

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

---

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VLIV SELENU NA PRODUKCI SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ  
V *IN VITRO* KULTUŘE LÉČIVÝCH ROSTLIN – I**

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

Pověřen vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, PhD.

Hradec Králové, květen 2017

Pavčina Černá

Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení a užitečné rady, PharmDr. Janu Martinovi, PhD. za pomoc při zpracování výsledků pomocí HPLC a celému kolektivu Katedry farmakognozie za vstřícný přístup v průběhu laboratorní 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.

Pavčina Černá

# OBSAH

1	Úvod .....	6
2	Cíl práce.....	7
3	Teoretická část.....	8
3.1	Explantátové kultury rostlin.....	8
3.1.1	Kalusové a suspenzní kultury .....	8
3.1.2	Výhody a nevýhody kultivace <i>in vitro</i> .....	9
3.1.3	Využití explantátových kultur .....	9
3.1.4	Kultivační média.....	10
3.2	Obsahové látky v rostlinách .....	15
3.2.1	Možnosti získávání sekundárních metabolitů.....	17
3.2.2	Metody zvyšování produkce sekundárních metabolitů <i>in vitro</i> .....	18
3.3	Rostliny a stres .....	18
3.3.1	Mechanismy stresové reakce .....	20
3.4	Elicitace.....	21
3.4.1	Ionty těžkých kovů jako elicitory .....	23
3.4.1.1	Selen.....	24
3.5	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.....	27
3.5.1	Charakteristika rostliny.....	27
3.5.2	Původ .....	28
3.5.3	Odrůda Špačinská .....	29
3.5.4	Využití .....	29
3.5.5	Obsahové látky .....	30
3.5.5.1	Rutin.....	31
4	Experimentální část .....	33
4.1	Přístrojové vybavení.....	33
4.2	Chemikálie .....	34
4.3	Biologický materiál.....	35
4.4	Kultivace <i>in vitro</i> .....	35

4.4.1	Složení a příprava kultivačního média.....	35
4.4.2	Založení kalusové kultury.....	36
4.4.3	Průběh kultivace .....	36
4.4.4	Příprava a kultivace suspenzní kultury .....	37
4.5	Elicitace <i>in vitro</i> kultur.....	37
4.5.1	Příprava elicitoru.....	37
4.5.2	Průběh elicitace.....	38
4.6	Stanovení obsahu rutinu .....	39
4.6.1	Příprava extraktů.....	39
4.6.2	HPLC analýza .....	39
4.6.2.1	Ukázka chromatogramu .....	41
4.7	Statistické zpracování výsledků .....	42
5	Výsledky.....	44
5.1	Tabulky .....	44
5.2	Grafy .....	46
6	Diskuze.....	49
7	Závěr.....	54
8	Použitá literatura.....	55
9	Abstrakt .....	61
10	Abstract.....	62

# 1 ÚVOD

Rostliny hrají v životě člověka nezastupitelnou roli. Prostřednictvím procesu fotosyntézy vytvářejí kyslík, jejich produkty využíváme jako zdroj potravy a našly své místo i v průmyslu. Obrovský význam rostlin tkví ale mimo jiné v široké škále možností jejich uplatnění na poli farmacie. Rostlinné léky jsou běžnou součástí moderní medicíny.

Od pradávna se snažíme rozpoznat, které druhy rostlin by mohly být prospěšné a přínosné a jak je co nejvhodněji zpracovat. Pro léčebné účely se dříve používaly celé rostliny nebo jejich části. Poté, co se podařilo určit a izolovat z rostlin vlastní účinné látky, mohly být připravovány daleko efektivnější léčivé přípravky se specifitějšími účinky. Výzkum pokračuje dodnes: hledají se nové látky a zároveň nové indikace pro látky známé.

Rostlinné metabolity lze získávat různými způsoby. Aktuálním cílem je najít metodu relativně jednoduchou a přitom finančně nenáročnou. Ačkoliv se v posledních dekádách obracela pozornost zejména k chemickým syntézám, u řady látek rostlinného původu se nyní hledá ekonomicky přijatelnější alternativa. Výrazný pokrok nejen v oblasti produkce, ale i v rámci studia metabolitů léčivých rostlin umožnil rozvoj biotechnologií, jako je například kultivace rostlinných explantátů v prostředí *in vitro*.

Oproti běžnému pěstování intaktních rostlin nabízí kultivace *in vitro* nesporné výhody. Množství získávaných obsahových látek touto metodou však nemusí dosahovat požadovaných výsledků, a tak se přistupuje k umělému vyvolávání stresových reakcí působením stresoru na explantát. Proces se nazývá elicitace a vede ke zvyšování produkce sekundárních metabolitů v rostlinném materiálu.<sup>1)</sup>

Záměrem této práce je rozšířit knihovnu poznatků vedoucích k efektivní a ekonomicky výhodné produkci sekundárních metabolitů metodou elicitace.

## 2 CÍL PRÁCE

Účelem této diplomové práce je seznámit se s technikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Diplomová práce si dále klade za cíl zjistit vliv abiotického elicitoru selenu na produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum* Moench., varieta Špačinská, a na základě stanovení obsahu rutinu HPLC metodou určit, zda je uvedený elicitor v různých koncentracích schopen ovlivnit produkci této obsahové látky.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Explantátové kultury rostlin

Termín rostlinný explantát označuje materiál rostlinného původu odebraný za účelem kultivace *in vitro*. Explantát může tvořit v podstatě jakýkoliv segment rostliny, nezávisle na stupni jeho diferenciaci. Důvodem je schopnost totipotence rostlinné buňky. To znamená, že každá životaschopná buňka s jádrem obsahujícím veškerou genetickou výbavu může zprostředkovat regeneraci celé matečné rostliny. I specializovanou buňku je tak možné přimět k dediferenciaci a vyvolat její neorganizovaný růst. Jako explantát lze tedy využít rostlinné orgány, část meristematického pletiva, buňky, protoplast či kalus. Zdrojem může být jak intaktní rostlina, tak již existující explantátová kultura. Podmínkou je sterilita výchozího materiálu, jíž dosáhneme aseptickým pěstováním nebo povrchovou sterilizací.<sup>2, 3, 4)</sup>

#### 3.1.1 Kalusové a suspenzní kultury

Rostlinné explantáty můžeme klasifikovat na základě jejich morfologických znaků do několika skupin: kultury orgánové, tkáňové, suspenzní, buněčné a kultury buněčných protoplastů.

Orgánové kultury tvoří dílčí rostlinné orgány, jejich části nebo komplex orgánů, jejichž buňky jsou diferencované a stavba i funkce zůstávají zachovány. Buněčné kultury naopak sestávají z jednotlivých volných buněk kultivovaných v tekutých nebo polotekutých živných půdách, případně na nosiči nasyceném živnou půdou.<sup>4)</sup>

Tkáňové (pletivové, kalusové) kultury představují velké mnohobuněčné agregáty, které jsou částečně soudržné a nejsou morfologicky organizované. K jejich kultivaci se využívají především polotuhá nebo tuhá kultivační média.<sup>4)</sup> Volba vhodného média, obvykle s obsahem auxinů a cytokininů, vede k růstu a dělení neorganizované masy buněk ve formě kalusu. Čerstvě narostlé části kalusu je pak možné opakovaně přenášet na nově připravené půdy a udržovat tak získanou kalusovou kulturu v aktivním stavu. Během tvorby kalusu dochází do určité míry k dediferenciaci, která vede k morfologickým i metabolickým změnám, jako je např. ztráta schopnosti fotosyntézy.<sup>3, 5)</sup>

Tkáňové kultury patří mezi historicky nejdéle používané. Využívaly se například při určování optimálního složení živných médií či ke studiu obsahu rostlinných



fytohormonů v médiích a jejich vlivu na diferenciaci rostlinných orgánů v prostředí *in vitro*. Často slouží jako výchozí objekt při odvozování suspenzních kultur.<sup>6)</sup>

Suspenzní kultury tvoří volné buňky či jejich malé shluky suspendované v tekuté živné půdě. Suspenze se promíchávají a provzdušňují, čímž se zlepšuje dostupnost živin i výměna dýchacích plynů. To vede k velmi rychlému růstu buněčné suspenze. Při delší kultivaci se pak z homogenní kultury stává heterogenní – kromě buněčných agregátů se v suspenzi objevují také protáhlé vakuolizované buňky. K tomuto jevu dochází v důsledku metabolických i genetických změn, jež jsou u suspenzních kultur poměrně časté.<sup>6)</sup>

### 3.1.2 Výhody a nevýhody kultivace *in vitro*

Explantát je kultivován v *in vitro* prostředí, většinou asepticky.<sup>7)</sup> Hlavní výhodou kultivace *in vitro* je možnost regulace podmínek jako je okolní teplota, vlhkost vzduchu, kvalita a množství světla pronikajícího ke kultuře, množství a druh živin v kultivačním médiu a jeho pH, atp.<sup>2, 4)</sup> Tím jednak eliminujeme nežádoucí vliv nestabilního prostředí doprovázejícího klasické polní pěstování (roční období, klimatické podmínky, kvalita půdy, riziko kontaminace), jednak jsme tak schopni lépe sledovat a určovat další vývoj pěstované kultury.<sup>3, 7, 8)</sup> Oproti pěstování celých rostlin pomáhá automatizace a racionální regulace metabolických procesů u *in vitro* kultivace redukovat náklady a zvyšovat produktivitu.<sup>9)</sup>

Kultivace explantátů má však i své slabé stránky. Heterotrofní a mixotrofní systémy vyžadují pro svůj zdárný růst a vývoj živné médium s vysokým obsahem organických látek, kupříkladu vyšší koncentrace sacharidů (alespoň 2 %). To má za následek větší náchylnost systému k mikrobiální kontaminaci. Další nevýhodou explantátové kultivace je obtížná extrapolace dat. Výsledky získané studiem buněčných či tkáňových kultur slouží jen jako modelové a nelze je kompletně uplatnit na vývoj intaktních rostlin.<sup>7)</sup>

### 3.1.3 Využití explantátových kultur

Existuje řada možností, jak využít potenciál explantátových kultur v praxi. Podle Kováče a Hradilíka<sup>2, 6)</sup> se může kultivace explantátů uplatnit:

- jako metoda vegetativního rozmnožování rostlin,
- jako způsob ozdravování rostlin od patogenů virového původu,
- při hybridizaci taxonomicky vzdálených rostlinných druhů,

- jako prostředek pro regulaci procesu oplození,
- při produkci haploidů (při kultivaci prašníků, mikrospor a vajíček),
- při sledování genových a genomových mutací, vznikajících spontánně či indukovaně v buněčných a tkáňových kulturách, a jejich selekci u regenerovaných rostlin,
- při vytváření nových hybridů pomocí řízené fúze protoplastů,
- při inkorporaci cizího genetického materiálu do buněk za účelem modifikace rostlinného genomu,
- jako metoda průmyslové produkce sekundárních metabolitů a jiných biologicky aktivních látek,
- při experimentální morfogenezi v rámci studia integrity rostlin.

Sikyta a Dušek popisují explantátové kultury mimo jiné jako alternativní zdroj produktů získávaných doposud z rostlin v polní kultuře, či z rostlin nespodně pěstovatelných. Dále uvádějí, že je možné na základě změn metabolismu explantátových rostlinných buněk izolovat z explantátu nové látky, které nebyly identifikovány v mateřských rostlinách. V explantátových kulturách také probíhají biotransformační reakce, které umožňují produkovat látky, jež nelze jinak získat chemickou cestou ani mikrobiologicky.<sup>3)</sup>

Pant zdůrazňuje význam explantátové kultivace pro konzervaci ohrožených druhů.<sup>10)</sup>

### 3.1.4 Kultivační média

Vhodné složení kultivačního (živného) média je jedním ze základních předpokladů pro úspěšnou kultivaci explantátu, jeho růst a případnou morfogenezi.<sup>2)</sup> Médium je exogenním zdrojem živin, růstových regulátorů a dalších látek.<sup>11)</sup> Slouží také jako reakční prostředí, v němž se odehrávají různé metabolické pochody. Pro optimální průběh těchto reakcí je zapotřebí udržovat vhodnou konzistenci a aciditu půdy (pH 5,4–5,7).<sup>4)</sup>

Pro různé druhy rostlin a různé účely kultivace byla vytvořena celá řada živných médií, jejichž receptury se liší zejména poměrem mikro a makroelementů.<sup>2, 4)</sup> Mezi nejznámější a zároveň nejpoužívanější patří média, která připravili:

- Murashige a Skoog (1962, MS),
- Linsmaier a Skoog (1965, LS),

- Gamborg et al. (1968, B5),
- Chu (1978, N6),
- Nitsch a Nitsch (1969),
- Lloyd a McCown (1980).<sup>6)</sup>

Výběr živného média se mimo jiné odvíjí od zvoleného způsobu kultivace (heterotrofní, fotomixotrofní nebo fotoautotrofní). Obojí – složení média i způsob kultivace – má vliv na množství a druh metabolitů, jež budou v kultuře produkovány.<sup>3)</sup> Většina kultur se chová heterotroficky, případně mixotroficky (pokud mají přístup ke světlu a vyvinou se u nich chloroplasty). Vedle anorganických látek je tak třeba do média přidávat i látky organické.<sup>7)</sup>

Součástí živného média sloužícího ke kultivaci rostlinných buněk, pletiv či orgánů jsou nejčastěji následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny, další zdroje organického dusíku, sacharidy, nedefinované organické složky, růstové regulátory, aktivní uhlí, antioxidanty, zpevňující látka (v případě přípravy polotuhého či tuhého média), redestilovaná voda a v některých případech pufr.<sup>2, 12, 13)</sup>

### **Makroelementy**

Mezi makroelementy dodávané do kultivačních médií patří šest základních minerálních prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra. Koncentrace každého z nich se liší a mění v závislosti na konkrétních potřebách rostlinného druhu a podmínkách kultivace. Médium dle MS se vyznačuje zvýšeným obsahem dusíku a draslíku.

Dusík je důležitou součástí proteinů a nukleových kyselin a objevuje se například v chlorofylu. Médium by mělo celkem obsahovat 25–60 mM anorganického dusíku, přidávaného v různých podobách. Optimální koncentrace nitrátů, které se ve většině rostlin vyskytují jako jediný zdroj oxidovaného dusíku, se v médiu zpravidla pohybuje v rozmezí 25–40 mM. Dusík v redukované, amoniakální formě se přidává v koncentraci nižší (2–20 mM). Vysoké koncentrace  $\text{NH}_4^+$  v médiu jsou pro kultury toxické a vedly by k nežádoucím změnám pH. Kombinace dusíku v podobě nitrátů a amoniakálních solí často vede k lepšímu růstu kultury než samostatně dodané nitráty. V některých případech je dusík v redukované formě (amoniakální soli, primární aminy, amidy) pro kultivaci nepostradatelný. Jako další zdroj dusíku fungují aminokyseliny a bílkovinné hydrolyzáty.

Draslík je dodáván v podobě dusičnanu nebo chloridu draselného v koncentraci 20–30 mM. Ostatní makroelementy postačí obvykle v koncentracích 1–3 mM.<sup>6)</sup>

## **Mikroelementy**

Skupina mikroelementů přidávaná do živných médií zahrnuje mangan, zinek, bór, měď, nikl, chlór, molybden a v neposlední řadě také železo, jež ale z fyziologického hlediska náleží spíše mezi makroelementy. Další prvky jako např. kobalt, hliník, sodík nebo jód mohou být prospěšné, či dokonce nezbytné při kultivaci určitých druhů rostlin, avšak jejich esenciální význam pro většinu druhů zatím nebyl prokázán. Optimální koncentrace jednotlivých mikroelementů v médiích se liší v rámci rozmezí 0,1–100  $\mu\text{M}$ .<sup>6)</sup>

## **Sacharidy**

Částečná či úplná dediferenciace rostlinného explantátu neumožňuje kulturám získávat organické látky soběstačně pomocí fotosyntézy.<sup>5)</sup> Do médií je tedy nutno dodávat sacharidy jako zdroj energie a uhlíku. Nejčastěji se využívá sacharóza v koncentraci 2–3 %, výjimečně také glukóza či fruktóza. Ostatní sacharidy jako např. maltóza, laktóza či škrob vykazují nižší efektivitu. V médiu a při autoklávování se sacharóza částečně rozkládá na monosacharidy (glukózu a fruktózu). Sacharóza je také schopna ovlivňovat osmotické vlastnosti média.

Sacharidy jsou zdrojem výživy nejen pro pěstovanou kulturu, ale i pro nežádoucí mikroorganismy objevující se při nedostatečné sterilizaci. Mohou tak přispět k rozvoji kontaminace kultur.<sup>6, 14)</sup>

## **Vitamíny**

Vitamíny představují základní součást metabolismu rostlin i živočichů coby katalyzátory celé řady biochemických reakcí. Na rozdíl od intaktních rostlin však kultury *in vitro* nejsou schopny vitamíny syntetizovat v dostatečném množství. Hypovitaminóza pak může způsobit zpomalení či úplné zastavení růstu kultur.

