a tím působí preventivně jako prevence vzniku diabetes mellitus typu II. Extrakty z plodů podávané perorálně, intraperitoneálně nebo intradermálně významně inhibují vaskulární propustnost.<sup>11)</sup>

Nať pohanky se používá ve farmacii i k výrobě různých přípravků a čajových směsí. V lidovém léčitelství se používají pohankové zábaly k léčení zánětu žil.<sup>6)</sup>

### **3.1.4. Lékopisná droga**

Dle Českého lékopisu 2017 je *Fagopyrum esculentum* Moench. zdrojem lékopisné suroviny *Fagopyri herba* (nať pohanky). Je to celá nebo rozlámaná nať sbíraná v časně fázi květenství, před vytvořením plodů, ihned usušená. Droga je zdrojem zejména flavonoidu rutinu, kterého obsahuje nejméně 3,0 %, počítáno na usušenou drogu.<sup>8)</sup>

### **3.1.5. *Fagopyrum esculentum* Moench., kult. Bamby**

Krom kultivarů *Bamby*, který pochází z Rakouska existují i další odrůdy pohanky. Tyto odrůdy se liší obsahem fenolických látek a antioxidační aktivitou. V České republice byly vyšlechtěny

kultivary *Pyra* a *Jana C1*, na Slovensku například *Špačinská 1* a *Východočeská krajová*. Mezi další vyšlechtěné kultivary *Fagopyrum esculentum* patří *Emka*, *Ballada*, *Aiva*, *Darja*, *Alex*, *La Harpe*, *Winsor Royal* a další. <sup>20)</sup>

Kultivar *Bamby* byl v Rakousku zaregistrován v roce 1989 a byl použit k několika studiím:

- 1) Srbská univerzita Novi Sad ve spolupráci se slovinskou univerzitou v Lublani porovnávala obsah fenolických látek a míru antioxidačního působení u různých kultivarů pohanky, které pocházely z Evropy s kultivary pocházející z Balkánu. Spolu s odrůdami *Novosadska*, *Godijevo* a *Špačinská 1* měla odrůda *Bamby* nejvyšší antioxidační aktivitu. V obsahu rutinu nijak zvlášť odrůda *Bamby* nevynikla. <sup>21)</sup>
- 2) V rámci studie, která probíhala na Slovensku v roce 2016 a porovnávala množství fenolických sloučenin a rutinu v kultivarech pohanky, amarantu a quinoa semínek, byl u odrůdy *Bamby* zjištěn nejvyšší obsah polyfenolů i flavonoidu rutinu. <sup>20)</sup>
- 3) V roce 2017 probíhal výzkum na univerzitě v Itálii v Pise. Stanovovala se koncentrace rutinu a kvercetinu v odrůdách *Bamby* a *Lileja* v různých fázích sklizně. Obsah těchto látek se v pozdější fázi sklizně snižoval. Kultivar *Bamby* obsahoval více kvercetinu a méně rutinu. <sup>22)</sup>
- 4) Během studie probíhající v Maďarsku v roce 2017 byla stanovována koncentrace rutinu metodou fotoakustické UV spektroskopie u 7 odrůd *Fagopyrum esculentum* a 6 odrůd *Fagopyrum tataricum*. Tato metoda se ukázala stejně přesná pro měření koncentrace rutinu jako metoda HPLC. V tomto případě byl u kultivaru *Bamby* naměřen nejmenší obsah rutinu. Ve všech kultivarech *Fagopyrum tataricum* byl naměřený obsah rutinu mnohonásobně vyšší než jeho obsah v kultivarech *Fagopyrum esculentum*.
- 5) Na Slovensku ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Piešťanech byla prováděna studie, která dokázala v kultivaru *Bamby* obecně vysoký obsah polyfenolů. Odrůda *Bamby* byla porovnávána s deseti jinými odrůdami pohanky. Průměrný obsah rutinu ve zkoumaných odrůdách byl 1446 mg/kg, v odrůdě *Bamby* byl 3600 mg/kg. <sup>23)</sup>
- 6) Odrůda *Bamby* je používána v některých studiích zabývajících se zvyšováním produkce rutinu. <sup>24)</sup>

## 3.2. Obsahové látky

Kvetoucí nať se využívá k izolaci flavonoidů (hlavně rutinu). Stejně jako ostatní rostliny z čeledi rdesnovitých obsahuje až 10 % kyseliny šťavelové. Čerstvá pohanková nať obsahuje také fotosenzibilizátory – fagopyrin a fotofagopyrin, které mohou vyvolat u některých lidí alergii a fotosenzibilizaci. V sušených rostlinách jsou pouze jejich stopy. <sup>7) 16)</sup>

Z patnácti druhů pohanky bylo celkem izolováno 106 sloučenin rozdělených do šesti hlavních tříd: flavonoidy, fenoly, fagopyritoly, triterpenoidy, steroidy a mastné kyseliny. Hlavní aktivní komponenty jsou flavonoidy a fenolické sloučeniny. <sup>11)</sup>

Plody *Fagopyrum esculentum* obsahují až 12 % bílkovin, 3 % tuků, 55 % polysacharidů, 8 % vlákniny a 2,5 % minerálních látek. Z těchto minerálních látek je nejvýznamnější vápník, železo, zinek, fosfor a draslík. Obsahuje také vitamíny B1, B2, niacin a vitamin E. <sup>7) 16)</sup>

Bílkovinný komplex je tvořen hlavně albuminy a globuliny. Plody neobsahují prolaminy, které jsou toxické pro pacienty s celiakií. Pokud jsou bílkoviny obsažené v pohankové nažce nedostatečně tepelně upravené, mohou způsobit průjem. Lipidy jsou nejvíce přítomny v zárodku, z fosfolipidů je hojně zastoupen lecitin.

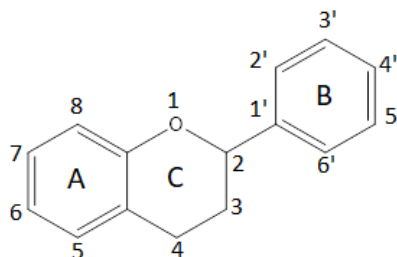
Z kardioprotektivního hlediska je významný vysoký obsah nenasycených mastných kyselin, z celkového obsahu lipidů to je 82 % (hlavně kyselina linolová a alfa – linolenová). Ze sacharidů obsahuje především škrob. Z celkového obsahu vlákniny je 20-30 % rozpustná vláknina, která pomáhá snižovat hladinu cholesterolu v krvi. Vláknina se naváže na molekulu cholesterolu, který se pak nemůže vstřebat a vyloučí se společně s vlákninou. <sup>14) 16)</sup>

### 3.2.1. Flavonoidní glykosidy a jejich charakteristika

Glykosidy jsou hojně rozšířenou skupinou sekundárních metabolitů. Glykosidické sloučeniny jsou štěpeny enzymy glukosidázami na dvě části: sacharid (glykon) a necukernou složku (aglykon, genin). Aglykonem je většinou hydroxysloučenina navázaná acetátovou vazbou na sacharid. Jednotlivé skupiny glykosidů jsou rozlišovány podle struktury aglykonů na fenolické, antrachinové, kardioaktivní, flavonoidní a další. <sup>25)</sup>

Flavonoidy jsou velmi velká a rozmanitá skupina sekundárních rostlinných metabolitů patřící do skupiny polyfenolických sloučenin. Je jich známo několik tisíc typů.

Všechny flavonoidy mají stejný základní skelet. Jde o patnáctiuhlíkatý řetězec (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sup>3)</sup>, který se skládá ze dvou šestiuhlíkatých kruhů (kruh A a kruh B) spojený tříuhlíkatým řetězcem, který je často s atomem kyslíku zapojen do třetího heterocyklického kruhu (kruh C, 2H-pyran). Kruhy A a C vytvoří heterocyklus zvaný chroman, který může být arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany). Základní strukturou flavonoidů je flavanové jádro.<sup>26)</sup>



**Obrázek 2:** Flavan (2-fenylchroman)<sup>26)</sup>

Základní kruhy bývají různě modifikovány. Na základě těchto modifikací se dělí flavonoidy na různé chemické skupiny. Jsou to například chalkony, flavanony (narigenin, hesperidin), flavonoly (rutin, kvercetin, keampferol, myrcetin), flavony (apigenin, luteolin), isoflavony (genistein), flavanoly (katechin) a anthokyanidiny (cyanidin, pelargonidin).

Flavanoly tvoří rozmanitou skupinu polyfenolů. Existují monomerní (katechin, epikatechin) i polymerní procyanidiny (kondenzované třísloviny). Jsou obsaženy hlavně v ovoci, v čaji, červeném víně, kakau a v cereáliích.<sup>27)</sup>

Všechny rostlinné fenoly jsou syntetizovány z fenylpropanoidových prekurzorů. Fenolické sloučeniny jsou v rostlině syntetizovány dvěma biochemickými dráhami, šikimárovou dráhou (kruhy A a C) a acetátovou dráhou (kruh B).<sup>26)</sup>

### 3.2.2. Význam flavonoidních glykosidů

Flavonoidní glykosidy jsou hojně terapeuticky využívány a mají význam i pro samotnou rostlinu. Flavonoidy byly prokázány jako hlavní aktivní sloučeniny v pohance nacházející se v různých částech těla rostliny. Šest flavonoidů (rutin, kvercetin, orientin, vitexin, isovitexin a isorientin) se vyskytuje v nadzemní části rostliny a pouze rutin a isovitexin se nachází v semenech.

<sup>11)</sup>

### 3.2.2.1. Význam pro rostlinu

Flavonoidní glykosidy chrání rostlinu před různými patogeny a býložravci. Chrání ji před UV zářením, které je zdrojem reaktivních forem kyslíku. Dokonce mají schopnost přímo zhasět volné radikály (singletový kyslík, peroxid vodíku, superoxid). Zároveň lákají opylovače. <sup>26) 28)</sup>

Anthokyanidinové pigmenty (pelargonidin, malvidin) zabezpečují zbarvení květů a plodů. Jsou zodpovědné za červenou a modrou barvu bobulí, za žlutou a oranžovou barvu citrusů. Flavonoidová barviva jsou rozpustná ve vodě, proto jsou skladována v buněčných vakuolách. Methoxylované jsou lipofilní a vyskytují se také v silicích.

Flavonoidy a jejich deriváty mohou působit jako účinné látky proti rostlinným virům (potato virus X-PVX, virus tabákové mozaiky-TMV). Mají i antibiotické a antifugální účinky, mohou být použity jako potenciální biocidy. <sup>13) 26) 27)</sup>

Bylo prokázáno, že flavonoidy ovlivňují transport rostlinných fytohormonů auxinů, které kontrolují rostlinný růst a vývoj. Flavonoidy byly označeny jako inhibitory transportu auxinů při *in vitro* studiích. Experimenty *in vivo* tuto teorii podpořily. Mezi testovanými a kontrolními rostlinami byly pozorovány tyto fenotypové rozdíly: větší množství vytvořených květenství, redukce výšky rostlin, snížení plochy stonku a lepšího vývoje stonku. <sup>29)</sup>

### 3.2.2.2. Terapeutický význam

Flavonoidy s biologickou aktivitou bývají označovány jako bioflavonoidy. Flavonoidy mají dlouhou historii terapeutického využívání, hlavně kvůli účinku na kapiláry a funkci krevního řečiště. Mají schopnost normalizovat permeabilitu kapilár, působit antihemoragicky a antiedematózně. Rozšiřují cévy, snižují krevní tlak a působí antiagregačně. Mají i protizánětlivý a protinádorový účinek. Potencují účinek vitamínu C. Aktivují řadu buněk imunitního systému, uvolňují mediátory ze žírných buněk, bazofilů, neutrofilů, eozinofilů a granulocytů. Tím snižují symptomy astmatu, alergie a zánětů. <sup>11) 13) 27) 30)</sup>

Mají výbornou antioxidační aktivitu, chrání buňky, lipidy nebo DNA před oxidativním poškozením. Tato vlastnost je dána přítomností aromatického kruhu v molekule flavonoidů, který slouží jako donor i akceptor elektronů pro volné radikály.

Konzumace flavonolů (rutinu) je spojena se snížením rizika mrtvice a rakoviny. Některé tyto sloučeniny jsou spojovány s prevencí osteoporózy a neuroprotektivními vlastnostmi.



Anthokyanidiny zvyšují kvalitu zraku a zrakovou ostrost tím, že přispívají k regeneraci rodopsinu. Isoflavony (diadzein, genistein) zmírňují menopauzální obtíže a regulují menstruační cyklus (mohou se vázat na estrogenové receptory) a jsou spojeny se snížením rizika rakoviny prsu. Občas bývají přiřazovány k fytoestrogenům. Je potvrzeno, že flavanoly mohou stimulovat hladiny oxidu dusnatého v krvi kuřáků a zvrátit poškození cév související s kouřením.

Flavonoidy mají uplatnění také v potravinářském průmyslu. Některé sloučeniny se zdají být využitelné jako sladidla nebo potravinářské barvy. Jiné mohou být používány v zahradnictví a průmyslu řezaných květin jako květinové pigmenty.<sup>27)</sup>

Zajímavá je studie, která systematicky hodnotila aktivitu různých flavonoidů vůči lidským cytochromům. *In vitro* bylo zjištěno pozoruhodné inhibiční chování vůči CYP3A4 závislé na struktuře. Doporučuje se ověření této schopnosti při interakcích s léčivými, která jsou eliminována CYP3A4 *in vivo*.<sup>31)</sup>

### 3.2.3. Rutin

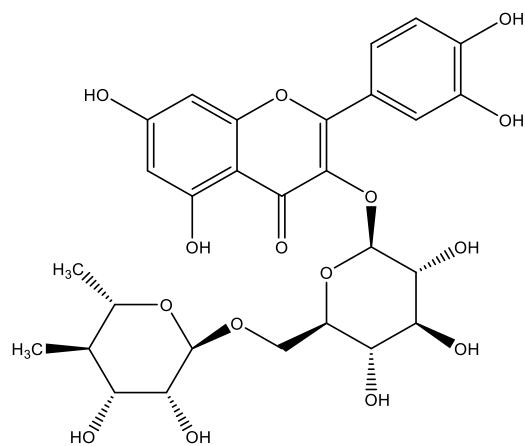
Rutin je flavonoidní glykosid, které chemicky vychází z flavonoidu kvercetinu. Rutin (kvercetin-3-rutinosid) je v rostlinách velmi rozšířený. Doposud byl prokázán nejméně v 85 rostlinách a pohanka je jeho významným zdrojem. Poprvé byl izolován v roce 1842 z routy vonné (*Ruta graveolens* L.). Rutinu se dostalo pojmenování podle latinského názvu této rostliny. Je to krystalická zelenožlutá látka, která je špatně rozpustná ve vodě.<sup>7)</sup>

Obsah rutinu v rostlině závisí na růstových podmínkách, na míře slunečního záření a na odrůdě pohanky. Rutin se akumuluje nejvíce při nízké vlhkosti vzduchu a teplotě 15 °C. Jeho nejvyšší koncentrace je v listech a květech. Lodyha obsahuje rutinu nejméně.<sup>11) 14)</sup>

Rutin má pro lidský organismus velmi prospěšné účinky. Zvyšuje pevnost krevních kapilár, s ionty vápníku tvoří komplexní soli a tím přispívá ke správné srážlivosti krve. Pomáhá snižovat krevní tlak (působí diuretický a rozšiřuje cévy), kompenzovat diabetes, redukovat aterosklerózu a snižovat cévní komplikace těchto onemocnění. Rutin také násobí vliv vitamínu C (je antioxidant kyseliny askorbové). U rutinu je prokázáno snížení obsahu jaterního cholesterolu a plazmových lipidů. Rutin působí také vasokonstrikčně a antiedematózně.<sup>6) 7) 14) 30)</sup>

Farmaceutický průmysl vyrábí přípravky s obsahem rutinu a vitamínu C, například Ascorutin. Pro aplikaci je výhodná jeho mikronizovaná forma. V kombinaci s trypsinem a bromelainem je rutin perorálně používán při osteoartritidě.<sup>30)</sup>

Rutin chrání rostlinu před UV-zářením a chorobami. Tvoří 90 % celkového obsahu flavonoidů v semenu pohanky.<sup>22)</sup>



**Obrázek 3:** Rutin<sup>32)</sup>

### 3.3. Produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách

#### 3.3.1. Explantátové kultury

##### 3.3.1.1. Charakteristika explantátových kultur

Explantátové kultury slouží k manipulaci s vyššími rostlinami na úrovni izolovaných buněk, pletiv a orgánů kultivací *in vitro*. Jejich kultivace probíhá v uzavřených, nejčastěji skleněných nádobách na aseptických živných půdách.

