

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE

KULTURY LÉČIVÝCH ROSTLIN
in vitro- XIV

Jitka Majerová
diplomová práce

Datum zadání:	26. 9. 2013
Vedoucí katedry:	doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.
Vedoucí diplomové práce:	Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.
Počet stran:	62
Oponent:	PharmDr. Marie Kašparová, PhD.

V Hradci Králové, 2014

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení a poskytnuté rady při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla vyjádřit poděkování PharmDr. Janu Martinovi, PhD. za pomoc při analytickém zpracování výsledků pomocí HPLC a v neposlední řadě také pracovníkům katedry Farmakognozie za přátelskou atmosféru při realizaci praktické části.

Prohlašuji, že práci jsem vypracovala samostatně a je tedy mým původním autorským dílem, který jsem nepoužila k získání jiného titulu. Veškerou literaturu, kterou jsem při psaní práce použila, jsem uvedla v seznamu literatury. V práci jsem tuto literaturu řádně citovala.

V Hradci Králové dne

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Explantátové kultury rostlin.....	9
3.1.1	Definice.....	9
3.1.2	Charakteristika kultur.....	9
3.1.3	Založení kultur	9
3.1.4	Typy kultur.....	9
3.1.4.1	Kultury zachovávající genetickou stabilitu	10
3.1.4.2	Kultury zvyšující genetickou variabilitu	11
3.1.5	Výhody a nevýhody explantátových kultur	12
3.1.6	Využití explantátových kultur.....	13
3.1.6.1	Produkce sekundárních metabolitů	14
3.2	Živné médium a jeho složení	15
3.2.1	Makroelementy	16
3.2.2	Mikroelementy	19
3.2.3	Regulátory růstu	19
3.2.3.1	Auxiny	19
3.2.3.2	Cytokiny	21
3.2.3.3	Gibereliny	21
3.2.3.4	Kyselina abscisová	22
3.2.4	Aminokyseliny	22
3.2.5	Vitamíny.....	22
3.2.6	Zdroje uhlíku.....	23
3.2.7	Nedefinované organické složky	23
3.2.8	Složky zpevňující živné médium	23

3.2.9	Typy médií	24
3.3	Dezinfekce a sterilizace.....	24
3.3.1	Sterilizace živného média	25
3.3.2	Příprava matečné rostliny.....	25
3.4	Fyziologie stresu	26
3.4.1	Stresová reakce	27
3.4.2	Základní mechanismy stresové reakce.....	28
3.4.2.1	Stresové proteiny	28
3.4.2.2	Aktivní formy kyslíku	29
3.5	Elicitace.....	29
3.5.1	Biotické stresy.....	30
3.5.1.1	Aleopatie	30
3.5.1.2	Interakce s býložravými živočichy.....	30
3.5.1.3	Patogenní organismy	30
3.5.2	Abiotické stresy.....	31
3.5.2.1	Nedostatek vody	32
3.5.2.2	Zasolené půdy a kyselé půdy.....	32
3.5.2.3	Pokles množství kyslíku v půdě.....	33
3.5.2.4	Toxické látky v prostředí.....	33
3.5.2.5	Ultrazvuk.....	34
3.6	Fagopyrum esculentum	35
3.6.1	Charakteristika	35
3.6.2	Původ	35
3.6.3	Odrůdy a jejich výskyt	35
3.6.4	Obsahové látky.....	36
3.6.4.1	Rutin	37
3.6.5	Droga.....	37

3.6.6	Využití.....	37
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
4.1	Přístroje	40
4.2	Chemikálie	40
4.3	Rostlinný materiál	41
4.4	Složení a příprava živného média	41
4.5	Založení kultury	43
4.6	Průběh a podmínky kultivace.....	43
4.7	Elicitace ultrazvukem.....	44
4.8	Stanovení obsahu rutinu	45
4.8.1	Postup stanovení	45
4.8.2	Vlastní HPLC analýza.....	45
5	VÝSLEDKY	48
6	DISKUZE.....	52
7	ZÁVĚR.....	54
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	55
9	ABSTRAKT.....	61
10	ABSTRACT.....	62

1 ÚVOD

O rostliny se člověk zajímá od nepaměti. Zprvu je vyhledával pouze jako zdroj obživy. Na základě vlastních zkušeností lidé začali postupně přiřazovat jednotlivým rostlinám určité charakteristické vlastnosti, které dále využívali. Později se lidé k rostlinám vraceli cíleně. Léčivé účinky rostlin vyhledávali při léčbě různých nemocí. Při náboženských rituálech se uchylovali rostlinám s halucinogenním efektem (1).

S rozvojem syntetických léčiv je spojen i ústup fytofarmak. Jejich význam ale v posledních letech nabývá na důležitosti. Rostliny obsahují velké množství farmaceuticky zajímavých látek, ale jejich syntéza je obtížná nebo finančně náročná (2). Další překážkou v syntéze přírodních látek je fakt, že výsledný efekt přírodních látek je podmíněn souhrou hlavních i vedlejších obsahových látek (3).

Ukazuje se, že biotechnologické metody mohou být významnou alternativní cestou získávání sekundárních metabolitů (2).

V této práci jsem se zaměřila na metodu elicitace. Sledovala jsem vliv ultrazvuku na produkci rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* pěstované *in vitro*. Nejvýznamnější obsahovou látkou obsaženou v pohance je flavonoidní glykosid rutin, který je vyhledávanou složkou nejen potravních doplňků, ale i vstupní surovinou pro výrobu semisyntetických derivátů.

2 CÍL

Hlavním cílem práce bylo osvojit si základní metodiku při kultivaci rostlin *in vitro* a zjistit jaký vliv má ultrazvuk na produkci rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. Elicitace probíhala podle předem definovaného schématu. Závěrečná analýza obsahu rutinu byla provedena pomocí HPLC.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Explantátové kultury rostlin

3.1.1 Definice

Pod pojmem explantátové kultury rozumíme kultivaci různých rostlinných částí za předem definovaných podmínek *in vitro* (4).

3.1.2 Charakteristika kultur

Základem explantátových kultur je totipotence rostlinných buněk (5). Tuto vlastnost nemá jen zygota, která stojí na začátku vývoje nové rostliny, ale za vhodných podmínek každá rostlinná buňka s nepoškozeným jádrem. Zygota se za normálních podmínek mitoticky dělí a vznikají buňky dceřiné, které se následně diferencují a dávají vzniknout organizovaným pletivům (4). Totipotence se při diferenciaci nijak neztrácí, naopak, je zachována a rostlina může specializované buňky za určitých podmínek dediferencovat a navodit buněčné dělení (6).

3.1.3 Založení kultur

Nejdříve se musí vytvořit stabilní kultura, která se odvodí od malé části rostliny. Díky totipotenci nezáleží na místě odběru vzorku. Celá kultivace musí probíhat za aseptických podmínek. Rostlinné vzorky se proto odebírají ze sterilně napěstované rostliny nebo z rostliny povrchově sterilizované. Takto odebraný vzorek se umístí do živného média specifického složení a kultivuje se za předem určených podmínek (7).

3.1.4 Typy kultur

V prvních letech používání explantátů se věřilo, že nově odvozené kultury budou geneticky stabilní.

Podle změny jejich genetické stability se dělí na dvě následující skupiny: (8)

- **kultury zachovávající genetickou stabilitu**- meristémové kultury, embryokultury
- **kultury zvyšující genetickou variabilitu**- kalusové, suspenzní a protoplastové kultury

3.1.4.1 Kultury zachovávající genetickou stabilitu

Meristémová kultura

Meristemická kultura se odvodí kultivací samotného vznosného vrcholu a několika listových primodií (4).

Za běžných podmínek je činnost úžlabních axilárních meristémů potlačena vlivem apikální dominance, díky které je postranní větvení omezeno a vyvine se pouze jediná rostlina (8). Pro účely množení rostlin se do živného média přidávají tzv. regulátory růstu. V tomto případě je jedná o cytokiny, které potlačují inhibiční vliv vznosného vrcholu na axilární meristémy a naopak podporují jejich růst. Rychle rostoucí postranní prýty se po určitém čase odstraní a kultivují se na médiu vhodného složení. V této fázi se do média přidávají další látky regulující růst, auxiny, které podpoří zakořenění (4,8).

Tato metoda množení rostlin je velice využívána a jednoduchá. Určitým negativem může být problém se zakořeňováním klonů v primokultuře. Tento problém ale s rostoucími pasážemi mizí (4).

Embryokultury

Jsou typické vznikem somatických embryí přímo na primárních explantátech (4). Tato metoda není široce využívána proto, že je druhově specifická a zatím ji nelze aplikovat na všechny rostliny. Embrya vznikají z tzv. embryogenního kalusu. Vznik tohoto kalusu se navodí dediferenciací specializovaného pletiva pomocí 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny (2,4-D) (8).

3.1.4.2 **Kultury zvyšující genetickou variabilitu**

Kalusová kultura

Kalusová kultura je charakterizována neorganizovaným shlukem nediferenciováných buněk. Buňky mají různé tvary, různá stádia vývoje. Úroveň náročnosti odvození této kultury je závislá na druhu rostliny. U dvouděložných můžeme použít jakoukoliv část matečné rostliny, u jednoděložných je výběr složitější. Odebraný vzorek matečné rostliny kultivujeme v podmínkách *in vitro* (4,5).

Růst kalusu vyvoláme specifickým složením růstových regulátorů v živném médiu. V tomto případě potřebujeme podpořit růst buněk kalusu, který navodíme rovnovážnými koncentracemi auxinu a cytokinu. Tato rovnovážná koncentrace je pro každou rostlinu specifická (4,5).

Kalusovou kulturu můžeme udržovat pravidelným pasážováním na čerstvou živnou půdu i několik let. Musíme ale dodržet rovnovážnou koncentraci růstových faktorů. Posuneme-li jejich rovnováhu na stranu jednoho z nich, nastanou následující situace: (4,5)

- na stranu auxinu vyvoláme tvorbu kořenů
- na stranu cytokinu vyvoláme tvorbu pupenů a prýtu

Vhodnou úpravou koncentrace růstových faktorů navodíme tvorbu rozpadavého kalusu, který je vhodný pro převod do suspenzní kultury (4).

Suspenzní kultury

V ideálním případě suspenzní kulturu tvoří jednotlivé buňky nebo malé shluky nediferenciováných buněk, které se volně pohybují v tekutém médiu. Buňky jsou uloženy přímo v médiu a mají s jeho složkami lepší kontakt, díky kterému mohou růst rychleji než kalusové kultury, které jsou kultivovány na zpevněném živném médiu (4).

Kvalitu suspenzních kultur ovlivňuje složení živného roztoku. Buněčné kultury nejsou většinou schopné fotosyntézy a jsou tedy odkázány na exogenní přísun uhlíku, nejčastěji ve formě sacharózy. Koncentrace makroelementů je v 1 litru média nejčastěji milimolární, naopak mikroelementů řádově mikromolární. Důležitou roli opět hraje množství fytohormonů, aminokyselin, vitamínů (9).

Takto uspořádané kultury se využívají hlavně k produkci sekundárních metabolitů *in vitro*. V praxi se setkáme s produkcí shikoninu suspenzní kulturou kamejky rudokořenné a některých druhů tisů, která produkuje antineoplasticky účinný taxol (9).

Další oblasti využití suspenzních kultur jsou následující: (4)

- mutační šlechtění rostlin
- zakládání embryokultur (produkce somatických embryí)

Protoplastové kultury (4,8)

Pod pojmem rostlinný protoplast rozumíme rostlinnou buňku zbavenou buněčné stěny. Protoplast můžeme získat z různých rostlinných pletiv. Nejfrekventovanější zdroje jsou:

- listový mezofyl
- kalus
- suspenzní kultury

Buněčnou stěnu můžeme odstranit mechanicky nebo enzymaticky. Enzymatické odstranění je šetrnější, proto se dnes mechanické odstranění prakticky nepoužívá. Volba enzymu závisí na tom, jak chceme buněčnou stěnu rozrušit. Nejčastěji se využívají následující enzymy: (4)

- pektináza- rozpouští střední lamelu a následný rozpad buněčné stěny
- celulóza a hemicelulóza- rozpouští vlastní buněčnou stěnu

3.1.5 Výhody a nevýhody explantátových kultur

Převedením rostlinné produkce do prostor *in vitro* sice nejsme závislí na klimatických podmínkách a může se zdát, že vše probíhá za ideálních podmínek. Někdy je ale velmi těžké vyhovět požadavkům rostliny a zároveň technickému vybavení a ekonomickým stránkám.

