

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

1130771

**MOŽNOSTI EXPLANTÁTOVÝCH KULTÚR GINKA
DVOJLALOČNÉHO**

2011

Veronika Gregušová

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**MOŽNOSTI EXPLANTÁTOVÝCH KULTÚR
GINKA DVOJLALOČNÉHO**

Bakalárska práca

Študijný program: agrobiotechnológie
Študijný odbor: 2908700, biotechnológie
Školiace pracovisko: Katedra genetiky a šľachtenia rastlín
Školiteľ: Jana Kutišová, Ing.

Nitra, 2011

Veronika Gregušová

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Veronika Gregušová vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Možnosti explantátových kultúr ginka dvojlaločného“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 18. mája 2011

.....

Pod'akovanie

Dovoľujem si touto cestou poďakovať Ing. Jane Kutišovej, vedúcej bakalárskej práce, za cenné rady a pripomienky, ktorými mi ochotne pomáhala pri vypracovaní bakalárskej práce.

Ďakujem aj svojej rodine za podporu a trpezlivosť.

Abstrakt

Explantátové kultúry predstavujú kultiváciu izolovaných častí rastlín za umelých podmienok, čiže v podmienkách *in vitro*.

Prvý muž, ktorý sa zaoberal explantátovými kultúrami bol Gottlieb Haberlandt.

Explantátové kultúry môžeme rozdeliť na: orgánové, pletivové, bunkové a protoplastové kultúry. Majú veľa výhod a aj nevýhod.

Ginko dvojlaločné bolo objavené už pred mnohými rokmi v Číne v oblasti chrámov. Po niekoľkých rokoch sa dostalo aj do Európy, kde sa pestuje hlavne v parkoch. Patrí medzi živé fosílie.

Zaraďujeme ho medzi ihličnaté stromy. Patrí do oddelenia *Spermatophyta*, pododdelenia *Gymnospermatophytina* a triedy *Ginkgopsida*.

Na Slovensku sa považuje za chránenú rastlinu. Možno ho využiť aj v medicíne.

Kľúčové slová: explantátové kultúry, Ginko dvojlaločné

Abstract

Explantate cultures, as a concept, embody the cultivation of isolated plant parts in artificial conditions (*in vitro*).

The first man to conduct a research concerning the explantate cultures was Gottlieb Haberlandt.

The explantate cultures can be divided into several distinct types: the organ cultures, the tissual cultures, the cellular cultures and the protoplastic cultures. Their usage has a number of both the advantages and disadvantages.

Ginkgo biloba was discovered many years ago in the general vicinity of churches. After a few years it spread to Europe where it is being grown mainly in parks. It is a living fossil.

It is classified as a coniferous tree, member of the *Spermatophyta* division, the *Gymnospermatophytina* subdivision and of the *Ginkgopsida* class.

It is considered a state-protected plant in Slovakia. It can be used in medicine.

Key words: explantate cultures, *Ginkgo biloba*

Obsah

Úvod.....	6
1 Súčasný stav riešenej problematiky.....	8
1.1 Explantátové kultúry.....	8
1.1.1 História vzniku explantátových kultúr.....	9
1.1.2 Rozdelenie explantátových kultúr a ich charakteristika.....	10
1.1.3 Význam explantátových kultúr.....	22
1.1.4 Výhody a nevýhody explantátových kultúr.....	23
1.2 Ginko dvojlaločné.....	26
1.2.1 Pôvod slova.....	26
1.2.2 História ginka dvojlaločného.....	26
1.2.3 Taxonómia ginka dvojlaločného.....	27
1.2.4 Morfológická charakteristika ginka dvojlaločného.....	28
1.2.5 Využitie ginka dvojlaločného na farmaceutické účely.....	30
1.3 Explantátové kultúry a ginko dvojlaločné.....	32
2 Metodika práce.....	34
3 Cieľ práce.....	35
Záver.....	36
Zoznam použitej literatúry.....	37

Úvod

V súčasnosti je manipulácia s vyššími rastlinami na úrovni izolovaných buniek, pletív a orgánov jednou z perspektívnych oblastí rastlinných biotechnológií. Metódy, ktoré sú založené na kultivácii *in vitro*, označované aj ako explantátové kultúry, predstavujú nový netradičný metodický doplnok šľachtenia rastlín.

Explantátové kultúry sú pre súčasnú genetiku veľkým prínosom. Ukázalo sa tiež, že otvárajú možnosti k stále novým aplikáciám vo výskume a v šľachtení rastlín.

Hlavné prednosti týchto kultúr spočívajú najmä v rýchlejšej tvorbe nových výkonnejších odrôd, v rýchlom množení cenných rastlinných genotypov, v ozdravení šľachtiteľských materiálov a tým v dosahovaní vyšších úrod a nižších strát, ako aj v dlhodobom udržiavaní genetických zdrojov v kultúre *in vitro* a tým vo výraznom zefektívnení šľachtiteľského procesu.

Nevýhody sú oproti využitiu zanedbateľné. Za nevýhody možno považovať dlhé časové obdobie na vznik púčikov alebo výhonkov, úmerne s dĺžkou pestovania možnosť zvýšenia počtu genetických anomálií, vyššia variabilita v zakoreňovaných výhonkoch.