Explantáty jsou různé typy orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů, které jsou kultivovány *in vitro*.<sup>4) 38)</sup>

První definice explantátových kultur zní takto (BAYER, 1939): Za explantát je považován každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů, který je vytržený z korelačních vztahů k celku a je pěstován v umělých podmínkách.<sup>39)</sup>

##### Typické znaky explantátových kultur:<sup>35) 38)</sup>

- Jedná se o aseptickou *in vitro* kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek sloužící k izolaci buněk, pletiv, orgánů a jejich kultivaci ve sterilních podmínkách řízeného prostředí (definovaná kultivační media, teplota, vlhkost, kvalita a kvantita světla).
- Izolované části rostlin mohou být krátkodobě kultivovány *in vitro* a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny, protože každá buňka je díky její totipotenci (obsahuje genetickou informaci pro celou rostlinu) potencialem zdrojem nového organismu. Probíhá pak cyklus: rostlina – explantát – kultura *in vitro* – embryogeneze /organogeneze – intaktní rostlina.
- Kultura je zdrojem genetické variability, rostlinné buňky jsou *in vitro* nestabilní. Při použití mutagenů se genetická variabilita zvyšuje.

### 3.3.1.2. Druhy explantátových kultur

Podle morfologických kritérií se rozlišují: <sup>40)</sup>

- Orgánové kultury jsou tvořeny celými diferencovanými orgány nebo jejich částí. Stavba a funkce orgánů jsou zachované.
- Tkáňové (kalusové) kultury jsou mnohobuněčné komplexy pletiva, většinou kultivovaných na polotuhých nebo tuhých živných půdách.
- Suspenzní kultury jsou suspenze buněk a malých buněčných agregátů v tekutém médiu.
- Buněčné kultury jsou jednotlivé buňky pomnožené v tekutém, polotuhém živném médiu nebo na pevném nosiči s nasyceným médiem.
- Kultury buněčných protoplastů jsou tvořeny buňkami bez pevné buněčné stěny, jsou ohraničeny pouze cytoplazmatickou membránou.

#### Kalusové kultury

Kalusové kultury jsou historicky nejstarší. Kalus (rostlinné hojivé pletivo) je soubor nediferencovaných buněk, který lze odvodit z různých explantátů (segmenty listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, embryí). Kalus vzniká z explantátu jako reakce na poranění. Je to masa neorganizovaných, dělicích buněk. Kalus může být produkován i bez poranění v prostředí obsahující regulátor růstu rostlin. Ne všechny buňky v explantátu přispívají k tvorbě kalusu. Některé buňky jsou schopny se regenerovat v organizované struktury a u některých se dokonce zdá, že nejsou schopny totipotence. <sup>35)</sup>

Po nárůstu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné tyto buňky udržovat v aktivním stavu opakovaným přenášením na čerstvé živné půdy. Kalus lze použít k odvození suspenzní kultury v tekutém médiu jeho umístěním na třepačku. <sup>4) 35)</sup>

#### Suspenzní kultury

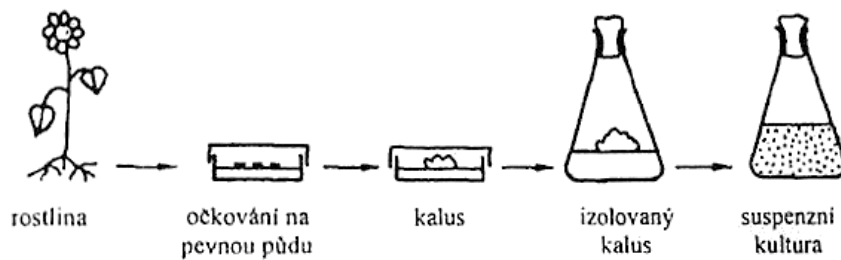
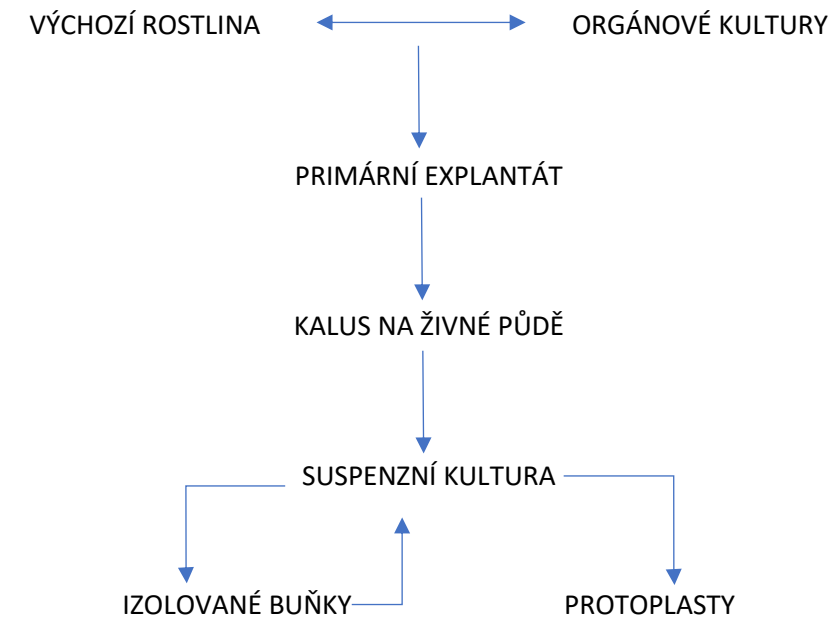
Suspenzní kultury se vyznačují rychlým růstem buněk, protože mají lepší kontakt s živným médiem. K zajištění stálého růstu je nutno tyto kultury poměrně často pasážovat na čerstvé médium. Buněčné suspenzní kultury jsou relativně homogenní populace buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu. Jsou modelovým systémem pro studium procesů sekundárního metabolismu, indukci enzymů, genové exprese, mutační šlechtění rostlin a produkce somatických embryí.

Pro systémy kultivace buněčných suspenzí je společně používání živných médií, které se pohybují. Dochází k lepšímu provzdušnění a přístupu živin k buňkám. Pro kontinuální kultivaci se

využívají různé bioreaktory, kde se pro pohyb média využívá míchadlo nebo probublávání sterilním vzduchem. Bioreaktory mají objem 5–10 litrů, automatické pH, stálou koncentraci plynů, monitoring růstu buněčné kultury. <sup>35)</sup>

Suspenní kultury jsou inspirovány mikrobiálními kulturami využívanými pro produkci klasických antibiotik. <sup>37)</sup>

**Odvození kultur rostlinných explantátů se dá znázornit následovně: <sup>40)</sup>**



**Obrázek 4:** Odvození explantátových kultur <sup>4)</sup>

### 3.3.1.3. Využití explantátových kultur

Používají se k biochemickým, fyziologickým, morfologickým a genetickým studiím ve výzkumu. Jsou také nedílnou součástí zemědělské produkce rostlin (rychlé klonové množení a šlechtění rostlin).

#### **Možnosti aplikace:** <sup>35)</sup>

- Vegetační množení rostlin metodou mikropropagace.
- Ozdravování od virových infekcí kultivací izolovaných meristémů.
- Regulace procesu oplodnění a jeho ovlivnění v podmínkách *in vitro*.
- Produkce haploidů při kultivaci prašníků, mikrospor a vajíček.
- Řízená fúze protoplastů s cílem vytvoření nových hybridů.
- Spontánní výskyt a indukce genových, genomových mutací v buněčných a tkáňových kulturách a jejich selekce na úrovni regenerovaných rostlin.
- Inkorporace cizího genetického materiálu do buněk s cílem modifikace rostlinného genomu.

Explantátové kultury byly na počátku 20. století široce využívány ke studiu základních biologických mechanismů u rostlin (morfogeneze). První zprávy o využití těchto kultur jsou z roku 1902, kdy se Gotlieb Harberlandt poprvé pokusil udržovat mezofylové buňky v kultuře. V dnešní době se tyto *in vitro* kultury staly spolehlivou technikou pro hromadnou výrobu rostlinného materiálu. Navíc je velký potenciál tuto techniku používat pro výrobu některých bioaktivních sloučenin. <sup>41) 42)</sup>

Rostlinné *in vitro* kultury byly použity ve studiích na screening nebo ověření funkčních genů, protože s tkáňovými kulturami se lépe pracuje než s pěstovanými nativními rostlinami. <sup>43)</sup>

Buněčné kultury zůstaly důležitým nástrojem při studiu rostlinné buněčné biologie. Například při studiích cytoskeletu, chromozomálních změn v kultivovaných buňkách a při studiích buněčného cyklu. <sup>44)</sup>

### 3.3.1.4. Kultivační média

Kultivační média (zásobní roztoky) jsou složena z těchto látek: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny (zdroj organického dusíku), sacharidy, zpevňující látky (agar) a růstových regulátorů. <sup>35)</sup>

### **Makroelementy**

Mezi používané makroelementy patří šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra. Jsou důležité pro zajištění růstu kultury. Nejlepšího růstu je dosaženo, pokud se dusík dodává ve formě nitrátů nebo amonných solí (nejčastěji ve formě dusičnanu amonného a dusičnanu draselného). Nižší koncentrace dusíku v médiu vede k syntéze polysacharidů. Draslík se dodává ve formě dusičnanu nebo chloridu. Zásobní roztok se připravuje většinou 10× koncentrovaný. Uchovává se v lednici po dobu několika týdnů. Soli vápníku je vhodné skladovat zvlášť, aby se zabránilo jejich vysrážení. <sup>43) 35)</sup>

### **Mikroelementy**

Mikroelementy jsou železo, mangan, zinek, bor, měď, molybden, (jod, sodík, chlor). Jsou rovněž důležité pro růst kultury. Železo a zinek se do média dodávají v chelátové formě. Zásobní roztoky jsou nejčastěji 100× koncentrované. Uchovávají se v lednici po dobu až jednoho roku (ale kontrolují se, aby nedošlo ke kontaminaci). Zásobní roztok železa se připravuje a uchovává odděleně.

### **Sacharidy**

Důležitým sacharidem, který se používá při přípravě živných roztoků je sacharóza. Sacharóza je zdrojem uhlíku a energie. V živném médiu jí bývá 2–3 %. Někdy je možné sacharózu nahradit glukózou nebo fruktózou.

### **Vitamíny**

Vitamíny jsou důležité pro růst a vývoj kultury. Jsou katalyzátory metabolických procesů. Mezi důležité vitamíny patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. Přítomnost thiaminu v kulturách je pro růst nepostradatelná. Myo-inositol se vyskytuje ve většině živných médií. Předpokládá se jeho účast na tvorbě sloučenin, které stimulují buněčné dělení. Používá se i biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová a riboflavin. Zásobní roztoky se připravují 100× nebo 1000× koncentrované a uchovávají se v mrazničce (-20 °C).

### **Aminokyseliny**

Aminokyseliny slouží jako zdroj dusíku nebo pro přímou výstavbu proteinů. Používají se směsi aminokyselin, například kasein–hydrolyzát. Často se používá také L–glutamin, L–asparagin, glycin a adenin.

Součástí živných médií mohou být **nedefinované složky organických médií** (kokosové mléko, kvasnicový extrakt, sladový extrakt, extrakt z banánů). Lze jimi stimulovat růst, ale jejich přidání je lepší vynechat z důvodu jejich nedefinovaného složení.

**Aktivní uhlí**, které může být do živného média přidáváno v koncentraci 0,5–1 % absorbuje látky inhibující růst kultury, ale i regulátory růstu. Může mít stimulační i inhibiční účinek. Způsobuje ztmavnutí média.

### **Růstové regulátory**

Růstové regulátory jsou rostlinné hormony (fytohormony), které lze rozdělit do čtyř skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová. V nízkých koncentracích vyvolají reakce v místě vzniku nebo tam, kde jsou transportovány. Mají stimulační i inhibiční účinky. Pro jejich účinek je rozhodující koncentrace a poměr jednotlivých hormonů. <sup>35)</sup>

#### **Auxiny**

Auxiny byly první objevenou skupinou fytohormonů. V rostlinách se syntetizují z tryptofanu. Jejich nejvýznamnější účinek spočívá ve stimulaci dlouhivého růstu buněk, protože mají schopnost roztahovat buněčné stěny. Za spolupůsobení cytokininů zesilují mitotickou aktivitu pletiv. Velmi významný je účinek auxinů na větvení kořenů a na tvorbu adventních kořenů. V praxi se této vlastnosti využívá při zakořeňování řízků rostlin. Používá se kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolylmásečná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina naftyloctová (NAA). Nejvíce se používají NAA, IBA a 2,4-D. Jednotlivé auxiny mají různou rychlost pohybu pletivy, různé receptory a rozlišný metabolismus. Stimulují růst kalusu a buněk. NAA a 2,4-D jsou stabilní auxiny, při teplotě 4 °C je lze uchovávat několik týdnů. IAA je nestabilní, v lednici vydrží týden. <sup>35) 40) 43)</sup>

#### **Cytokininy**

Mezi cytokininy patří benzylaminopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (2iP; IPA), furfurylaminopurin a zeatin, který byl objeven jako první. Jejich základní kostrou je adenin. Cytokininy stimulují buněčné dělení a tvorbu axiálních prýtů. Cytokininy jsou velmi nestabilní, uchovávají se v mrazničce. Připravují se 100× až 1000× koncentrované. <sup>35) 40)</sup>

#### **Gibereliny**

Gibereliny známe pouze nativní, vyrábějí se fermentací houby *Gibberella fujikuroi*. Jsou to terpenoidní sloučeniny označované GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, atd. Kyselina giberelová GA<sub>3</sub> je nejvýznamnější. Stimulují dělení buněk, hlavně jejich prodlužovací růst. <sup>40)</sup>



### **Kyselina abscisová (ABA)**

ABA je přirozeným inhibítozem rozšířeným zejména u krytosemenných rostlin. Chemicky se jedná o seskviterpen, jeho syntéza vychází z mevalonátu. Inhibuje celkovou syntézu proteinů. Této vlastnosti se využívá při navozování dormance, díky tomu urychlují i stárnutí buněk. <sup>40)</sup>