Důležitost suplementace jednotlivých vitamínů se liší v závislosti na druhu rostliny i odvozené kultury. Za nezbytné jsou považovány thiamin v koncentraci 0,1–10,0 mg/l a myo-inositol v koncentraci 50–5000 mg/l. Dalšími, tradičně dodávanými vitamíny jsou kyselina nikotinová (0,1–5,0 mg/l) a pyridoxin (0,1–10,0 mg/l), v malých množstvích také biotin, riboflavin, kyselina askorbová, pantotenová a listová.<sup>6)</sup>

## **Aminokyseliny**

Ačkoliv explantáty produkují dostatek aminokyselin pro pokrytí svých základních potřeb, externí přídavek aminokyselin může stimulovat růst kultury. Nezbytnou součástí média bývají zejména v případě kultivace suspenzí a protoplastů. Poskytují operativně dostupný zdroj dusíku, který je oproti anorganickému navíc kulturou rychleji přijímán.<sup>14)</sup>

Aminokyseliny se dodávají samostatně, či v podobě směsí. Jednotlivé aminokyseliny, např. glycin, L-glutamin, L-asparagin se využívají v koncentraci do 100 mg/l, ve vyšších koncentracích mohou růst explantátu naopak inhibovat. Ze směsí je nejpoužívanější hydrolyzát kaseinu o koncentraci 0,05–0,1 %.<sup>6)</sup> Různé hydrolyzáty se však mohou mírně lišit ve svém složení, a proto se spíše preferuje specifický přídavek samostatných aminokyselin.<sup>13)</sup>

## **Nedefinované organické složky**

Na základě empirických zkušeností je v některých případech výhodné pro stimulaci růstu přidat do média organickou látku s obtížně definovatelným složením, jako jsou např. bílkovinné hydrolyzáty, kvasničné či sladové extrakty, kokosové mléko či ovocné šťávy.

Pozitivní i negativní dopad na růst kultury může mít přídavek aktivního uhlí. Schopnost absorpce je prospěšná, pokud se na povrch aktivního uhlí vychytávají toxické sloučeniny zpomalující vývoj explantátu. Naopak absorpce fytohormonů je nežádoucí. Koncentrace aktivního uhlí, je-li přidáváno, se nachází v rozmezí 0,5–3,0 %.<sup>6)</sup>

## **Složky zpevňující médium**

Konzistenci živného média volíme podle druhu kultivovaného explantátu. V závislosti na množství a druhu přidané zpevňující látky dělíme média na tekutá, polotuhá a tuhá.<sup>11)</sup> Vliv na tuhost média má mimo jiné i pH.<sup>6)</sup> Tuhá média jsou výhodnější v tom případě, chceme-li dosáhnout lepšího kontaktu kultury se vzduchem. U tekutých médií se podobného cíle dosahuje zvýšením koncentrace kyslíku v tekutině či dodáním pevné podpěry, např. můstku z filtračního papíru nebo skleněných kuliček.<sup>12)</sup>

Nejobvyklejší přísadou pro přípravu tuhého média je agar. Získává se z vláken mořských řas a prochází různými procesy k odstranění nečistot. S vodou vytváří gel, který taje při 100°C a tuhne při 45°C, takže je odolný při všech teplotách běžných pro práci s kulturami. Mezi další přednosti agaru patří stabilita při kontaktu s rostlinnými enzymy

a minimální interakce se složkami média. Obsah agaru v médiu se zpravidla pohybuje v rozmezí 0,8–1,0 %.

K výrobě tuhého média se vedle agaru využívají i další látky, např. agaróza, Phytigel či Gelrite v koncentracích 1,25–2,50 g/l. Jejich výhodou je tvorba vysoce čistého gelu, v němž lze snáze rozpoznat případné nečistoty, a snižuje se tak riziko výskytu kontaminace.<sup>6, 12)</sup>

### **Růstové regulátory**

K regulaci vlastního růstu a vývoje si intaktní rostliny vytvářejí fytohormony. Jedná se o molekuly zprostředkovávající chemické signály z místa jejich vzniku do různých částí rostliny. Jsou přítomné v minimálních množstvích a oproti hormonům živočišným se chovají téměř nespecificky. Termín růstové regulátory v kontextu kultivačních médií zahrnuje jak nativní fytohormony, tak synteticky připravené látky. Jako stimulatory růstu obvykle působí auxiny, gibereliny a cytokininy, inhibici růstu zpravidla vyvolávají abscisiny a etylen.<sup>5, 11, 15)</sup> Fytohormony mohou navzájem ovlivňovat své účinky i metabolismus, a je proto důležité sledovat poměry jejich množství v médiu.<sup>12)</sup> Typ a koncentrace používaných fytohormonů závisí na konkrétním účelu kultivace.<sup>13)</sup>

### **Auxiny**

Společnou vlastností auxinů je jejich schopnost indukovat buněčné dělení i růst buněk. Nejvýznamnějším v přírodě se vyskytujícím auxinem je kyselina  $\beta$ -indolyloctová (IAA). Její přítomnost stimuluje zejména prodlužovací růst buněk. Velmi nízká stabilita vůči světlu a teplu však limituje její využití v praxi. Mezi nejpoužívanější syntetické analogy IAA se řadí kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), která podporuje formování kalusu, či kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA).<sup>5, 11, 15)</sup>

### **Cytokininy**

Přirozené cytokininy jsou deriváty adeninu. V přítomnosti auxinů stimulují buněčné dělení. Vyskytuje-li se v *in vitro* kultuře větší množství cytokininů než auxinů, je iniciována diferenciace pupenů, v opačném poměru je podporována diferenciace kořenů. Po nalezení určité rovnováhy mezi auxiny a cytokininy dochází ke stimulaci růstu nediferencovaného kalusu. Z nativních cytokininů se omezeně používají zeatin a isopentenyladenin (2iP). Vzhledem k jejich vysoké ceně a relativní nestabilitě se však

dává přednost jejich syntetickým analogům furfurylaminopurinu (kinetinu) a benzylaminopurinu (BAP). Cytokininovou aktivitou se vyznačují i některé deriváty močoviny (substituovaná fenylureáza).<sup>5, 7, 11)</sup>

### ***Gibereliny***

V současné době je známo několik desítek různých giberelinů. Strukturálně patří mezi diterpeny. Účinek giberelinu se projeví jen v přítomnosti auxinu. V praxi se využívá především GA<sub>3</sub>, kyselina giberelinová. Do média je přidávána za účelem stimulace růstu buněčných kultur, kalusu či zakrslých rostlin.<sup>6, 11)</sup>

### ***Abscisiny***

Mezi abscisiny vyniká kyselina abscisová (ABA), která se v rostlinách účastní procesu dormance a odlučování listů a plodů. V *in vitro* kulturách se chová jako růstový stimulant i retardant. Nachází uplatnění např. při regulaci embryogeneze.<sup>11, 12, 13)</sup>

### ***Etylen***

Etylen je látka plynného skupenství, která se přirozeně vyskytuje v rostlinách jako růstový regulátor a uplatňuje se při zrání ovoce a opadu listů. Je-li ve větším množství produkován v *in vitro* kultuře, funguje jako inhibitor růstu a vývoje kultury. V takovém případě je potřeba zajistit dostatečnou výměnu plynů mezi okolním prostředím a atmosférou v uzavřené nádobě s kulturou.<sup>5)</sup>

## **3.2 Obsahové látky v rostlinách**

Podle funkce v biochemických procesech dělíme všechny známé obsahové látky rostlin do dvou hlavních skupin. Menší skupinu tvoří primární metabolity, zatímco metabolity sekundární představují více než 99 % známých rostlinných látek.<sup>16)</sup>

Jako primární metabolity se označují jednoduché nízkomolekulární látky (karboxylové kyseliny, aminokyseliny, sacharidy apod.), které vznikají jako produkty reakcí primárního metabolismu, např. glykolýzy, Krebsova cyklu či pentózového cyklu. Nacházejí se ve všech rostlinných buňkách a zajišťují veškeré základní anabolické i katabolické procesy. Inhibice těchto životně důležitých procesů nebo ireverzibilní změna optimální koncentrace primárních metabolitů vede k odumření rostliny. Řada z nich slouží jako výchozí látky v reakcích sekundárního metabolismu.<sup>8, 16)</sup>

Sekundární metabolity se netvoří v každé rostlinné buňce a nejsou pro rostlinu zpravidla bezprostředně nepostradatelné. Jejich produkce je podmíněna přítomností komplexu enzymů, jež umožňují biosyntézu většinou složitějších struktur. Jednotlivé specializované enzymy se však nevyskytují ve všech rostlinách, a proto se různé čeledi, rody či druhy rostlin liší v kvantitativním i kvalitativním zastoupení sekundárních metabolitů. Variabilita může existovat i v rámci rostlinných částí jedince.<sup>16)</sup>

Pro sekundární metabolity je charakteristická různorodost chemických struktur. Přesto se však na základě chemické příbuznosti a vlastností dají uspořádat do 3 hlavních skupin: terpeny, fenolické sloučeniny a sloučeniny obsahující dusík.<sup>2, 17)</sup>

Význam sekundárních metabolitů pro rostlinu nebyl dlouhou dobu objasněn. V současnosti jsou považované za důležité faktory pro přežití rostlin. Účastní se interakcí rostliny s živočichy, jinými rostlinami, mikroorganismy a složkami prostředí. Sekundární metabolity slouží v rostlině především jako:

- obrana
  - před býložravci: jako odpověď na působení proteinů ze zvířecích slin vytváří rostlina např. hořké látky, nebo látky schopné denaturovat proteiny a poškodit sliznici ústní dutiny či trávicího traktu, které živočicha odradí od další konzumace rostliny; obranné látky, jež rostlina produkuje nezávisle na poškození pletiva, bývají často velmi toxické;
  - před hmyzem, mikroorganismy;
  - potlačení růstu jiných druhů rostlin v okolí vylučováním obranných látek do půdy či ovzduší (alelopatie);
- atraktanty
  - lákání opylovačů;
  - chuť plodů vybízí živočichy ke konzumaci, skrze výkaly konzumenta se poté šíří semena rostlin;
  - symbióza rostlin s hmyzem či bakteriemi;
- nositelé informace
  - při poškození pletiva vylučuje rostlina do okolí prchavé látky, rostliny stejného druhu je skrze speciální receptory vycítávají a na základě daného signálu začínají produkovat vlastní ochranné látky;
- ochrana před abiotickým stresem
  - např. UV záření, vysoké teploty.<sup>16)</sup>



Sekundární metabolity vyšších rostlin se prakticky dají využít ve farmacii jako léčiva, esenciální oleje, v potravinářství jako aditiva, sladidla, vonné látky, barviva, v zemědělství jako agrochemikálie a biopesticidy.<sup>6, 18)</sup>

### 3.2.1 Možnosti získávání sekundárních metabolitů

Poptávka po sekundárních metabolitech rostlin se zvyšuje a je třeba uvažovat nad nejvýhodnějším způsobem jejich získávání. Tradiční metodou je přímá extrakce metabolitů z intaktních rostlin. Produkce metabolitů klasicky pěstovanými rostlinami je však vysoce závislá na klimatických podmínkách, výtěžek se odvíjí také od postupu sušení a skladování rostlin a pěstování je samo o sobě finančně náročný proces. Jinou metodu představují chemické syntézy, které jsou vyvíjeny s cílem získat sloučeniny shodné s rostlinnými produkty, nebo jejich deriváty s podobnými vlastnostmi. Syntézy jsou však často složité, drahé a u komplexnějších sloučenin zatím neproveditelné.<sup>1, 2)</sup>

Jako slibná alternativa pro výrobu látek, které se jen obtížně získávají tradiční extrakcí či chemickou syntézou, se jeví využití explantátových kultur.<sup>1)</sup> Na základě principu totipotence lze předpokládat, že i kompletně dediferencovaná rostlinná buňka je částečně schopná fungovat jako buňka specializovaná. Buňky explantátové kultury by tedy měly obsahovat i tu genetickou informaci, která podmiňuje tvorbu a akumulaci sekundárních metabolitů typických pro matečnou rostlinu.<sup>8, 19)</sup>

Nastávají však situace, kdy se v *in vitro* kulturách předpokládané metabolity netvoří, nebo naopak vznikají látky netypické pro intaktní rostlinu. Tyto jevy jsou vysvětlovány mutacemi nebo ztrátou různých genů řídících biosyntézu, potlačením vzniku a aktivity potřebných enzymů, či vytvořením specifických buněčných struktur.<sup>4)</sup>

Uvádí se, že aktivita sekundárního metabolismu se zvyšuje při procesech jako je cytodiferenciace, buněčné agregace a morfologická organizace, které zpomalují růst. Mnohdy však růst, syntéza a akumulace sekundárních metabolitů probíhají souběžně a inverzní vztah mezi růstem a produkcí sekundárních metabolitů tedy není jednoznačný.<sup>4, 6)</sup>

Cílem současného výzkumu v oblasti produkce sekundárních metabolitů pomocí explantátových kultur je dosažení komplexní syntézy žádaných produktů z dodaných živin.<sup>2)</sup> Navzdory dlouholeté snaze o zdokonalení čelí však *in vitro* metody stále řadě biologických a biotechnologických překážek.<sup>1)</sup> Úspěšně bylo dosud do průmyslové výroby

dovedeno jen několik kultur, jedná se např. o produkci shikoninu buněčnou kulturou *Lithospermum erythrorhizon*, či výrobu berberinu kulturou druhu *Coptis japonica*.<sup>20)</sup>

### 3.2.2 Metody zvyšování produkce sekundárních metabolitů *in vitro*

Jeden z hlavních problémů využití *in vitro* kultur pro produkci sekundárních metabolitů je nízký výtěžek. Vyvíjí se proto strategie, které by přispěly ke zvýšení jejich produkce:

- selektují se vhodné druhy mateřských rostlin a buněčné linie s vysokým obsahem žádaných metabolitů,
- optimalizuje se složení média a podmínky kultivace,
- přidávají se prekurzory, které produkci sekundárních metabolitů v kulturách iniciují,
- zkouší se zvyšování permeability vakuol a buněčných stěn za účelem zvýšení uvolňování metabolitů do média,
- pomocí biotransformačních reakcí vytvářejí kultury z dodaných substrátů výsledné, žádané produkty,
- imobilizace buněk určitými činidly nebo umístěním na nosič a následná kultivace v bioreaktorech prokazatelně přispívá ke zvýšení produkce metabolitů,<sup>2)</sup>
- perspektivně se jeví metoda elicítace, jejíž princip vychází z původní funkce metabolitů v rostlině, tj. především ochrany rostliny před vlivem stresových faktorů,<sup>1)</sup>
- a další.<sup>18)</sup>

## 3.3 Rostliny a stres

Stres je obvykle definován jako vnější faktor, který nepříznivým způsobem ovlivňuje homeostázu organismu.<sup>21)</sup>

Na rozdíl od živočichů postrádají rostliny schopnost se stresovému faktoru vzdát či vyhnout. Musejí být proto vybaveny prostředky, které jim usnadní přizpůsobit se i nepřátelským podmínkám.

Prostředí, v němž se rostlina nachází, zasahuje do jejího růstu a vývoje skrze množství biotických a abiotických faktorů. Biotické faktory jsou výsledkem interakce s jiným živým organismem a zahrnují např. infekci, mechanické poškození (konzumace

býložravci, pošlapávání), symbiózu či parazitizmus. Mezi hlavní abiotické faktory patří teplota, vlhkost, intenzita světla, zásoba vody, minerálů a oxidu uhličitého. V širším měřítku mezi ně můžeme zařadit také částečně prospěšné vlivy, jako je vítr coby distributor semen a pylu, ale i vlivy kompletně škodlivé, např. ionizující záření či polutanty.

Efekt všech faktorů závisí na jejich množství a na době působení. Faktory prostředí v dávce vyvolávající v rostlinách stresovou reakci nazýváme stresové faktory. Organismy jsou většinou vystavovány několika stresovým faktorům zároveň.

Optimální intenzita a koncentrace faktorů prostředí se liší jak mezidruhově, tak v rámci různých orgánů jednoho organismu. Jako škodliviny označujeme látky, které vyvolají stresovou reakci při jejich aplikaci v jakékoliv dávce. Jedná se o např. o UV-B, ozón, ionizující záření, některé těžké kovy, potažmo také elektrické a silné magnetické pole.