Výhody: (4,7)

Díky produkci *in vitro* jsme schopni kultivovat na malém prostoru velké množství kultur, čímž se snižují náklady na provoz skleníků (7). K založení kultury nepotřebujeme díky totipotenci buněk žádnou specifickou část matečné rostliny. Z matečné rostliny můžeme odebrat velké množství malých vzorků a tím založit velkou populaci buněk a z každé můžeme vypěstovat novou rostlinu.

Vzhledem k tomu, že kultivace probíhá *in vitro*, nejsme limitováni klimatickými podmínkami ani ročním obdobím. Díky vhodně zvolenému složení živného média můžeme patřičně zvýšit koeficient množení nebo udržet kulturu libovolně dlouhou dobu.

Rostliny pěstujeme za aseptických podmínek a nehrozí riziko virových nebo mikrobiálních nákaz. V takových kulturách nemusíme používat chemické prostředky snižující riziko nákazy jako je tomu u polních kultur.

Nevýhody: (4,7)

Tato metoda je náročná hlavně na laboratorní vybavení. Vzhledem k tomu, že práce probíhá za aseptických podmínek, musíme pracovat v laminárním boxu, s vysterilizovanými nástroji a sklem. Živné médium se také musí podrobit sterilizaci v autoklávu. V tomto případě musíme zohlednit termolabilitu některých složek média a odolnost určitých mikroorganismů. Každý pracovník si musí být vědom důležitosti dodržení aseptické práce, protože její nedodržení může zničit celou kulturu.

Kultury vyžadují i určitou fotoperiodu, určitou vlhkost a suspenzní kultury i neustálé míchání na třepáčkách.

Celá metoda se nedá plně automatizovat, což opět zvyšuje finanční náklady.

3.1.6 Využití explantátových kultur

Z výhod explantátových kultur zmiňovaných výše můžeme odvodit následující oblasti jejich využití (7).

- alternativní cesta produkce k polním kulturám
- díky kulturám *in vitro* můžeme využívat produkty rostlin, které se v polních kulturách pěstují obtížně nebo se nedají pěstovat vůbec

- změnou metabolismus buněk v kultuře ve smyslu:
 - zvýšení produkce běžně produkovaného metabolitu
 - produkce nového metabolitu, který matečná rostlina neprodukuje

3.1.6.1 **Produkce sekundárních metabolitů**

Sekundární metabolity jsou produkty specifického metabolismu, označovaného jako sekundární metabolismus. Pojem sekundární plyne ze skutečnosti, že existují určité odlišnosti mezi tzv. primárním metabolismem.

Odlišnosti primárního a sekundárního metabolismu

Primární metabolismus (4,10)

- Pro rostlinnou buňku je nepostradatelný.
- Má spojitost s růstem- produkují se jím stavební látky.
- Aktivní v celé fázi růstu a vývoje rostliny, v určitých situacích je ovlivněna pouze jeho intenzita. Zde platí antagonistické postavení primárního metabolismu vůči sekundárnímu. Roste-li organismus, je aktivní primární metabolismus, sekundární je utlumen a naopak. Tento jev lze vysvětlit spojitostí metabolismů přes základní meziprodukty.
- Funguje ve všech živých organismech bez ohledu na složitost organismu.
- Přesně definovaný fyziologický význam.
- Chemicky definované struktury.

Sekundární metabolismus: (4,10,11)

- Pro organismus má speciální význam.
- Nemá spojitost s růstem, většinou se jedná o regulační, ochranné, detoxikační a další funkce.
- Aktivuje se pouze v určité fázi vývoje organismu. Spouštěčem je většinou určitá změna vnějších podmínek, na které organismus produkcí sekundárních metabolitů reaguje.
- Je specifický pro určité rostlinné druhy.
- Význam není u všech metabolitů přesně definovaný.

- Strukturálně se jedná o velmi pestrou skupinu.

I když se dají definovat určité odlišnosti mezi jednotlivými metabolismy, přesně určit hranici je velmi obtížné. Důkazem je skutečnost, že biosyntéza sekundárních metabolitů probíhá z úzkého spektra látek pocházejících z primárního metabolismu. Jedná se o meziprodukty při syntéze šikimové kyseliny, acetylCoA a některé další látky. Jako další důkaz můžeme považovat fakt, že v době, kdy se musí rostlina přizpůsobovat změnám okolních podmínek, sníží primární metabolismus svou intenzitu a naopak zesílí produkce sekundárních metabolitů. Toto antagonistické postavení obou metabolismů vysvětlujeme odlišné používáním stejných meziproduktů.

Z názvu „sekundární“ se může zdát, že produkty nemají v organismu podstatnou úlohu, ale opak je pravdou. Sice neznáme přesný význam všech sekundárních metabolitů, ale přesto se jejich úlohy pro produkující rostlinu dají rozdělit na následující skupiny: (4)

- **Ochranná funkce-** rostlina, která je vytvořila, je díky nim ochráněna proti škůdcům, predátorům.
- **Zajištění rozmnožování rostliny-** atraktanty pro opylovače.
- **Detoxikační funkce-** uvažuje se o tom, že jsou to produkty detoxikačního metabolismu rostlin.
- **Regulační funkce-** jsou ve formě rostlinných exudátů vylučovány do okolí a složí ke komunikaci (12).

3.2 Živné médium a jeho složení

Výběru a přípravě živné půdy v kulturách *in vitro* musíme věnovat nemalou pozornost. Kvalitativní i kvantitativní charakteristika média může velmi ovlivnit další vývoj celé kultury. Explantát potřebuje pro svůj vývoj stejné látky jako celistvá rostlina v polních kulturách.

Výběr živné půdy je značně závislý na druhu rostliny. Celkové složení má vliv nejen na růst ale i na správný vývoj explantátu.

Při minerální výživě buněk organismu se setkáváme s tzv. **antagonismem iontů**. Podstata antagonismu spočívá v tom, že pronikání jedné živiny omezuje pronikání jiné živiny. Kationty K^+ zpomalují příjem dalších kationtů- Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} . Podobně jsou na tom i anionty Cl^- , které brzdí příjem SO_4^{2-} (13).

Naopak při **synergismu** se setkáváme se zvýšeným průnikem iontů do buněk při společném pronikání některých kombinací iontů. Typickým příkladem je synergismus NH_4^+ a NO_3^- nebo Ca^{2+} a K^+ (13).

Obecně lze složení média vyjádřit následovně: (4)

- makroelementy
- mikroelementy
- regulátory růstu
- zdroj organického dusíku (aminokyseliny)
- vitamíny
- zdroj uhlíku (sacharóza)
- nedefinované složky
- složky zpevňující živné médium

3.2.1 Makroelementy

Součástí, které rostlina potřebuje v poměrně velkém množství, označujeme jako tzv. makroelementy nebo také makroprvky. Jejich obsah v sušině se většinou pohybuje v rozmezí desetin až setin procent (13).

„International Association for Plant Physiology“ považuje za makroelementy ty složky živného média, které jsou v koncentraci vyšší než 0,5 mM/l. Součástí média o nižší koncentraci se označují jako mikroelementy (14).

V rostlinném těle plní hlavně stavební funkci (13). Do této skupiny patří šest následujících prvků: dusík, draslík, fosfor, vápník, hořčík, síra (15).

Dusík:

Dusík rostliny přijímají v anorganické formě, kterou podrobí dvoustupňové redukci. Prvně nitrátreduktázou na nitrit a ve druhém stupni nitritreduktázou na amoniak. Vzniklý amoniak následně inkorporují do organických struktur, konkrétně do aminokyselin (16).

Anorganickou formou představuje nejčastěji nitrát v podobě dusičnanu draselného nebo dusičnanu amonného. Do živného média se ale přidává kombinace iontů NO_3^- a NH_4^+ , která vede k lepšímu růstu kultury (4). Tato skutečnost potvrzuje synergistické působení uvedených iontů.

Vzhledem k tomu, že dusík se účastní tvorby základních životně důležitých struktur, jako jsou bílkoviny, aminokyseliny nebo nukleové kyseliny, je jeho deficit znatelný na první pohled (16).

Draslík

Nejčastěji je přijímán ve formě chloridů nebo dusičnanů. V organismu plní hned několik funkcí: (13)

- ovlivňuje otevírání průduchů a tím i regulaci transpirace
- je součástí mnoha enzymů (Rubisco)
- regulace membránového potenciálu- draslík je hlavní intracelulární kationt
- ovlivňuje hydrataci

Fosfor (10,16)

Rostlina fosfor přijímá ve formě aniontů HPO_4^{2-} a H_2PO_4^- .

Význam fosforu v buňce je následující:

- energetický metabolismus- součástí makroergních vazeb v ATP
- součást signalizační kaskády- tvorba cAMP z ATP, fosforylace bílkovin pomocí kináz, tvorba inositol-1,4,5-trifosfátu
- součást nukleových kyselin DNA, RNA
- součást složených enzymů ve formě NAD^+ a NADP^+ významných v dýchacím řetězci resp. při fotosyntéze

- tvoří strukturu fosfolipidů, které vytváří plazmatické membrány

Vápník

Rostlinou je přijímán ve formě solí kyseliny fosforečné, sírové a uhličitě. Vápenaté soli plní v rostlinném organismu následující úlohy: (10)

- společně s pektiny tvoří lepidlou vrstvu a udržuje integritu buněčné stěny
- účastní se signalizační kaskády- splňuje také všechny čtyři podmínky pro primární posly, které uveřejnili Pooivah a Reedy: (17)
 1. Odpovědí organismu na primární stimuly je rostoucí koncentrace vápníku, teprve poté dojde k vlastní fyziologické odpovědi.
 2. Fyziologická odpověď, jako reakce na vzrůst koncentrace vápníku se dostaví, i když byla změna koncentrace vápenatých iontů navozena uměle.
 3. Buňka je vybavena mechanismy, díky kterým je schopna reagovat na změny v koncentraci vápníku.
 4. Zablokujeme-li změny koncentrace vápníku, zablokujeme také fyziologické odpovědi.

Hořčík

Hořčík je významně spojen s fotosyntézou, protože je součástí chlorofylu a světločivných gran v chloroplastech. Při osvitě se transportuje z lumen do stromatu, kde aktivuje enzym Rubisco (16).

Síra

Buňky síru přijímají jako aniont SO_4^{2-} , který se podrobí dalšímu metabolismu (13).

3.2.2 Mikroelementy

Mikroelementy sice rostlina potřebuje v menším množství než makroelementy, ale přesto jsou nezbytné pro správný vývoj *in vitro* kultur. Obsah mikroelementů v sušině se pohybuje v řádu tisícín až desetitisícín procent (13). Do této skupiny patří následující prvky: železo, zinek, mangan, molybden, bór, měď (4).

3.2.3 Regulátory růstu

Regulátory růstu se souhrnně označují jako fytohormony. V oblasti kultivace kultur *in vitro* se používají následující látky: auxiny, cytokiny, gibereliny a kyselina abscisová (4).

Při výběru jednotlivých složek média musíme zohlednit nejen výběr látky a její koncentraci, ale důležitý je i poměr jednotlivých složek. Typickým příkladem je vhodný poměr auxinu a cytokinu (16). Přidání auxinu podpoří tvorbu kalusu a některých sekundárních metabolitů. Naopak přítomnost cytokinu rozvoj kultur a produkci sekundárních metabolitů brzdí (18).