Vhodné pH pro přípravu média je 5,5 až 6,0. Podle potřeby lze upravit hydroxidem draselným nebo kyselinou chlorovodíkovou. Pro přípravu média je rovněž důležité mít vždy čisté sklo, vodu o vysoké kvalitě (destilovaná, demineralizovaná) a přesné navážky jednotlivých komponent. <sup>35)</sup>

Médium může obsahovat látku, které ho zpevňuje nebo jinak ovlivňuje jeho reologické vlastnosti, nejčastěji agar. Je také možné explantátové kultury pěstovat na můstkách z filtračního papíru, plovoucích polopropustných membránách nebo v polyuretanové pěně. <sup>45)</sup>

Pro přípravu kultivačních médií lze použít komerčně dostupné hotové práškové médium nebo zásobní roztoky. Jsou k dispozici různá kultivační média různých formulací a s obsahem různých regulátorů růstu. Mezi používaná média, která jsou komerčně dostupná, patří MS médium (Murashige a Skoog, 1962), LS médium (Linsmaier a Skoog, 1965), B5 médium a N6 médium. <sup>35) 46)</sup>

### **3.3.2. Produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách**

Existují tři základní způsoby získávání sekundárních metabolitů: <sup>47)</sup>

- 1) Extrakce z rostlin
- 2) Chemické syntézy
- 3) Explantátové kultury

Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky únosnou organickou syntézou, proto se k získání těchto látek využívají rostlinné explantátové kultury. <sup>36)</sup>

Nediferencované buňky explantátových kultur jsou preferovaným kultivačním systémem pro produkci hodnotných sekundárních metabolitů *in vitro*. Postupně probíhá selekce kultivarů s vysokou produkcí. Někdy může tato produkce probíhat i v diferencovaných tkáních (kořenové vlásky). <sup>3) 35)</sup>

Kultivace buněčných suspenzních kultur je jednoduchá a nákladově efektivní metoda, která se využívá k překonání problémů velkokapacitní produkce. Kultury rostlinných buněk mají lepší potenciál pro komerční použití než tkáňové nebo orgánové kultury. <sup>3)</sup>

### **Výhody produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami oproti tradičním způsobům získávání:**

- Řízená syntéza nezávislá na klimatu a půdních podmínkách.
- Jsou vyloučeny negativní biologické vlivy (patogenní organismy), které v přírodě mění produkci sekundárních metabolitů. <sup>35)</sup>
- Tato technologie je šetrná k životnímu prostředí. Nemusí se zde používat pesticidy a herbicidy na hubení škůdců. <sup>3)</sup>
- Lze selektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů.
- Možný pokles ceny a zvýšení produkce automatizací řízení buněčného růstu s regulací metabolických procesů. <sup>35)</sup>
- Produkce čistých sloučenin a kontrolovaný finální produkt. <sup>41)</sup>

Existují ale i jistá omezení a nevýhody této metody. Může to být nesprávné zaměření výzkumu, špatné vize a cíle výzkumu, finanční potřeby nebo nedostupnost vyškolené pracovní síly.

Problémem je komerčně nedostačující produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách. Jeden z hlavních důvodů je nedostatek znalostí biosyntetických cest a mechanismů zodpovědných za produkci sekundárních metabolitů. Jakákoliv technika upravující metabolismus rostlin může snížit výtěžky. Je potřeba vyvíjet techniky, které zvýší výtěžky i jakost sloučenin, které jsou produkovány explantátovými kulturami. <sup>2) 34) 35) 48)</sup>

Produkce sekundárních metabolitů *in vitro* kulturami obvykle probíhá dvoustupňovým procesem, akumulací biomasy a syntézou sekundárních metabolitů. Přičemž oba kroky je třeba optimalizovat nezávisle. Udržovací média (při akumulaci biomasy) a produkční média (při syntéze sekundárních metabolitů) se liší ve složení. <sup>3)</sup>

### **3.3.3. Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů *in vitro***

*In vitro* kultivace je velmi atraktivní technika pro získávání sekundárních metabolitů, zejména fenolických sloučenin. Zvyšování produkce bioaktivních fenolických extraktů umožňuje jejich širší využití, zejména v průmyslu funkčních potravin nebo ve farmaceutickém průmyslu a medicíně. Při komerčním využití explantátových kultur je nutné dosahovat vysokých výtěžků. <sup>41)</sup>

### Ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů *in vitro* přispívá:

- Výběr vhodné části rostliny (explantátu) pro odvození kultury.

Mezi faktory výběru explantátu patří věk orgánu, který má sloužit jako explantát (mladší tkáň je citlivější *in vitro*, starší tkáň nevytváří kalus, který je schopen regenerace), roční období (výhonky získané na jaře jsou mnohem citlivější), velikost explantátu (větší obsahují více rezerv a regulátorů růstu), kvalita rostlinného zdroje, konečný cíl explantátové kultur a genotyp rostliny. Úroveň regulátorů růstu rostlin (auxin, cytokininy, gibereliny, ethylen atd.) je hlavním faktorem, který řídí tvorbu kalusu v kultivačním médiu. <sup>44)</sup>

- Dodržování správných kultivačních podmínek.

Mezi ně patří teplota (20-28 °C), světlo, pH média (5,6-6), typ média, zdroj uhlíku (D–glukóza + D–fruktóza), zdroj dusíku a použité kovové ionty v médiu. <sup>43)</sup>

- Přidání prekurzorů exogenně do živného média.

Toto je výhodné jen pokud jsou prekurzory výrazně levnější než produkt.

- Použití elicitorů.

Elicitory působí jako aktivátory enzymů v pletivech rostlin nebo stimulují jejich syntézu. <sup>2)</sup>

- Biotransformace.

Rostlinné buňky jsou schopny transformovat exogenně dodané látky různými reakcemi (oxidací, redukcí, metylací, demethylací, hydroxylací).

- Imobilizace buněk.

Překonává problémy s agregací buněk. Při této technice jsou buňky zachyceny v určité gelové matrici. Nejvíce se používá alginát vápenatý, dále to může být agaróza, karagenan nebo polyakrylamid. Tímto způsobem se prodlouží čas pro růst buněk.

- Genetická manipulace.

Probíhá v rámci metabolického inženýrství. Využívá se genových manipulací pro upravení exprese genů podílejících se na syntéze sekundárních metabolitů. Biotechnologie otevírá příležitost aplikovat tradiční nebo metabolické inženýrské strategie, které podporují akumulaci požadovaných sloučenin pomocí *in vitro* kultur. <sup>3)</sup>

## 3.4. Fyziologie stresu rostlin

### 3.4.1. Rostlinný stres

Rostliny jsou vystaveny proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Pokud jsou tyto podmínky velmi nepříznivé a překročí hranici tolerance, dojde v rostlině k poruchám funkcí a struktur. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí označujeme jako stresové faktory (stresory). Pokud je jim rostlina vystavena, je ve stavu, který se nazývá stres.

Stres je dynamický komplex mnoha reakcí, nikoliv ustálený stav. Dochází při něm k aktivaci různých nápravných procesů. Fyziologie stresu u rostlin je komplikovanější než u živočichů. Rostliny nemohou před nebezpečím uniknout, protože žijí přisedlým způsobem života. Je u nich také velká mezidruhová variabilita a heterogenita vnitřní i vnější stavby rostlinného těla. Stres může vést k nové homeostáze nebo k uhynutí postiženého orgánu či celé rostliny.

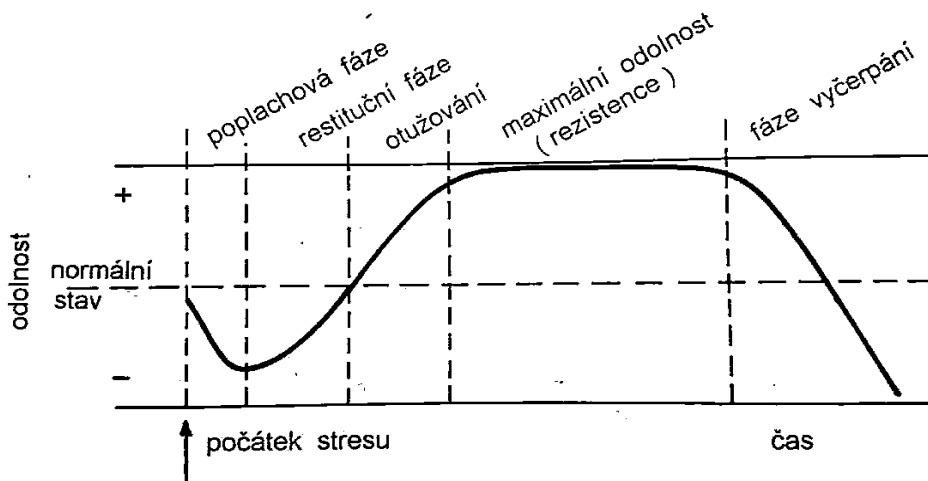
Rostliny se před stresem chrání několika způsoby, pasivně i aktivně. Pasivně a dlouhodobě se rostliny chrání pomocí ochranných struktur (kutikula na listech, impregnace buněčných stěn a rezervoáry vody), které tlumí nepříznivé vlivy vnitřního prostředí. Mechanismy aktivní odolnosti tlumí negativní dopady stresu až po jeho propuknutí, dochází ke spuštění stresové reakce.<sup>49)</sup>

### 3.4.2. Stresová reakce a její mechanismus

Jde o řetězec reakcí, který má čtyři fáze:

- 1) Poplachovou fázi
- 2) Restituční fázi
- 3) Fázi rezistence
- 4) Fázi vyčerpání

Průběh stresové reakce závisí na intenzitě a délce působení stresoru a na genetických předpokladech odpovědi dané rostliny (adaptační schopnosti). Ihned po začátku působení stresoru se rostlina dostává do poplachové fáze, dochází k narušení buněčných struktur a funkcí. Pokud nedojde k uhynutí rostliny, dojde k fázi restituční, při které se aktivují kompenzační mechanismy. Během následující fáze rezistence se rostlina stává odolnější vůči působení stresových faktorů. Pokud stresor působí na rostlinu dlouhodobě může dojít k fázi vyčerpání.



**Obrázek 5:** Idealizovaný průběh stresové reakce. <sup>49)</sup>

Ve skutečnosti je vlastní stresová reakce složitější a vlastní působení stresorů daleko rozmanitější. Stresová reakce je intenzivně studována na různých organizačních úrovních (molekulové a genetické základy až po reakce celé rostliny).

#### Adaptace a aklimatizace na stres

Adaptace a aklimatizace na stres jsou pojmy, které mají ve fyziologii rostlinného stresu rozdílný význam. Adaptace na stres je trvalá a geneticky podmíněná odolnost vůči působení stresorů. Aklimatizační reakce probíhají jako indukované změny fenotypu v rámci jednoho genotypu, podléhají genovému řízení. Geny, které mají tyto reakce na starosti jsou předprogramované a za jistých podmínek se mohou spustit. <sup>49)</sup>

#### **3.4.2.1. Společné mechanismy stresových reakcí**

Metabolické změny v buňkách při působení rozličných stresorů mají spoustu společných znaků. Při stresové reakci zvyšující odolnost rostlin může docházet k těmto společným změnám:

- tvorba stresových proteinů,
- tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku,
- tvorba stresových fytohormonů (kyseliny abscisové, etylenu, kyseliny jasmonové),
- tvorba osmoregulačních sloučenin (cukrů, polyalkoholů a jednoduchých dusíkatých látek).

## Stresové proteiny

Při působení každého stresového faktoru dochází ke kvalitativním i kvantitativním změnám v syntéze proteinů v buňkách. Vrchol změn v syntéze proteinů nastává v průběhu několika hodin od začátku stresu, poté pomalu nastává normální stav.

Stresové proteiny, které se tvoří nespecificky a jejich tvorba je indukována různými typy stresorů jsou nejčastěji molekulární chaperony, proteázy a ubikvitin. Tyto proteiny jsou konstitutivní, vyskytují se pravidelně v buňkách všech genotypů a za stresu se jejich tvorba zvyšuje.<sup>49)</sup>

**Většina stresových proteinů je specificky vázána na konkrétní stresový faktor, jsou to:**<sup>49)</sup>

- Proteiny indukované zvýšenou teplotou (heat-shock proteins, HSP)
- Proteiny indukované chladem (cold-induced proteins)
- Proteiny indukované dehydratací (dehydration-induced proteins)
- Proteiny indukované sníženou koncentrací kyslíku (anaerobic stress proteins, ASP)
- Proteiny indukované patogeny (pathogenesis-related proteins, PRP)

## Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Aktivní formy kyslíku mají prospěšné i nežádoucí účinky na rostlinný organismus, je tedy vhodné udržovat jejich koncentraci na jisté úrovni. Vznikají jako nebezpečné produkty působením stresových reakcí a rostliny je musí deaktivovat. Zároveň mohou být signály či ochrannými látkami při stresu. Mezi ROS se řadí peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxidový aniont ( $\text{O}^{2-}$ ) a hydroxylový volný radikál ( $\cdot\text{OH}$ ).<sup>43) 49)</sup>

Tvorba aktivních forem kyslíku probíhá několika způsoby. V první řadě probíhá v chloroplastech. Dochází zde k absorpci záření asimilačními pigmenty, tím se v chloroplastech hromadí velké množství energie. Kyslík se fotoredukuje a primární produkt při této reakci je superoxid. Z něho se mohou tvořit více nebezpečné produkty jako jsou hydroxylové radikály a peroxid vodíku.

Působením různých stresových faktorů se může snížit rychlost sekundárních procesů fotosyntézy (fixace oxidu uhličitého), tím se zvyšuje tvorba aktivních forem kyslíku v chloroplastech a riziko poškození funkce tylakoidu.

Negativní působení aktivních forem kyslíku spočívá především v peroxidaci lipidů, zvláště těch, které mají vysoký obsah nenasycených mastných kyselin. Histidin, methionin, tryptofan a guanin jsou aminokyseliny nejvíce náchylné k oxidaci.

Existují různé mechanismy ochrany před oxidačním poškozením. Mezi systémy přímé deaktivace patří zejména karotenoidy. Ty rychle odstraňují singletový kyslík z chloroplastu. Dochází k excitaci karotenoidů do tripletového stavu, který se velmi snadno vrátí do základního stavu za uvolnění tepla. Alfa-tokoferol (vitamín E) je lipofilní sloučenina, která se vyskytuje v membránách, deaktivací singletového kyslíku chrání membránové lipidy před peroxidací.

Specializované enzymy a enzymatické systémy jsou nejuniverzálnější ochranou před aktivními formami kyslíku. Superperoxidodismutáza (SOD) katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. Ten je dále rozkládán buď katalázou v peroxizomech a glyoxyzomech nebo askorbátperoxidázou v chloroplastech a cytosolu. Askorbát a glutation nejspíše hrají klíčovou roli v antioxidační ochraně, v chloroplastech jsou v hojném množství. Askorbát může dokonce reagovat se superoxidem a singletovým kyslíkem bez účasti enzymů.

Peroxid vodíku je zapojen i do dalších reakcí rostliny při napadení patogeny. V součinnosti s kyselinou salicylovou indukuje tvorbu některých stresových proteinů.