Rostlina se může adaptovat danému prostředí dvěma způsoby – pasivně a aktivně. Při dlouhodobém kontaktu se stresorem si rostlina vyvine různé prvky pasivní ochrany, které zabrání dalšímu pronikání stresoru k rostlině. Jedná se např. o uzavírání stomat a tvorbu rezervoárů oxidu uhličitého jako prevenci před působením horka a sucha, či tvorbu mechanické bariéry jako je kutikula a trichomy. Jinou cestu adaptace představuje vytvoření vnitřní tolerance, kdy je přítomnému stresoru kladen aktivní odpor v momentě jeho působení pomocí různých biochemických procesů.<sup>17, 22)</sup>

Aktivní odpověď rostliny na stresový podnět můžeme rozdělit do několika fází:

- poplachová fáze – buněčné struktury a jejich funkce jsou narušeny vlivem stresoru,
- restituční fáze – rostlina mobilizuje kompenzační mechanismy,
- rezistenční fáze – odolnost rostliny vůči stresu se zvyšuje,
- fáze vyčerpání – nastává v případě dlouhodobého a intenzivního působení stresoru, odolnost rostliny se postupně snižuje.

Ve většině případů, kdy způsobené škody nejsou příliš závažné, je rostlina schopná regenerace. Přemíra stresového působení však může vést až k úhynu rostliny.<sup>22)</sup>

### 3.3.1 Mechanizmy stresové reakce

Pokud je organizmus vystaven stresu, zvyšuje se činnost jeho metabolismu a paralelně probíhají reakce, které se za běžných podmínek v organizmu odehrávají minimálně nebo vůbec. Tyto stresové a adaptivní reakce jsou částečně specifické a částečně nespecifické.<sup>17)</sup> Univerzální model stresové reakce zřejmě neexistuje, lze však najít řadu společných prvků, které vedou ke zvýšení rezistence rostliny vůči několika různým stresovým faktorům současně. Řadíme mezi ně následující procesy:

- produkce stresových proteinů,
- tvorba a odstraňování aktivních forem kyslíku,
- syntéza stresových fytohormonů,
- tvorba osmoregulačních sloučenin (cukry, polyalkoholy, jednoduché dusíkaté látky).<sup>22)</sup>

#### **Stresové proteiny**

Jedná se o proteiny, které se běžně v rostlinné buňce nevyskytují. Tvorba většiny z nich je specificky podmíněna působením určitého stresového faktoru.

Nespecifické stresové proteiny se mohou naopak objevovat v reakci na více druhů stresorů. Patří mezi ně zejména molekulární chaperony, proteázy a ubikvitin, které jsou zpravidla součástí obvyklé výbavy buněk všech genotypů. V rámci stresové reakce se však jejich tvorba mnohonásobně zvyšuje jako kompenzace za stresem poškozené proteiny v různých buněčných strukturách.<sup>22)</sup> Chaperony zajišťují správné prostorové uspořádání funkčních i mírně poškozených proteinů a jejich transport přes buněčné membrány. Ubikvitin slouží jako marker ireverzibilně narušených proteinů. Proteázy pak ubikvitinem označené proteiny likvidují a ze vzniklých aminokyselin se syntetizují nové bílkoviny.

Stresové proteiny se obecně sdružují pod názvem „heat shock proteins“ neboli proteiny teplotního šoku (zkratka hsp). Ačkoliv název odkazuje především na proteiny indukované zvýšenou teplotou, řadíme mezi ně také proteiny reagující na chlad, těžké kovy, ozón, osmotický a oxidativní stres, apod.<sup>21)</sup>

#### **Aktivní formy kyslíku**

Některé procesy v rostlinách vedou k přeměně molekulárního atmosférického kyslíku, jehož reaktivita je relativně nízká, na výrazně aktivnější formy. To má pozitivní i negativní dopad. Nežádoucí je peroxidace lipidů, kterou aktivní formy kyslíku vyvolávají.

Naopak v některých případech se aktivní formy kyslíku účastní stresových situací jako prostředek ochrany rostliny či signalizace. Udržování správné, pro rostlinu prospěšné hladiny aktivních forem kyslíku zajišťují specializované enzymy a antioxidační substráty.<sup>22)</sup>

### **Fytohormony**

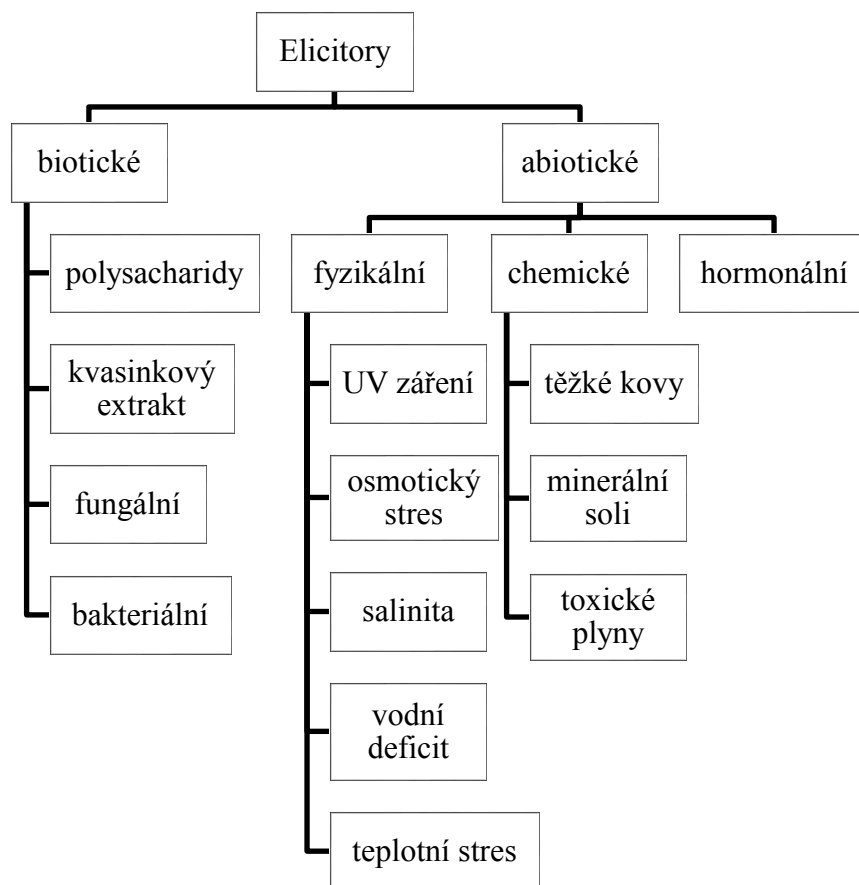
Fytohormony zde slouží především jako signální molekuly, které v cílových strukturách vyvolávají syntézu enzymů, jež se dále uplatňují při stresové reakci.<sup>17)</sup> Patří sem kyselina abscisová, etylen, kyselina jasmonová, metyljasmonát a polyaminy. Jejich syntéza se po expozici stresoru výrazně zvyšuje. Výsledkem jejich působení může být stimulace tvorby stresových proteinů, ale i zpomalení růstu rostliny.<sup>22)</sup>

## **3.4 Elicitace**

Pojem elicitor je definován jako substance, jejíž přítomnost v malých koncentracích v živém buněčném systému iniciuje nebo zlepšuje biosyntézu specifických sloučenin. Elicitace je biosyntéza metabolitů vyvolaná nebo podpořená přidavkem stopového množství elicitoru.<sup>20)</sup>

Podle povahy se elicitory dají rozdělit na biotické a abiotické, jejich základní přehled znázorňuje schéma (obrázek č. 1). Mohou vznikat exogenně i endogenně.<sup>20)</sup> Abiotické elicitory zahrnují látky nebiologického původu a jedná se o faktory fyzikální, chemické a hormonální. Naproti tomu biotické elicitory mají biologický původ a patří mezi ně polysacharidy pocházející z rostlinných buněčných stěn (např. chitin, pektin, celulóza) a produkty mikroorganismů.<sup>23)</sup>

Obr. č. 1: Klasifikace elicitorů založená na jejich povaze.<sup>23)</sup>



Je zřejmé, že vlivem elicitoru dochází v rostlině či v kultuře *in vitro* k akumulaci fytoalexinů a dalším fyziologickým a morfologickým změnám. Mechanismus elicitace je však velmi komplexní a často se liší v rámci různých elicitorů a podmínek, není proto dosud plně objasněn.<sup>20)</sup>

Úspěch elicitační metody při zvyšování nebo iniciaci produkce sekundárních metabolitů v kultuře závisí na řadě faktorů. Musí být aplikován elicitor o optimální koncentraci, který vykazuje selektivitu k dané kultuře. Důležité je také určit dobu, po níž bude kultura elicitoru vystavena. Záleží i na stáří kultury, použité buněčné linii a kvalitě buněčných stěn. Výsledky může výrazně ovlivnit složení živného média, podmínky kultivace a přítomnost růstových regulátorů.<sup>23)</sup>

### 3.4.1 Ionty těžkých kovů jako elicitory

Pojem těžké kovy zahrnuje skupinu přirozeně se vyskytujících stopových prvků s určitými vlastnostmi. Řadíme mezi ně nejen kovy (rtuť, měď, olovo, hliník), ale i polokovy (arzen, telur) a nekovy (bór, chlór, síra). Existují v elementární formě nebo jako součást rozmanitých sloučenin. Většina z nich jsou více či méně toxické látky, které mají tendenci se v organismech akumulovat. V různých koncentracích jsou přítomné ve všech ekosystémech, avšak lidská činnost jejich hladiny drasticky mění, a tak se těžké kovy stávají jedním z hlavních abiotických stresových faktorů pro živé organismy. Mezi hlavní antropogenní zdroje těžkých kovů patří řada průmyslových procesů, spalování fosilních paliv či umělá hnojiva a pesticidy v zemědělství.<sup>24, 25, 26)</sup>

Kovy jako zinek, železo a měď jsou esenciálními mikronutrienty, které se v rostlinných orgánech účastní široké škály fyziologických procesů týkajících se aktivity enzymů a proteinů na kovech závislých. Zvýšené hladiny těchto kovů však mohou působit toxicky. Naproti tomu arzen, rtuť, kadmium či olovo nejsou pro organismus esenciální a vyznačují se potenciálně vysokou toxicitou. Jakmile koncentrace těžkých kovů v cytosolu překlene určitou hranici, inhibují se transpirační a fotosyntetické procesy, naruší se metabolismus sacharidů a vyvolá se další stres, např. nutriční či oxidativní.<sup>27)</sup>

Přítomnost těžkých kovů se projeví zejména potlačením růstu rostlin a stimulací procesu stárnutí.<sup>25)</sup> Součástí mechanismů stresových reakcí je kromě tvorby stresových proteinů (izoenzymy, proteázy, ubikvitin) také syntéza specifických sloučenin – fytochelatinů. Jedná se o polypeptidy s malou molekulovou hmotností, strukturálně příbuzné glutationu. Vytvářejí s těžkými kovy chelátové komplexy a tím je inaktivují. Komplexy jsou dále zpracovány ve vakuolách za přítomnosti organických kyselin.<sup>22)</sup>

Řada studií se zabývá působením těžkých kovů na rostliny a rostlinné kultury *in vitro* a jejich potenciálním využitím jako elictorů ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů.

Bylo zjištěno, že přidavek manganu, niklu, olova a kadmia v dávce 5 mM vede ke zvýšené akumulaci alkaloidů, zejména serpentinu, v rostlině *Catharanthus roseus*, aniž by docházelo k výrazným změnám v objemu biomasy.<sup>28)</sup>

Studie Kašparové a Siatky ukázala pozitivní vliv elicítace těžkými kovy na produkci anthracenových derivátů v explantátové kultuře *Rheum palmatum* L. Jako nejúčinnější se jevily chlorid kademnatý o koncentraci 10  $\mu$ M po 48 hodinách a chlorid

hlinitý o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  po 6 hodinách působení na suspenzní kulturu. Nárůst obsahu derivátů oproti kontrolní kultuře činil 66 % v případě kadmia a 60 % v případě hliníku.<sup>29)</sup>

Cai et al. zkoumali efekt iontů těžkých kovů (kobaltnatých, stříbrných a kademnatých) v různých koncentracích na viabilitu buněk a produkci antokyanů a kyseliny fenolové v suspenzních kulturách *Vitis vinifera*. Kobalt ve všech třech použitých koncentracích (5, 25 a 50  $\mu\text{M}$ ) a stříbro a kadmium v nízkých koncentracích (5  $\mu\text{M}$ ) nejlépe stimulovali produkci kyseliny fenolové za současného zvýšení hladiny 3-*O*-glukosyl-resveratrolu po 4 hodinách působení. Přitom nedošlo k inhibici buněčného růstu a buněčná viabilita zůstala zachována. Vyšší koncentrace stříbra a kadmia (25 a 50  $\mu\text{M}$ ) působící po 24 hodin naopak vedly k významnému snížení životaschopnosti buněk až o 15% oproti kontrolním vzorkům. Těžké kovy neovlivnily produkci antokyanů.<sup>25)</sup>

Huang a Zhong porovnávali účinnost sloučenin vanadu, niklu, mědi a manganu při zvyšování produkce ginsenosidů v suspenzní kultuře *Panax ginseng*. Nejlepších výsledků dosáhl vanadičnan o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  po 4 dnech působení.<sup>30)</sup>

Rai et al. ve své studii hodnotili efekt kadmia v různých koncentracích na růst, změny v morfologii listu a produkci sekundárních metabolitů v rostlině *Phyllanthus amarus* Schum. a Thonn. Ačkoliv mělo kadmium veskrze negativní dopad např. na délku kořenů a výhonků, hladinu chlorofylu, karotenoidů a dalších látek, u terapeuticky využitelných sloučenin fylantinu a hypofylantinu byl pod vlivem určitých koncentrací kadmia zaznamenán žádoucí nárůst produkce.<sup>31)</sup>

### 3.4.1.1 Selen

Selen (selenium) je chemický prvek se symbolem Se a atomovým číslem 34. Objevil ho v roce 1818 švédský chemik Jöns Jacob Berzelius. Společně s kyslíkem, sírou a tellurem se selen řadí do skupiny chalkogenů. Jeho chemické a fyzikální vlastnosti odpovídají částečně kovům a zčásti nekovům.

Selen nacházíme ve vodě, vzduchu i půdě. Vyskytuje se v podobě organických i anorganických sloučenin nejčastěji s oxidačním číslem -II (v kombinaci s vodíkem či kovy), +IV nebo +VI. Méně se objevuje také v elementárním stavu s oxidačním číslem 0, a to v různých alotropických modifikacích. V přírodě představuje například součást rudních minerálů, částečně jako náhrada za síru, jelikož vykazuje podobné vlastnosti.<sup>32, 33, 34)</sup>



## Selen v lidském organismu

Jedná se o esenciální stopový prvek přítomný v těle živočichů i člověka. Působí prostřednictvím metaloenzymů. V podobě selenového analogu cysteinu (selenocysteinu) se objevuje jako součást enzymu glutathionperoxidázy, která tvoří podstatnou složku antioxidantního systému organismu. Selen ve formě selenocysteinu je také inkorporován do enzymu 5'-deiodinázy, jež slouží jako katalyzátor při přeměně tyroxinu na trijodtyronin.<sup>35)</sup>

Sloučeniny selenu se v organismu účastní reakcí, které brání rakovinovému bujení. Holeček uvádí, že Combs et al. pozorovali u pacientů s vysokou hladinou selenu v krvi nižší výskyt karcinomu prostaty.<sup>36)</sup> Strava obohacená o selen přispívá také k prevenci dalších typů rakoviny, virových onemocnění (i HIV) a mužské neplodnosti.<sup>37)</sup> Naopak deficit selenu v organismu se dává do spojitosti s výskytem některých chorob postihujících chrupavky kloubů a pojivovou tkáň, či s Keshanskou chorobou (endemická juvenilní kardiomyopatie).<sup>35)</sup>

Nadměrné množství selenu může působit toxicky. Rozdíl mezi prospěšnou a škodlivou dávkou selenu je však poměrně nevýrazný. Základní požadavek na denní příjem selenu činí 50–70 µg. V oblastech s nízkým příjmem selenu v potravě činí průměrná hodnota hladiny selenu v krvi 0,027 µg/ml. Denní příjem 90 µg selenu by odpovídal koncentraci 0,11 µg/ml selenu v krvi. Toxicita selenu se může projevit v rozmezí hodnot 0,179–7,5 µg/ml krve. Pro mnohé sloučeniny selenu platí, že hodnota LD<sub>50</sub> (střední smrtná dávka) se pohybuje mezi 1,5–6 mg/kg tělesné hmotnosti.<sup>38)</sup>

Princip toxicity některých forem selenu spočívá v jeho interakci s thioley. Reakcí seleničitanu s glutathionem a H<sub>2</sub>Se (selan) vzniká superoxidový radikál (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), který zapříčiní peroxidaci biogenních molekul a membrán. Chronický toxický účinek selenu se projevuje změnou kvality vlasů a jejich vypadáváním, změnami na nehtech a dechem zapáchajícím po česneku.<sup>35)</sup>

## Selen v rostlinách

Role selenu v rostlinách zatím není plně objasněna. Selen podněcuje růst, zvyšuje antioxidantní kapacitu a odolnost vůči býložravcům, patogenům a abiotickým stresům u mnoha druhů rostlin. Pravděpodobně však není pro většinu z nich esenciální. Výjimku by mohly tvořit rostliny se schopností hyperakumulace selenu, které v jeho přítomnosti

prospívají výrazně lépe. Zatím ale nebylo prokázáno, že by při absenci selenu nedokázaly dokončit svůj životní cyklus.<sup>37)</sup>

Rostliny mají různou schopnost akumulovat selen ve svých tkáních. Většina rostlin se řadí mezi neakumulátory, které se vyznačují nízkou koncentrací selenu v listech, obvykle méně než 25 µg/g sušiny. Koncentrace selenu u nich jen výjimečně přesáhne 100 µg/g sušiny, i když je rostlina pěstována na půdě bohaté na selen.<sup>39)</sup>

Specializované druhy rostlin, které se zpravidla nacházejí na půdách s přirozeně vysokým obsahem selenu, dokáží v listech akumulovat vysoké koncentrace selenu. Primární akumulátory jsou schopné akumulovat selen z půdy s jeho běžným obsahem až do vysoce toxických koncentrací (1000 ppm). Absorbují ho především ve formě selenanu, méně seleničitanu. Z nich se pak vytvářejí aminokyseliny jako metylselenocystein, selenocystathion či selenocystin. Sekundární akumulátory absorbují selen jen z půdy vysoce bohaté na selen a inkorporují ho především do aminokyseliny selenomethioninu.