Jedná se o látky s regulační aktivitou, podobně jako hormony v živočišné říši. Od živočišných hormonů mají následující odlišnosti: (16)

- Fytohormony se v rostlinném těle tvoří na více místech najednou, rostliny nemají žádnou specifickou žlázu, ve které k produkci dochází.
- Nemají tak jednoduchou závislost „účinek- koncentrace“. Vliv fytohormonů na růst může být pozitivního nebo inhibičního charakteru.
- Působí na více procesů, jsou tedy méně specifické než hormony živočišné říše.

3.2.3.1 Auxiny

Prvním látkou s fytohormonální povahou byla β - indolyloctová kyselina, dnes častěji uváděna pod zkratkou IAA (10).

V současné době se více využívají syntetická analoga IAA, protože nepodléhají enzymatické degradaci. Jedná se o následující látky: (16)

- Indolylmásečná kyselina (IBA)
- Naftylactová kyselina (NAA)
- 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (2,4 D)
- Fenylactová kyselina
- Fenylmásečná kyselina

Koncentrace auxinu závisí na: (16)

- **Ročním období-** na jaře je vyšší koncentrace, která souvisí s intenzivním růstem.
- **Části rostliny a jejím růstovým potenciálem-** vyšší hladiny nacházíme u částí rychle rostoucích (pupeny).
- **Stáří rostlinného orgánu-** mladší orgány mají vyšší rostoucí potenciál a tím i vyšší hladinu auxinu.

Auxiny se v kultivačním médiu využívají z následujících důvodů: (16)

- **Stimulace růstu-** tuto vlastnost pozorujeme hlavně u izolovaných rostlinných částí, u intaktních rostlin je ten to vliv nezřetelný. Důvodem může být dostatek vlastního endogenního auxinu.
- **Stimulace tvorby kořenů-** auxiny, které mají tuto úlohu, jsou většinou původu stonkového. Kořeny je směřují za gibereliny, cytokiny a další látky, které jsou naopak transportovány směrem do stonku. Z tohoto důvodu musíme stimulovat izolovaný kořen nízkými koncentracemi auxinu. U stimulace intaktní rostliny musíme být opatrnější, protože kořen je k působení auxinu citlivější než stonek.
- **Stimulace buněčného dělení**
- **Vliv na apikální dominanci-** auxiny inhibují růst úžlabních pupenů, podporují růst prýtu, ze kterého se vyvine rostlina.

3.2.3.2 Cytokiny

První objevenou látkou z této skupiny byl kinetin (6-furfurylaminopurin) (16). Efekt cytokinů se projevuje při současném působení β -indolyloctvé kyseliny (IAA) (10).

Hlavní úlohy cytokinu v rostlinném organismu shrnují následující body: (13)

- **Stimulace buněčného dělení** spojené s rostoucí tvorbou DNA.
- **Regenerace orgánů**- ve spolupráci s auxiny zajišťují regenerační procesy. Zde je velmi důležitý vzájemný poměr obou složek. Vyrovnaná koncentrace auxinu a cytokinu vede k tvorbě kalusu, nadbytek auxinu vede k tvorbě kořene a naopak nadbytek cytokinu vyvolá regeneraci prýtu.
- **Apikální dominance**- cytokiny antagonizují působení auxinu na vznosný vrchol. Působení cytokinů vede k větvení stonku.

3.2.3.3 Gibereliny

Základem aktivity giberelinů je přítomnost *ent*-giberelanového skeletu a dvou karboxylových skupin (poloha 7 a 19). Dnes rozeznáváme mnoho látek, které se řadí mezi gibereliny. (16).

Jednotlivé gibereliny se mohou lišit svou aktivitou. Vliv na míru aktivity má druh a stáří rostliny. V neposlední řadě také jejich aktivitu ovlivňuje i místo odběru vzorku. Nejvyšší aktivitou se vyznačují nově vznikající orgány a místa aktivního růstu (16).

Účinky giberelinů na rostlinný organismus vystihují následující body: (10,16)

- **Stimulace růstu**- zde se dají vysledovat určité odlišnosti od účinků auxinů. Jedná se hlavně o to, že gibereliny stimulují růst pouze u nadzemních částí rostlin. Jejich vliv je zřetelněji vidět na intaktních rostlinách, zatím co auxiny působí především na izolované rostlinné části.
- **Vliv na pohlaví květů**- tento jev je patrný pouze u některých rostlin (okurka, špenát). Aplikace giberelinů podporuje vývoj samčích květů a zároveň potlačuje rozvoj samičích květů.

3.2.3.4 Kyselina abscisová

Tato látka působí na rostlinu inhibičním mechanismem. Byla objevena při studiu opadu listů a dormance (16).

3.2.4 Aminokyseliny

Dodávat aminokyseliny do všech kultur není bezpodmínečně nutné. Buňky kultur jsou samostatné v syntéze všech nezbytných aminokyselin, ale vhodně zvolená aminokyselina a její koncentrace může pozitivně ovlivnit růst kultury. Vysoká koncentrace může mít ale vliv opačný a růst inhibovat. Rostlina dodané aminokyseliny využívá především jako dostupný zdroj dusíku pro syntézu proteinů (4).

Můžeme do média přidávat jednotlivé aminokyseliny např. L-glutamin, L-asparagin, glycin nebo adenin. Častěji se používá směs aminokyselin např. ve formě hydrolyzátu kaseinu (15).

3.2.5 Vitamíny

Vitamíny hrají významnou roli v metabolických procesech, protože vystupují jako katalyzátory (4).

Intaktní rostlina je schopná syntetizovat si všechny potřebné vitamíny (4). Explantáty pěstované *in vitro* mohou být obsahem vitamínů v živném médiu limitovány (15).

Mezi více či méně nepostradatelné vitamíny patří thiamin, kyselina nikotinová, myo-inositol a pyridoxin. Obsah myo-inositolu není v živném médiu přímo limitní, ale jeho přítomnost může růst kultury stimulovat (4).

Ostatní vitamíny se přidávají pouze do určitých typů živných médií, protože nejsou limitujícím faktorem růstu (19).

3.2.6 Zdroje uhlíku

Výživa explantátů je oproti intaktní rostlině heterotrofní. Schopnost explantátů vyživovat se autotrofním způsobem je značně omezena, proto je množství organického uhlíku v živném médiu velmi důležité (4).

Nejčastěji se používá sacharóza, glukóza nebo fruktóza. Právě jejich použití vede k lepším výsledkům než přítomnost galaktózy, maltózy nebo laktózy. Sacharóza obsažená v živném médiu se jeví jako univerzální varianta, protože se při sterilizaci média částečně rozštěpí na glukózu a fruktózu. Vzniklou glukózu jsou schopny buňky explantátu ihned využívat (4).

3.2.7 Nedefinované organické složky

Některá média mohou být obohacena o další organické extrakty. Nejčastěji se používá kokosové mléko, kvasničný extrakt a různé druhy ovocných šťáv (4).

Někdy se do média přidává aktivní uhlí, které ale může růst jak stimulovat, tak inhibovat (4). Jeho stimulační vliv byl pozorován na kultuře cibule a mrkve (20,21). Naopak, v kultuře sojových bobů byl pozorován jeho inhibiční vliv. (20).

Schopnost aktivního uhlí ovlivnit růst kultury na obě strany se vysvětluje jeho schopností vázat různé složky média. Dojde-li k absorpci růstových regulátorů, působí aktivní uhlí inhibičním vlivem. Naopak, absorpcí toxických fenolických látek vznikajících při růstu explantátu se vysvětluje jeho stimulační vliv (4).

3.2.8 Složky zpevňující živné médium

Pro zpevnění živného média se nejčastěji používá agar. Díky jeho následujícím vlastnostem je upřednostňován oproti jiným látkám.

Je mísitelný s vodou, geluje v teplotním rozmezí 60-100°C, poskytuje gel stabilní při teplotě 45°C. Vytvořený gel je tedy stabilní při teplotě kultivace rostlinných kultur. K jeho dalším pozitivům se řadí stabilita při kontaktu s rostlinnými enzymy. V neposlední řadě nereaguje s žádnou složkou živného média (22).

Při přípravě se musí věnovat velká pozornost čistotě agaru, protože on sám obsahuje vápník, hořčík draslík a sodík a tím může dojít ke změně koncentrace jednotlivých iontů v médiu (4).

Kromě agaru je možno použít i agarózu, Phytigel nebo Gerlite. Často se také používají můstky z různých materiálů (filtrační papír, polyuretanová pěna) (4).

3.2.9 Typy médií

V současné době se používá velké množství živných médií. Jejich výběr je ovlivněn hlavně druhem kultivované rostliny, protože každá rostlina má jiné požadavky na minerální výživu.

Mezi nejpoužívanější se řadí následující média: (4)

- Murashige and Skoog (MS)
- Gamborg (B5)
- Nitsch and Nitsch (NN)
- Gautheret
- Lloyd and McCown
- Shenk and Hildebrandt (SH)
- Linsmaier and Skoog (23)

3.3 *Dezinfekce a sterilizace*

Procesu dezinfekce a sterilizace se musí při práci věnovat náležitá pozornost. Dlouhodobé udržení kultury je závislé nejen na pravidelném pasážování na nové živné médium, ale také na dodržení podmínek aseptické práce. Jejich dodržení je jedním z nejdůležitějších, ale zároveň i nejproblematictějších úkonů.

Po celou dobu manipulace s explntátovými kulturami se pracuje se sterilními pomůckami ve sterilních podmínkách (4).

Sterilizace pomocí vlhkého tepla má vyšší účinnost než sterilizace suchým teplem (24).

3.3.1 Sterilizace živného média

Metoda sterilizace živného média je závislá na vlastnostech látek obsažených v médiu. Obsahuje-li médium termolabilní součásti, musí se takové médium sterilizovat filtrací. K tomuto účelu se používají speciální membránové filtry o velikosti pórů menší než 0,2 μm . Tyto filtry mohou být jednorázové, dodávané již ve sterilní podobě, nebo se filtry a další potřebné zařízení sterilizuje v autoklávu. Připravený roztok se filtruje v boxu s laminárním prouděním do sterilní nádoby (4).

Jsou-li obsaženy termostabilní součásti, médium se sterilizuje v autoklávu. Doba sterilizace média v autoklávu je závislá na množství média (24).

Často se tyto metody kombinují. Termostabilní složky média se sterilizují v autoklávu, nechají se vychladnout na teplotu 35-45°C. Do takto připraveného média se přidají sterilně zfiltrované termolabilní složky (24).