Regulovaná tvorba aktivních forem kyslíku může mít i přímý antimikrobiální účinek a může i přispívat ke zpevnění buněčné stěny, a tím k větší odolnosti vůči působení různých stresorů. <sup>49)</sup>

### **Stresové fytohormony**

Fytohormony neboli rostlinné hormony jsou endogenní růstové regulátory. Krom již zmíněných růstových regulátorů sem řadíme i ethylen. Na rozdíl od živočišných hormonů se fytohormony vytváří na více místech v rostlině a jsou výrazně méně specifické. Každý z fytohormonů ovlivňuje několik procesů, zároveň jeden proces může být ovlivňován více fytohormony. <sup>49)</sup>

#### **Ethylen**

Vyskytuje se v plynném stavu a vyšší rostliny ho produkují ve všech svých částech, zvláště v dozrávajících plodech a při působení stresových faktorů. Poraněné orgány zvyšují mnohonásobně produkci ethylenu již během několika desítek minut. Syntéza ethylenu vychází z aminokyseliny methioninu. Ethylen zpomaluje dlouhivý růst stonků i kořenů, ale vyvolává tvorbu adventivních kořenů, může stimulovat klíčení semen a urychluje zrání plodů. <sup>40)</sup>

**Ostatní růstové regulátory** jsou například kyselina jasmonová, polyaminy, oligosacharidy a některé fenolické látky. Mezi fytohormony se neřadí, protože se vyskytují v koncentracích vyšších než hormonálních a jejich univerzalita výskytu není jednoznačně dokázána. <sup>49)</sup>

### 3.4.3. Stresové faktory

Stresory (stresové faktory) mohou mít povahu fyzikální, chemickou nebo mechanickou. Jsou abiotické nebo biotické.

#### Abiotické stresové faktory

- **Příliš vysoká teplota** (více než 40 °C).

Při takto vysoké teplotě dochází u většiny rostlin ke změnám ve fyzikálně–chemických vlastnostech buněčných membrán i proteinů. Membrána se stává propustnou pro ionty a přestává poskytovat pevnou oporu pro membránové proteiny. U proteinů dochází ke změnám konformace a ztrátě jejich funkce. Při teplotách nad 50 °C působících pouze několik desítek minut dojde u většiny rostlinných druhů k nevratnému poškození exponovaného orgánu a jeho odumření. K výjimkám patří druhy rostlin z pouští a polopouští (sukulenty).

- **Příliš nízká teplota** (pod 0 °C).

Při teplotách pod bodem mrazu dojde i v rostlinách ke změně skupenského stavu vody. Dochází k mrazové dehydrataci buněk. To má velký vliv na všechny fyziologické funkce. Spousta našich druhů rostlin jsou na chlad ještě citlivější, přičemž je velmi důležitá doba, po kterou chlad působí. Velmi citlivé na chlad jsou květní orgány v raném stádiu vývoje.

- **Nedostatek vody a hrozba dehydratace.**

Voda má velmi rychlý koloběh ve všech ekosystémech a její zásoba v rostlinách vystačí jen velmi krátkou dobu. Nedostatek vody zásadně zpomaluje dlouhivý růst buněk postižených orgánů. Rychlost růstu je závislá na turgorovém tlaku a nejvíce postižené jsou vždy listy. Při vysoké dehydrataci klesá turgorový tlak v buňkách na nulu a listy začínají vadnout.

- **Nedostatek kyslíku v půdě.**

Nedostatek kyslíku hrozí v půdách, které mají málo vzdušných pórů (jílové půdy, zamokřené půdy). Pokud klesne koncentrace kyslíku v intracelulárách pod 2-4 % dojde k inhibici aerobních respiračních procesů. Rostlina přechází na anaerobní disimilační procesy, což má velmi vážné důsledky (velmi malá energetická účinnost, nebezpečné konečné produkty anaerobní fermentace: ethanol, kyselina mléčná).

- **Zasolené a kyselé půdy.**



Zasolené půdy nejsou problémem jenom přímořských oblastí. Objevují se v oblastech, kde výpar vody převažuje nad srážkami. K zasolení půdy může dojít i v blízkosti komunikací, které jsou v zimním období posypávané solí. Toxický vliv mají vysoké koncentrace samotných iontů ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), ale i nízký vodní potenciál a zhoršené fyzikální vlastnosti půdy.

- **Nedostatek živin.**
- **Toxické látky v prostředí** (oxid siřičitý, ozon, toxické kovy: Zn, Pb, Cd).<sup>49) 50)</sup>

Abiotické stresové faktory jsou hlavní příčinou úbytku plodin na celém světě, což snižuje průměrné výnosy a kvalitu. Tyto enviromentální podmínky vedou k variabilitě morfologických, fyziologických, biochemických a molekulárních změn.

Na základě stálých změn klimatu je pravděpodobné, že rostliny narazí na nové a horší kombinace abiotických stresových faktorů v blízké budoucnosti.<sup>50)</sup>

### **Biotické stresové faktory**

- **Alelopatie.**

Jde o jev, kdy sekundární metabolity dané rostliny působí inhibičně až toxicky na jiné rostliny vyskytující se v její blízkosti. Dochází k přenosu sekundárního metabolitu z jedné rostliny na druhou, především kořenovou cestou.

- **Interakce s býložravými živočichy.**

Před býložravými živočichy se rostliny chrání morfologickými (trny, trichomy, sklerenchymatická pletiva, regenerace poškozených orgánů) i biochemickými adaptacemi (sekundární metabolity působící až toxicky na býložravé živočichy).

- **Patogenní mikroorganismy.**

Obrannými reakcemi rostlina vytvoří buď specifické stresové proteiny nebo sloučeniny chemicky jednodušší s antibiotickým účinkem. Tyto látky se označují jako fytoncidy či inhibitory a patří k nim různé flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy. Tyto látky jsou v rostlině přítomny i za normálních okolností, po napadení patogenem se v rostlině hromadí. Phytoalexiny jsou látky patřící do této skupiny obranných látek a jsou zvláštní v tom, že se začínají vytvářet po napadení patogenem. Průnik přes plazmatickou membránu patogenů jim usnadňuje jejich lipofilní povaha.<sup>49)</sup>

## 3.5. Elicitace

Elicitace (očkování tkáňových kultur elicitory) je jednou z neúčinnějších strategií pro zvýšení produktivity sekundárních metabolitů v kulturách rostlinných tkání. Elicitace zvýší syntézu i akumulaci sekundárních metabolitů. <sup>41) 51)</sup>

### 3.5.1. Elicitory

Elicitor je jako stresový faktor podmětem ke spuštění obranné reakce. Po identifikaci vhodným receptorem hostitelské rostliny spustí obrannou reakci. Ovlivní pak biochemické procesy v buňkách, tím zrychlí růst rostlin, zvýší jejich odolnost, syntézu a akumulaci sekundárních metabolitů.

#### Druhy elicitorů:

- exogenní (jsou vylučované patogeny: specifické enzymy, peptidy),
- endogenní (látky uvolňující se z narušených buněčných stěn obou organismů), <sup>49)</sup>
- biologické (bakterie, kvasinky, plísně),
- chemické (aminokyseliny, kyselina salicylová, etylén, glyfosát, růstové regulátory),
- fyzikální (světlo, elektrický proud). <sup>41)</sup>

Nejnámější a nejefektivnější elicitory používané v předních studiích jsou komponenty mikrobiálních buněk, zvláště polysacharidy a oligosacharidy. Také jsou využívány ionty těžkých kovů a signální molekuly, které hrají roli v rostlinné obraně.

Bylo prokázáno, že kvasinkový polysacharid (YPS) je účinným biotickým elicitem pro stimulaci akumulace sekundárních metabolitů v rostlinné buňce. Výroba mnoha hodnotných bioaktivních sloučenin je úspěšně stimulována YPS elicitory. Nejběžnější a neúčinnější elicitory flavonoidů používané ve studiích jsou kvasinkové extrakty, methyljasmonát, kyselina salicylová a těžké kovy. <sup>51) 52)</sup>

### 3.5.2. Reakce rostlin na elicitory

Na produkci sekundárních metabolitů má vliv několik faktorů včetně typu elicitoru, jeho koncentrací, doby podání a délky působení. <sup>24)</sup>

Při obranné reakci elicitory neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale pomocí druhých posílů (přenašečů signálu, second messengers: kyselina salicylová, kyselina jasmonová, oxid dusnatý). Druzí poslové přenáší signál od aktivovaných receptorů elicitorů v plazmatické membráně k jádru do DNA. Takto je zprostředkováván elicitorový signál na signál k biosyntéze sekundárních metabolitů. <sup>49)</sup>

#### **Druzí poslové (second messengers):**

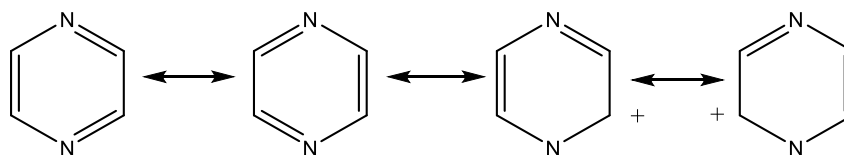
Oxid dusnatý je bioaktivní molekula, která vykonává řadu signálních funkcí v rostlinných i živočišných buňkách. Studie ukázaly, že jeho syntéza je charakteristickou známkou smrti rostlinných buněk. Hraje klíčovou roli při oxidativním vzplanutí a syntéze kyseliny jasmonové.

Jasmonová kyselina je jednak signálem pro biosyntézu sekundárních metabolitů mnoha rostlin, ale i převodník signálu pocházejícího od elicitoru.

Kyselina salicylová je jako signální molekula v rostlinách přítomná ve velmi nízké koncentraci. Použití kyseliny salicylové jako elicitoru je velmi časté. Syntéza této sloučeniny souvisí s obranným systémem rostliny. Rychle se hromadí v místě infekce a zabraňuje jejímu šíření. Indukuje biosyntézu některých tříd sekundárních metabolitů. <sup>43)</sup>

### 3.6. Pyraziny

Pyrazin (1,4-diazin) je symetrická molekula. Pyrazinové jádro je slabě aromatickým planárním útvarům, který vytváří několik rezonančních hybridů. Existence rezonančních struktur a indukivní efekt dusíkových atomů způsobuje, že na atomech uhlíku je kladný náboj. Proto pyrazin podléhá spíše nukleofilním substitucím než elektrofilním.<sup>53)</sup>



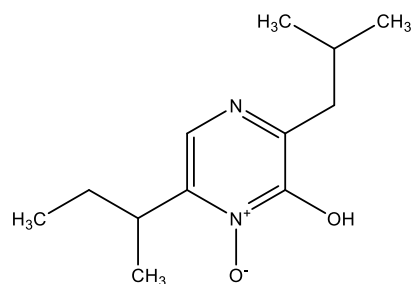
Obrázek 6: Rezonanční hybridy pyrazinového kruhu

Pyrazinový kruh je součástí mnoha biologicky aktivních a průmyslově využívaných polycyklických sloučenin. Tyto sloučeniny se nacházejí běžně v živých organismech a jsou produkovány mikroorganismy během jejich primárního nebo sekundárního metabolismu. Syntetické deriváty pyrazinu jsou využívány jako léčiva (antivirové, protirakovinné, antimykobakteriální atd.), fungicidy a herbicidy. Herbicidy jsou obecně považovány za inhibitory růstu, a proto byly zkoumány různé inhibiční reakce v různých kultivačních systémech.<sup>54)</sup>

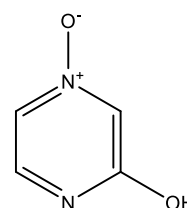
Pyrazinové deriváty jsou těkavé a nestálé sloučeniny, proto jsou v přírodních zdrojích identifikovány v malém množství. První syntetické pyraziny (70. léta 20. století) byly odvozené od přírodních pyrazinů. Následně byly jejich struktury (alkylované, vinylované a alkoxylované) objeveny i v potravinách. Zvláště při tepelné úpravě zajišťují typické chutě a vůně. Velké množství pyrazinových sloučenin je v kakaových, kávových a sójových bobech, ve vařeném hovězím masu, v sýrech, ve víně a v pivu. Složení směsi těkavých pyrazinů a dihydropyrazinů se rychle mění a tím potraviny ztrácejí aroma (pražená káva, pečené a vařené potraviny).

Pyrazinové deriváty mají i toxické vlastnosti. Při zahřívání směsi sacharidů, aminokyselin a kreatininu (tepelná úprava masa) vznikají karcinogenní a mutagenní sloučeniny.

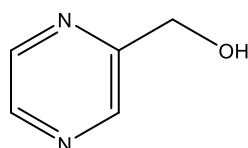
Jsou také vytvářené plísněmi. Plíseň *Aspergillus flavus* tvoří **aspergillovou kyselinu** s baktericidními účinky. Z kmene *Streptomyces* byla izolována antifugálně účinná sloučenina **emimycin** (3-hydroxypyrazin 1-oxid). **Pyrazinmethanol** a **tetramethylpyrazin** jsou fungicidní látky (*Bacillus subtilis*, *B. nato*).<sup>53)</sup>



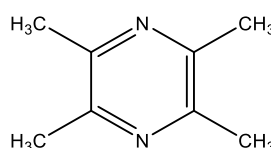
Obrázek 7: Kyselina aspergillová <sup>53)</sup>



Obrázek 8: Emimycin <sup>53)</sup>



Obrázek 9: Pyrazinmethanol <sup>53)</sup>

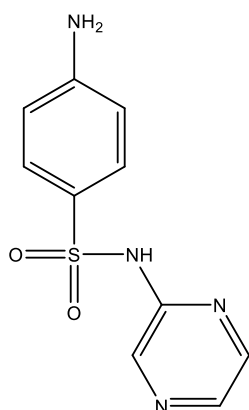


Obrázek 10: Tetramethylpyrazin <sup>53)</sup>

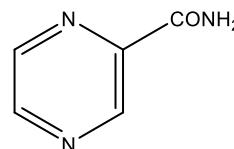
Syntetické pyraziny se využívají jako aditiva (chutě a vůně) při výrobě potravin. Příkladem je výroba instantní kávy a cukrovinek.