Pokud je obsah selenu v rostlinách vysoký, dochází k jeho volatilizaci ve formě dimetyldiselenidu, jež intenzivně zapáchá po česneku. Vyšší koncentrace selenu mohou na rostlinu působit toxicky, což se projeví následujícími symptomy: zakrnělý růst, chloróza, vadnutí a osychání listů, snížená syntéza proteinů, případně i úhyn rostliny.<sup>35, 40)</sup>

### **Využití selenu**

Selen se využívá v elektronickém, sklářském a farmaceutickém průmyslu, jako součást barviv, šampónů proti lupům, fungicidních a pesticidních přípravků a při výrobě pryžových produktů. Schopnost rostlin akumulovat selen a proces volatilizace selenu se dají využít při fytoremediaci půd znečištěných selenem a při obohacování potravin o selen. Selen je také přidáván jako výživový doplněk do krmiv drůbeže a hospodářských zvířat.<sup>37, 41)</sup>

V rámci rostlinných biotechnologií jsou studovány účinky selenu na rostliny a rostlinné kultury *in vitro*. Sleduje se jeho vliv na růst a vývoj rostlin, ale také na produkci sekundárních metabolitů a dalších obsahových látek. Některé studie se zabývají schopností selenu potlačit účinky abiotických stresových faktorů v rostlinách.

Hawrylak et al. se věnovali vlivu selenu v koncentracích 5 a 20 µM na vodní kultury rostliny *Lactuca sativa* L. kontaminované 50 µM niklu. Sledoval se výtěžek sklizně, obsah chlorofylu, karotenoidů a antokyanů, akumulace niklu, selenu a síry. Selen

stimuloval růst kultur a zvýšil koncentraci asimilačních barviv, čímž částečně zabránil toxickému efektu nadbytku niklu. Způsoboval ale zároveň větší příjem niklu do rostliny.<sup>42)</sup>

Jiná studie se zaměřila na účinky selenu na toxické působení arzenu v rostlině *Phaseolus aureus* Roxb. Zatímco aplikace samostatného selenu mírně stimulovala růst, arzen v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  růst závažně inhiboval. Kombinace arzenu (10  $\mu\text{M}$ ) a selenu (5  $\mu\text{M}$ ) růst zlepšila a naznačila antagonistické působení obou prvků. V koncentraci 5  $\mu\text{M}$  selen výrazně snížil příjem arzenu rostlinou, omezil poškození membrán a chlorofylu a oxidativní poškození buněk. Zvýšení aktivity enzymů jako glutathion-S-transferáza ukazuje, že součástí odpovědi na přítomnost selenu jsou také detoxifikační mechanismy.<sup>43)</sup>

Guerrero et al. porovnávali působení seleničitanu a selenanu na *Triticum aestivum*. Látky vykazovaly rozdílné chování. Po jejich současné aplikaci převládaly účinky seleničitanu – byl rostlinou rychleji přijímán a pravděpodobně interferoval s příjmem a transportem selenanu. V nízkých koncentracích se selen projevil jako růstový stimulant. Ve vysokých koncentracích inhiboval elongaci kořenů a produkci biomasy a způsobil změny v příjmu a translokaci některých esenciálních živin.<sup>44)</sup>

### **3.5 *Fagopyrum esculentum* Moench.**

#### **3.5.1 Charakteristika rostliny**

Pohanka setá, neboli *Fagopyrum esculentum* Moench. (dále jen *Fagopyrum esculentum*), patří do čeledi rdesnovitých, *Polygonaceae*. Jedná se o bylinu jednoletou, dvouděložnou, cizosprašnou a hmyzosnubnou. Délka vegetačního období pohanky činí přibližně 80–120 dní a je závislá na době setí, nadmořské výšce, počasí a konkrétní odrůdě.

Pohanka se vyznačuje křovitým, málo větveným kořenem, jež do půdy proniká většinou jen mělce. Na základě vědeckých prací Campbella, Hřivny, Sokolova, Šmajstrly a Šmajstrlové prezentuje Moudrý et al. následující údaje. Kořenový systém pohanky tvoří pouhé 3–4 % celkové hmotnosti rostliny, přesto je intenzita jeho činnosti až 12krát vyšší než u pšenice. Hlavní část kořenů je umístěna v horní vrstvě půdy (60 cm), živiny jsou však odebírány i z nižších vrstev (130 cm). Kořeny pohanky vylučují organické kyseliny, které usnadňují příjem živin (zejména fosforu) z jejich těžko rozpustných forem. Toho se využívá v pěstíteckých systémech se sníženými vstupy (low input). Může to však vyústit i ve větší příjem nežádoucích těžkých kovů do rostliny. V případě kadmia a rtuti lze pohanku označit jako akumulární rostlinu.

Hlavní lodyha pohanky je přímá, podélně rýhovaná, někdy popisována jako hranatá. Lodyha je dutá a členěná na nody. V horní třetině se obvykle větví. Má zelenou až červenou barvu v závislosti na množství přítomných antokyanů. Výška rostliny se různí podle podmínek prostředí, obvykle se pohybuje v rozmezí 50–140 cm.

Listy pohanky mají různý tvar i velikost v rámci jednoho exempláře – jedná se o heterofylii. Na stonku jsou postaveny střídavě. Bázi řapíku vždy pokrývá blanitá pochva, srostlá s drobnými palisty, jež jsou patrné zejména u spodních listů.

Z úžlabí listů vyrůstají jednotlivá květenství tvořená zpravidla 7–9 kvítky uspořádanými v hroznu či ve vrcholovém chocholíku. Počet květů je velmi vysoký, ale značně variabilní. Květy jsou oboupohlavné, drobné, o velikosti 5–10 mm. Okvětí je pětídílné s 8 tyčinkami a pestíkem se 3 čnělkami. Okvětní lístky mají bílou nebo růžovou barvu, méně často červenou. Hlavním opylovačem pohanky je včela medonosná.

Plodem pohanky je hladká trojboká nažka s celokrajnými hranami. Velikost i barva nažky se liší v závislosti na odrůdě i podmínkách prostředí. Charakteristickým znakem rodu *Fagopyrum* jsou silné děložní lístky uložené v centru nažky a nažky částečně překryté neopadavým květním obalem.<sup>45)</sup>

### 3.5.2 Původ

Pohanka setá pochází z Asie. Moudrý et al. uvádí, že De Candolle (1883) považoval za původní místo výskytu pohanky severní Čínu, oblast jižní Sibíře, a Šmajstrla a Šmajstrlová (1991) oblast Himalájí. Vzhledem k rozšíření divokých druhů pohanky je v současnosti za místo jejího původu označována oblast tří řek v jihozápadní Číně (mezi Sihanem, Yunanem a východním Tibetem). Tady pravděpodobně došlo k domestikaci pohanky a jejímu rozšíření na další území.

Národy severní Indie pěstovaly pohanku už před 2500 lety. Do Evropy se pohanka dostala ve středověku při nájezdech mongolských, tureckých a jiných vojsk, která ji využívala jako zdroj stravy. Odtud pravděpodobně pochází i název pohanky – evropská křesťanská kultura označovala nájedníky za pohany.

V Čechách a na Moravě se pohanka ujala zejména v horách a podhůří a tvořila součást stravy zejména chudých lidí. V některých oblastech se dokonce stala ingrediencí v tradičních pokrmech. Ve dvacátém století, především po druhé světové válce, pěstování pohanky na našem území výrazně upadalo. Obrat nastal v devadesátých letech, kdy vzrostl zájem o racionální výživu a ekologické zemědělství.<sup>45)</sup>

### 3.5.3 Odrůda Špačinská

*Fagopyrum esculentum* varieta Špačinská 1 (dále jen „odrůda Špačinská“) byla registrovaná na Slovensku v roce 1998. Byla vyšlechtěná Výzkumným ústavem rostlinné výroby v Piešťanech. Název dostala podle pracoviště v obci Špačince. Šlechtění probíhalo metodou tvorby syntetické odrůdy hromadným křížením. Jako výchozí materiál byly použity odrůdy Lehnická a Hruszowská.<sup>46)</sup>

Odrůda Špačinská byla již využita v řadě různých studií, např.:

- Studie Bystrické et al. potvrdila významný nárůst celkového obsahu polyfenolů v průběhu vegetačního období v různých odrůdách pohanky, včetně Špačinské. Nejbohatším zdrojem polyfenolů byly květy a listy.<sup>47)</sup>
- V experimentu, který proběhl v Praze, byly hodnoceny morfologické, růstové a agronomické vlastnosti různých odrůd pohanky. Odrůda Špačinská poskytla největší úrodu (3,24 t.ha<sup>-1</sup>) a její vegetační období trvalo nejdéle.<sup>48)</sup>
- Odrůda Špačinská byla použita i v rámci studie o porovnávání vybraných vlastností pohanky seté a tatarské. U odrůdy Špačinská bylo na rozdíl od ostatních odrůd pozorováno jen slabé větvení.<sup>49)</sup>
- Kiprovski et al. porovnávali obsah fenolických sloučenin a antioxidační vlastnosti evropských odrůd *Fagopyrum esculentum*. Odrůdy Novosadská, Godijevo, Bamby a Špačinská prokázaly velmi vysokou antioxidační kapacitu.<sup>50)</sup>

### 3.5.4 Využití

Pohanka může potenciálně sloužit jako:

- konvenční i dietní potravina,
- léčivá rostlina zpracovávaná ve farmaceutickém průmyslu,
  - lékopisnou drogu *Fagopyri herba* tvoří celá nebo rozlámaná nať druhu *Fagopyrum esculentum*, která se sbírá v časně fázi kvetení před vytvořením plodů a ihned se suší,<sup>51)</sup>
- meziplodina k obnově úrodnosti půdy,
- krmivo,
- medonosná plodina,
- výplň do polštářů (slupky pohanky), mulč, palivo, stelivo pro drůbež, aj.

V dnešní době nachází pohanka uplatnění především v racionální výživě. Obsahuje velké množství esenciálních živin a bioaktivních složek, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví. Pohanka se využívá při léčbě cévních obtíží jako jsou křečové žíly, hemoroidy či bérkové vředy a při poruchách prokrvení končetin s výskytem charakteristických červených nitek. Konzumace pohanky slouží jako prevence proti praskání cév, např. proti náhlým příhodám mozkovým, a je vhodná i u vředového onemocnění. Také chrání před srdečními chorobami svým působením na hladinu cholesterolu v krvi a posiluje imunitní systém. Může být součástí bezlepkové diety, je vhodná pro těhotné i diabetiky. Nažky pohanky představují hodnotnou potravinu s vysokým podílem vlákniny (3,4–5,2 %).<sup>45, 52)</sup>

### 3.5.5 Obsahové látky

Plody pohanky obsahují komplex vitamínů skupiny B, vitamín E a C, ve větším množství také prvky jako draslík, fosfor, hořčík a vápník a ve stopách železo, selen, měď, mangan a zinek. Pohanková semena jsou ceněna pro vysoký obsah plnohodnotných bílkovin (10–14 %), bohatých na nezastupitelné aminokyseliny. Vysoká hladina tříslovin (0,5–4,5 %) však patří k faktorům, které stravitelnost bílkovin snižují. Obsah škrobu v semenech činí 55–70 %, olejnatost semen se pohybuje v rozmezí 1,5–3,7 %. Nenasycené mastné kyseliny zastupuje v pohance především kyselina linolová. Loupaná pohanka obsahuje významné množství lecitinu (až 0,5 %), který přispívá k regeneraci mozkové kůry. Nejdůležitějším sekundárním metabolitem pohanky je flavonoid rutin. Především v reprodukčních orgánech pohanky nacházíme další látky typu polyfenolů: orientin, isorientin, vitexin, isovitexin a quercetin.<sup>52)</sup>

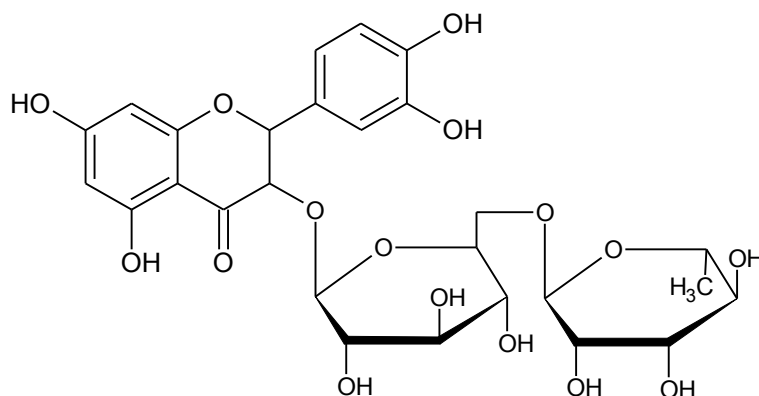
V pohance je také přítomen fagopyrin. Jedná se o derivát hypericinu a patří mezi fotosenzibilující látky. Při akumulaci fagopyrinu pod pokožkou může po vystavení pokožky slunečnímu záření nastat toxická reakce, tzv. fagopyrizmus. Pokožka zčervená a svědí.<sup>53)</sup> Slovinská studie ukázala, že spolehlivá data ohledně množství fagopyrinu způsobujícího fagopyrizmus ještě nejsou známa. Naznačuje však, že pohanková semena, mouka a čaje v běžných dávkách jsou bezpečné. Strava bohatá na pohankové klíčky, nať a květy, či extrakty pohanky s vyšším obsahem fagopyrinu mohou způsobit fagopyrizmus. Sušení a dlouhodobé skladování obsah fagopyrinu v pohance výrazně snižuje.<sup>54)</sup>

Hypersenzitivní reakci mohou způsobit i některé proteiny obsažené v semenech pohanky, např. Fag e 1. Alergická reakce se projeví ekzémem, kopřivkou či výjimečně astmatickým záchvatem.<sup>53)</sup>

### 3.5.5.1 Rutin

Rod *Fagopyrum* představuje významný zdroj rutinu, dříve označovaného jako vitamin P. Rutin, neboli kvercetin-3- $\beta$ -rutinosid, se skládá z aglykonu kvercetinu a glykosidicky navázaného disacharidu rutinózy.<sup>45)</sup> Chemickou strukturu naznačuje obrázek (obr. č. 2).

Obr. č. 2: Strukturní vzorec rutinu.<sup>8)</sup>



Rutin je využíván ve farmaceutickém, kosmetickém i potravinářském průmyslu. Vyznačuje se tím, že posiluje stěny a pružnost krevních kapilár, má antioxidační, antiflogistické, antimutagenní a antikancerogenní účinky a chrání vůči UV záření. Snižuje obsah jaterního cholesterolu a lipidů v plazmě a může mít pozitivní vliv na hladinu krevního cukru. Častá je jeho kombinace s kyselinou askorbovou.

Obsah rutinu v pohance je velmi variabilní v závislosti na okolních podmínkách (vlhkost, teplota, světlo), genotypu a vývojové fázi rostliny. Nejvyšší koncentrace rutinu je dosaženo na počátku kvetení.<sup>45)</sup>

Kreft et al. srovnávali obsah rutinu v různých částech pohanky seté, největší obsah rutinu byl zaznamenán v květech.<sup>55)</sup> Steadman et al. stanovili vysoký obsah rutinu (0,8–4,4 g/kg) ve slupkách plodů pohanky seté.<sup>56)</sup>

Jiang et al. porovnávali obsah rutinu a flavonoidů ve třech druzích pohanky (*Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum* a *F. homotropicum*). Pohanka setá obsahovala 0,02 % rutinu a 0,04 % flavonoidů. Nejvyšších hodnot obsahu rutinu i celkového množství flavonoidů dosahovala pohanka tatarská (*F. tataricum*).<sup>57)</sup>

Český lékopis 2009 uvádí nejméně 3,0 % rutinu v droze *Fagopyri herba*, počítáno na vysušenou drogu.<sup>51)</sup> Kalusová kultura *Fagopyrum esculentum* obsahuje průměrně

0,023 % flavonoidů, což je méně v porovnání s intaktní rostlinou.<sup>58)</sup> K navýšení produkce rutinu v *in vitro* kulturách pohanky by mohla sloužit např. metoda elicitace.