3.3.2 Příprava matečné rostliny

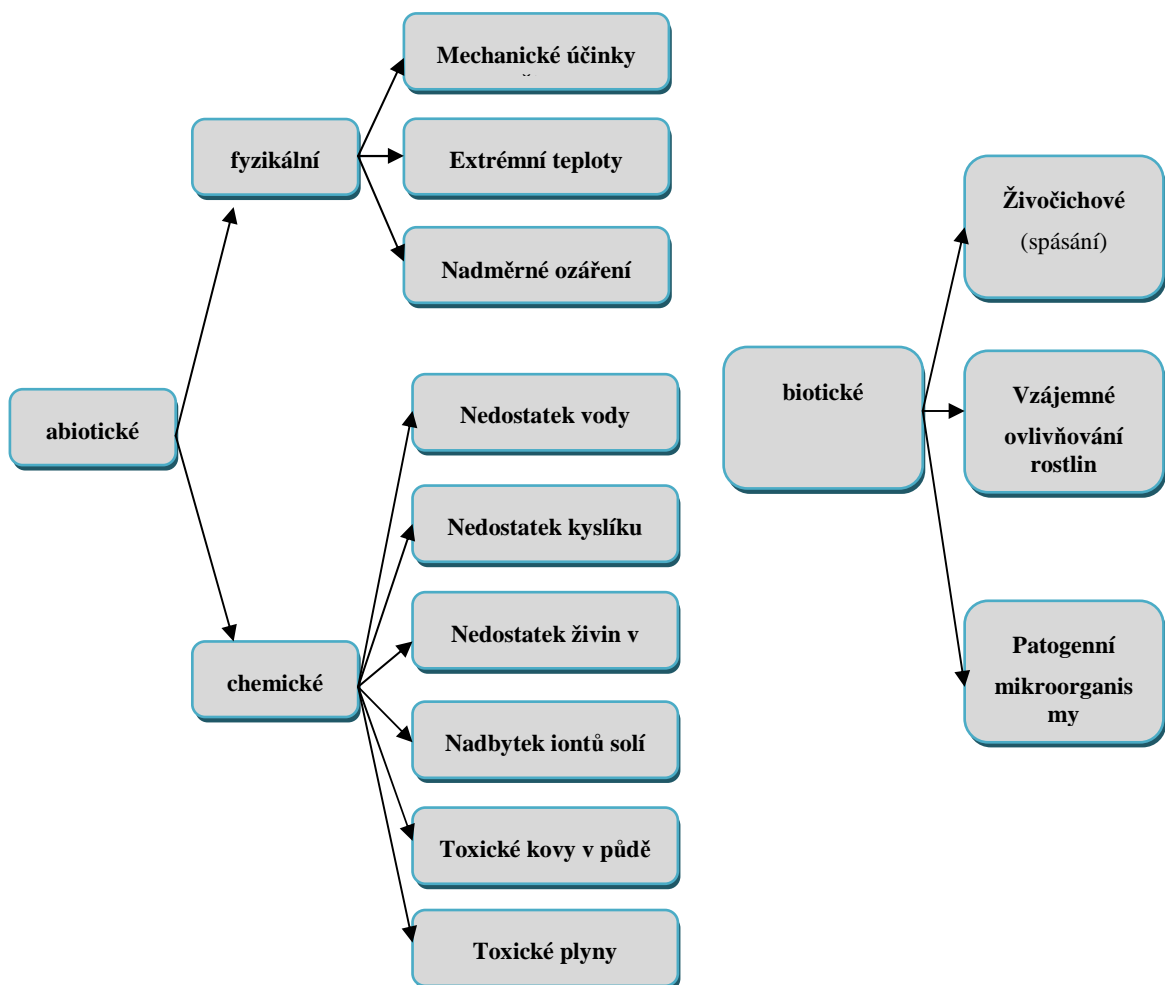
Obecně platí, že rostliny pěstované ve skleníku jsou méně kontaminované než rostliny pocházející z polní kultury (24). Přesto je důležité správně provést povrchovou sterilizaci rostliny.

Rostlinný materiál není možné sterilizovat pomocí vysokých teplot, ale používají se různé dezinfekční roztoky. Použité prostředky nesmí poškozovat rostlinu a její pletiva, ale musí dostatečně účinně ničit bakterie a plísň (4).

3.4 Fyziologie stresu

Rostliny jsou součástí určitého prostředí, které je různým způsobem ovlivňuje. Rostliny nemohou před škodlivými vlivy zevního prostředí nijak uniknout, musí být proto vybaveny systémem ochranných reakcí (16).

Nepříznivé vlivy prostředí se označují jako stresové faktory (stresory). Jejich rozdělení vystihuje následující obrázek.



Obrázek 1: Rozdělení nejdůležitějších stresových faktorů (podle Larchera 1995)

(16)

Při hodnocení vlivu jednotlivých stresových faktorů se většinou uvažuje ideální situace, kdy na rostlinu působí pouze jeden stresový faktor. Často je rostlina vystavena působení několika faktorů najednou (vysoká teplota a nedostatek vody v půdě). Dalším problémem je i fakt, že stresory sice působí pouze na určitou část rostliny, ale aktivované stresové reakce většinou působí na rostlinu jako celek (16).

Mechanismy, kterými rostlina odolává působení stresových faktorů zevního prostředí, se dají rozdělit do dvou následujících skupin: (16)

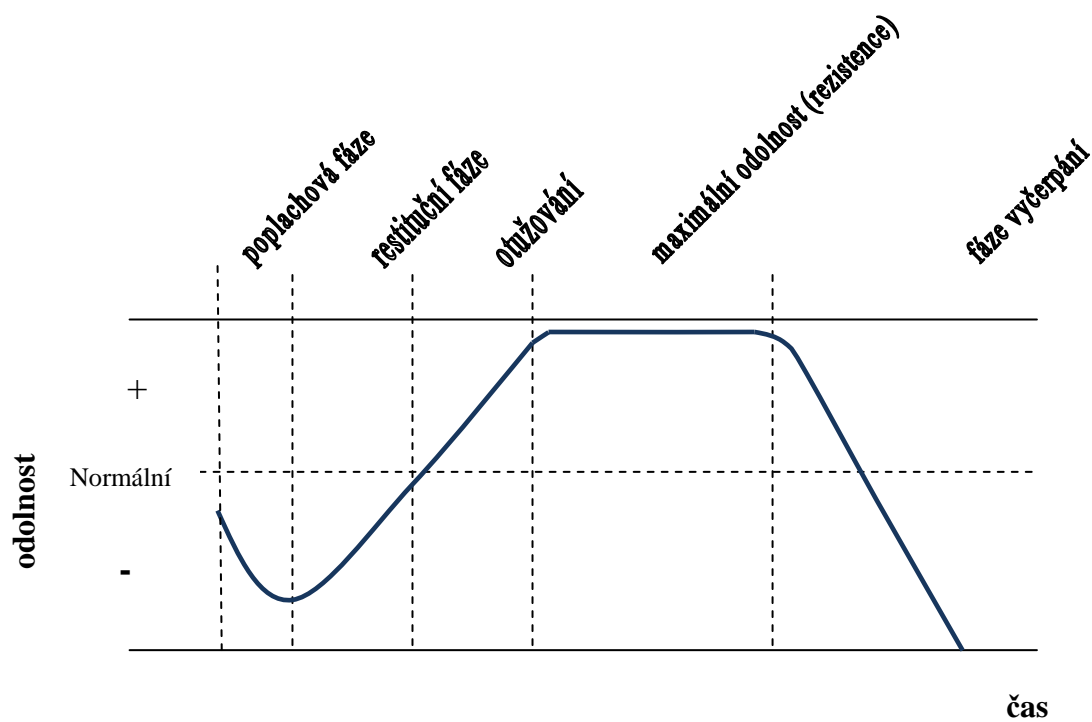
- **Pasivní a mechanismy**- zabraňují působení stresu pomocí mechanické bariéry (silná kutikula, rezervoáry vody).
- **Aktivní mechanismy**- omezují negativní působení stresových faktorů v buňkách a tkáních. Tento proces se obecně označuje jako stresová reakce.

3.4.1 Stresová reakce

Rostliny a živočichové se sice vzájemně liší nejen v anatomii, ale i fyziologií. I přesto můžeme aplikovat na rostliny vystavené stresovému působení obecné schéma stresové reakce (16).

Průběh stresové reakce dělíme na několik fází a jejich průběh zachycuje obrázek 2. Bezprostředně poté, co je rostlina vystavena působení stresových faktorů, se v rostlině aktivují určité obranné mechanismy. Prvně dojde k poškození struktury nebo funkce některých buněčných struktur (tzv. **poplachové fáze**). Tyto faktory mohou působit delší dobu. Vzhledem k tomu, že rostlina nemůže z dosahu působení těchto faktorů nijak utéci, musí aktivovat určité kompenzační mechanismy. Tento stav se označuje jako tzv. **restituční fáze**. Tato fáze nastane pouze, když intenzita stresových faktorů není pro rostlinu letální. Díky aktivovaným kompenzačním mechanismům může být rostlina vystavena působení delší dobu, aniž by to nějak narušilo její integritu. Tento stav se označuje jako **fáze rezistence**. I přes aktivované mechanismy nemůže být rostlina trvale vystavena stresorům. Po určité době dojde k tzv. **fázi vyčerpání** (16).

Celkový průběh a výsledek stresové reakce se odvíjí jednak od délky a intenzity působení stresoru a jednak od stupně vývoje rostliny. Určitou roli zde hrají i rostlinné adaptační schopnosti (16).



Obrázek 2: ideální průběh stresové reakce (16)

3.4.2 Základní mechanismy stresové reakce

3.4.2.1 Stresové proteiny

Pod vlivem stresových faktorů rostlina mění syntézu různých proteinů, ať už z hlediska kvalitativního nebo kvantitativního (16).

K indukci jejich syntézy dochází několika následujícími způsoby: (16)

- zvýšenou teplotou
- chladem
- dehydratací
- sníženou koncentrací kyslíku
- patogeny

3.4.2.2 Aktivní formy kyslíku

V rostlinách mohou sloužit jako signální molekuly aktivující specifické struktury zodpovědné za aktivaci exprese specifických genů (25). Na druhou stranu vznikají v organismu při působení stresových faktorů (16).

Jako produkty běžného metabolismu se kyslíkové radikály tvoří hlavně v chloroplastech a mitochondriích (26).

Vysoká koncentrace těchto reaktivních forem kyslíku způsobuje poškození membránových lipidů, enzymů a nukleových kyselin. Výsledkem působení těchto reaktivních forem je aktivace hypersenzitivní reakce, která vede k apoptóze buňky (27,28).

Aby mohla rostlina udržovat stálost vnitřního prostředí, musí regulovat množství aktivních forem kyslíku. K tomuto účelu je rostlina vybavena antioxidanty, které tvoří dvě skupiny- enzymové a neenzymové (29).

Mezi nejdůležitější neenzymové antioxidanty patří askorbová kyselina, α -tokoferol, karotenoidy a redukovaný glutathion. Druhou skupinu tvoří specializované enzymy, mezi které patří zejména superoxidodismutáza, katalasa, glutathionperoxidáza (29).

3.5 Elicitace

Podstatou elicítace je působení vhodně zvoleného stresového faktoru (elicitoru) na rostlinný explantát. Daný elicitor vyvolá v rostlinném organismu stresovou reakci, která aktivuje enzymatické reakce, vedoucí k produkci sekundárních metabolitů (15).

Elicitor může zvýšit produkci běžně produkovaného metabolitu nebo zapříčiní syntézu metabolitu *de novo* (24).

Tato metoda je středem zájmu mnoha výzkumů. Hledají se nejen kultury, u kterých by se dala metoda elicítace využít, ale i druh a koncentrace daného elicitoru.

3.5.1 Biotické stresy

Na rostlinu působí jak neživé, tak živé součásti přírody. Mezi biotické stresy řadíme stresové faktory způsobené živými organismy.

3.5.1.1 Aleopatie

Rostlina je obklopena dalšími rostlinami, které ji mohou určitým způsobem ovlivňovat. Pod pojmem aleopatie rozumíme ovlivnění okolních (cílových) rostlin účinnými látkami jiné rostliny (zdrojové rostliny) (16).

Zdrojová rostlina musí být proti svému sekundárnímu metabolitu odolnější než cílová rostlina. O tom svědčí i skutečnost, že se setkáváme se souvislými porosty jedné rostliny, ve kterém se jiný rostlinný druh neudrží (16).

3.5.1.2 Interakce s býložravými živočichy

Rostliny si během evolučního vývoje vyvinuly určité obranné mechanismy proti herbivorním živočichům. Rostliny se mohou chránit mechanickým způsobem (trny, velké množství sklerenchymatických pletiv) nebo cestou produkce sekundárních metabolitů (16).

Rostliny mohou obsahovat sekundární metabolity v malém množství, ale vysoce účinné. Patří sem různé alkaloidy, které rostlinu spolehlivě chrání před býložravci. Druhou skupinu tvoří rostliny obsahující sice větší množství účinných látek, které jsou ale méně účinné (16).

3.5.1.3 Patogenní organismy

Rostlina je sice proti působení mikroorganismů chráněna silnou buněčnou stěnou, ale ani ta nemůže působení patogenů odolávat dlouhou dobu. Nejčastěji jsou rostliny napadeny virovou, bakteriální nebo houbovou infekcí (16).