Syntetické pyraziny mají významné farmakologické účinky. Řada molekul léčiv obsahuje pyrazinový kruh: <sup>53)</sup>

- Sulfonamidové chemoterapeutikum **sulfapyrazin** byl prvním používaným léčivem s uměle syntetizovaným pyrazinovým kruhem

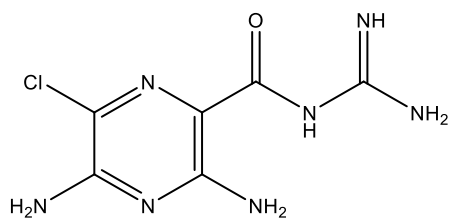


Obrázek 11: Sulfapyrazin <sup>53)</sup>



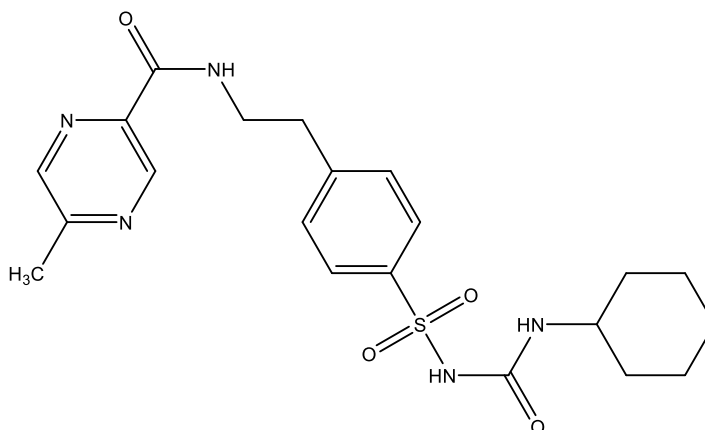
Obrázek 12: Pyrazinamid <sup>53)</sup>

- Antituberkulotikum **pyrazinamid**
- Kalium šetřící diuretikum **amilorid** (léčba hypertenze)



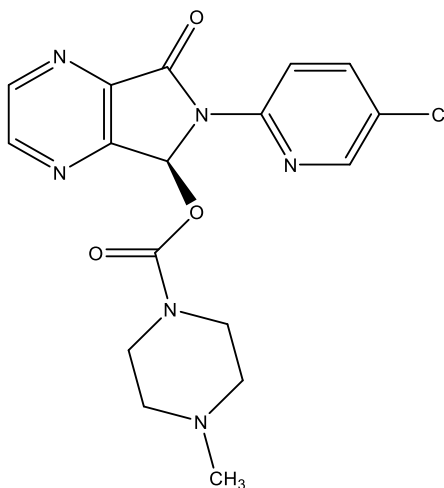
Obrázek 13: Amilorid <sup>53)</sup>

- Perorální antidiabetikum (derivát sulfonylmočoviny) **glipizid**



Obrázek 14: Glipizid <sup>53)</sup>

- Nebenzodiazepinové hypnotikum (cyklopyrrolon) **zopiklon** a jeho eutomer **eszopiklon**

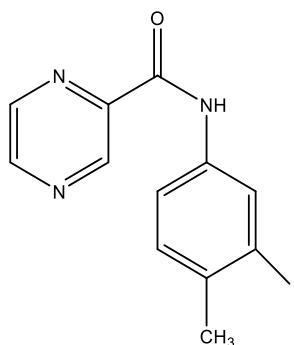


Obrázek 15: Eszopiklon <sup>53)</sup>

### 3.7. Pyraziny využívané jako elicitory

Předchozí studie ukázaly, že deriváty kyseliny pyrazin-2-karboxylové použité jako elicitory mohou zvýšit produkci sekundárních metabolitů v *in vitro* rostlinných kulturách. Látka 1-(2-chlorpyridin-4-yl)-3-fenylmočovina podporuje buněčné dělení a růst. Její použití bylo schváleno v USA na pěstování kiwi a hroznů. Na základě těchto skutečností byl studován vliv podobných sloučenin na produkci rutinu v kalusových kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby*. Výsledky studií naznačují, že by tyto elicitory mohly zvýšit produkci rutinu. <sup>24)</sup>

V předchozích pracích byly použity substituované pyrazin-2-karboxamidy jako účinné elicitory, které zvyšují nejen produkci flavonolignanů v kulturách *Silybum marianum*, ale také produkci flavonoidů v kulturách *Ononis arvensis*. <sup>52)</sup>



**Obrázek 16:** Substituovaný pyrazin-2-karboxamid použitý jako elicitor. <sup>52)</sup>

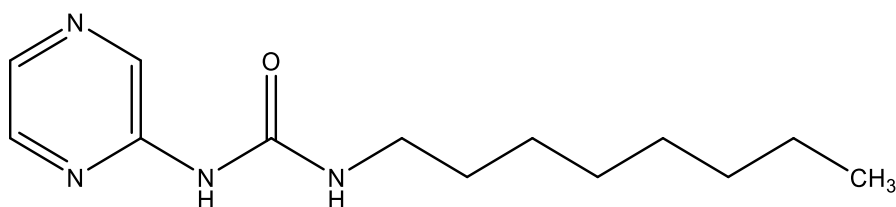
### 3.7.1. 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea

Během provádění experimentální části této diplomové práce byla jako elicitor použita látka 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea, zkratkou PN6. Tato sloučenina byla syntetizována týmem prof. PharmDr. Martina Doležala, Ph.D. v roce 2017 na katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Z její analýzy vyplynuly následující informace: <sup>55)</sup>

**Tabulka 1:** Fyzikálně- chemické vlastnosti 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea

Bod tání	84-86 °C
Rozpustnost	Rozpustná ve vodě a dimethylsulfoxidu Nerzpustná v horké vodě
Molekulová hmotnost	250,18

Zajímavostí je, že bylo prokázáno, že sloučeniny typu N-octyl-N'-(pyrazin-2-yl)urea mají antimykobakteriální účinnost s minimální inhibiční koncentrací 25 µg/ml proti *M. tuberculosis* a *M. kansasii*. <sup>56)</sup>



**Obrázek 17:** 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea <sup>55)</sup>



## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Použité chemikálie

1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea, Katedra organické chemie, FaF UK v HK, ČR

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

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

Destilovaná voda R, 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

Edtan disodný *p.a.*, Sigma-Aldrich, USA

Ethanol 96%, Lachema, ČR

Glycin *p.a.*, Penta, ČR

Hydrolyzát kaseinu, Imuna, SR

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

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

Inositol, Fluka, Švýcarsko

Jodid draselný *p.a.*, Penta, ČR

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová, Lachema, ČR

Kyselina fosforečná R *p.a.*, Penta, ČR

Kyselina boritá *p.a.*, Lachema, ČR

Kyselina nikotinová, Sigma-Aldrich, USA

Methanol HPLC Grade, Merck, Německo

Methanol R 80%, Penta, ČR

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

Pyridoxin, Plant Cell Culture, Sigma-Aldrich, USA

Rutin R, Sigma-Aldrich, USA

Sacharóza *p.a.*, Lachema ČR

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

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

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

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

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

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

Thiamin, Plant Cell Culture, Sigma-Aldrich, USA

## 4.2. Použitý biologický materiál

K experimentu byla použita kalusová kultura *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby*, 35.-40. pasáž. Od této kalusové kulture byla odvozena suspenzní kultura.

## 4.3. Přístrojové vybavení

Analytické váhy PRLT A13, Sartorius, Německo

Autokláv PS 20 A, Chirana, ČR

Box s laminárním prouděním Fartran LF, SR

Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko

Horkovzdušný sterilizátor SV59/1, Chirana ČR

Mikrofiltry (0,20 µm), Corning NY 14831, Německo

Pipetovací balonek, Filip, Německo

Sušárna HS 61A, Chirana, ČR

Těsnění na vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR

Třepačka K5 15 A Control, Edmund Bühler, Německo

Ultrazvuková lázeň, typ Rx 255H Bandelin Sonorex, Německo

Vialky, Labichom s.r.o, Olomouc, ČR

Vodní lázeň GFL, typ 1042

### **HPLC**

Autosampler Jasco A5-2055 Plus, Japonsko

Čerpadlo Jasco PU-2089 Plus, Japonsko

Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko

Kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5 µm), Merck, Německo

Předkolona LiChroCART 4-4, sorbent LiChrospher 5 µm

Pumpa Jasco PU-2089

Termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko

## 4.4. Složení a příprava živného média

Pro tento experiment bylo použito živné médium Murashigeho a Skooga (MS), které bylo obohaceno o růstový regulátor, kyselinu dichlorfenoxyoctovou (2,4-D) v koncentraci 1 mg/l.<sup>57)</sup>

Tabulka 2: Složení kultivačního média dle Murashigeho a Skooga:<sup>57)</sup>

Složka živného média	Koncentrace mg/l
<b>Makroelementy</b>	
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	440,00
KNO <sub>3</sub>	1900,00
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	370,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	170,00
<b>Mikroelementy</b>	
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	22,30
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	11,50
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
KI	0,830
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025
NaMoO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Železnatý komplex</b>	
FeSO <sub>4</sub>	27,84
Na <sub>2</sub> EDTA	37,31
<b>Vitamíny</b>	
Kyselina nikotinová	0,50
Pyridixin	0,50
Thiamin	0,10
<b>Další složky</b>	
Glycin	2,00
Inozitol	100,00
Hydrolyzát kaseinu	1000,00
Sacharóza	30,00

Do odměrné baňky o objemu 1000 ml byly pipetovány zásobní roztoky makroelementů (100 ml), železnatého komplexu (10 ml), mikroelementů (1ml), vitamínů (1 ml), glycinu (1 ml) a kyseliny 2,4–dichlorfenoxyoctové (1 ml).

Na analytických vahách s přesností na 3 desetinná místa bylo odváženo 30,0 g sacharózy, 0,1000 g inositolu a 1,000 g hydrolyzátu kaseinu. Tyto složky byly přidány do odměrné baňky. Následně se přidalo kolem 200 ml destilované vody, aby se tyto složky dobře rozpustily. Po rozpuštění se roztok dolil destilovanou vodou po rysku odměrné baňky.<sup>57)</sup>

## 4.5. Kultivace a pasážování

Kultivace byla prováděna v předem sterilizovaných Erlenmeyerových baňkách vyrobených z varného skla, které měly objem 100 ml.

Pro kultivaci kalusových kultur byly do Erlenmeyerových baněk umístěny můstky z filtračního papíru. Následně se do každé baňky se nalilo 30 ml připraveného živného média. Při přípravě baněk pro kultivaci suspenzních kultur můstky nebyly třeba, do baněk se rovnou nalilo 30 ml živného média. Hrdla baněk se zakryla alobalem a následně umístila do autoklávu, kde probíhala jejich sterilizace po dobu 20 minut, při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

### 4.5.1. Kalusové kultury

Samotné pasážování kultury probíhalo přibližně jednou za čtyři týdny, podle růstu kultury. Vždy se konalo za aseptických podmínek v laminárním boxu, který byl předem sterilizován. Jeho sterilizace probíhala tak, že byl nejdříve vymyt roztokem Ajatinu v koncentraci 1:10 a poté se na minimálně jednu hodinu spustilo germicidní záření. Box musel být vždy zapnutý minimálně půl hodiny před prováděním samotné práce, aby se ustálil proud vzduchu. Při práci v laminárním boxu bylo potřeba dodržovat pravidla práce za aseptických podmínek. Pracovalo se vždy v čistém laboratorním plášti a v latexových rukavicích omytých 96% ethanolem. Nástrojem použitým k pasážování byly čisté vysterilizované pinzety.

Před tím, než se baňky přenesly do laminárního boxu musely být ošetřeny roztokem 96% ethanolu. Tento roztok se nanese na kus buničiny a otřela se jím hrdla baněk včetně alobalu, kterým byly baňky zakryté. Do laminárního boxu byla umístěna baňka s narostlým kalusem a několik baněk s připraveným médiem s můstkou. Z hrdla baněk byl odstraněn alobal. Z baňky s narostlým kalusem byl přenesen shluk buněk o velikosti asi 1 cm<sup>3</sup> do baňky se živným médiem, hrdlo této baňky se hned poté zakrylo alobalem, aby nebyl kalus zbytečně kontaminován.

Kultivace probíhala v kultivační místnosti katedry farmakognosie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Byly zde tyto kultivační podmínky: teplota 25 °C a fotoperioda 16/8 (16 hodin světla a 8 hodin tmy).

#### **4.5.2. Suspensní kultury**

Kultivace suspensních kultur probíhala obdobně. Od kalusových kultur byly odvozeny tak, že se při pasážování z baněk s narostlým kalusem odebralo stejné množství buněk jako při pasážování kalusových kultur. Tyto buňky byly přeneseny do baněk se živným médiem bez mŕstvků. Shluky buněk musely být mechanicky rozmělněny, aby došlo k vytvoření co nejhomogennější suspenze.

Kultivace kultur probíhala ve stejné kultivační místnosti a za stejných podmínek jako u kultur kalusových po dobu asi 3 týdnů. Rozdílem bylo, že se tyto kultury umístily na celou dobu kultivace na třepačku (frekvence otáček 120 otáček za minutu). Tím se zajistilo provzdušnění a míchání kultur.

### **4.6. Elicitace *in vitro* kultur**

#### **4.6.1. Příprava roztoků elicitoru**

Při provádění tohoto experimentu byl elicitem roztok derivátu pyrazinu, 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea. Byl použit ve třech koncentracích:

$$c_1 = 100,0 \text{ mg}/100 \text{ ml } (3,9971 \times 10^{-3} \text{ mol/l})$$

$$c_2 = 10,0 \text{ mg}/100 \text{ ml } (3,9971 \times 10^{-4} \text{ mol/l})$$

$$c_3 = 1,0 \text{ mg}/100 \text{ ml } (3,9971 \times 10^{-5} \text{ mol/l})$$

Pro přípravu prvního roztoku o koncentraci  $c_1$  bylo naváženo na analytických vahách 100,00 mg 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea a následně kvantitativně přeneseno do odměrné baňky o objemu 100,0 ml. Tato látka poté byla rozpuštěna v 96% ethanolu, který byl dolit po rysku odměrné baňky. Tento krok probíhal za aseptických podmínek v laminárním boxu, kde byla realizována i další ředění.

Roztok o koncentraci  $c_2$  byl připraven ředěním roztoku o koncentraci  $c_1$ . Z odměrné baňky, ve které byl roztok s koncentrací  $c_1$  bylo odpipetováno 10,0 ml tohoto roztoku do další odměrné baňky o objemu 100,0 ml a doplněn 96% roztokem ethanolu po rysku.

Roztok s koncentrací  $c_3$  byl připraven obdobným způsobem. Z odměrné baňky s roztokem s koncentrací  $c_2$  bylo odpipetováno 10 ml do odměrné baňky s objemem 100 ml a zředěno ethanolom 96% doplněním po rysku odměrné baňky.

#### **4.6.2. Průběh elicitace**

Elicitace byla prováděna u kalusových kultur po asi po čtyřech týdnech kultivace a u suspenzních kultur asi po třech týdnech kultivace. Na jeden pokus bylo potřeba 35 baněk s narostlými kulturami.

Elicitace probíhala za aseptických podmínek v laminárním boxu podobným způsobem jako pasážování. Před tím, než byly baňky přeneseny do laminárního boxu, musely být očištěny ethanolom 96%. Ethanol se nanas na buničinu a očistilo se jím hrdlo baňky i se zátkou z alobalu. V boxu se čistou sterilizovanou pipetou přidalo do 30 baněk po 1 ml roztoku elicitoru o příslušné koncentraci. Zbýlých pět baněk sloužilo ke kontrolním odběrům, místo roztoku elicitoru se do každé z nich pipetoval 1 ml roztoku ethanolu 96%.

Předtím, než byly baňky přeneseny zpět do kultivační místnosti, byly řádně označeny číslicí, která značila konkrétní čas odběru. Odběry probíhaly po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách. Pro každý odběr bylo určeno pět baněk. Kontrolní odběry probíhaly po 24 hodinách a 168 hodinách. V kultivační místnosti byly suspenzní kultury umístěny na třepačku, samotná kultivace probíhala opět za stejných podmínek.

Po požadované době působení elicitoru se odebíraly vzorky. Kalusy se rozprostřely na filtrační papír a sušily se při laboratorní teplotě. K odebrání vzorků u suspenzních kultur bylo médium odsáto na Büchnerově nálevce a samotná suspenze se sušila za laboratorní teploty. Živná média se uchovávala ve zkumavkách se zátkou v mrazáku (při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Takto byly vzorky připraveny k dalšímu zpracování.

## 4.7. Stanovení obsahu rutinu

Obsah rutinu se stanovoval metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Před stanovováním se musely vzorky kultur zpracovat a vytvořit z nich extrakty. Postupovalo se dle Českého lékopisu 2017.

### 4.7.1. Příprava extraktů

Usušené vzorky kalusů i buněčných shluků byly rozdrobněny pomocí třerky s třenkou a následně zváženy na analytických vahách s přesností na 4 desetinná místa. Hmotnost vzorků byla pečlivě zaznamenána.

