

DATUM:

JMÉNO:

TÉMA: **Založení kultury adventivních kořenů *Echinacea purpurea* pro produkci derivátů kyseliny kávové**

Třapatka růžová (*Echinacea purpurea*) je důležitá léčivá bylina. Extrakty z kořenů mají antioxidantní, antibakteriální, antivirotické a antimykotické účinky a používají se jako imunostimulancia proti zánětlivým a virovým nemocem. Hlavními účinnými látkami jsou deriváty kyseliny kávové, alkylamidy a polysacharidy, které je možné produkovat i biotechnologicky v suspenzních kulturách.

### 1. INICIACE TVORBY ADVENTIVNÍCH KOŘENŮ Z KOŘENOVÝCH EXPLANTÁTŮ

MATERIÁL: Kořeny třapatky růžové (*Echinacea purpurea*)

MÉDIUM: **MS-T** médium, 5% sacharóza, 4,9  $\mu$ M IBA, 0,2% gelrit, pH 6,0.

POMŮCKY: sterilní Petriho misky, sterilní pinzeta a skalpel, kahan, apod.

POSTUP:

1. Zdravé kořeny omyj pečlivě ve vodovodní vodě.
2. Desinfikuj kořeny ponořením do 96% ethanolu na 10 sekund a následně do 20% chlornanu sodného s přidavkem detergentu po dobu 10 minut.
3. Oplachuj 3 x kořeny v SDV po dobu 5 minut.
4. Připrav kultivační nádoby s čerstvým médiem a sterilní nástroje (pinzety, skalpely).
5. Ožehni hrdlo otevřené nádoby plamenem.
6. V laminárním boxu nakrájej 1 cm segmenty kořenů a inokuluj je do MS média výše uvedeného složení.
7. Inkubace kultur: 4 týdny v termostatu, tma, 25°C
8. Explantáty je třeba pasážovat na čerstvé médium ve čtyřtýdenních intervalech.

HODNOCENÍ:

Kontroluj výskyt infekcí v průběhu kultivace. V případě nedostatečné desinfekce výše uvedeným postupem je nutné použít razantnější postup desinfekce s aplikací 0,1% chloridu rtuťnatého. **Tato látka je však velmi toxická (spadá do kategorie T+ látek) a je nutné při jejím používání dodržovat všechna pravidla pro nakládání s takovými látkami = používat požadované ochranné pracovní prostředky a nechat likvidovat odpad specializovanou firmou.**

Adventivní kořeny by se na kořenových explantátech měly objevit po 4 týdnech kultivace.

## 2. INDUKCE KULTURY ADVENTIVNÍCH KOŘENŮ

MATERIÁL: Kultura adventivních kořenů třapatky růžové (*Echinacea purpurea*)

MÉDIUM: tekuté ½ MS médium, 5% sacharóza, 4,9µM IBA, pH 6,0.

POMŮCKY: sterilní Petriho misky, sterilní pinzeta a skalpel, kahan, apod.

POSTUP:

1. Odeber aktivně rostoucí adventivní kořeny z kultury na polotuhém médiu.
2. Nakrájej 2 cm segmenty a inokuluj minimálně 1 g čerstvé hmotnosti adventivních kořenů do 250 ml Erlenmayerovy lahve se 100 ml tekutého média.
3. Inkubuj kultury ve tmě, 25°C, na třepačce při 100 otáčkách za min.
4. Pasážuj na čerstvé médium ve čtyřtýdenních intervalech.

HODNOCENÍ:

V průběhu kultivace by měla být vytvořena hmota adventivních kořenů, která může být použita pro suspenzní kultury v bioreaktoru nebo extrakce a analýzy derivátů kyseliny skořicové. Je nutné kontrolovat pravidelně výskyt infekcí.

LITERATURA

Jain S. Mohan; Saxena Praveen K. (Eds.)(2009): Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 547.