Vedle pohanky je rutin nejvíce zastoupen v routě (*Ruta graveolens*, *Rutaceae*), z níž byl poprvé izolován. Získává se také z pupenů druhu *Sophora japonica* (*Fabaceae*) a vysoký obsah rutinu má i list *Eucalyptus macrorhyncha* (*Myrtaceae*), oplodí pomeranče (*Pericarpium aurantii*) či list černého rybízu (*Folium ribes nigri*).<sup>8, 52)</sup>



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Přístrojové vybavení

Autokláv PS 20 A, Chirana, ČR

Box s laminárním prouděním Fatran LF, SR

Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan LtD, Lotyšsko

Horkovzdušný sterilizátor SVS 9/1, Chirana, ČR

Laboratorní analytické váhy PRLT A13, Sartorius, Německo

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

Pipetovací balónek, Filip, Německo

Sušárna HS 61A, Chirana, ČR

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

Třepačka KS 15 A Control, Edmund Bühler, Německo

Ultrazvuková lázeň, typ RX 255H Bandelin Sonorex, Německo

Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR

Vodní lázeň GFL, typ 1042

Kapalinový chromatograf:

Autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko

Čerpadlo Jasco PU-2089 Plus, Japonsko

Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko

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

Předkolona, Merck, Německo

Termostat kolony Jetsream 2 Plus, Japonsko

## 4.2 Chemikálie

Agar, Oxoid, Velká Británie  
Ajatin plus roztok 10%, Profarma – produkt s.r.o., ČR  
Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK HK, ČR  
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema, ČR  
Dusičnan amonný p.a., Penta, ČR  
Dusičnan draselný p.a., Lachema, ČR  
Edetan sodný p.a., Sigma–Aldrich, USA  
Etanol 96%, Lachema, ČR  
Glycin p.a., Penta, ČR  
Hydrolyzát kaseinu, Imuna, SR  
Chloramin, Bochemie, ČR  
Chlorid kobaltnatý hexahydrát p.a., Lachema, ČR  
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Penta, ČR  
Jodid draselný p.a., Penta, ČR  
Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR  
Kyselina nikotinová, Sigma–Aldrich, USA  
Metanol p.a., Penta, ČR  
Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta, ČR  
Myo-inositol, Fluka, Švýcarsko  
Oxid seleničitý r. q. 98%, Sigma–Aldrich, USA  
Pyridoxin, Plant Cell Culture, Sigma–Aldrich, USA  
Sacharóza p.a., Lachema, ČR  
Savo, vyrobeno v EU, sklad FaF UK HK  
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR  
Síran manganatý monohydrát p.a., Lachema, ČR  
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema, ČR  
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR  
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lachema, ČR  
Standardy pro HPLC analýzu – rutin, Sigma–Aldrich, USA  
Thiamin, Plant Cell Culture, Sigma–Aldrich, USA  
Ultračistá voda, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR

### 4.3 Biologický materiál

Experiment byl proveden s kalusovými a suspenzními kulturami odvozenými ze semene klíčící rostliny *Fagopyrum esculentum* varieta Špačinská z 9.–15. pasáže. Semena byla převzata z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Piešťanech na Slovensku.

### 4.4 Kultivace *in vitro*

#### 4.4.1 Složení a příprava kultivačního média

Ke kultivaci kalusových a suspenzních kultur bylo použito živné médium podle Murashigeho a Skooga<sup>59)</sup> (MS), jeho přesné složení uvádí tabulka č. 1.

Tab. č. 1: Složení kultivačního média podle MS.

Makroelementy (mg/l)	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0
KNO <sub>3</sub>	1900,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0

Mikroelementy (mg/l)	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
KI	0,830
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,900
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,250
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	11,500

Vitamíny (mg/l)	
kyselina nikotinová	0,50
pyridoxin	0,50
thiamin	0,10

Železnatý komplex (mg/l)	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,84
Na <sub>2</sub> EDTA	37,34

<b>Glycin (mg/l)</b>	2,0
----------------------	-----

<b>Hydrolyzát kaseinu (g/l)</b>	1,0
---------------------------------	-----

<b>Myo-inositol (mg/l)</b>	100,0
----------------------------	-------

<b>Sacharóza (g/l)</b>	30,0
------------------------	------

Řada složek média je zastoupena jen v malých množstvích. Pro přesnější a jednodušší odměřování se proto předem připravily jejich zásobní roztoky, z nichž se pak daný objem odebíral pipetou. Postupně se do odměrné baňky vpravily roztoky makroelementů, železnatého komplexu, mikroelementů, glycinu a vitamínů. Poté byl přidán roztok růstového stimulantu 2,4-D (kyseliny dichlorfenoxycetové) v koncentraci 1 mg 2,4-D na 1 l média. Směs se zředila destilovanou vodou. Sacharóza, myo-inositol a hydrolyzát kaseinu se navázily na analytických vahách a dodaly k předchozímu do odměrné baňky. Po vytvoření homogenní směsi se doplnila destilovaná voda po rysku.

Hotové médium se rozdělilo po 30 ml do vysterilizovaných Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml. Pro kalusové kultury byly do baněk navíc předem umístěny můstky z filtračního papíru. Hrdla baněk se zakryla hliníkovou fólií a baňky byly řádně označeny. Následovala sterilizace v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121°C a tlaku 100 kPa.

#### **4.4.2 Založení kalusové kultury**

Jako výchozí, primární explantát, z něhož byla později odvozena vlastní kultura, jsme využili semena klíčící rostliny *Fagopyrum esculentum*, var. Špačinská. Kvůli zamezení kontaminace prošla semena sterilizačním procesem. Nejprve byla 1–2 minuty oplachována 70% etanolem, poté ponechána 15–20 minut v 10% roztoku chloraminu a následně 15–20 minut v 10% roztoku Sava. Mezi jednotlivými kroky byla semena vždy oplachována sterilní destilovanou vodou a na závěr 70% roztokem etanolu. Vysterilizovaná semena byla nasazena na živnou půdu zpevněnou agarem. Po 4–6 týdnech kultivace vznikl kalus.

#### **4.4.3 Průběh kultivace**

Za účelem minimalizace kontaminace probíhala veškerá manipulace s kulturami v aseptických podmínkách v boxu s laminárním prouděním. Prostor boxu byl vždy předem vydezinfikován roztokem Ajatinu (1:10) a ozářen UV zářením germicidní lampy.

Vzniklý kalus byl v prvním kroku přenesen pomocí vysterilizované pinzety z pevného média na můstek umístěný v médiu tekutém (MS obohacené o 2,4-D). Kultivace pak probíhala v kultivační místnosti za daných podmínek: při neměnné teplotě 25°C a za pravidelného střídání světla a tmy (16 hod světlo, 8 hod tma).

V rozmezí 4–5 týdnů byly uskutečňovány následující pasáže. Nejdříve se roztokem 96% etanolu očistily hliníkové zátky na baňkách. Z kalusové kultury se poté sterilní pinzetou odebíraly světlejší, čerstvě narostlé části a umísťovaly se do nově připravených baněk s můstkem a živným médiem.

#### **4.4.4 Příprava a kultivace suspenzní kultury**

Kalusové kultury sloužily jako výchozí materiál pro zakládání kultur suspenzních. Části kalusu, odebrané vysterilizovanou pinzetou, byly mechanicky rozmělněny v prostředí tekutého živného média za vzniku suspenze. Erlenmeyerova baňka se suspenzí byla opatřena hliníkovou zátkou a poté umístěna do třepačky. Při frekvenci otáček 120 za minutu a stejných teplotních i světelných podmínkách jako u kalusových kultur byly suspenzní kultury pěstovány po dobu 3–4 týdnů.

### **4.5 Elicitace *in vitro* kultur**

#### **4.5.1 Příprava elicitoru**

K vlastnímu experimentu byl jako abiotický elicitor zvolen roztok oxidu seleničitého  $\text{SeO}_2$  ve třech různých koncentracích.

Pro přípravu roztoku o koncentraci  $c_1 = 100 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  bylo na analytických vahách naváženo 100,0 mg čisté substance  $\text{SeO}_2$ . Navážku bylo potřeba kvantitativně převést do odměrné baňky s objemem 100 ml a poté doplnit sterilní destilovanou vodou po vyznačenou rysku. Roztok byl sterilizován v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě  $121^\circ\text{C}$  a tlaku 100 kPa.

Roztok o koncentraci  $c_2 = 10 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  vycházel z předchozího roztoku: 10,0 ml roztoku o koncentraci  $c_1$  bylo pipetou přeneseno do nové 100ml odměrné baňky a doplněno sterilní destilovanou vodou po rysku.

Podobně byl připraven i roztok o koncentraci  $c_3 = 1 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ . Z roztoku o koncentraci  $c_2$  bylo odebráno 10,0 ml a v odměrné baňce zředěno sterilní destilovanou vodou na 100,0 ml.

Všechny roztoky byly připravovány za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním. Použité laboratorní sklo bylo předem vysterilizováno v horkovzdušném sterilizátoru.

Celkem byly připraveny tři sterilní roztoky elicitoru  $\text{SeO}_2$  o následujících koncentracích:

- $c_1 = 100 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ ,
- $c_2 = 10 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ ,
- $c_3 = 1 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ .

#### 4.5.2 Průběh elicítace

Elicítace byla provedena podobným způsobem u kalusových i suspenzních kultur. U kalusových byl pokus uskutečněn zhruba po 4–5 týdnech od poslední pasáže, u suspenzních po 2–3 týdnech jejich růstu.

K jednotlivým pokusům se vždy odebralo 36 baněk buď s kalusovou, nebo se suspenzní kulturou. Nejprve byly všechny omyty roztokem 96% etanolu a umístěny do vysvíceného aseptického boxu s laminárním prouděním. Do 24 baněk se vysterilizovanou pipetou nanesl 1 ml roztoku elicitoru o dané koncentraci, do zbylých 12 baněk 1 ml sterilní destilované vody – ty pak sloužily jako kontrolní vzorky.

Kultivace probíhala v kultivační místnosti za běžných podmínek ( $25^\circ\text{C}$ , střídání světla a tmy). Suspenzní kultury byly umístěny opět na třepačku s frekvencí otáček 120 za minutu. V časových intervalech 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin po expozici elicitoru byly odebírány elicítované vzorky, v intervalech 6, 24, 72 a 168 hodin také kontrolní vzorky kalusových kultur a po 24, 72 a 168 hodinách kontrolní vzorky kultur suspenzních.

Kalus či shluky buněk suspenze byly následně odfiltrvány z tekutého média, rozprostřeny na filtrační papír a ponechány při laboratorní teplotě vyschnout. Média byla převedena do lékovek a zmražena. Takto připravené vzorky sušiny a médií byly uchovávány k dalšímu zpracování.

Stejný postup byl uplatněn pro všechny roztoky elicitoru, tzn. roztoky o koncentraci  $c_1$ ,  $c_2$  i  $c_3$ .

## 4.6 Stanovení obsahu rutinu

### 4.6.1 Příprava extraktů

Pro HPLC analýzu bylo nutné vzorky sušiny i médií zpracovat a vytvořit extrakty. Postupovalo se podle metody uvedené v Českém lékopise 2009 s drobnými úpravami.<sup>51)</sup>

Usušené vzorky kalusů a shluků buněk ze suspenze byly pomocí těrky pečlivě upráškovány v třecí misce. Na analytických vahách byla diferenční metodou zjištěna a zaznamenána jejich hmotnost. Každý vzorek se převedl do varné baňky a smísil se s 10,0 ml 80% metanolu R. Baňka se směsí se umístila na vodní lázeň udržovanou při teplotě 60°C a zahřívala se pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Obsah baňky byl poté za horka zfiltrován přes vatu do odměrné baňky o objemu 25,0 ml. Vata se zbytkovým materiálem se vložila zpět do varné baňky a s přidavkem 5,0 ml 80% metanolu R byla extrahována 15 minut v ultrazvukové lázni. Směs se opět zfiltrovala přes kousek vaty do odměrné baňky k prvnímu filtrátu.

Obsah odměrné baňky se doplnil po rysku 80% metanolem. Vzniklý roztok byl zbaven nečistot filtrací přes mikrofiltr (0,20 µm) a 1,7 ml roztoku se odebralo do čisté, náležitě označené vialky.

Zmrazené vzorky kultivačních médií se nechaly volně rozpustit a odpařit do sucha na vodní lázni při teplotě 60°C. K vytvořenému odparku se přidalo 10,0 ml 80% metanolu, odparek se rozpustil a nechal se krátce zahřát. Následovala filtrace přes mikrofiltry (0,20 µm) a převedení 1,7 ml roztoku do vialek.

Vialky s extrakty byly poté uchovávány v chladničce až do HPLC analýzy.

### 4.6.2 HPLC analýza

Stanovení obsahu rutinu bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Jde o separační metodu, jež na základě interakcí separovaných látek s mobilní a stacionární fází dokáže zprostředkovat kvantitativní i kvalitativní hodnocení vzorku.

K analýze extraktů byla využita chromatografická sestava JASCO s čerpadlem PU-2089, detektorem MD-2015 a autosamplerem AS-2055, vybavená předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 µm) s ochrannou předkolkou. Mobilní fáze byla složena z eluentu A – 5% acetonitrilu a 0,15% H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> ve vodě, a eluentu B –

100% acetonitrilu. Eluce mobilní fáze probíhala po dobu 6 minut isokraticky, poté gradientově, jak značí následující tabulka (tab. č. 2).

Tab. č. 2: Schéma průběhu eluce.

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

Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,0 ml/min při teplotě kolony 25°C. Nastříkovaný objem činil 20 µl.

Detekce byla zajištěna diodovým detektorem v rozpětí vlnových délek 200–450 nm. Obsah rutinu se počítal z píků zaznamenaných při vlnové délce 350 nm, byl kvantifikován pomocí matematické metody normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou získanou metodou vnějšího standardu.

Použity byly roztoky standardu rutinu zakoupeného od Sigma–Aldrich, vytvořené přímým rozpouštěním v metanolu, o následujících koncentracích:

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

Proměřením roztoků standardu rutinu o daných koncentracích jsme získali kalibrační křivku (viz obr. č. 3). Odpovídá rovnici  $y = bx + a$ :