Pro boj s houbovými mikroorganismy jsou rostliny vybaveny několika obrannými mechanismy. Prvním z nich jsou tzv. **preinfekční mechanismy**, které má rostlina k dispozici i když není vystavena působení patogenům (25).

Dalším mechanismem je tzv. **hypersenzitivní reakce**. Po vniknutí patogena do organismu se rostlina snaží zabránit šíření infekce. V místě průniku rychle odumírají buňky, které zabrání přísunu živin k původci infekce a ten postupně odumírá. Hypersenzitivní reakce může být samostatným obranným mechanismem nebo je spouštěcím mechanismem systémových reakcí (25).

Rostlina se také může bránit produkcí určitých obranných látek. Mezi makromolekulární látky řadíme tzv. proteiny vztažené k patogenezí (**PR- proteiny**) nebo **antifungální proteiny** (25).

K obranné reakci může napadená rostlina využít i nízkomolekulární látky. Některé se v rostlině vyskytují běžně, ale v menší míře než při infekci. Jedná se hlavně o flavonoidy, fenolické látky nebo alkaloidy. Souhrnně se takové látky označují jako **fytoncidy** nebo **inhibitiny** (16).

Zvláštní postavení mají tzv. **fytoalexiny**. Jedná se o látky nízkomolekulární povahy, které se v rostlině běžně nenacházejí (16). Jejich produkci stimuluje probíhající infekce patogenem, elicitory nebo fyzikálně chemické podněty (25). Pod pojmem elicitory zde rozumíme specifické metabolity produkované patogenem (exogenní elicitory) nebo látky uvolňující se při kontaktu buněčných stěn patogenu a rostlinné buňky (endogenní elicitory) (16).

Jak rostlina zlepšuje své obranné mechanismy, tak i různé patogeny si vyvíjejí mechanismy, díky kterým lépe proniknou do rostlinné buňky. Patogeny produkují tzv. **supresory**, které potlačí rozvoj hypersenzitivní reakce, produkcí specifických obranných látek (16).

3.5.2 Abiotické stresy

Mezi abiotické stresy řadíme všechny neživé faktory, které jsou schopny v rostlinném organismu vyvolat stres. Podle jejich vlastností se rozdělují do dvou základních skupin, které se dále dělí. Jejich detailní rozdělení vystihuje obrázek 1, následující text popisuje pouze nejvýznamnější abiotické stresy.

Podmínky, které jsou pro jeden druh stresující, mohou pro jiný rostlinný druh znamenat optimální podmínky k růstu.

3.5.2.1 Nedostatek vody

Pokles vody v půdě pod kritickou mez je označovaná jako vodní stres. Pro každou rostlinu je tato kritická hranice různá. Vodní stres se vyskytuje u všech rostlin, ale každá na něj reaguje odlišným způsobem (30).

Rostlina reaguje na nedostatek vody následujícími mechanismy: (16)

- **Změna aktivit enzymů**- některé zvýší svou aktivitu (α -amyláza) a některé ji naopak sníží (nitrátreduktáza).
- **Roste koncentrace kyseliny abscisové (ABA)**- její množství se zvýší až čtyřicetinásobně vlivem zvýšené produkce nebo mobilizací jejích zásob z chloroplastů. K jejímu nárůstu dojde hlavně v listech, kde snižuje výměnu plynů průduchy, což vede k poklesu transpirace a fotosyntézy.
- **Roste syntéza osmoticky aktivních látek** (složitější alkoholy) jejímž úkolem je zvýšit osmotický tlak v buňkách.

Vodní stres také ovlivní množství chlorofylu, karotenoidů (31). V listech vrby byl pozorován nárůst flavonoidů a fenolických kyselin (32).

3.5.2.2 Zasolené půdy a kyselé půdy

Ionty obsažené ve vysoké koncentraci v půdě se hromadí v buňkách rostlin, kde inhibují metabolické procesy. Vysoký podíl iontů je pro většinu rostlin toxický, existují však rostliny, které jsou schopny růst i na vysoce zasolených půdách bez větších problémů (16).

Nadbytek iontů solí v půdě vede k dehydrataci buněk a následné redukci cytoplazmatického objemu buňky (33).

Na poklesu pH půdy se podílí nejen kyselé deště v průmyslových oblastech, špatné hnojení dusíkatými hnojivy a další zemědělské aktivity. Rostliny většinou nejsou poškozeny přímo nízkým pH půdy. Klesající hodnoty pH mají za následek vyplavování důležitých iontů (vápník, hořčík) z půdy nebo zvýšenou rozpustnost iontů, které jsou ve vyšší koncentraci pro rostlinu škodlivé (železo, mangan, hliník) (16).

3.5.2.3 Pokles množství kyslíku v půdě

Jeho obsah je ovlivněn množstvím a velikostí póru v zemině a množstvím aerobních mikroorganismů žijících v půdě. Zde platí přímá úměra: čím větší bude počet a velikost pórů, tím více kyslíku se do půdy dostane. Problém nastává u jílovitých nebo u nadměrně zamokřených půd (16).

Nedostatkem kyslíku trpí rostliny přímo i nepřímo. Problémy nastanou při poklesu kyslíku v intercelulárách pod 2-4 %. Poté dochází ke změně metabolismu z aerobního na anaerobní, zataví se transport elektronů v mitochondriích a citrátový cyklus. Buňka získává energii z glykolýzy a následným odbouráváním pyruvátu anaerobní cestou, což je energeticky málo výhodné a vede k rychlému vyčerpání organických zásob (16).

Nepřímý vliv spočívá v postupné změně složení některých látek v půdě. Pod vlivem nízkého množství kyslíku mění svůj metabolismus nejen rostliny, ale i mikroorganismy žijící v půdě. Mezi nejznámější změny metabolismu patří redukce nitrátů na dusík, síranů na sirovodík a uvolnění škodlivých železnatých, manganatých iontů (16).

3.5.2.4 Toxické látky v prostředí

Rostliny se postupem času musely vyrovnávat s rostoucím množstvím cizorodých látek ve svém okolí. Ať už se jedná o látky plynné v ovzduší nebo o látky pevné, kapalné v půdě.

V posledních letech je nejvíce zmiňovaný oxid siřičitý, který se do ovzduší dostává při spalování fosilních paliv. Proniká průduchy, mění se na siřičitanové anionty a míří do chloroplastů. Při jeho nízké koncentraci se zde siřičitanové ionty inkorporují do organických vazeb, ale ve vyšším množství inhibují enzym Rubisco a následně sekundární část fotosyntézy (16).

3.5.2.5 Ultrazvuk

Ultrazvuk generuje kmity vyšší než 20kHz, které jsou nad hranicí slyšitelnosti (34).

Účinky ultrazvuku na biologické struktury jsou tepelné, mechanické a fyzikálně chemické (35). Uvádí se, že 30 % energie se v tkáních přemění na tepelnou energii. Množství vzniklého tepla je závislé jak na fyzikálním stavu tkání, tak na intenzitě ultrazvuku (34).

Při průchodu ultrazvuku prostředím dochází k tlakovým změnám, jejichž následkem vznikají v tkáních vzduchové bubliny, které kmitají. Jejich objem se zvětšuje i zmenšuje a může dojít i k jejich zániku. Díky těmto procesům vznikají rázové vlny. K poškození tkání dochází nejen vlivem rázových vln, ale i vznikem aktivních kyslíkových forem (36).

Vliv ultrazvuku na biologické struktury závisí na frekvenci (intenzitě) ultrazvuku. Pozitivní působení je spojeno s vysokofrekvenčními ultrazvuky (mají nízkou intenzitu). S rostoucí intenzitou se pozitivní účinky mění v negativní (34).

- **Stimulační účinky** se projevují na buňkách schopných rychlé regenerace (34). Přesný mechanismus není dosud plně znám, ale předpokládá se, že spočívá v urychlení metabolismu (35) nebo ovlivnění propustnosti membrán (34).
- **Inhibiční účinky** lze pozorovat na několika úrovních. Dochází k poškození biopolymerů (enzymy, nukleové kyseliny) a membránových organel (mitochondrie) (34).

3.6 *Fagopyrum esculentum*

3.6.1 Charakteristika

Jedná se o jednoletou, dvouděložnou rostlinu z čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*), rodu *Fagopyrum*. Z lodyhy vyrůstají srdčité převážně celokrajné dlouze řapíkaté listy (37). Květy mají bílou nebo růžovou barvu. Jsou uspořádány do lat vycházejících z úžlabí listů. U pohanky se vyskytuje typický nepoměr mezi tyčinkami, kterých je osm, a okvětních lístků, kterých je pět. Jelikož je rostlina medonosná, nachází se v květu i nektária, která oddělují jednotlivé tyčinky (38). Plod (*Fagopyri semen*) je tvořený tvrdou trojbokou nažkou obsahující jedno semeno (39). Nažky jsou uloženy v tvrdé slupce (oplodí). Na způsobu odstranění oplodí závisí i množství obsahových látek. Nažky se získávají dvěma způsoby: (40)

- **Mechanicky**- živiny jsou zachovány, výsledné zbarvení nažek je světle žluté.
- **Tepelně**- většina živin je zničena a vznikají nažky hnědé barvy.

3.6.2 Původ

Původem je pohanka ze střední a severní části Asie, v oblasti mezi Mandžuskem a Bajkalským jezerem. Odtud se rozšířila do Evropy při nájezdech Mongolů a Tatarů. U nás se pěstovala od 16. století. Není náročná na obsah živin v půdě, proto se pěstovala hlavně na chudých půdách v Beskydech, Karpatech a oblasti východního Slovenska (41).

3.6.3 Odrůdy a jejich výskyt

Některé zdroje rozlišují 2 odrůdy. První druh pochází z oblasti Japonska, Koreje, severní Číny, Nepálu a Indie. Vyznačují se pozdějším dozráváním, vysokým vzrůstem, velkým množstvím listů. Ke správné tvorbě generativních orgánů vyžadují den dlouhý nejméně deset hodin (42).

Druhému typu pohanky stačí pro vytvoření generativních orgánů pouze devíti hodinový osvit. Pěstuje se v Evropě a severní Číně. Je to odrůda raná, nižšího vzrůstu a méně olistěná (42).

Někdy se setkáváme s pohankou tatarskou (*Fagopyrum tartaricum* Gärtner), která je odolnější než pohanka setá (*Fagopyrum esculentum* Moench.). Z tohoto důvodu bývá vysazována do vyšších nadmořských výšek (43).

3.6.4 Obsahové látky

Pohanka obsahuje velké množství biologicky aktivních sloučenin. Některé se využívají ve farmaceutickém průmyslu (rutin), ostatní mají hlavně nutriční význam.

Nažky jsou vyhledávanou plodinou v různých dietních režimech. Obsahují 10 % bílkovin, 65 % škrobu a olejnatou představuje 2,5 % (44).

Plody pohanky jsou bohaté na vitamíny skupiny B, vitamín E a C. Dále obsahuje řadu dalších látek, zejména draslík, hořčík, vápník, fosfor, stopově železo, měď, mangan, zinek, selen (39).

Z lipidů obsahuje nenasycené mastné kyseliny- linolovou a linolenovou, 0,2 % biologicky aktivních sterolů (sitosterol) (45).

Pohanka je vyhledávaným zdrojem flavonoidů. Mezi nejvýznamnější patří rutin, orientin, isorientin, vitelin. Jednotlivé druhy pohanky se vzájemně liší obsahem flavonoidů. Zjistilo se, že jejich obsah je vyšší v druhu *Fagopyrum tartaricum*, než ve *Fagopyrum esculentum*. Obě zmíněné pohanky se obsahem liší čtyřnásobně (43).