Takto připravené vzorky byly přeneseny do varných baněk o objemu 100 ml a přidalo se k nim po 10 ml methanolu R 80%. Každá baňka byla označena konkrétní koncentrací a konkrétním časem odběru, aby nedošlo k záměně. Varné baňky se vzorky byly poté umístěny na vodní lázeň pod zpětný chladič, kde probíhala 30 minut extrakce. Ještě za horka se roztoky filtrovaly přes vatou do odměrných baněk o objemu 25 ml. Odměrné baňky musely být také řádně označeny. Do varných baněk se zbytkem vzorku byla přidána vata použitá při filtraci a opět 10 ml methanolu R 80%. Varné baňky se zakrytým hrdlem byly umístěny na ultrazvukovou lázeň po dobu 15 minut. Poté znovu proběhla filtrace přes novou vatou do odměrných baněk s filtrátem, následně byly baňky doplněny methanolem R 80% po rysku. Extrakty v odměrných baňkách bylo nutno promíchat a přefiltrovat přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  do vialek.

Vzorky média se nejdříve rozmrazily a poté se nalilo 10 ml vzorku na porcelánovou misku. Porcelánové misky se umístily na vodní lázeň, aby se média odpařila. Odparek se rozpustil v 10 ml methanolu R 80% a následně přefiltroval přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  do vialek.

### 4.7.2. HPLC analýza

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, při které probíhá separace složek vzorku, jejímž účelem je identifikace látek (kvalitativní analýza) a stanovení jejich koncentrace (kvantitativní analýza).

Vysokotlakým čerpadlem se do kolony chromatografického systému vstřikuje kapalná mobilní fáze, která obsahuje příslušný vzorek. Protékající složky mobilní fáze interagují v koloně



chromatografu s látkami pevné stacionární fáze, dochází k jejich adsorpci a ustalování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Separační účinnost stacionární pevné fáze závisí na velikosti a tvaru částic, ze kterých je složena. Nejvýhodnější jsou částice malé mající pravidelný tvar. Součástí chromatografického systému je detektor.

Výsledkem HPLC analýzy je záznam, který je nazýván chromatogram. Jsou na něm vyznačené píky, které definují jednotlivé separované složky. Při kvalitativní analýze se hodnotí retenční čas. To je čas, který složka potřebuje k průchodu chromatografickým systémem (čas od nástřiku na kolonu k maximu chromatografického píku). V rámci kvantitativní analýzy se hodnotí plochy chromatografických píků.<sup>58)</sup>

#### 4.7.2.1. Parametry analýzy

Při stanovování obsahu rutinu metodou HPLC byla použita chromatografická sestava Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055) s předkolonovým filtrem, kolonou L LiChrospher RP-18 250x4 (5 µm) a ochrannou předkolonkou.

##### **Složení mobilní fáze:**

- Eluent A: 5% acetonitril + 0,15% H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> ve vodě
- Eluent B: 100% acetonitril

Prvních 6 minut analýzy probíhala isokratická eluce (složení fáze se v čase nemění), poté gradientová eluce. Složení mobilní fáze se v čase měnilo podle následující tabulky:

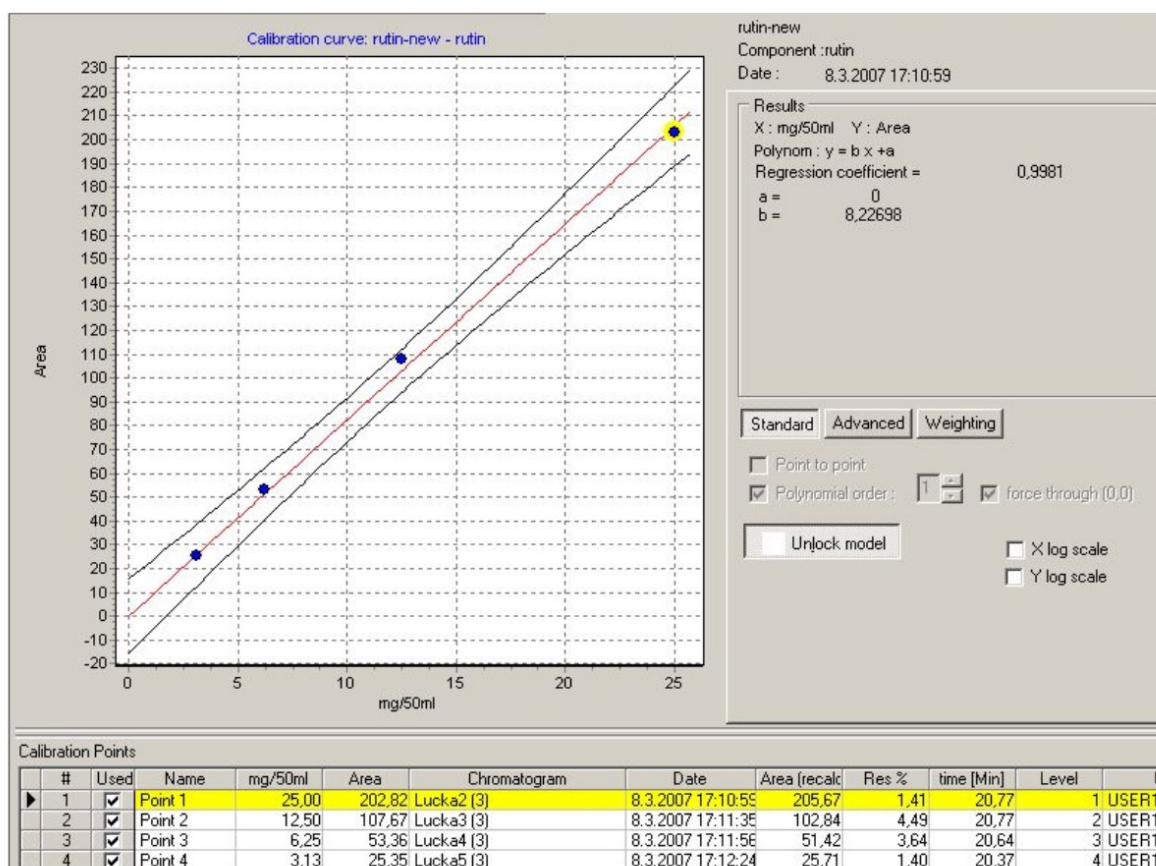
**Tabulka 3:** Složení mobilní fáze během gradientové eluce.

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

Průtok kolonou byl 1,0 ml/min. Kolona měla teplotu 25 °C a nastřikovaný objem eluentu byl 20 µl. Detekce byla prováděna pomocí spektrofotometrického DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200–450 nm. Obsah rutinu se vypočítal z píků při vlnové délce 350 nm. Tento obsah byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnán s kalibrační křivkou standartu rutinu.

Roztoky standartu rutinu byly připraveny jeho rozpuštěním v methanolu. Použité roztoky standartu rutinu měly tyto koncentrace:

- 25 mg/100 ml
- 12,5 mg/100 ml
- 6,25 mg/100 ml
- 3,125 mg/100 ml



Obrázek 18: Kalibrační přímka rutinu. <sup>23)</sup>

## 4.8. Statistické zpracování výsledků

### 4.8.1. Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je nejpravděpodobnější hodnota  $x$  při získání více hodnot opakovaným měřením jedné veličiny. Vypočítá se jako součet všech naměřených hodnot, který se vydělí počtem měření. Je to střední hodnota souboru vypočtená podle vzorce:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$$

$\bar{x}$  ... aritmetický průměr

$x_i$  ... jednotlivé hodnoty

$n$  ... počet členů souboru

### 4.8.2. Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka udává, jak se liší naměřené hodnoty od průměrné střední hodnoty souboru. Vždy má stejný rozměr jako aritmetický průměr a vypočítá se podle vzorce:

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

$s$  ... směrodatná odchylka

$n$  ... počet členů v souboru

$x_i$  ... hodnota sledované veličiny

$\bar{x}$  ... průměrná hodnota sledované veličiny

### 4.8.3. T – test

T – test je statistická metoda, která ověřuje účinnost aplikovaného pokusného zásahu ve sledovaném experimentu. Pomocí T – testu lze zjistit, jak velký vliv měla metoda elicitace na syntézu sekundárních metabolitů. Určuje totiž statistickou významnost rozdílu průměrných hodnot mezi dvěma skupinami (zkoušenou a kontrolní). Platí tento vztah:

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

$t$  ... testovací kritérium

$x_1$  ... aritmetický průměr kontrolního souboru

$x_2$  ... aritmetický průměr zkoušeného souboru

$n_1$  ... počet členů kontrolního souboru

$n_2$  ... počet členů zkoušeného souboru

$s_1$  ... směrodatná odchylka kontrolního souboru

$s_2$  ... směrodatná odchylka testovacího souboru

Testovacímu kritériu náleží  $t$  – rozdělení se stupněm volnosti, který se vypočítá podle vzorce:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Hodnota testovacího kritéria se porovnává s kritickou hodnotou  $t(v)_p$ , která je uvedena v tabulkách. Tato hodnota je uvedena pro konkrétní stupeň volnosti  $v$  a zvolenou hladinu významnosti  $p$ .

Během analýzy rutinu byla pro každý vzorek pokusného i kontrolního souboru provedena tři paralelní stanovení. To znamená, že počet členů souboru byl  $n_1 = n_2 = 3$  a stupeň volnosti  $v = 4$ . Pro tento počet stupňů volnosti a zvolené hladiny významnosti  $p = 0,05$  je kritická hodnota  $t(v)_p$  rovna číslu 2,78. Pokud je hodnota testovacího kritéria vyšší než tabulková kritická hodnota, výsledky jsou statisticky významné.

Pro určení testovacího kritéria byly pokusným souborem odběry po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách. Kontrolním souborem byly odběry po 24 hodinách (pro odběry pokusného souboru po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách) a 168 hodinách (pro odběry pokusného souboru po 168 hodinách).

59) 60)

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Tabulky

#### 5.1.1. Kalusové kultury

**Tabulka 4:** Obsah rutinu (mg/g DW) v závislosti na čase odběru v **kalusové kultuře** *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* po elicitaci roztokem 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea o koncentraci C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> a C<sub>3</sub>.

Koncentrace elicitoru (mg/100 ml)	Doba působení elicitoru (hod)	Průměrný obsah rutinu (mg/g DW)	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
100 (C <sub>1</sub> )	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	24K	0	0	-
	168K	0	0	-
10 (C <sub>2</sub> )	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	24K	0	0	-
	168K	0	0	-
1 (C <sub>3</sub> )	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	24K	0	0	-
	168K	0	0	-

## 5.1.2. Suspenzní kultury

**Tabulka 5:** Obsah rutinu (mg/g DW) v závislosti na čase odběru v **suspenzní kultuře** *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* po elicitaci roztokem 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea o koncentraci C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> a C<sub>3</sub>.

Koncentrace elicitoru (mg/100ml)	Doba působení elicitoru (hod)	Průměrný obsah rutinu (mg/g DW)	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
100 (C <sub>1</sub> )	6	0	0	0
	<b>12</b>	<b>0,08</b>	<b>0,04</b>	<b>1,67</b>
	<b>24</b>	<b>0,06</b>	<b>0,016</b>	<b>1,93</b>
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	24K	0	0	-
	168K	0	0	-
10 (C <sub>2</sub> )	<b>6</b>	<b>0,07</b>	<b>0,065</b>	<b>0,63</b>
	<b>12</b>	<b>0,11</b>	<b>0,017</b>	<b>2,34</b>
	24	0	0	0
	<b>48</b>	<b>0,06</b>	<b>0,016</b>	<b>0</b>
	<b>72</b>	<b>0,09</b>	<b>0,016</b>	<b>0,75</b>
	168	0	0	0
	24K	0,06	0,025	-
	168K	0	0	-
1 (C <sub>3</sub> )	6	0	0	0
	<b>12</b>	<b>0,09</b>	<b>0,024</b>	<b>1,17</b>
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	24K	0,06	0,025	-
	168K	0	0	-

Písmenem „K“ jsou označené kontrolní vzorky, bez přidaného roztoku elicitoru. Zkratka „DW“ (z anglického Dry Weight) znamená hmotnost sušiny.

### 5.1.3. Živné médium

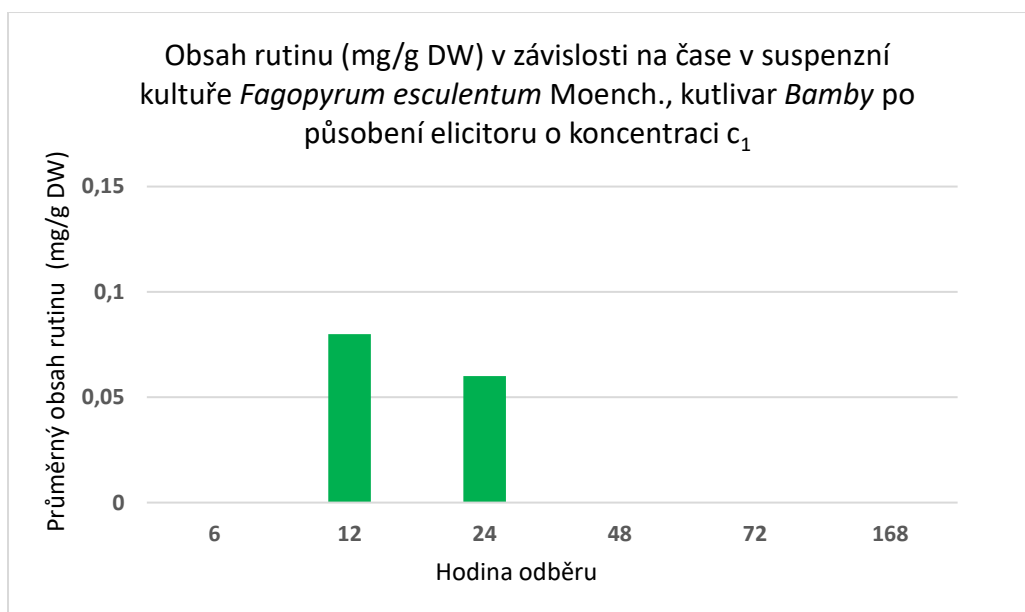
**Tabulka 6:** Obsah rutinu ( $\mu\text{g/ml}$ ) v závislosti na čase odběru v živném médiu kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* po elicitaci roztokem 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea o koncentraci  $c_1$ ,  $c_2$  a  $c_3$ .