y – plocha pod křivkou

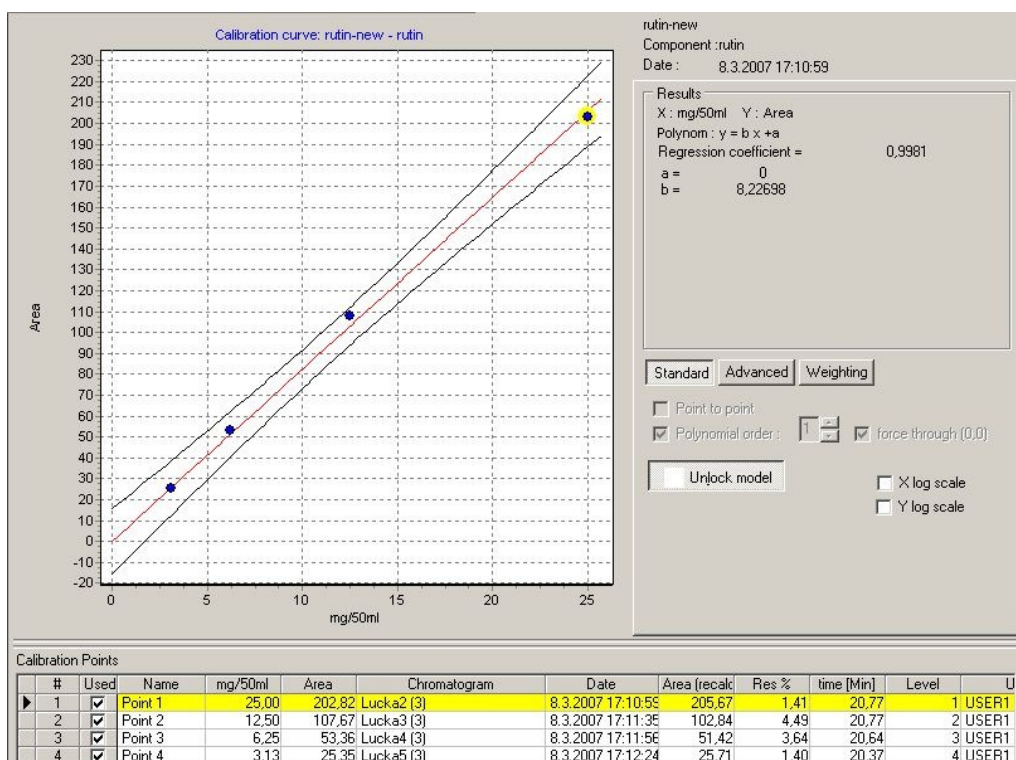
x – koncentrace v mg/50 ml

a = 0

b – hodnota odpovídající rutinu

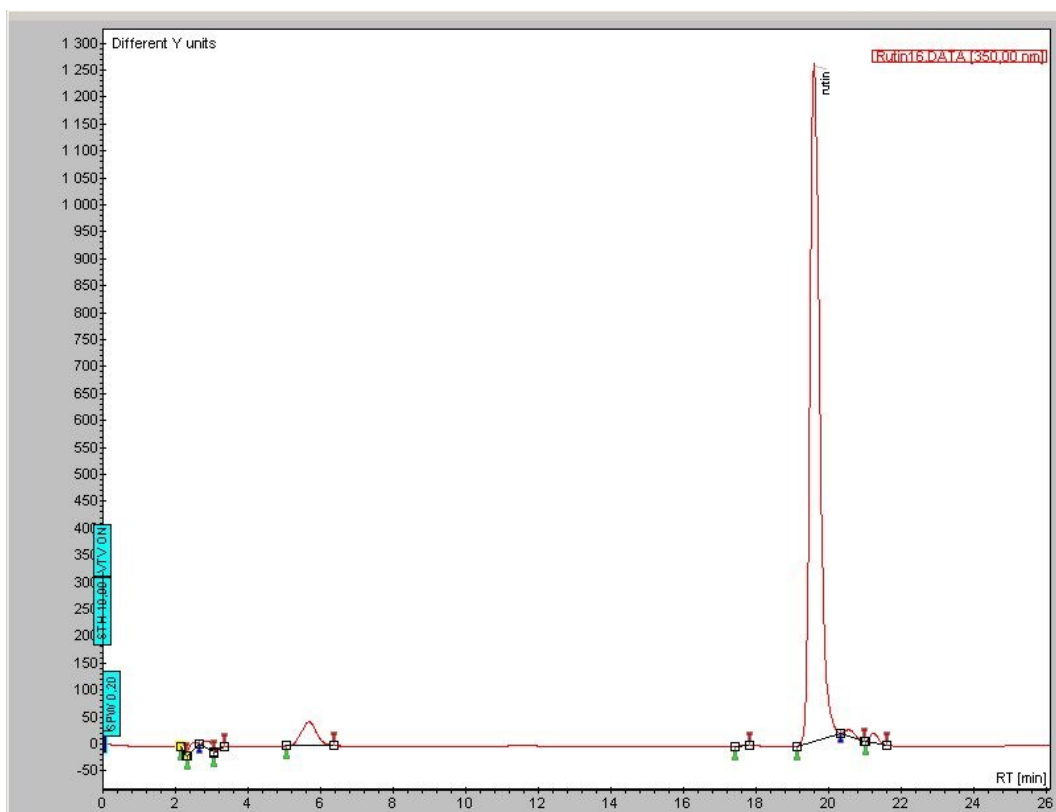


Obr. č. 3: Kalibrační křivka ke stanovení obsahu rutinu.



#### 4.6.2.1 Ukázka chromatogramu

Obr. č. 4: Ukázka chromatogramu z HPLC analýzy standardu rutinu.



## 4.7 Statistické zpracování výsledků<sup>60)</sup>

Směrodatná odchylka je veličinou, jež udává, do jaké míry se naměřené hodnoty v souboru odlišují od hodnoty průměrné (střední).

Její funkci definuje vztah: 
$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

$s$  – směrodatná odchylka

$x$  – hodnota sledované veličiny

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

$n$  – počet členů souboru

K testování statistické významnosti rozdílu dvou průměrných hodnot, zpravidla mezi zkoušenou a kontrolní skupinou, slouží t-test. Umožňuje posoudit, jaký vliv měla elicitace na produkci sekundárních metabolitů.

Testovací kritérium se vyjadřuje jako: 
$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} * \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

$t$  – testovací kritérium

$x_1$  – aritmetický průměr kontrolního souboru

$x_2$  – aritmetický průměr pokusného souboru

$n_1$  – počet členů kontrolního souboru

$n_2$  – počet členů pokusného souboru

$s_1$  – směrodatná odchylka kontrolního souboru

$s_2$  – směrodatná odchylka pokusného souboru

Testovacímu kritériu náleží t-rozdělení se stupněm volnosti, jehož hodnotu získáme pomocí následujícího vztahu:  $v = n_1 + n_2 - 2$ .

Výpočtem zjištěná hodnota testovacího kritéria se dále porovná s tabelovanou kritickou hodnotou  $t(v)_p$  pro příslušný stupeň volnosti  $v$  a zvolenou hladinu významnosti  $p$ .

V případě, že  $t$  je větší než  $t(v)_p$ , jsou výsledky statisticky významné na hladině významnosti  $p$ .

Během analýzy obsahu rutinu byla pro každý vzorek provedena tři stanovení. Počet členů pokusného i kontrolního souboru tedy činil  $n_1 = n_2 = 3$  a stupeň volnosti  $v = 4$ . Hladina významnosti byla zvolena jako  $p = 0,05$ . Uvedeným parametrům přísluší kritická hodnota testovacího kritéria  $t(v)_p = 2,78$ .

Pro výpočet testovacího kritéria byly jako pokusný soubor použity odběry po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách, jako kontrolní soubor odběry po 6, 24, 72 a 168 hodinách v případě kalusové kultury a po 24, 72 a 168 hodinách v případě suspenzní kultury.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Tabulky

Tab. č. 3: Vliv elicitoru SeO<sub>2</sub> v různých koncentracích na obsah rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře *Fagopyrum esculentum*, var. Špačinská.

Koncentrace elicitoru	Doba působení elicitoru [hod]	Průměrný obsah rutinu [mg/g DW]	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
c <sub>1</sub>	6	0	0	0
	6K	0	0	–
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	–
	48	0,1	0,025	<b>5,6569</b>
	72	0	0	0
	72K	0	0	–
	168	0,2	0,035	<b>8,0812</b>
	168K	0	0	–
c <sub>2</sub>	6	0,2	0,048	<b>5,8926</b>
	6K	0	0	–
	12	0,6	0,063	<b>13,4687</b>
	24	0,3	0,025	<b>3,3511</b>
	24K	0,2	0,034	–
	48	0,3	0,030	<b>3,8014</b>
	72	0	0	0
	72K	0	0	–
	168	0	0	0
	168K	0	0	–
c <sub>3</sub>	6	0,2	0,015	<b>6,4483</b>
	6K	0,1	0,016	–
	12	0,1	0,017	0
	24	0	0	5,4393
	24K	0,2	0,052	–
	48	0	0	5,4393
	72	0	0	4,0406
	72K	0,1	0,035	–
	168	0,1	0,023	4,1631
	168K	0,2	0,025	–

Tab. č. 4: Vliv elicitoru SeO<sub>2</sub> v různých koncentracích na obsah rutinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře *Fagopyrum esculentum*, var. Špačinská.

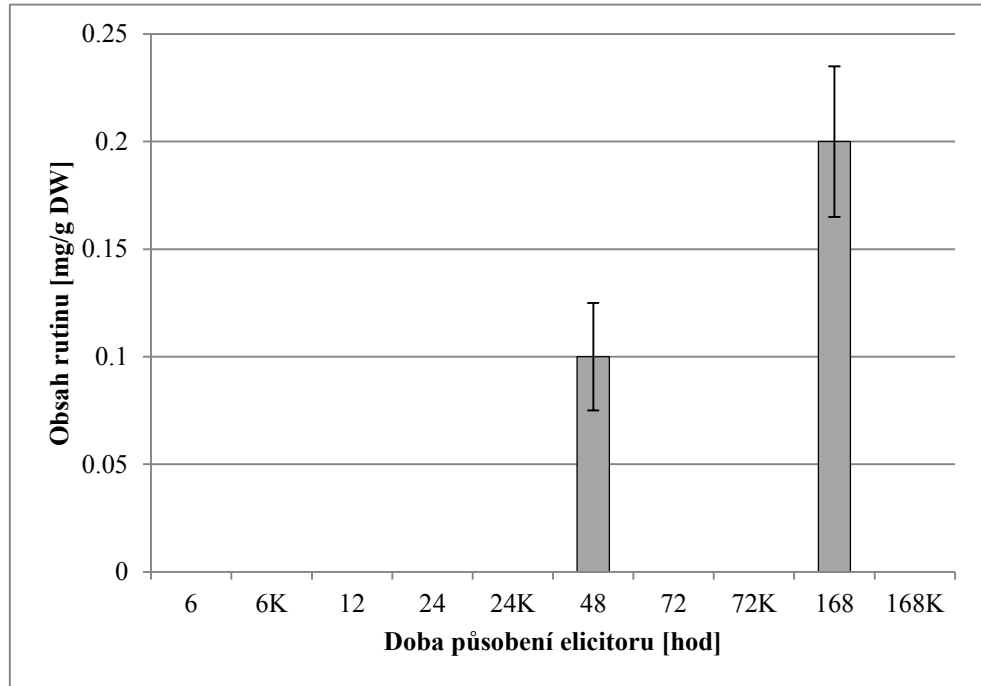
Koncentrace elicitoru	Doba působení elicitoru [hod]	Průměrný obsah rutinu [mg/g DW]	Směrodatná odchylka	Testovací kritérium
c <sub>1</sub>	6	0	0	0
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	–
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	72K	0	0	–
	168	0	0	0
	168K	0	0	–
c <sub>2</sub>	6	0,2	0,026	2,2905
	12	0	0	2,5254
	24	0	0	2,5254
	24K	0,1	0,056	–
	48	0	0	2,5254
	72	0	0	0
	72K	0	0	–
	168	0	0	0
	168K	0	0	–
c <sub>3</sub>	6	0,1	0,018	<b>7,8567</b>
	12	0	0	0
	24	0	0	0
	24K	0	0	–
	48	0,1	0,032	<b>4,4194</b>
	72	0	0	2,7196
	72K	0,1	0,052	–
	168	0,1	0,025	0
	168K	0,1	0,035	–

„K“ označuje kontrolní vzorky bez elicitoru. „DW“ je zkratkou pro „Dry Weight“ (sušinu). Tučně vyznačené výsledky testovacího kritéria jsou statisticky významné a znázorňují nárůst produkce rutinu.

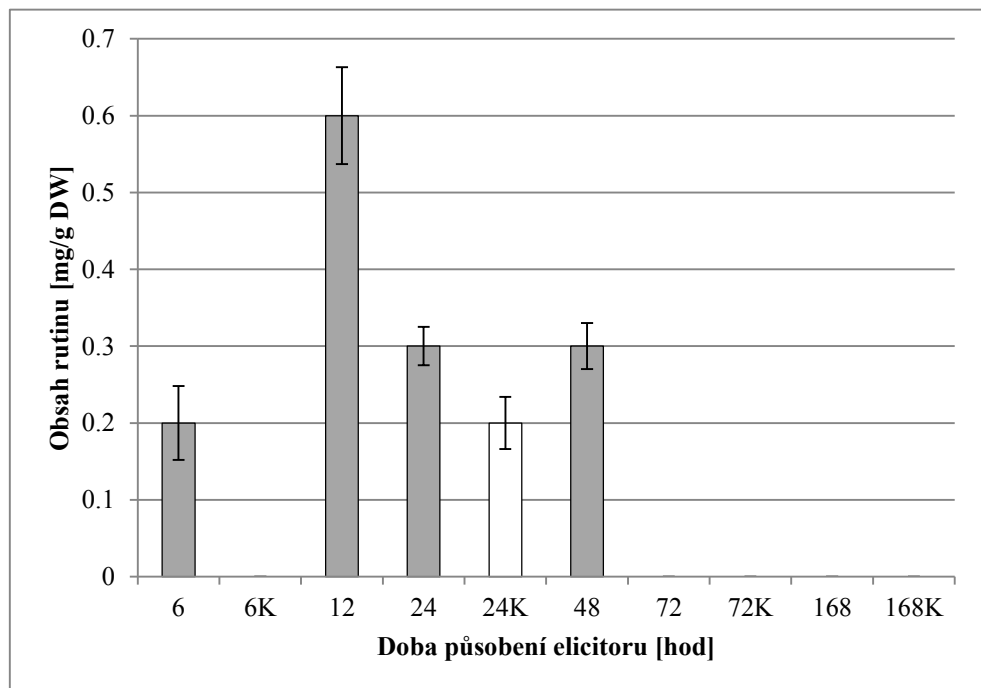
Vzorky kultivačních médií nevykazovaly detekovatelné hodnoty obsahu rutinu, tabulky pro ně tedy nebyly zpracovány.

## 5.2 Grafy

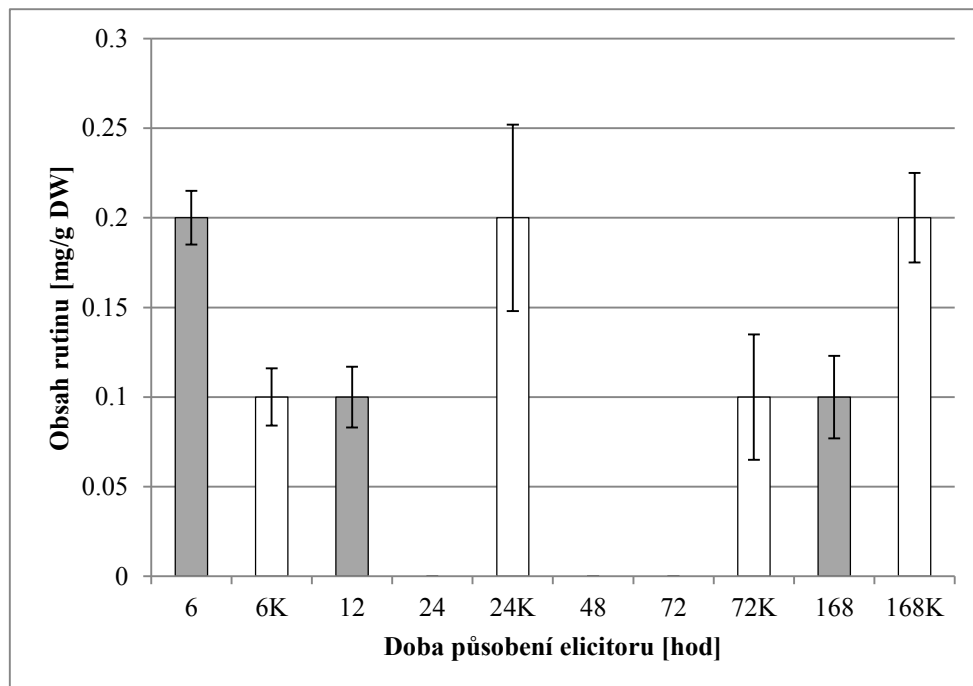
Graf č. 1: Závislost obsahu rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře na době působení elicitoru  $\text{SeO}_2$  o koncentraci  $c_1$  [100 mg/100 ml].



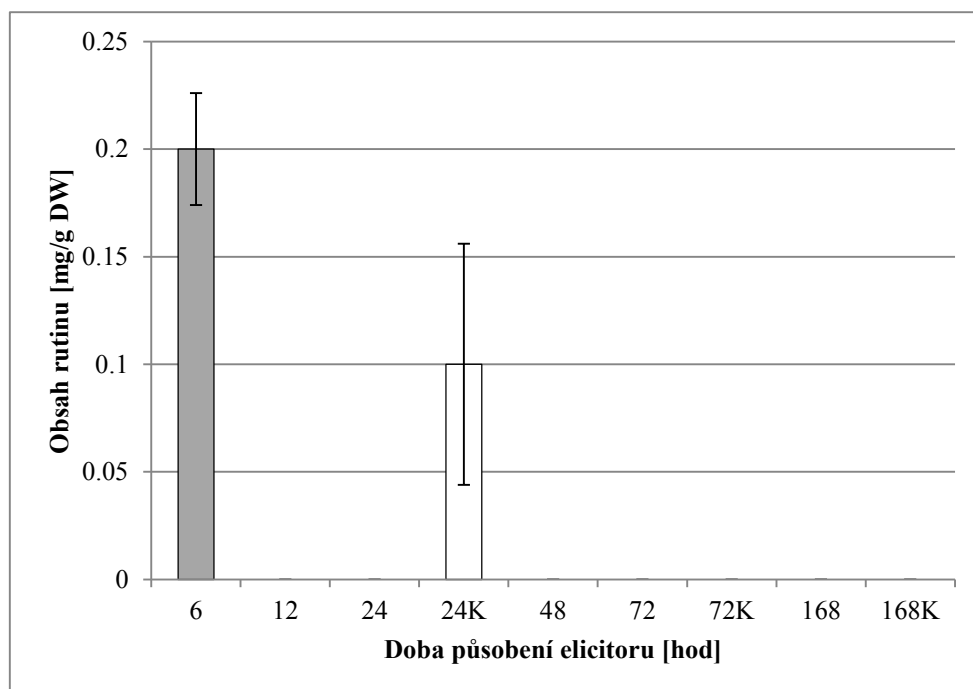
Graf č. 2: Závislost obsahu rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře na době působení elicitoru  $\text{SeO}_2$  o koncentraci  $c_2$  [10 mg/100 ml].