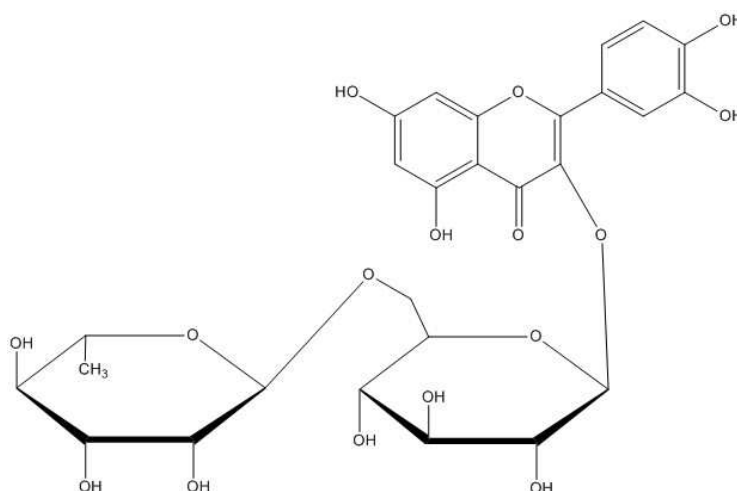
V pohance nejsou obsaženy jen prospěšné látky, ale i potenciálně škodlivé. Zejména fagopyrin, který způsobuje fotosenzitivní reakci. Při slunečním osvitu pokožka zrudne a svědí. Reakce organismu na fagopyrin se označuje jako fagopyrismus (43, 46).

3.6.4.1 Rutin

Rutin je žlutý krystalický prášek nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v metanolu. Při kontaktu se slunečním světlem tmavne, proto se při skladování musí před slunečním zářením chránit (47).

Rutin představuje nejfrekventovanější glykosidickou podobu kvercetinu (48). Chemicky by se rutin dal vyjádřit jako kvercetin-3-rutinosid (49). Jedná se tedy o flavonoidní glykosid, jehož cukernou složku představuje disacharid rutinóza (rhamnóza a glukóza), aglykonem je kvercetin (50,51).

V menší míře je rutin obsažen v různých druzích ovoce, zeleniny. V minulých letech se zjišťovalo, jak významný je obsah rutinu v bezu černém (*Sambucus nigra* L.). Předmětem studie byly hlavně plody, větve a listy. Při ořezávání bezu vzniká odpad ve formě listů a větví, který je bez využití kompostován (52,53).



Obr. 3: Strukturní vzorec rutinu (47,54).

3.6.5 Droga

Drogu představuje řezaná nať (*Fagopyri herba*), která se sbírá na začátku kvetení, před tím, než vytvoří plody. Droga je po sběru ihned usušena. Český lékopis 2009 definuje min. 4% obsah rutinu, počítáno na usušenou drogu (47).

3.6.6 Využití

Léčebně se využívá kvetoucí nať (*Fagopyri herba*) a nažky (*Fagopyri semen*). Někdy se používá i oplodí, ze kterého se připravuje čaj (40).

Rutin se využívá nejen ve farmaceutickém průmyslu, ale je i vhodnou součástí různých dietních režimů. Má celou řadu významných vlastností, ke kterým se řadí hlavně antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné působení (50,51).

Rutin je schopný tlumit tzv. Fantonovu reakci, při které vznikají v organismu reaktivní formy kyslíku, které poškozují tkáň (50,51).

Má také své místo v terapii žilních onemocnění, protože posiluje pevnost žil a zvyšuje jejich elasticitu. Využívá se tedy v terapii hemoroidů, křečových žil, bérkových vředů, při nedokrevnosti končetin. Jeho efekt a cévy není jen terapeutický, ale i preventivní. Snižuje riziko praskání cév, snižuje riziko vzniku náhlé cévní mozkové příhody (37).

Rutin představuje pro farmaceutický průmysl významnou surovinu. Jeho důležitost dokazují data v tabulce 1, která dokladuje množství distribuovaných léčivých přípravků obsahujících rutin a jeho deriváty v České republice za rok 2010 (58,67).

Rutin nemá význam jen farmaceutický, ale i potravinářský. Konzumace pohanky snižuje riziko rakoviny střev. Flavonoidy se vstřebávají v tlustém střevě, kde jsou podrobeny rozkladu. Na něm se podílí mikroorganismy, které enzymaticky odštěpí kvercetin. Aglykon je dále štěpen za vzniku fenolových kyselin (55,56). Tyto kyseliny se špatně resorbují, a proto je jejich koncentrace v tlustém střevě vysoká. Usuzuje se, že právě tato skutečnost může preventivně působit proti kolorektálnímu karcinomu (55).

Ukazuje se, že konzumace pohanky v těhotenství má příznivé účinky na plod. Flavonoidy prostupují placentární bariérou a přispívají ke správnému vývoji nervového systému a mozku (43). Na druhou stranu se v souvislosti s metabolity flavonoidů (polyfenolové kyseliny) zjistilo, že vytváří s nehemovým železem komplexy a snižují tak jeho vstřebatelnost. Snížený příjem železa může být nebezpečný zejména v době těhotenství (57).

Pohanka je také využívána ke snížení hladiny cholesterolu. V porovnání s účinnými látkami získanými ze soji se zjistilo, že pohanka účinněji snižuje hladiny cholesterolu, zejména LDL a VLDL (45).

Neobsahuje lepek, proto je vhodnou potravinou pro pacienty s celiakií (40).

Tabulka 1: Distribuované léčivé přípravky v České republice obsahující rutin a jeho deriváty pro rok 2010 (58,67)

název přípravku	sledovaná LL	množství sledované LL (mg)	Celkem finance/ rok s max. obch. přírůžkou a DPH	množství LL (mg) ve všech baleních za celý rok
ASCORUTIN	rutosidum trihydricum	20	35656060	1151143000
ANAVENOL	rutosidum trihydricum	30	15978943	731061000
WOBENZYM	rutosidum trihydricum	50	232624769	2958986000
PHLOGENZYM	rutosidum trihydricum	100	12304137	163834000
GINKOR FORT	troxerutinum	300	6075150	309141000
CILKANOL	troxerutinum	300	64351033	6182928000
VENORUTON	oxerutinum	300	8353925	793815000
VENORUTON FORTE	oxerutinum	300	32380708	3098085000
			407724726	15388993000

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Přístroje*

- Analytické váhy Sartorius PRLT A 1
- Horkovzdušný sterilizátor, Chirana SVS9/1
- Autokláv, PS 20A Chirana
- Box s laminárním prouděním, Fatran LF
- Sušárna HS 61A Chirana
- Třepačky, IKA KS 260 Basic, Heidolph Pkomax 2020
- Vodní lázeň, typ 1042 GFL
- Ultrazvuková lázeň, typ RX 255H Bandelin Sonorex
- Mikrofiltry 0,45 μ m, Tessek
- Vialky Labicom s.r.o. Olomouc
- Kapalinový chromatograf JASCO AS 2055 Plus
- Kolona Li Chrospher RP-18 125-4, sorbent Li Chrospher 5 μ m
- Předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5 μ m
- Pumpa Jasco PU-2089 Plus
- Termostat kolony Jetstream 2 Plus
- Autosampler Jasco AS-2055 Plus
- Diodový detektor Jasco MD- 2015
- Spínací napájecí zdroj MW7H380 GS Traveler + dvě elektrody

4.2 *Chemikálie*

- Destilovaná voda R
- Ajatin
- Ethanol 96%
- Methanol R 80%
- Ajatin
- Acetonitril R
- Kyselina fosforečná R

4.3 Rostlinný materiál

K praktické části jsem použila kulturu odvozenou ze semene klíčící rostliny *Fagopyrum esculentum* Moench. ve 22.-26. pasáži.

4.4 Složení a příprava živného média

K experimentální části bylo použito živné médium podle Murashigeho Skooga (MS), připravené podle následujícího schématu: (4)

<u>Makroelementy:</u>	<u>g/l</u>
CaCl ₂ ·7H ₂ O	4,40
KNO ₃	19,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,70
NH ₄ NO ₃	16,50
KH ₂ PO ₄	1,70

<u>Mikroelementy:</u>	<u>g/l</u>
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,90
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	11,50
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025

<u>Železnatý komplex</u>	<u>g/l</u>
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,78

Na₂EDTA 3,73

Vitamíny a další složky: g/l

Pyridoxin 0,50

Thiamin 0,10

Kyselina nikotinová 0,50

Sacharoza 30,00

Myo-inositol 0,10

Hydrolyzát kaseinu 1,00

Růstový regulátor: ml/l

2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (2,4-D) 1,00

Podle předepsaného schématu bylo připraveno živné médium navážením jednotlivých složek na analytických vahách. Většina komponent je zastoupena ve velmi malém množství, proto byly připraveny jejich zásobní roztoky, ze kterých se definované množství odměřovalo pipetou. Ke vzniklému roztoku byla dovážena sacharosa, myo-inositol a hydrolyzát kaseinu. K urychlení rozpouštění přidaných látek byla použita ultrazvuková lázeň. Jako stimulant růstu byla v živném médiu zastoupena 2,4-D v koncentraci 1,0 ml na litr roztoku.

Takto připravený roztok byl po 30,0 ml rozdělen do čistých Erlenmayerových baněk. Jejich hrdlo se překrylo hliníkovou fólií a označilo zkratkou živného média (2,4-D).

4.5 Založení kultury

Kultura byla odvozena od semene klíčící rostliny *Fagopyrum esculentum* Moench, které bylo podrobena povrchové sterilizaci následujícím postupem:

- 1-2 min. v 70% roztoku ethanolu
- 15-20 min. v 10% roztoku chloraminu
- 15-20 min. v 10% roztoku Sava
- Závěrečné opláchnutí semen v 70% ethanolu
- Nasazení sterilních semen na živné médium zpevněné agarem

Mezi jednotlivými kroky povrchové sterilizace se semena oplachovala sterilizovanou destilovanou vodou.

Takto založená kultura se kultivovala za definovaných podmínek. Po 4-6 týdnech se vytvořil kalus, který byl dále kultivován.

4.6 Průběh a podmínky kultivace

Ke kultivaci bylo použito čisté, vysterilizované a suché laboratorní sklo.

Do Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml byl umístěn můstek z filtračního papíru a nalito 30 ml MS živného média. Baňky byly uzavřeny zátkou z hliníkové folie a označeny zkratkou názvu kultivačního média. Poté se umístily do autoklávu, kde se podrobily sterilizaci při 121°C, tlaku 100kPa po dobu 15minut.

Práce s kulturami probíhala za aseptických podmínek, aby se snížilo riziko kontaminace virovými, mikrobiálními zárodky. Manipulace proto probíhala v boxu s laminárním prouděním, který byl před pasážováním vydezinfikován roztokem Ajatinu (1:10) a následně vysvícen germicidní UV-zářivkou.

Baňky s kulturami určenými k pasážování se před umístěním do laminárního boxu podrobily povrchové dezinfekci roztokem Ajatinu. Následně se do laminárního boxu umístily vysterilizované pinzety i nové Erlenmayerovy baňky.

Při pasážování se vždy z jednoho narostlého kalusu oddělily 2-3 menší části, které se umístily do nové baňky s můstkem z filtračního papíru a živého média. Vždy se

odebírala světlejší část kalusu, která byla schopna růstu. Hliníkovou folii uzavřené nové baňky se umístily do kultivační místnosti.

Pěstování probíhalo za definovaných podmínek při teplotě 25°C a stálé fotoperiodě nastavené na 16 hodinový osvit a 8 hodinovou tmu.

Další pasážování probíhalo stejným způsobem v intervalu 5 týdnů.

Z narostlého kalusu se připravila suspenzní kultura mechanickým rozdrobením v Erlenmayerově baňce a následným přenesením suspenze do nové baňky. Kultivace suspenzní kultury, vzniklé mechanickým rozdrobením narostlého kalusu, probíhala opět v kultivační místnosti za stejných podmínek jako kalusová kultura. Jediným rozdílem bylo umístění baněk se suspenzní kulturou na třepačky s konstantní rychlostí 150 ot/min.

4.7 Elicitace ultrazvukem

K elicitaci *in vitro* kultur *Fagopyrum esculentum* byl jako abiotický elicitor použit ultrazvuk o výkonu 0,1 W/cm³ a frekvenci 35 kHz.