Koncentrace elicitoru (mg/100 ml)	Doba působení elicitoru (hod)	Obsah rutinu v médiu ( $\mu\text{g/ml}$ )
100 ( $c_1$ )	6	53,4
	12	78,3
	24	188,5
	48	89,8
	72	111,5
	168	183,0
	24K	36,0
	168K	30,9
10 ( $c_2$ )	6	71,1
	12	187,6
	24	153,7
	48	184,3
	72	81,6
	168	111,1
	24K	7,1
	168K	25,2
1 ( $c_3$ )	6	75,1
	12	85,8
	24	173,6
	48	92,4
	72	92,3
	168	98,3
	24K	77,5
	168K	48,3

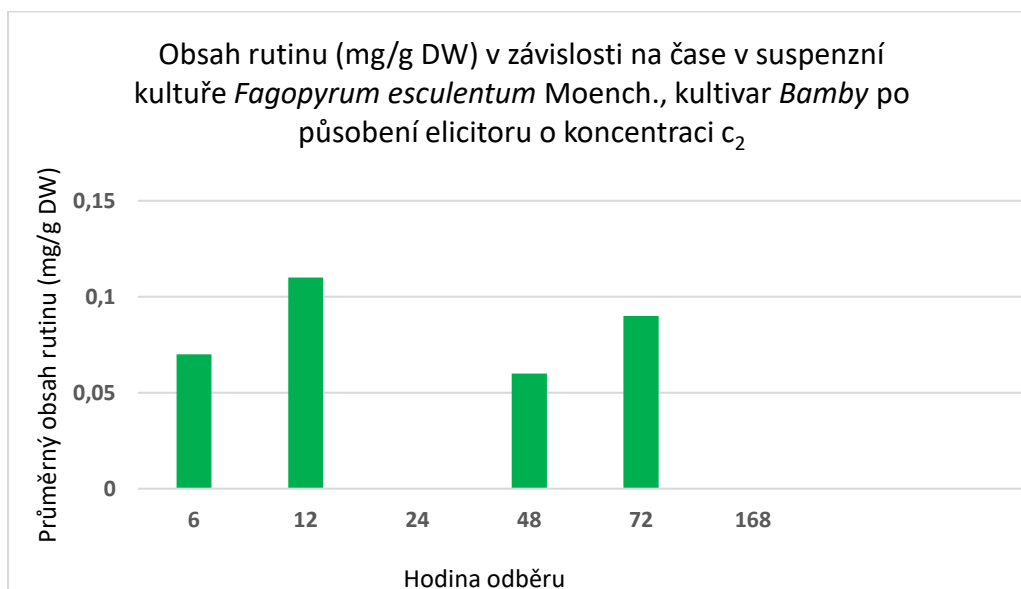
Ve vzorcích živných médiích suspenzních kultur byl obsah rutinu detekován ve velmi malém množství nebo nebyl detekován vůbec, proto tyto vzorky nebudou dále vyhodnocovány.

## 5.2. Grafy

### 5.2.1. Suspenzní kultury

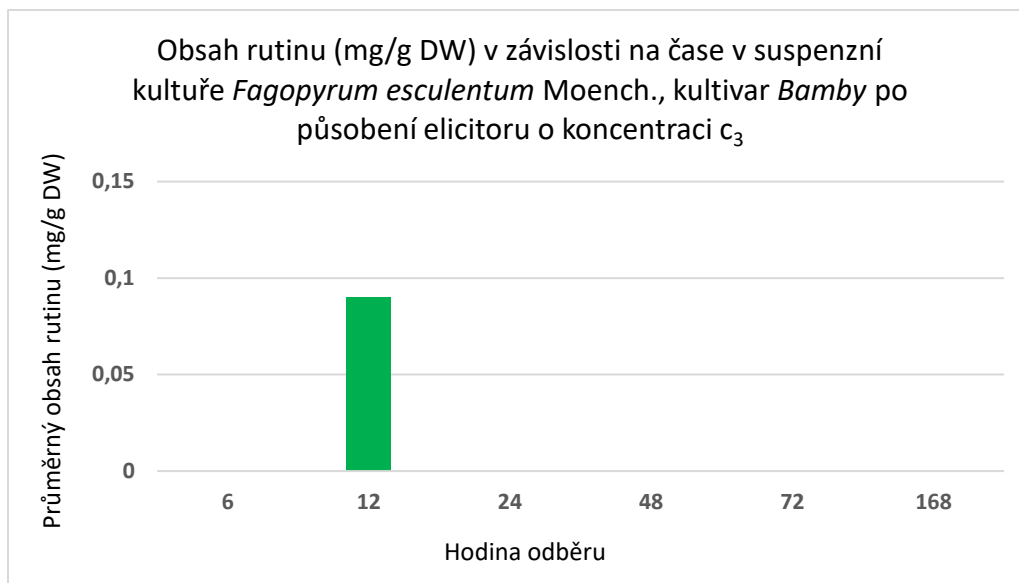


**Graf 1:** Obsah rutinu (mg/g DW) v závislosti na čase v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* po působení elicitoru o koncentraci  $c_1$ .



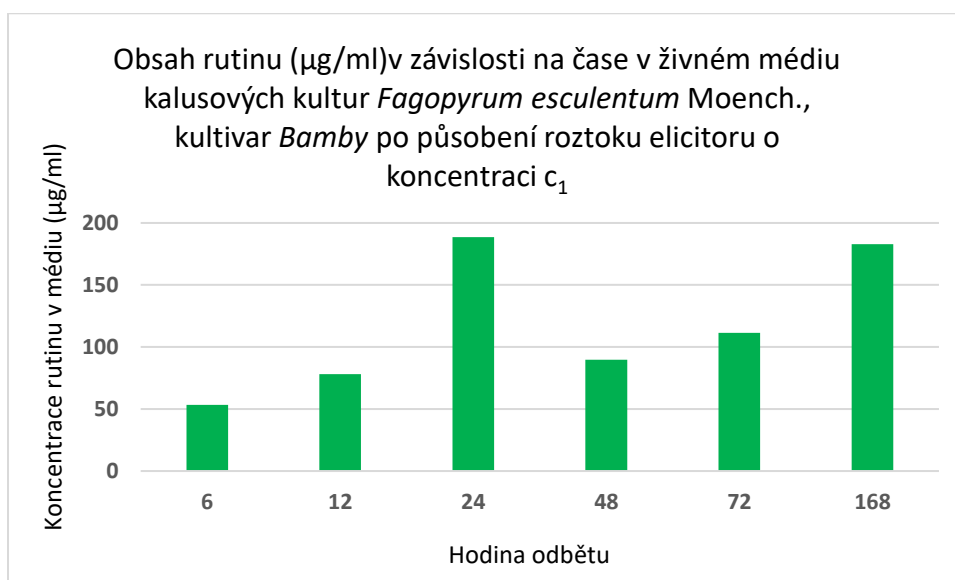
**Graf 2:** Obsah rutinu (mg/g DW) v závislosti na čase v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* po působení elicitoru o koncentraci  $c_2$ .



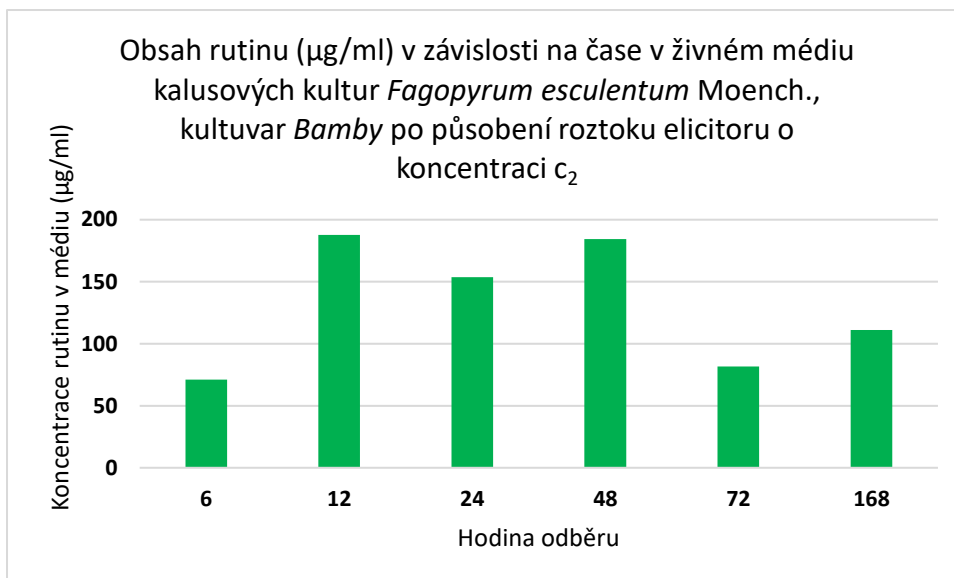


**Graf 3:** Obsah rutinu (mg/g DW) v závislosti na čase v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* po působení elicitoru o koncentraci  $c_3$ .

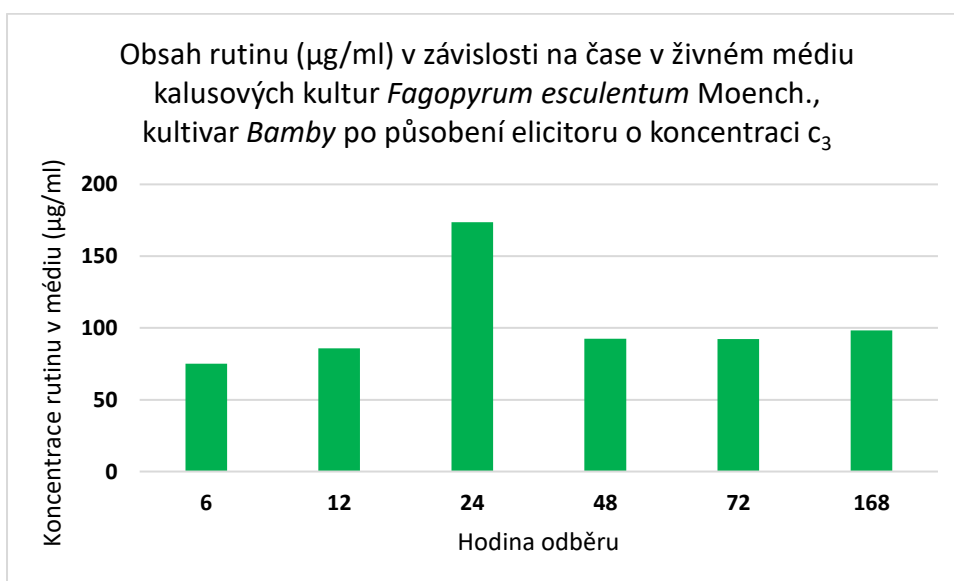
### 5.2.2. Živné médium kalusových kultur



**Graf 4:** Obsah rutinu ( $\mu\text{g/ml}$ ) v závislosti na čase v živném médiu kalusových kultur *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* po působení roztoku elicitoru o koncentraci  $c_1$ .



**Graf 5:** Obsah rutinu ( $\mu\text{g/ml}$ ) v závislosti na čase v živném médiu kalusových kultur *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* po působení elicitoru o koncentraci  $c_2$ .



**Graf 6:** Obsah rutinu ( $\mu\text{g/ml}$ ) v závislosti na čase v živném médiu kalusových kultur *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* po působení elicitoru o koncentraci  $c_3$ .

## 6. DISKUZE

Cílem práce bylo seznámit se s metodou kultivace rostlinných kultur *in vitro* a zjistit vliv abiotického elicitoru 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea na produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., odrůdy *Bamby*.

Při výzkumu byla použita 35.–40. pasáž kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* Moench., odrůdy *Bamby*. Z kalusové kultury byla odvozená kultura suspenzní. Použitým kultivačním médiem bylo médium Murashigeho a Skooga, které bylo obohaceno o růstový regulátor kyselinu dichlorfenoxyoctovou v koncentraci 1 mg/l.

Elicitorem, který by měl ovlivnit produkci rutinu v *in vitro* kulturách byl derivát pyrazinu, 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea použitý ve třech koncentracích:

$$c_1 = 100,0 \text{ mg}/100 \text{ ml } (3,9971 \times 10^{-3} \text{ mol/l})$$

$$c_2 = 10,0 \text{ mg}/100 \text{ ml } (3,9971 \times 10^{-4} \text{ mol/l})$$

$$c_3 = 1,0 \text{ mg}/100 \text{ ml } (3,9971 \times 10^{-5} \text{ mol/l})$$

Vliv elicitoru na *in vitro* kultury se zjišťoval odebráním vzorků po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách. Obsah rutinu ve vzorcích se porovnával s jeho obsahem při kontrolních odběrech po 24 a 168 hodinách. V kontrolních vzorcích byl místo elicitoru použit 96% ethanol. Obsah rutinu se stanovoval analytickou metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Látky chemicky podobné elicitoru, který byl použit během tohoto experimentu podporují buněčné dělení a růst. Proto byl studován jejich vliv na produkci rutinu v *in vitro* kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby*. Výsledky studií naznačují, že by tyto elicitory mohly zvýšit produkci rutinu. <sup>24)</sup>

U kalusových kultur *Fagopyrum esculentum* Moench., odrůda *Bamby* bylo zjištěno, že elicitor sice neovlivnil produkci rutinu samotnými kalusy, ale pozitivně ovlivnil vylučování rutinu do jejich živných médií. Při působení elicitoru 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea došlo k uvolňování rutinu do média při použití každé koncentrace roztoku elicitoru. Koncentrace rutinu v médiích se pohybovala v rozmezí 53,4–184,3 µg/ml. (Tabulky 4, 6; Grafy 4, 5, 6)

Produkce rutinu u suspenzních kultur byla zvýšená při použití všech zkoušených koncentrací elicitoru, ale jen nepatrně. Nejvíce ovlivnil produkci rutinu elicitor o koncentraci 10,0 mg/100 ml ( $c_2$ ). Při použití této koncentrace byla zaznamenána i nejvyšší produkce rutinu (0,11 mg/g DW) po 12 h působení elicitoru. Při použití elicitoru v koncentraci  $c_2$  se obsah rutinu, zvýšil i po jeho 6 h

působení (0,07 mg/g DW), dále po 48 h (0,06 mg/g DW) a 72 h (0,09 mg/g DW) působení elicitoru. (Tabulka 5, Graf 2)

Použitím elicitoru o koncentraci 100,0 mg/100 ml ( $c_1$ ) došlo ke zvýšení produkce rutinu při odběru po 12 h (0,08 mg/g DW) a po 24 h (0,06 mg/g DW). Elicitor o koncentraci 1,0 mg/100 ml ( $c_3$ ) zvýšil produkci rutinu po 12 h působení (0,09 mg/g DW). (Tabulka 5, Grafy 1, 3)

Suspenní kultury do živného média rutin neuvolňovaly.

Elicitor působil lépe na produkci rutinu u suspenních kultur. Shluky buněk mají větší povrch a jsou v lepším kontaktu s živným médiem, které je obohaceno o roztok elicitoru a pohybuje se. Dochází k lepšímu provzdušnění a k lepšímu přístupu živin a elicitoru k buňkám. <sup>35)</sup>

Nejvýznamnějším důvodem nulové produkce rutinu kalusovými kulturami a jeho nízké produkce suspenními kulturami je nejspíše stáří kultury. Mladší tkáň je *in vitro* citlivější, starší kalusy nejsou schopny rychlé regenerace.

Další faktor, který ovlivňuje produkci sekundárních metabolitů *in vitro* kulturami je samotný výběr elicitoru, jeho koncentrace a doba působení. Pyrazinový derivát 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea byl jako elicitor vybrán na základě zjištění, že některé deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny podporují auxinovou aktivitu, buněčné dělení, růst a produkci sekundárních metabolitů. Tato aktivita byla potvrzena v několika předchozích pracích. <sup>24) 52)</sup>

Bylo potvrzeno, že substituované pyrazin-2-karboxamidy zvyšují produkci flavonolignanů v kulturách *Silybum marianum* a flavonoidů v kulturách *Ononis arvensis*. V suspenní kultuře *S. marianum* zvýšil elicitor 5-(2-hydroxybenzoyl)-pyrazin-2-karboxamid produkci silydianinu po 24 hodinovém působení elicitoru o koncentraci  $1,159 \times 10$  mol/l. Maximální obsah flavonoidů v suspenní kultuře *O. arvensis* byl zjištěn po 48 hodinovém působení elicitoru N-(2-brom-3-methylphenyl)-5-terc-butylpyrazin-2-karboxamidu o koncentraci  $8,36 \times 10^{-6}$  mol/l. <sup>61)</sup>

Produkci sekundárních látek v *in vitro* kulturách také ovlivňuje výběr správného kultivačního média a růstového regulátoru. Nevhodný výběr růstového regulátoru může negativně ovlivnit biosyntézu a akumulaci sekundárních metabolitů.