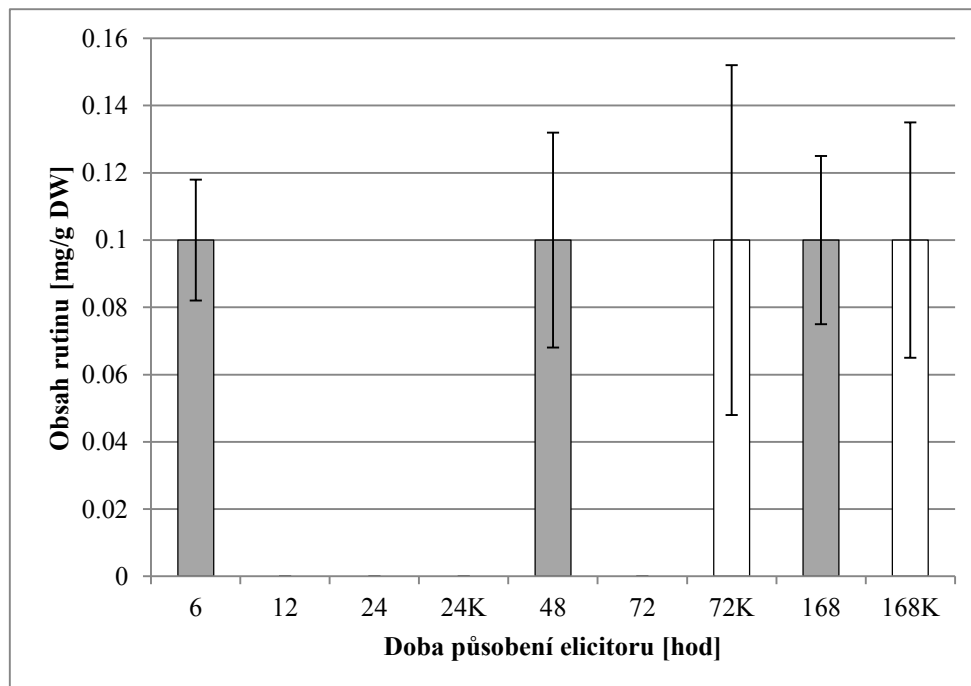
Graf č. 3: Závislost obsahu rutinu [mg/g DW] v kalusové kultuře na době působení elicitoru SeO<sub>2</sub> o koncentraci c<sub>3</sub> [1 mg/100 ml].



Graf č. 4: Závislost obsahu rutinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře na době působení elicitoru SeO<sub>2</sub> o koncentraci c<sub>2</sub> [10 mg/100 ml].



Graf č. 5: Závislost obsahu rutinu [mg/g DW] v suspenzní kultuře na době působení elicitoru  $\text{SeO}_2$  o koncentraci  $c_3$  [1 mg/100 ml].



„K“ označuje kontrolní vzorky bez elicitoru. „DW“ je zkratkou pro „Dry Weight“ (sušinu).

Graf nebyl vyhotoven pro změny obsahu rutinu v suspenzní kultuře v závislosti na elicitaci  $\text{SeO}_2$  o koncentraci  $c_1$  (100 mg/100 ml), protože žádný ze vzorků nevykazoval detekovatelné hodnoty obsahu rutinu.

Ve vzorcích kultivačních médií nebyl rutin prokázán, výsledky nebyly graficky zaznamenány.



## 6 DISKUZE

Celá řada sekundárních metabolitů produkovaných vyššími rostlinami nachází uplatnění v různých oborech, jako je např. farmacie, potravinářství či kosmetika. Existují rozličné způsoby, jak sekundární metabolity získávat. Vedle izolace metabolitů z intaktních rostlin a ekonomicky náročné organické syntézy se jako perspektivní alternativa jeví využití biotechnologií.<sup>9)</sup> Množství sekundárních metabolitů produkovaných explantátovými kulturami v *in vitro* prostředí však není zpravidla dostatečné.<sup>61)</sup> Jednou z metod umožňujících zvýšení produkce je elicitace – syntéza a akumulace sekundárních metabolitů v kultuře se zintenzivní v rámci stresové, obranné reakce vyvolané elicitorem.<sup>6, 62)</sup>

Diplomová práce je zaměřena na pozorování vlivu abiotického elicitoru oxidu seleničitého ( $\text{SeO}_2$ ) v různých koncentracích na produkci flavonoidu rutinu v kalusových a suspenzních kulturách pohanky seté (*Fagopyrum esculentum*, var. Špačinská). Také bylo sledováno množství rutinu uvolněného do živného média. K experimentu byly využity kultury z 9.–15. pasáže. Obsah rutinu byl analyzován z extraktů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Ke kultivaci bylo použito médium dle Murashigeho a Skooga<sup>59)</sup> a kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová o koncentraci 1 mg/l jako růstový regulátor. Roztoky elicitoru  $\text{SeO}_2$  o třech různých koncentracích ( $c_1 = 9,012 \cdot 10^{-3}$  mol/l,  $c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$  mol/l a  $c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$  mol/l) se postupně přidávaly k suspenzním i kalusovým kulturám. Odběr vzorků elicitovaných kultur probíhal v pravidelných časových intervalech po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách kultivace. Paralelně byly odebírány vzorky živných médií.

Extrakty připravené z odebraných vzorků byly analyzovány metodou HPLC pomocí standardů rutinu. Výsledný obsah rutinu v kulturách po elicitaci je uveden v tabulkách č. 3, 4 a znázorněn graficky (grafy č. 1–5).

### **Kalusová kultura**

Roztok elicitoru o koncentraci  $c_1$  ovlivnil obsah rutinu v kalusové kultuře ve dvou případech. Po 48 hod elicitace byl zaznamenán obsah 0,1 mg/g DW a po 168 hod 0,2 mg/g DW rutinu. (tab. č. 3, graf č. 1)

Výraznějších výsledků v produkci rutinu bylo dosaženo působením elicitoru o koncentraci  $c_2$ . Vzorek odebraný po 6hod elicitaci vykazoval 0,2 mg/g DW rutinu. Obsah rutinu se znatelně zvýšil 12 hod po expozici elicitoru na 0,6 mg/g DW – jedná se

o nejvýznamnější nárůst oproti kontrole (0 mg/g DW) ze všech měření. Poté obsah rutinu postupně klesal. Po 24 a 48 hod bylo ve vzorku zjištěno shodných 0,3 mg/g DW rutinu, což však ve srovnání s kontrolou (0,2 mg/g DW) činí nárůst jen o 0,1 mg/g DW. Po 72 a 168 hod elicitace nebyl rutin detekován vůbec. (tab. č. 3, graf č. 2)

Elicitor o nejnižší koncentraci ovlivnil produkci rutinu pozitivně pouze u vzorku odebíraného po 6 hod (0,2 mg/g DW), který vykazoval nárůst o 0,1 mg/g DW oproti kontrolnímu vzorku. Po 12 hod působení elicitoru odpovídalo množství rutinu naměřené v elicitovaném vzorku (0,1 mg/g DW) obsahu zjištěném ve vzorku kontrolním (0,1 mg/g DW), elicitor tedy produkci nijak neovlivnil. V případě vzorků odebíraných po 24, 72 a 168 hod od aplikace elicitoru byl zjištěn vyšší obsah rutinu u kontrolních než u elicitovaných kultur, což v důsledku znamená statisticky významný pokles produkce rutinu po působení elicitoru. U kontrolního vzorku po 24 hod elicitace, jež byl porovnáván s elicitovanými kulturami odebíranými po 24 a 48 hod (shodně naměřeno 0 mg/g DW), bylo zjištěno 0,2 mg/g DW rutinu. Kontrolní vzorky po 72 hod (0,1 mg/g DW) a po 168 hod (0,2 mg/g DW) vykazovaly shodný rozdíl obsahu rutinu 0,1 mg/g DW oproti elicitovaným vzorkům odebíraným v paralelních časech. (tab. č. 3, graf č. 3)

S výjimkou vzorku elicitovaného roztokem o koncentraci  $c_3$  a odebíraného po 12 hod (0,1 mg/g DW) elicitace se ve všech případech jednalo o statisticky významné výsledky.

### **Suspenzní kultura**

Rožtok elicitoru o koncentraci  $c_1$  neměl na obsah rutinu v suspenzních kulturách žádný vliv.

Po elicitaci rožtokem o nižší koncentraci  $c_2$  se obsah rutinu v suspenzní kultuře zvýšil pouze v intervalu 6 hod na 0,2 mg/g DW. Také u kontrolního vzorku odebíraného po 24 hod došlo k nárůstu obsahu rutinu na 0,1 mg/g DW. Kontrolní vzorek 24K byl porovnáván s elicitovanými vzorky odebranými po 6, 12, 24 a 48 hod, ani v jednom z případů však pokles produkce rutinu v elicitovaných kulturách oproti kontrole nedosahoval statisticky významných hodnot. (tab. č. 4, graf č. 4)

Elicitace rožtokem o koncentraci  $c_3$  ovlivnila produkci rutinu v suspenzních kulturách nejvýrazněji. O statisticky významné hodnoty obsahu rutinu se jednalo u vzorků odebíraných po 6 a 48 hod elicitace (shodně 0,1 mg/g DW). Po 72 hod došlo ke statisticky nevýznamnému zvýšení obsahu rutinu u kontrolního vzorku (0,1 mg/g DW). Po 168 hod elicitace byl naměřen shodný výsledek u elicitovaného i kontrolního vzorku

(0,1 mg/g DW), obsah rutinu tedy nebyl v tomto případě elicací ovlivněn. (tab. č. 4, graf č. 5)

Uvolňování rutinu do kultivačního média nebylo prokázáno ani u kalusových, ani u suspenzních kultur v žádném z měření.

Stanovení obsahu rutinu v elicovaných a kontrolních vzorcích suspenzí a kalusové kultury *Fagopyrum esculentum* variety Špačinská ukázalo, že je oxid seleničitý jako abiotický elicitor schopen ovlivňovat produkci rutinu v daných kulturách.

Jako vhodnější se jeví jeho použití u kalusových kultur, u nichž se statisticky významně zvýšila produkce rutinu po aplikaci elicitoru ve všech třech testovaných koncentracích. Nejvyššího nárůstu produkce rutinu v kalusové kultuře bylo docíleno použitím roztoku elicitoru o koncentraci  $c_2 = 9,012 \cdot 10^{-4}$  mol/l působícího po 12 hodin. Výsledný obsah rutinu v tomto případě dosahoval 0,6 mg/g DW. Naopak v případě nejnižší použité koncentrace elicitoru  $c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$  mol/l došlo u většiny vzorků ke statisticky významnému poklesu produkce rutinu oproti kontrole, nejvýrazněji u vzorků odebraných po 24 a 48 hodinách elicitace.

Vliv elicitoru na obsah rutinu u suspenzní kultury byl prokázán pouze ve dvou případech, konkrétně se jednalo o nejnižší koncentraci elicitoru  $c_3 = 9,012 \cdot 10^{-5}$  mol/l a dobu působení 6 a 48 hodin. Naměřené hodnoty obsahu rutinu byly srovnatelné s hodnotou získanou u kalusových kultur po elicaci roztokem elicitoru o stejné koncentraci ( $c_3$ ) po dobu 6 hodin. Oproti nejvyšší naměřené hodnotě obsahu u kalusové kultury byla však produkce rutinu v suspenzních kulturách šestkrát nižší.

Pro zvýšení obsahu rutinu u kalusových kultur se nejlépe osvědčil roztok elicitoru o koncentraci  $c_2$ , u suspenzních kultur roztok o koncentraci  $c_3$ .

Oxid seleničitý jako abiotický elicitor nijak nepřispěl k uvolňování rutinu do kultivačního média a jeho využití k tomuto účelu u kultur *Fagopyrum esculentum* variety Špačinská se tedy nejeví jako vhodné.

Využití selenu jako abiotického elicitoru má podklad v řadě předchozích studií. Kapoor et al. zkoumali vliv selenu v podobě seleničitanu v různých koncentracích na *in vitro* kultury rostliny *Allium sativum* L. Kromě jiného prokázali zvyšování produkce sekundárního metabolitu alliinu s rostoucí koncentrací selenu s maximem při 4 mg/l.<sup>63)</sup>

Jeong a Park ve své studii zkoušeli vliv několika abiotických elicitorů na kořenové kultury rostliny *Panax ginseng*, konkrétně na růst kultury a biosyntézu sekundárních metabolitů. Po 21 dnech kultivace byl ke kultuře přidán selen v koncentraci 0,5 mM. Na základě toho se významně zvýšil obsah a produkce saponinů.<sup>64)</sup>

Ahmad et al. posuzovali účinek selenu na toxické působení kadmia v rostlině *Brassica juncea*. Selen zmírňoval dopad toxicity kadmia zvyšováním tvorby a koncentrace osmoprotektivních látek, antioxidantních enzymů a sekundárních metabolitů.<sup>65)</sup>

Selen může však ve vysokých koncentracích působit toxicky, jak ukázala např. studie Cheng et al. V závislosti na dávce a době působení selenu se měnil metabolismus druhu *Spirulina platensis* a byly zvýšeně produkovány antioxidantní enzymy. Vyšší dávky selenu než 175 mg/l vedly ovšem až k peroxidaci lipidů a úniku draslíku z buněk, tzn., že ani zvýšená produkce antioxidantů nebyla dostatečná k ochraně buněčné membrány před stresem vyvolaným vysokou koncentrací selenu.<sup>66)</sup>

Také některé diplomové práce se věnovaly selenu jako abiotickému elicitoru. Chreňová K. uvádí, že u suspenzních kultur *Genista tinctoria* L. byl vliv selenu na produkci sekundárních metabolitů znatelnější než u kultur kalusových. Během experimentu nedocházelo k uvolňování metabolitů do médií.<sup>67)</sup> Naopak Seidlová M. ve své práci prokázala, že elicítace selenem u kultur *Silybum marianum* L. vede k uvolňování sekundárních metabolitů do média.<sup>68)</sup>

Rigorózní práce Sojkové K. se zabývala vlivem selenu na produkci flavonoidů v kulturách *Hypericum perforatum* L. Suspenzní kultury vykazovaly po elicítaci vyšší obsah flavonoidů než kalusové. Nižší výsledný obsah flavonoidů v kalusových kulturách je vysvětlován uvolňováním většího množství metabolitů do kultivačních médií. U obou druhů kultur se jako nejúčinnější jevil roztok elicitoru o koncentraci  $c_1$  ( $9,012 \cdot 10^{-3}$  mol/l).<sup>69)</sup>

Také pohanka druhu *Fagopyrum esculentum* je předmětem zájmu soudobých vědeckých prací. Pro její výhodné vlastnosti jako je sladká chuť a velká, snadno loupateľná semena se jedná o v současnosti nejvyžívanější druh pohanky v potravinářství. Zkoumá se jako potenciální zdroj rutinu.