Celkem bylo pro pokus vybráno 34 baněk se suspenzními kulturami *Fagopyrum esculentum*. Elicitaci bylo podrobena 28 Erlenmayerových baněk, které byly rozděleny podle intervalu odběru vzorku do 7 skupin po 4 baňkách.

Zbýlých 6 baněk tvořilo kontrolní vzorky, které nebyly vystaveny působení ultrazvuky. Tyto kontrolní vzorky byly kultivovány za stejných podmínek jako elicitované buňky suspenzní kultury. Po 24 a 168 hodinách byly odebrány vždy 3 baňky a upraveny stejným způsobem jako elicitované vzorky.

Elicitované suspenzní kultury byly podrobny působení ultrazvuku v intervalu 1, 2, 3, 4 a 5 minut. Ze 4 Erlenmyerových baněk se vzorky buněk suspenzní kultury odebraly ihned po elicitaci, zbylé byly umístěny do kultivační místnosti na třepačky.

Další vzorky se odebíraly postupně v intervalu 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Po uplynutém intervalu se z třepaček v kultivační místnosti odebraly příslušné baňky. Buňky suspenzní kultury se zfiltrovaly přes filtrační papír, řádně se označily a nechaly se sušit za pokojové teploty. Zároveň byl odebrán i vzorek média, který byl pro další analýzu uložen do mrazáku.

4.8 Stanovení obsahu rutinu

4.8.1 Postup stanovení

Vzorky byly před vlastní HPLC analýzou upraveny podle metody v ČL 2005.

Usušené vzorky se důkladně rozdrobily v třecí misce. Ve varné baňce se smísily s 10,0 ml 80% methanolu R a zahřívaly se 30 minut pod zpětným chladičem na vodní lázni při 60°C. Následně byl obsah baňky zfiltrován přes vatu do 20,0 ml odměrné baňky. Vata se znovu extrahovala 5,0 ml 80% methanolu R v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut. Roztok se zfiltroval přes vatu k prvnímu filtrátu do 20,0 ml odměrné baňky. 80% methanolem se odměrná baňky doplnila po rysku a důkladně promísila.

Takto připravený roztok se přefiltroval přes mikrofiltry (0,45 µm). Do připravených a příslušně označených vialek se vpravilo 1,7 ml roztoku.

Vzorky živného média, které se odebíraly současně s buňkami suspenzní kultury, se dále upravily následujícím způsobem. Živné médium se odpažilo do sucha na vodní lázni při 60°C. Vzniklý odparek se rozpustil v 10,0 ml 80% methanolu R a krátce se zahřál na vodní lázni. Takto připravený vzorek se přefiltroval přes mikrofiltry (0,45 µm). Do připravených a řádně označených vialek se opět přefiltrovalo 1,7 ml roztoku.

4.8.2 Vlastní HPLC analýza

Celá HPLC analýza probíhala na kapalinovém chromatografu JASCO AS 2055 Plus s následujícími parametry:

- Kolona Li Chrospher RP-18 125-4, sorbent Li Chrospher 5µm
- Předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5µm
- Pumpa Jasco PU-2089 Plus
- Termostat kolony Jetstream 2 Plus
- Autosampler Jasco AS-2055
- Diodový detektor Jasco MD- 2015
- Spínací napájecí zdroj MW7H380 GS Traveler + dvě elektrody

Parametry analýzy: (47)

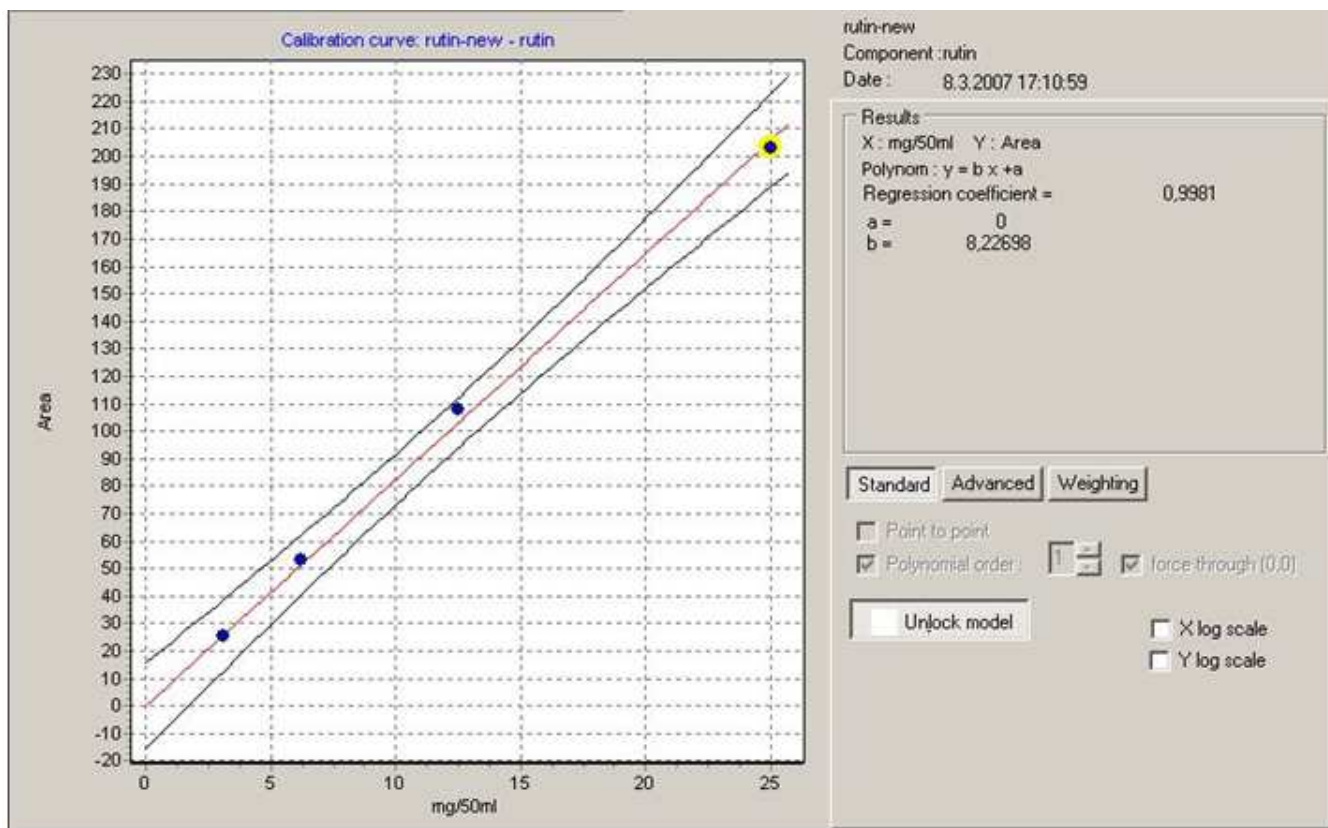
- Mobilní fáze A: směs 5% acetonitrilu R a 0,15% kyseliny fosforečné ve vodě
- Mobilní fáze B: 100% acetonitril
- Standard: Rutin (firma Aldrich)
 - Koncentrace standardů: 25 mg/50 ml; 12,5mg/50ml; 6,25mg/50ml; 3,125 mg/50ml
- Detekce:
 - detektor s fotodiodovým polem
 - $\lambda = 350 \text{ nm}$
- Rychlost nástřiku: 1 ml/min
- Teplota kolony: 25°C
- Množství nastříknutého vzorku: 20 μ l

- Časový průběh analýzy probíhal prvních 6 minut izokraticky, poté gradientově podle tabulky 2

Čas (min)	Mobilní fáze A %	Mobilní fáze B %
0 – 6	96	4
6-16,5	96→80	4→20
16,5-22	80→65	20→35
22-23	65→60	35→40

Tabulka 2: Časový průběh HPLC analýzy

Proměřením definovaných koncentrací standardu rutinu byla sestavena kalibrační křivka, ze které se poté stanovil obsah rutinu v procentech (viz graf 1).



Graf 1: Kalibrační křivka pro stanovení obsahu rutinu

Obsah rutinu byl kvantifikován pomocí metody normalizace a následně porovnán s kalibrační křivkou získanou měřením standartu rutinu.

5 VÝSLEDKY

Tabulka 3: Obsah rutinu (%) v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. po elicitaci ultrazvukem v intervalu 1-5 minut

doba působení ultrazvuku (min)	odběr vzorku (hod)	obsah rutinu (%)	směrodatná odchylka	testovací kritérium
1	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0
2	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0
3	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0

doba působení ultrazvuku (min)	odběr vzorku (hod)	obsah rutinu (%)	směrodatná odchylka	testovací kritérium
4	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0
5	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0

K= kontrolní vzorky (bez elicítace)

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

Tabulka 4: obsah rutinu v médiu (mg/100ml) po elicitaci suspenzní kultury *Fagopyrum esculentum* Moench. ultrazvukem v intervalu 1-5 minut

doba působení ultrazvuku (min)	odběr vzorku (hod)	obsah rutinu (%)	směrodatná odchylka	testovací kritérium
1	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0
2	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0
3	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0

doba působení ultrazvuku (min)	odběr vzorku (hod)	obsah rutinu (%)	směrodatná odchylka	testovací kritérium
4	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0
5	0	0	0	0
	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	168	0	0	0
	168K	0	0	0

K= kontrolní vzorky (bez elicitace)

Vzhledem k nulovým nulovému obsahu rutinu v médiu nemohla být data statisticky zpracována.

6 DISKUZE

Léčiva obsahující látky přírodního původu mají v terapii neustále své místo. V České republice se za rok 2010 použilo pro výrobu léčivých přípravků s rutinem a jeho deriváty přes 15 388 kg léčivé látky. Je zřejmé, že takové množství léčivé látky nelze získávat pouze z polní produkce (58).

Využití biotechnologických metod je jedna z možností, jak zajistit dostatečné množství rostlinných sekundárních metabolitů pro další zpracování. Zajímavou alternativní cestou jsou rostlinné explantátové kultury *in vitro*. Vlastní produkce explantátových kultur je nepatrná, proto se ke zvýšení produkce využívá metoda elicítace (4). Elicitor vyvolá stresovou reakci jejímž výsledkem je zvýšení produkce daných metabolitů (16).

V této práci jsem se zabývala metodou ovlivnění produkce rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. pomocí ultrazvuku ($0,1 \text{ W/cm}^3$, 35 kHz). Bylo sledováno i uvolňování rutinu do živného média. Závěrečná analýza vzorků byla provedena pomocí HPLC.

Použila jsem kulturu *Fagopyrum esculentum* ve 22.-26. pasáži, která byla pěstována na živném médium podle Murashigeho a Skooga za běžné fotoperiody. Růst kultury byl podpořen růstovým regulátorem- dichlorfenoxycetová kyselina (2,4-D) v koncentraci 1 ml/l roztoku. Buňky suspenzní kultury a vzorky média byly odebrány v pravidelných intervalech 5 týdnů. Kultura byla vystavena působení ultrazvuku v časových intervalech 1, 2, 3, 4 a 5 minut. Elicitované buňky byly odebrány v pravidelných časových intervalech 0, 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin od působení ultrazvuku. Kontrolní vzorky (bez elicítace) byly odebrány po 24 a 168 hodinách.

Ze získaných výsledků je zřejmé, že ultrazvuk není vhodným elicitem suspenzní kultury *Fagopyrum esculentum*. Ultrazvuk ($0,1 \text{ W/cm}^3$, 35 kHz) ani v jednom ze sledovaných časových intervalů nevedl k produkci rutinu v buňkách suspenzní kultury (tabulka 3). V rámci pokusu bylo zjišťováno, zda nedochází k uvolňování rutinu do média. Po analýze odebraných vzorků nebyl ani zde zjištěn obsah rutinu (tabulka 4).

Jedním z možných vysvětlení může být stáří použité kultury. Maliňáková L. pracovala se suspenzí kulturou *Fagopyrum esculentum* v 27.-31. pasáži a zjistila, že tato kultura neprodukuje žádný rutin po elicitaci chloridem ceritým (60). Píchová M. ve své práci pracovala s kulturou *Fagopyrum esculentum* ve 3.-10. pasáži, kde byla průměrná produkce rutinu 0,023 % (61).