## 7. ZÁVĚR

V této práci se sledoval vliv elicitoru pyrazinového derivátu 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea na produkci sekundárních metabolitů (zejména rutinu) v *in vitro* kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench., odrůda *Bamby*.

Výsledky pozorování jsou následující:

- Ke zvýšení produkce rutinu v suspenzní kultuře došlo celkem v sedmi případech:
  - Při použití elicitoru o koncentraci 100,0 mg/100 ml po 12 (0,08 mg/g DW) a po 24 hodinách (0,06 mg/g DW).
  - Při použití elicitoru o koncentraci 10,0 mg/100 ml po 6 (0,07 mg/g DW), 12 (0,11 mg/g DW), 48 (0,06 mg/g DW) a 72 hodinách (0,09 mg/g DW).
  - Při použití elicitoru o koncentraci 1,0 mg/100 ml po 12 hodinách (0,09 mg/g DW).
- V kalusových kulturách nedocházelo působením elicitoru k ovlivnění produkce rutinu, ale elicitor inicioval vylučování rutinu těmito kulturami do živného média. V neošetřených kalusech nebyl rutin detekován ani v jednom případě.
- K uvolňování rutinu do živného média došlo u kalusových kultur při použití elicitoru u všech 3 testovaných koncentrací a při každém časovém odběru. Hodnoty koncentrace rutinu v médiích se pohybovaly v rozmezí 53,4–184,3 µg/ml.

Byl potvrzen pozitivní vliv elicitoru 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea na produkci rutinu u suspenzních kultur *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby*. Kalusové kultury po působení elicitoru uvolňovaly rutin do živného média. Z výsledků je patrné, že se nejslibněji jeví působení na suspenzní kulturu *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby* při použití koncentrace 10 mg/100 ml a době působení 12 hodin.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Castelman M. Velká kniha léčivých rostlin: Klasický průvodce nejlepšími přírodními léčivy představující ty nejlepší-časem i vědou prověřené léčivé rostliny. 1. vyd. Praha: Columbus 2004; 15-17, 68-73.
2. Hussain M.S., Fareed S., Ansari S., Rahman M.A., Ahmad I.Z., Saeed M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2012; 4(1), 10-20.
3. Gonçalves S., Romano A. Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. *Secondary Metabolites-Sources and Applications*. 2018; 81-99.
4. Sikyta B., Dušek M. *Biotechnologie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum 2001; 75-80.
5. Jahodář L. *Farmakobotanika: Semenné rostliny*. 3. vyd. Praha: Karolinum 2011; 63-64.
6. Moudrý J. Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum* Moench.). [http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Pohanka\\_seta.htm](http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Pohanka_seta.htm). (28.12. 2018)
7. Leifertová I. *Pohanka zdravá a léčivá i dnes*. 1. vyd. Praha: Art press servis 1991; 21.
8. Kolektiv autorů. *Český lékopis 2017*, 4. díl. 1. vyd. Praha: Grada 2017; 4031.
9. Janovská D., Kalinová J., Michalová A. Metodika pěstování pohanky obecné v ekologickém a konvenčním zemědělství. 3. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby 2008; 4-8.
10. Zajačiková P. Vliv methylviolgenu na produkci sekundárních látek v in vitro kultuře *Fagopyrum esculentum*, odrůda Pyra. Diplomová práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2018.
11. Jing R., Li H.Q., Hu C.L. et al. Phytochemical and Pharmacological Profiles of Three *Fagopyrum* Buckwheats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(4), 589.
12. [http://caliban.mpipz.mpg.de/thome/band2/tafel\\_033.html](http://caliban.mpipz.mpg.de/thome/band2/tafel_033.html). (22.1. 2019)
13. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M. *Farmakognozie*. 1. vyd. Praha: Karolinum 2016; 106.
14. Mrázová B. *Charakteristika a vlastnosti pohanky*. Diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická 2010.
15. Katsu K., Suzuki R., Tsuchiya W. et al. A New Buckwheat Dihydroflavonol 4-reductase (DFR), with a Unique Substrate Binding Structure, Has Altered Substrate Specificity. *BMC Plant Biology*. 2017; 17, 239-253.
16. Bulková V. *Rostlinné potraviny*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů 2011; 45.
17. Wloch A., Strugala P., Pruchnik H., Zylka R., Oszmianski J., Kleszynska H. Physical Effects of Buckwheat Extract on Biological Membrane in vitro and its Protective Properties. *The Journal of Membrane Biology*. 2016; 249(1-2), 155-170.

18. Vollmanová A., Margitanová E., Tóth T., Timoracká M., Urminská D., Bojňanská T., Čičová I. Cultivar Influence on Total Polyphenol and Rutin Contents and Total Antioxidant Capacity in Buckwheat, Amaranth, and Quinoa Seeds. *Czech Journal of Food Sciences*. 2013; 31, 589-590.
19. Sensoy Í., Rosen T.R., Ho Ch.T., Karwe V.M. Effect of Processing on Buckwheat Phenolics and Antioxidant Activity. *Food Chemistry*. 2006; 99, 383-393.
20. Mikulajová A., Šedivá D., Hybernová E., Mošovská S. Buckwheat Cultivars-Phenolic Compounds Profiles and Antioxidant Properties. *Acta Chimica Slovaca*. 2016; 9(2), 124-129.
21. Kiprovski B., Mikulic-Petkovsek M., Slatnar A., Veberic R., Stampar F., Malencic D., Latkovic D. Comparison of Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of European *Fagopyrum Esculentum* Cultivars. *Food Chemistry*. 2015; 185, 41-47.
22. Mariotti M., Andreuccetti V., Nuvoloni R. et al. Rutin and Quercetin Content in the Forage of Common Buckwheat as Affected by Maturity and Conservation Method. *Grassland Science*. 2017; 63(3), 169-176.
23. Vlachová V. Vliv methylviologenu na produkci sekundárních látek v in vitro kultuře *Fagopyrum esculentum*, odrůda Bambi. Diplomová práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2018.
24. Bouz G., Juhás M., Niklová P. et al. Ureidopyrazine Derivates: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-infectives and Abiotic Elicitors. *Molecules*. 2017; 22, 1797.
25. Macholán L. Sekundární metabolity. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita 2003; 10-150.
26. Bowsheer C., Steer M., Tobin A. *Plant biochemistry*. 1. vyd. New York: Garland Science 2008; 363-397.
27. Brodowska M. K. Natural Flavonoids: Classification, Potential Role and Application of Flavonoid Analogues. *European Journal of Biological Research*. 2017; 7(2), 108-123.
28. Říhová H. Flavonoidy. Stručný přehled a biologický význam. Bakalářská práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2008.
29. Protivová V. Flavonoidy a jejich role ve vývoji rostlin. Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta 2006.
30. Opletal L. Přírodní látky a jejich biologická aktivita, Nutraceutika: Sekundární metabolity rostlin. 1. vyd. Praha: Karolinum 2016; 19-26, 430-519.
31. Li Y., Ning J., Wang Y. et al. Drug Interaction Study of Flavonoids Toward CYP3A4 and Their Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) Analysis for Predicting Potential Effects. *Toxicology Letters*. 2018; 294, 27-36.
32. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r5143?lang=en&region=CZ>. (10. 3. 2019)
33. Akula R., Ravishankar A.G. Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. *Plant Signaling Behavior*. 2011; 6(11), 1720-1731.
34. Rao A.N. In vitro Production of Various Compounds in Medical Plants. *Journal of Tropical Medicinal Plants*. 2009; 10(1), 61-72.
35. Kováč J. Explantátové kultury rostlin. 1. přeprac. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého 1995; 1-82.

36. Tůmová L., Tůma J. Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat. *Chemické listy*. 2009; 103, 503-510.
37. Klouček P., Landa P., Vaněk T. Rostliny in vitro továrny na léčiva? *Živa*. 2005; 6, 246-248.
38. Novák F. J. Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. 1. vyd. Praha: Academia 1990; 11-13.
39. Hradilík J. Rostlinné explantáty. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita 2005; 8.
40. Tůma J., Tůmová L. Fyziologie rostlin. 1. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus 1998; 197-220, 242-246.
41. Dias M.I., Sousa M.J., Ferreira C.F.R.I. Exploring Plant Tissue Culture to Improve the Production of Phenolic Compounds: A Review. *Industrial Crops and Products*. 2016; 82, 9-22.
42. Barreto C.S., Homsani F., Holandino C. et al. Plant Tissue Culture and Ultra High Diluted Studies: Suggesting a Novel Model Using in vitro Techniques. *Proceedings of the XXX GIRI Meeting*. Netherland: International Journal of High Dilution Research, 2016; 15(4), 45-49.
43. Wang J., Li J., Li J. et al. Production of Active Compounds in Medicinal Plants: from Plant Tissue Culture to Biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*. 2017; 9(2), 115-125.
44. Smith H.R. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. 3. vyd. Amsterdam: Elsevier/AP 2012; 23-79.
45. Martin J. Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v in vitro kulturách *Scutellaria baicalensis* Georgii. Disertační práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2006.
46. Davey M.R. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. 1. vyd. Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell 2010; 1-23, 297-331.
47. Kostříba J. Explantátové kultury vyšších rostlin 27. Diplomová práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2007.
48. Luciano A.J., Irineo T.P., Virginia R.O.V. et al. Integrating Plant Nutrients and Elicitors for Production of Secondary Metabolites, Sustainable Crop Production and Human Health: A Review. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2017; 19, 391-402.
49. Procházka S., Macháčková I. Fyziologie rostlin. 1. vyd. Praha: Academia 2003; 240-285, 322-346, 412-431.
50. Zandalinas S.I., Mittler R., Balfagon D. et al. Plant Adaptions to the Combination of Drought and High Temperatures. *Physiologia Plantarum*. 2018; 162, 2-12.
51. Zhao J.L., Zou L., Zhao G. et al. Efficient Production of Flavonoids in *Fagopyrum Tataricum* Hairy Root Cultures with Yeast Polysaccharide Elicitation and Medium Renewal Process. *Pharmacognosy Magazine*. 2014; 10, 234-240.
52. Tůmová L., Tůma J., Kubeš J. et al. New Synthetic Pyrazine Carboxamide Derivates as Potential Elicitors in Production of Secondary Metabolite in in vitro cultures. *Pharmacognosy Magazine*. 2016; 12, 57-62.



53. Doležal M. Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu. *Chemické listy*. 2006; 100, 959-966.
54. Doležal M., Králová K. Synthesis and Evaluation of Pyrazine Derivates with Herbicidal Activity. *Herbicides, Theory and Applications*. 2011; 581-610.
55. Doležal M. Ústní sdělení. Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 09 Hradec Králové. (4.2. 2019)
56. Niklová P. Deriváty pyrazinu jako potencionální léčiva. Diplomová práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2018.
57. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Journal of Plant Physiology*. 1962; 15, 473-497.
58. Karlíček R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum 2007; 265-279.
59. Klemera P., Klemerová V. *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. 3. vyd. Praha: Karolinum 1999; 15-16, 23-27.
60. Reisenauer R. *Metody matematické statistiky a jejich aplikace*. 2. rev. a dopln. vyd. Praha: SNTL 1970, 26-33, 78-81.
61. Tůmová L., Tůma J., Doležal M. Pyrazinecarboxamides as Potential Elicitors of Flavonolignan and Flavonoid Production in *Silybum Marianum* and *Ononis Arvensis* Cultures in vitro. *Molecules*. 2011; 16, 9142-9152.

## 9. ABSTRAKT

Předmětem této diplomové práce bylo zjistit, zda má vliv použití derivátu pyrazinu, 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea, jako abiotického elicitoru na produkci flavonoidu rutinu v *in vitro* kulturách *Fagopyrum esculentum* Moench., kultivar *Bamby*. Suspenzní a kalusové kultury byly kultivovány na živném médiu podle Murashigeho a Skooga (MS) s přidavkem růstového regulátoru kyseliny 2,4 - dichlorfenoxyoctové (2,4-D) v koncentraci 1 mg/l.

Ethanolový roztok elicitoru byl ke kulturám přidáván ve třech koncentracích:  $c_1$  (100,0 mg/100 ml),  $c_2$  (10,0 mg/100 ml) a  $c_3$  (1,0 mg/100 ml). Působení elicitoru bylo sledováno v šesti časových intervalech: 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Kontrolní vzorky, ke kterým se místo roztoku elicitoru přidával 1 ml ethanolu 96% byly odebrány po 24 a 168 hodinách. Po odebrání vzorků v daných časových intervalech, jejich vysušení a zpracování následovalo samotné stanovování obsahu rutinu metodou HPLC. Sledovalo se i uvolňování rutinu do živného média.

V kalusových kulturách nebylo vlivem působení elicitoru pozorováno žádné statisticky významné zvýšení produkce rutinu. Kalusy však ve všech případech uvolňovaly rutin do živného média. Obsah rutinu v médiích se pohyboval v rozmezí koncentrací 53,4 – 184,3  $\mu\text{g/ml}$ .

Během působení roztoku elicitoru (koncentrace  $c_1$ ,  $c_2$  i  $c_3$ ) na suspenzní kultury došlo ke zvýšení obsahu rutinu. Maximální obsah rutinu (0,11 mg/g DW) byl zjištěn při použití roztoku elicitoru o koncentraci  $c_2$  (10,0 mg/100 ml), který působil 12 hodin. Po 12 hodinovém působení elicitoru byl vždy zjištěn zvýšený obsah rutinu. Elicitor v koncentraci  $c_2$  zvyšoval produkci rutinu i po 6, 48 a 72 hodinách.

Elicitor 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea měl pozitivní vliv na produkci rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., odrůda *Bamby*. V kalusové podnitil uvolňování rutinu do média.

## 10. ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the effect of pyrazine derivative, 1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea, as an abiotic elicitor on the production of flavonoid rutin in *in vitro* cultures of *Fagopyrum esculentum* Moench., Cultivar *Bamby*. Suspension and callus cultures were cultivated on Murashige and Skoog nutrient medium (MS) with the addition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as growth regulator at a concentration of 1 mg/l.

The elicitor solution was added to the cultures at three concentrations:  $c_1$  (100,0 mg/100 ml),  $c_2$  (10,0 mg/100 ml) and  $c_3$  (1,0 mg/100 ml). The elicitor was monitored at six time intervals: 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours. To control samples 1 ml of ethanol 96% was added instead of elicitor solution and samples were collected after 24 and 168 hours. Samples were taken at given time intervals and dried. Subsequently, the rutin content was monitored by HPLC. The rutin release into the nutrient medium was also tested.

During the experiment on the callus cultures no statistically significant increase in rutin production after elicitor treatment was observed. But elicitor increased rutin production in suspension cultures after treatment in all tested concentrations. The calluses always released rutin into the nutrient medium. The rutin content in the media ranged from 53,4 to 184,3  $\mu\text{g/ml}$ .

The maximum rutin content (0,11 mg/g DW) was detected in the suspension culture after 12 hours of elicitor application at a concentration  $c_2$  (10,0 mg/100 ml), related to a 24-hour control (0,06 mg/g DW). At 12 hours sampling the increased rutin content was always detected. A higher rutin production was also observed after 6, 48 and 72 hours of elicitor treatment at a concentration  $c_2$ .

Elicitor-1-octyl-3-(pyrazin-2-yl)urea had the positive effect on rutin production only in suspension cultures of *Fagopyrum esculentum* Moench., Cultivar *Bamby*. In callus cultures elicitor stimulated the rutin release into the medium.