*In vitro* produkci rutinu v pohance *Fagopyrum esculentum* prověřovali Lee et al. Za určitých podmínek bylo v kořenových kulturách naměřeno 0,8–1,2 mg/g DW rutinu. Růst a produkce rutinu probíhaly nejlépe při kultivaci na MS médiu. Přídavek auxinů na obsah rutinu neměl vliv. Kultivace kořenových kultur *Fagopyrum esculentum* byla vyhodnocena jako potenciálně vhodná alternativní metoda k získávání rutinu.<sup>70)</sup>

Studie Jiang et al. porovnávala obsah rutinu a flavonoidů v semenech tří druhů pohanky a jejich antioxidační aktivitu. Vedle *Fagopyrum tataricum* a exotického druhu *Fag. homotropicum* vykazovala pohanka setá (*Fagopyrum esculentum*) nejmenší obsah rutinu (0,02 %). Antioxidační aktivita významně korespondovala s obsahem rutinu.<sup>57)</sup>

K podpoře produkce rutinu v pohance se zkouší různé elicitory. Tůmová a Tůma sledovali vliv elicitoru paraquat ve třech různých koncentracích na produkci flavonoidů v *in vitro* kulturách *Fagopyrum esculentum*. Maximální obsah rutinu (0,25 %) v kalusové kultuře byl zjištěn po 72 hodinách elicítace paraquatem o koncentraci  $2,1929 \cdot 10^{-3}$  mol/l. V suspenzní kultuře naměřili nižší hodnotu maximálního obsahu rutinu než v kalusové (0,02 %) po 24hodinové elicítaci paraquatem o koncentraci  $2,1929 \cdot 10^{-5}$  mol/l.<sup>71)</sup>

Diplomová práce Majerové J. vyhodnotila ultrazvuk jako nevhodný elicitor ke zvyšování obsahu rutinu v kulturách *Fagopyrum esculentum*.<sup>72)</sup> Maliňáková L. ve své práci uvádí statisticky významné zvýšení produkce rutinu po elicítaci kultur *Fagopyrum esculentum* elicitorem chloridem ceritým o koncentraci  $4,057 \cdot 10^{-3}$  mol/l po dobu 6 hodin.<sup>73)</sup>

## 7 ZÁVĚR

Účelem této diplomové práce bylo sledovat vliv elicitoru  $\text{SeO}_2$  v podobě roztoku o různých koncentracích na produkci sekundárního metabolitu rutinu v explantátových kulturách *Fagopyrum esculentum*, varieta Špačinská. Z provedené analýzy vyplývají následující poznatky:

- přidavek elicitoru se projevil zvýšenou produkcí rutinu u kalusových i u suspenzních kultur;
- výraznějších výsledků (obecně vyšších hodnot obsahu rutinu a většího množství statisticky významných dat) bylo docíleno u kultur kalusových;
- nejvyššího nárůstu produkce rutinu (0,6 mg/g DW) bylo dosaženo po elicitaci kalusové kultury roztokem  $\text{SeO}_2$  o koncentraci  $9,012 \cdot 10^{-4}$  mol/l a době působení elicitoru 12 hodin;
- maximální obsah rutinu u suspenzních kultur byl naměřen shodně 0,1 mg/g DW po 6 a 48 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $9,012 \cdot 10^{-5}$  mol/l;
- u kalusových kultur se obecně nejvíce osvědčila koncentrace elicitoru  $9,012 \cdot 10^{-4}$  mol/l, u suspenzních kultur jediné  $9,012 \cdot 10^{-5}$  mol/l;
- v některých případech vykazovaly kontrolní vzorky vyšší obsah rutinu než vzorky elicítované: produkce rutinu tedy v daných kulturách po elicitaci klesala, nejmarkantněji v kulturách kalusových po 24 a 48 hodinách působení elicitoru o koncentraci  $9,012 \cdot 10^{-5}$  mol/l;
- ani u kalusových, ani u suspenzních kultur nedocházelo k uvolňování rutinu do živného média.

Z daných výsledků lze usoudit, že selen v podobě oxidu seleničitého je jako abiotický elicitor schopen za určitých podmínek zvyšovat produkci rutinu v kalusových a suspenzních kulturách rostliny *Fagopyrum esculentum*, varieta Špačinská. Použití selenu za účelem uvolňování rutinu z kultury do kultivačního média se neosvědčilo.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R.. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 2005; 23, 283–333.
2. Kováč J. Explantátové kultury rostlin. 1. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého 1995; 142 s.
3. Sikyta B., Dušek J. Biotechnologie pro farmaceuty. 3. vyd. Praha: Karolinum 2001; 75–81.
4. Tůma J., Tůmová L. Fyziologie rostlin. 1. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus 1998; 132, 242–246.
5. Slater A., Scott N., Fowler M. *Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants.* Oxford: Oxford University Press 2008; 37–53.
6. Hradilík J. Rostlinné explantáty. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita 2005; 85 s.
7. Neumann K. H., Kumar A., Imani J. *Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology.* Berlín: Springer 2009; 1–50.
8. Tomko J., Kresánek J., Hubík J., et al. *Farmakognózia.* 1. vyd. Martin: Osveta 1989; 424 s.
9. Vanisree M., Lee C. Y., Lo S. F., et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica* 2004; 45, 1–22.
10. Pant B. Application of Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Phytochemicals in Medicinal Plants. *Adv Exp Med Biol* 2014; 808, 25–39.
11. Procházka S., Šebánek J., Gloser J., Sladký Z. *Botanika: Morfologie a fyziologie rostlin.* 3. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita 2007; 184–212.
12. George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J. *Plant Propagation by Tissue Culture.* 3. vyd. Dordrecht: Springer 2008; 65–281.
13. Smith R. H. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments.* Academic Press 2012; 31–43.
14. Torres K. C. *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops.* 1. vyd. New York: Van Nostrand Reinhold 1989; 26–51.

15. Chawla H. S. Introduction to Plant Biotechnology. 2. vyd. Enfield: Science Publishers 2002; 15–19.
16. Nagy M., Grančai D., Mučaji P. Farmakognózia: Biogenéza prírodných látok. 1. vyd. Martin: Osveta 2011; 23–25.
17. Schulze E.-D., Beck E., Müller-Hohenstein E. Plant ecology. Heidelberg: Springer 2005; 6–13.
18. Murthy H. N., Lee E.-J., Paek K.-Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Org* 2014; 118 (1), 1–16.
19. Ramachandra Rao S., Ravishankar G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2002; 20, 101–153.
20. Namdeo A. G. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Phcog Rev* 2007; 1 (1), 69–79.
21. Sreedhar A. S., Vanathi P., Paithankar K. R. Stress proteins in biology and medicine: evolution, adaptation and clinical evaluation. *Int J Pharma Bio Sci* 2010; 1 (3), 1–36.
22. Procházka S., Macháčková I., Krekule J. et al. Fyziologie rostlin. 1. vyd. Praha: Academia 1998; 412–431.
23. Naik P. M., Al-Khayri J. M. Abiotic and Biotic Elicitors – Role in Secondary Metabolites Production through *In vitro* Culture of Medicinal Plants. In: Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives. InTech 2016; 247–277.
24. EMEP Assessment Report, Chapter 7: Heavy Metals.  
[http://emep.int/publ/reports/2004/assessment\\_2004.html](http://emep.int/publ/reports/2004/assessment_2004.html) (3. 4. 2017)
25. Cai Z., Kastell A., Speiser C., Smetanska I. Enhances Resveratrol Production in *Vitis vinifera* Cell Suspension Cultures by Heavy Metals Without Loss of Cell Viability. *Appl Biochem Biotech* 2013; 171 (2), 330–340.
26. Ulbrichová I. Těžké kovy.  
[http://fle.czu.cz/~ulbrichova/Skripta\\_HIO/kapitoly/Skodliviny/Tezkovyuvod.htm](http://fle.czu.cz/~ulbrichova/Skripta_HIO/kapitoly/Skodliviny/Tezkovyuvod.htm)  
(3. 4. 2017)
27. Shanker A. K., Venkateswarlu B. Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations. Rijeka: InTech, 2011; 59–78.



28. Srivastava N. K., Srivastava A. K. Influence of Some Heavy Metals on Growth, Alkaloid Content and Composition in *Catharanthus roseus* L. Indian J Pharm Sci. 2010, 72 (6), 775–778.
29. Kašparová M., Siatka T. Abiotická elicitace explantátové kultury *Rheum palmatum* L. těžkými kovy. Čes slov farm 2004; 5, 252–255.
30. Huang C., Zhong J.–J. Elicitation of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax ginseng* by vanadate. Process Biochem 2013; 48, 1227–1234.
31. Rai V., Khatoon S., Bisht S. S., Mehrotra S. Effect of cadmium on growth, ultramorphology of leaf and secondary metabolites of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. Chemosphere 2005; 61, 1644–1650.
32. Martens D. A. Selenium. In: Encyclopedia of water science. New York: Marcel Dekker 2003; 840–842.
33. Mechora Š., Sotler M., Urbanek Krajnc A., Ambrožič–Dolinšek J. How Selenium Affects *Berula erecta*. Water Air Soil Pollut 2016; 227 (12), 451.
34. Preedy V. R. Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects. Cambridge: Royal Society of Chemistry 2015; 3–15.
35. Dastych M. Selen – esenciální stopový prvek. Labor Aktuell 2004; 3, 29–31.
36. Holeček V. Oxidační stres u nádorových onemocnění. Klin Biochem Metab 2010; 18 (39), 225–230.
37. Pilon–Smits E. A. H., LeDuc D. L. Phytoremediation of selenium using transgenic plants. Curr Opin Biotech 2009; 20, 207–212.
38. Nordberg M., Nordberg G. F., Fowler B. A., Friberg L. Handbook on the Toxicology of Metals. 3. vyd. Academic Press 2011; 783–807.
39. Ellis D. R., Salt D. E. Plants, selenium and human health. Curr Opin Plant Biol 2003; 6, 273–279.
40. Kaur N., Sharma S., Kaur S., Nayyar H. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? Arch Agron Soil Sci 2014; 60 (12), 1593–1624.
41. Selenium Compounds. <https://www.epa.gov/haps/health-effects-notebook-hazardous-air-pollutants> (3. 4. 2017)
42. Hawrylak B., Matraszek R., Szymańska M. Response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to selenium in nutrient solution contaminated with nickel. Vegetable Crops Research Bulletin 2007; 67, 63–70.

43. Malik J. A., Goel S., Kaur N., et al. Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. *Environ Exp Bot* 2012; 77, 242–248.
44. Guerrero B., Llugany M., Palacios O., Valiente M. Dual effects of different selenium species on wheat. *Plant Physiol Bioch* 2014; 83, 300–307.
45. Moudrý J., Kalinová J., Petr J., Michalová A. Pohanka a proso. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací 2005; 20–129.
46. Polák E. Perspektívy šľachtenia pohánky na Slovensku. <http://www.agris.cz/clanek/110789/perspektivy-slachtenia-pohanky-na-slovensku> (3. 4. 2017)
47. Bystricka J., Musilova J., Tomas J., et al. Changes of Polyphenolic Substances in the Anatomical Parts of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) during Its Growth Phases. *Foods* 2014; 3, 558–568.
48. Janovská D., Čepková P. Evaluation of Common Buckwheat Varieties Registered in Czech Republic. In: *Advances in Buckwheat Research. 10th International Symposium on Buckwheat*. Yangling: Northwest A & F Univ Press 2007; 57–59.
49. Stehno Z., Janovská D., Wang Z. Comparison of Selected Traits of Common and Tartary Buckwheat Originated from China and Czech Republic under Conditions of the Czech Republic. In: *Advances in Buckwheat Research. 10th International Symposium on Buckwheat*. Yangling: Northwest A & F Univ Press 2007; 252–256.
50. Kiproviski B., Mikulic–Petkovsek M., Slatnar A., et al. Comparison of phenolic profiles and antioxidant properties of European *Fagopyrum esculentum* cultivars. *Food Chem* 2015; 185, 41–47.
51. Kolektiv autorů. Český lékopis 2009. Praha: Grada Publishing 2009; 1355–1356.
52. Tůmová L., Píchová M., Dušek J. Pohanka obecná a její terapeutické využití. *Praktik lékáren* 2007; 4, 190.
53. Hon Z., Patočka J. Pohanka jako funkční potravina. *Kontakt* 2008; 10 (1), 229–231.
54. Tavčar Benkovič E., Kreft S. Fagopyrins and Protofagopyrins: Detection, Analysis, and Potential Phototoxicity in Buckwheat. *J Agr Food Chem* 2015; 63 (24), 5715–5724.
55. Kreft S., Knapp M., Kreft I. Extraction of Rutin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds and Determination by Capillary Electrophoresis. *J Agr Food Chem* 1999; 47 (11), 4649–4652.

56. Steadman K. J., Burgoon M. S., Lewis B. A., et al. Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions. *J Sci Food Agr* 2001; 81 (11), 1094–1100.
57. Jiang P., Burczynski F., Campbell C., et al. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Res Int* 2007; 40 (3), 356–364.
58. Tůmová L., Píchová M., Dušek J. *Fagopyrum esculentum in vitro*. *Čes slov farm* 2007; 56, 125–128.
59. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum* 1962; 15, 473–497.
60. Klemra P., Klemrová V. *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 1993. 16–17, 22–27.
61. Tůmová L., Tůma J. Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidávkem elicitoru paraquat. *Chem listy* 2009; 103, 503–510.
62. Siatka T., Sklenářová H., Kašparová M., Solich P. Vliv chloridu rtuťnatého na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Chem listy* 2011; 105, 367–370.
63. Kapoor R., Nasim S. A., Dhir B., Mahmooduzzafar M. A. Selenium treatment alters phytochemical and biochemical activity of *in vitro*-grown tissues and organs of *Allium sativum* L. *In Vitro Cell Dev-Pl* 2012; 48, 411–416.
64. Jeong G.-T., Park H.-H. Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system. *Appl Biochem Biotech* 2006; 129–132, 436–446.
65. Ahmad P., Abd Allah E. F., Hashem A. Exogenous Application of Selenium Mitigates Cadmium Toxicity in *Brassica juncea* L. (Czern & Cross) by Up-Regulating Antioxidative System and Secondary Metabolites. *J Plant Growth Regul* 2016; 35 (4), 936–950.
66. Chen T. F., Zheng W. J., Wong Y. S., Yang F. Selenium-induced Changes in Activities of Antioxidant Enzymes and Content of Photosynthetic Pigments in *Spirulina platensis*. *J Integr Plant Biol* 2008; 50 (1), 40–48.
67. Chreňová K. *Kultury léčivých rostlin in vitro – XX*. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2016.
68. Seidlová M. *Kultury léčivých rostlin in vitro – IXX*. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2016.

69. Sojková K. Možnosti ovlivnění produkce sekundárních látek v *in vitro* kulturách léčivých rostlin. Rigorózní práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2014.
70. Lee S. Y., Cho S. I., Park M. H., et al. Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). *Prep Biochem Biotech* 2007; 37 (3), 239–246.
71. Tůmová L., Tůma J. The effect of paraquat on flavonoid production in *Fagopyrum esculentum* cultures *in vitro*. *Cereal Res Commun* 2009; 37 (1), 557–560.
72. Majerová J. Kultury léčivých rostlin *in vitro* – XIV. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2013.
73. Maliňáková L. Kultury léčivých rostlin *in vitro* – X. Diplomová práce. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2010.

## 9 ABSTRAKT

Vyšší rostliny představují důležitý zdroj cenných látek, sekundárních metabolitů, k jejichž získávání mohou být využity explantátové kultury rostlin. Elicitace je metoda zvyšování produkce sekundárních metabolitů. Cílem této studie je vyhodnotit produkci sekundárních metabolitů v *in vitro* kultuře *Fagopyrum esculentum* variety Špačinská po přidavku elicitoru. Experiment byl zaměřen na změnu v produkci rutinu v kalusové a suspenzní kultuře *F. esculentum* var. Špačinská, vyvolanou aplikací selenu. Ke kultivaci bylo použito médium podle Murashigeho a Skooga obohacené o 2,4-dichlorfenoxycetovou kyselinu o koncentraci 1 mg l<sup>-1</sup>. Kultury byly elicitovány roztoky selenu o různých koncentracích ( $c_1 = 9.012 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>,  $c_2 = 9.012 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>,  $c_3 = 9.012 \times 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup>) po dobu 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Obsah rutinu byl stanoven prostřednictvím HPLC analýzy. Studie se zabývala také uvolňováním sekundárních metabolitů do živného média.

Produkce rutinu se po aplikaci elicitoru zvýšila v kalusové i v suspenzní kultuře. Vyšší hodnoty obsahu rutinu byly naměřeny v kalusové kultuře. Maximálního obsahu rutinu (0.6 mg g<sup>-1</sup> DW) bylo dosaženo v kalusové kultuře po 12 h působení elicitoru o koncentraci  $c_2$ . Nejvyšší produkce rutinu v suspenzní kultuře (0.1 mg g<sup>-1</sup> DW) byla zaznamenána po 6 a 48 h elicitace roztokem selenu o koncentraci  $c_3$ . Uvolňování rutinu do živného média nebylo pozorováno. Selen je jako elicitor schopen zvyšovat produkci rutinu v *in vitro* kulturách *Fagopyrum esculentum* variety Špačinská.

## 10 ABSTRACT

Higher plants represent an important source of valuable substances, so called secondary metabolites, which can be obtained through explant cultures of plants. Elicitation is a method of increasing the secondary metabolites production. This study aims to evaluate the secondary metabolites production in *Fagopyrum esculentum* variety Spacinska cultures *in vitro* after abiotic elicitor treatment. The experiment was focused on alteration of rutin production in callus and suspension cultures of *F. esculentum* var. Spacinska after selenium application. Murashige and Skoog nutrient medium supplemented with 1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid was used for the cultivation. Selenium solutions of various concentrations ( $c_1 = 9.012 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>,  $c_2 = 9.012 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>,  $c_3 = 9.012 \times 10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup>) were affecting the cultures for 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours. The content of rutin was determined by HPLC. The release of secondary metabolites into the nutrient medium was studied as well.

After elicitor application, the rutin production increased in both callus and suspension cultures. Higher levels of rutin content were detected in callus culture. The maximum rutin content (0.6 mg g<sup>-1</sup> DW) was reached after 12 h of elicitor treatment of  $c_2$  concentration in callus culture. Concerning suspension culture, the maximum rutin production (0.1 mg g<sup>-1</sup> DW) was detected after 6 and 48 h of elicitor application of  $c_3$  concentration. The rutin release into the nutrient medium was not observed. The elicitor selenium is able to increase rutin production in *Fagopyrum esculentum* variety Spacinska cultures *in vitro*.