Důležitý je i výběr vhodného elicitoru. Ze zjištěných výsledků se ukazuje, že ultrazvuk není vhodný elicitor pro suspenzí kulturu *Fagopyrum esculentum*. Pokusy provedené Řimákovou J. na suspenzí kultuře *Glycyrrhiza glabra* ukazují, že u této kultury ultrazvuk neovlivnil produkci saponinů (62).

Jiné studie ukazují, že působení samotného ultrazvuku je účinné v kulturách *in vitro* jiných rostlin. Lin elicitoval kulturu *Panax ginseng* pomocí ultrazvuku a zjistil nárůst saponinů o 75 % (63).

Další možností zvýšení účinku elicitace je kombinace ultrazvuku a chemického elicitoru. Tato metoda byla využita v kultuře *Corylus avellana*, která byla vystavena působení ultrazvuku (40 kHz po dobu 2, 3, 5 a 10 minut) a salicylové kyseliny (25 a 50 mg/l). Byl zkoumán nejprve vliv jednotlivých elicitorů a následně jejich kombinace na produkci taxolu. Výsledky ukazují, že samotný ultrazvuk zvyšuje 3x produkci metabolitů oproti kontrolním vzorkům. Kombinace zmíněných elicitorů způsobila až 14x vyšší produkci celkového taxolu oproti kontrole (64).

V jiné studii použil Wu suspenzí kulturu *Taxus chinensis*, kterou elicitoval kombinací methyljasmonátu a ultrazvuku, aplikovaného před a po přidání chemického elicitoru. Ultrazvuk (38,5 kHz, 2 minuty) byl použit 5. a 9. den kultivace. Methyljasmonát byl aplikován 7. den kultivace. Kombinace ultrazvuku a methyljasmonátu zvýšila produkci až o 50 % (65).

Na základě mnou uvedených výsledků je zřejmé, že ultrazvuk není vhodným elicitem pro ovlivnění produkce rutinu v suspenzí kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench.

Kuncová L. zjistila, že produkce rutinu v suspenzí kultuře *Fagopyrum esculentum* je zvýšena po aplikaci chemického elicitoru- methylviologendichlorid dihydrát (67).

7 ZÁVĚR

- Ultrazvuk ani v jednom ze zvolených časových intervalů nevedl k produkci rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. (22.-26. pasáž).
- Buňky sledované suspenzní kultury neuvolňovaly rutin do živného média ani po elicitaci ultrazvukem.

Produkci rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. by mohly ovlivnit následující faktory:

- jiný elicitor
- kombinace ultrazvuku a chemického elicitoru
- použití mladší kultury

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Hampl F, Paleček J. Farmakochemie. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT; 2002. 17.
2. Iburg A. Lexikon přírodní medicíny: obsahové látky, léčebné účinky, užití. 1. vyd. Dobřejovice: Rebo; 2006. 9-10, 16-17.
3. Namdeo AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Pharmacognosy Reviews*. 2007; 1(1):69–78.
4. Kováč J. Explantátové kultury rostlin. 1. přeprac. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého; 1995. 1-54.
5. Kultivace in vitro [Internet]. [cited 2014 Jan 6]. Available from: http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130p13/navody/11_invitro.pdf
6. Opatrný Z. Z každé buňky nový organismus: Regenerační kompetence rostlin. *Živa*. 2007(2):53–56.
7. Sikyta B. Biotechnologie pro farmaceuty. 3. vyd. Praha: Karolinum; 2001. 75-83.
8. Róth M. Metody kultivace rostlinných explantátů v tekutých médiích. Masarykova Univerzita v Brně. Přírodovědecká fakulta. Brno; 2011.
9. Klouček P, Landa P, Vaněk T. Rostliny in vitro- továrny na léčiva. *Živa*. 2005(6):246–248.
10. Jahodář L. Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty. 2. vyd. Praha: Karolinum; 2000. 30-40
11. Vodrážka Z. Biochemie. 2. oprav. vyd. Academia; 1995.
12. Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*. 2006; 57(1):233–266.

13. Romanovský A. Obecná biologie. 2. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství; 1985. 349-356
14. Fossard R. Tissue culture for plant propagation. Armidale: University of New England; 1976.
15. Torres KC. Tissue culture techniques for horticultural crops. New York, London: Chapman and Hall; 1989.
16. Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J. Fyziologie rostlin. 1. vyd. Academia,; 1998. 102-110, 243-269, 412-430.
17. Poovaiah BW, Reddy ASN, Feldman L. Calcium and Signal Transduction in Plants. Critical Reviews in Plant Sciences. 1993; 12(3):185–211.
18. Lee Y, Lee D-E, Lee H-S, Kim S-K, Lee WS, Kim S-H, et al. Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2011;105(1):9–19.
19. Murashige T. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology. 1974; 25(1):135–166.
20. Fridborg G, Pedersén M, Landström L, Eriksson T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiologia Plantarum. 1978; 43(2):104–106.
21. Fridborg G, Eriksson T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. Physiologia Plantarum. 1975; 34(4):306–308.
22. Pierik R. In vitro culture of higher plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1997.
23. Linsmaier EM, Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 1965; 18(1):100–127.
24. Ponmurugan P, Kumar KS. Applications of plant tissue culture. New Delhi: New Age International; 2012.

25. Prokop M. Jak se rostliny brání napadení houbovými patogeny. *Živa*. 2009; 4:152–153.
26. Scandalios JG. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics*. 1990; 28(1):1–41.
27. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 1994; 79(4):583–593.
28. Delledonne M, Murgia I, Ederle D, Sbicego PF, Biondani A, Polverari A, et al. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002; 40(6–8):605–610.
29. Piterková J, Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P. Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem Listy*. 2005; 99:455–466.
30. Xu Z, Zhou G, Shimizu H. Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling & Behavior*. 2010; 5(6):649–654.
31. Anjum F, Yaseen M, Rasool E, Wahid A, Anjum S. Water stress in barley (*Hordeum vulgare* L.) II. Effect on chemical composition and chlorophyll contents. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 2003; 40(1-2):45–49.
32. Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 1988; 27(4):969–978.
33. Mahajan S, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys*. 2005; 444(2):139–158.
34. Hrazdira I, editor. *Biofyzika: učebnice pro lékařské fakulty*. 2. přeprac. vyd. Praha: Avicenum; 1990. 193-195.
35. Ďoubal S. *Aplikovaná fyzika a biofyzika pro studenty farmacie II*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství; 1990. 57-58.

36. Hrazdira I, Mornstein V. Lékařská biofyzika a přístrojová technika. 1. vyd. Brno: Neptun; 2001. 197-198.
37. Janča J, Zentrich JA. Herbář léčivých rostlin- 4.díl. 1. vyd. Praha: Eminent; 1996. 28-30.
38. Kursanov LI. Botanika. 2.díl. 1. vyd. Praha: Československá akademie věd; 1955. 345-347.
39. Raghuvanshi R, Singh R, Singh R. Nutritional composition of uncommon foods and their role in meeting micronutrient needs. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 2001; 52(4):331–335.
40. Hon Z, Patočka J. Pohanka jako funkční potravina. Kontakt. 2008; 1:229–231.
41. Mladá J, Procházka F. Atlas cizokrajných rostlin. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství; 1987. 250.
42. Petr J, Hradecká J. Grounding of buckwheat and millet productions. Institute of Education of Czech Department of Agriculture; 1997. 5-6.
43. Li SQ, Zhang QH. Advances in the development of functional foods from buckwheat. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2001; 41(6):451–464.
44. Daniel M. Medicinal plants: Chemistry and properties. Science Publishers; 2006. 161.
45. Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, Yamazaki M, Kato N. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-Fed rats because of its low digestibility. The Journal of Nutrition. 1997; 127(7):1395–1400.
46. Hinneburg I, Neubert RHH. Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53(1):3–7.
47. Kolektiv autorů. Český lékopis 2009. 1. vyd. Grada Publishing; 2009. 573, 2069, 3094-3095.

48. Kreft S, Štrukelj B, Gaberščik A, Kreft I. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*. 2002; 53(375):1801–1804.
49. Kolektiv autorů. The Merck index. 14.vyd. ed. Merck Publishing; 2006. 8304.
50. Holiman PCH, Hertog MGL, Katan MB. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*. 1996; 57(1):43–46.
51. Rhodes M, Price K. Identification and analysis of plant phenolic antioxidants. *European Journal of Cancer Prevention*. 1997; 6(6):518–521.
52. Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992; 40(9):1591–1598.
53. Větvička V. *Stromy a keře*. Praha: Aventinum; 2005.
54. Kučera M. *Přírodní léčiva ; Farmakognosie*. 1. vyd. Praha: Avicenum; 1971. 101.
55. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*. 2000; 130(8):2073S–2085S.
56. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 33(2):220–235.
57. Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2002; 56(6):276–282.
58. SUKL. Suhrné informace o cenách a množství distribuovaných léčivých přípravků v jednotlivých čtvrtletích roku 2010 [Internet]. [cited 2013 Nov 17]. Available from: <http://www.sukl.cz/dodavky-leciv-se-zamerenim-na-lecive-pripravky-1>
59. Ganapathi B, Kargi F. Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* (Periwinkle). *Journal of Experimental Botany*. 1990; 41(3):259–267.

60. Maliňáková L. Kultury léčivých rostlin *in vitro*- X. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové; 2008.
61. Píchová M. Růstové a produkční charakteristiky kultury *Fagopyrum esculentum in vitro* I. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové; 2006.
62. Řimáková J. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů kulturami léčivých rostlin *in vitro*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové; 2005.
63. Lin L, Wu J, Ho K-P, Qi S. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2001; 27(8):1147–1152.
64. Rezaei A, Ghanati F, Behmanesh M, Mokhtari-Dizaji M. Ultrasound potentiated salicylic acid–induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2011; 37(11):1938–1947.
65. Wu J, Lin L. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003; 62(2-3):151–155.
66. Kunczová L. Kultury léčivých rostlin *in vitro*- IV. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové; 2006.
67. Souhrn údajů o přípravku. Ascorutin, Anavenol, Wobenzym, Phlogenzym, Cilkanol, Gingor Fort, Venoruton, Venoruton forte

9 ABSTRAKT

V této práci byl studován vliv abiotického elicitoru na produkci rutinu v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench. Kultura byla kultivována na živném médium podle Murashigeho a Skooga s růstovým regulátorem: 2,4-dichlorfenoxyoctovou kyselinou (1 ml/l) Jako abiotický elicitor byl použit ultrazvuk (0,1 W/cm³, 35 kHz) po dobu 1, 2, 3, 4 a 5 minut. Vzorky byly odebírány v intervalu 0, 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin po elicitaci. Kontrolní vzorky (bez působení ultrazvuku) byly odebírány po 24 a 168 hodinách. Obsah rutinu byl analyzován pomocí HPLC.

Buňky suspenzní kultury *Fagopyrum esculentum* Moench. pod vlivem ultrazvuku (0,1 W/cm³, 35 kHz) neprodukovaly rutin. V průběhu pokusu nebylo pozorováno žádné uvolňování rutinu do živného média.

10 ABSTRACT

The object of this study was the influence of abiotic elicitor on the production of rutin in suspension culture of *Fagopyrum esculentum* Moench. The culture was cultivated in Murashige and Skoog nutritive medium with growth regulator: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (1 ml/l). The ultrasound was used as abiotic elicitor (0,1 W/cm³, 35 kHz) for time period of 1, 2, 3, 4 and 5 min. The samples were taken 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours after elicitation. The kontrol samples (without the influence of ultrasound) were taken 24 and 168 hours after elicitation. The amount of rutin was analyzed by HPLC.

Suspension culture of *Fagopyrum esculentum* Moench. didn't produce any rutin under the influence of ultrasound. No release of rutin into the nutritive medium was observed during this study.