Pletivové kultúry môžeme z genetického hľadiska rozdeliť na kultúry uchovávajúce relatívnu genetickú stálosť rastlín pestovaných v podmienkach *in vitro* (embryokultúry, meristémové kultúry) a kultúry rozširujúce genetickú variabilitu (bunkové, protoplastové a kalusové kultúry).

Zmienka o ginku dvojlaločnom pochádza už z obdobia druhohôr, postupne z Číny, kde boli pestované najmä v oblasti chrámov sa rozšírilo jeho pestovanie aj do krajín Európy. Ginko dvojlaločné je považované za živú fosíliu.

Na Slovensku možno pekné exempláre vidieť hlavne v mestách ako sú Košice, Topolčianky, Trenčín, Arborétum Mlyňany. V súčasnosti sa vysádza najmä do parkov.

Zaraďujeme ho medzi ihličnaté stromy. Strom rastúci do výšky 20-30 m so zaujímavými, na jeseň do žltá sfarbenými opadavými listami. Kvety sú dvojdomé. Pestuje sa ako cenný strom, odolný proti mrazu.

Ginko dvojlaločné môžeme využiť aj medicíne. Používame ho hlavne pri poruchách zrážania krvi, zvýšení pamäťovej výkonnosti, prietoku krvi mozgom, pri bolestiach hlavy a závratoch. Bol zistený aj priaznivý účinok proti Alzheimerovej chorobe.

Výživové doplnky s obsahom kyseliny ginkolovej môžu spôsobiť tráviace ťažkosti a bolesti hlavy. Nemali by sme konzumovať semená ginka, pretože sú jedovaté a spôsobujú otravu až smrť.

1 Súčasný stav riešenej problematiky

1.1 Explantátové kultúry

V rámci biologických vedných disciplín majú dôležité a nezastupiteľné miesto rastlinné biotechnológie a genetické inžinierstvo. Bez viac ako tri štvrtiny storočia trvajúceho výskumu kultivácie rastlinných orgánov a pletív rastlín v podmienkach *in vitro*, by tieto oblasti nemohli dosiahnuť taký pokrok a napredovanie, aký je zaznamenaný v súčasnosti.

Pojem „kultúra rastlinných explantátov *in vitro*“ znamená aseptickú kultiváciu izolovaných častí rastlín za umelých podmienok. V praxi experimentu to znamená oddeliť zo sterilne vypestovanej alebo povrchovo sterilizovanej rastliny určitú časť, umiestniť ju do sterilného priestoru a kultivovať za viac alebo menej definovaných podmienok (Landa, 1980).

Komplex metód založený na kultivácii *in vitro* - explantátové kultúry predstavuje v súčasnej dobe nový netradičný systém šľachtenia rastlín.

Šľachtiteľská biotechnológia vychádza z týchto základných princípov

(Novák,1990) :

Veľké populácie buniek, z ktorých každá je potenciálnym zdrojom celého rastlinného organizmu, možno dlhodobo kultivovať a za kontrolovaných podmienok regenerovať v rastliny. V prípade indukcie procesu somatickej embryogenézy celá rastlina pochádza z jedinej somatickej bunky.

Bunková kultúra je potenciálnym zdrojom genetickej variability, pretože rastlinné bunky *in vitro* sú geneticky a chromozomálne nestabilné. Genetickú variabilitu možno prenikavo zvýšiť použitím mutagénov v kultúre *in vitro*. Bunkové mutantné línie nestrácajú totipotenciu, čo umožňuje získať výraznú genetickú premenlivosť aj u rastlín generovaných *in vitro*.

Geneticky rôznorodá bunková populácia môže byť vystavená značným selekčným tlakom (stresové podmienky prostredia, chemické látky, toxíny), ktoré selektujú bunky nesúce špecifickú genetickú zmenu (mutáciu). Mnohokrát koreluje prejav znaku na úrovni bunkovej s prejavom toho istého alebo iného znaku na úrovni celého organizmu. Znak selektovaný *in vitro* sa prenáša po regenerácii rastlinného organizmu sexuálnou alebo vegetatívnou cestou na pomomstvách v ďalších generáciach.

Populácia odvodená z haploidných buniek (peľ, vajíčka) zvyšuje pravdepodobnosť zachytenia recesívnych mutácií, ktoré nie sú maskované dominantnými alelami.

Kultúra organizovaných štruktúr rastlinného organizmu (zárodka alebo meristému) predstavuje systém udržania vysokej genetickej stability materiálu. Kultivácia

organizovaných štruktúr, najmä meristému v podmienkach *in vitro* umožňuje hromadne množiť geneticky identické potomstvo (klon) nepohlavnou cestou.

S využitím vyššie uvedených princípov je u kultúrnych rastlín realizovaná možnosť previesť časť efektívneho šľachtiteľského programu do laboratórnych kontrolovaných podmienok.

História vzniku explantátových kultúr

Landa (1980) uvádza: Kultúry rastlinných explantátov *in vitro* datujú svoj vznik prácou profesora Gottlieba Haberlandta, ktorý ako prednosta Botanického ústavu vo februári roku 1902 predložil na zasadnutí matematickej a prírodovedeckej sekcie Cisárskej akadémie vied vo Viedni výsledky pokusu, ktoré započali novú kapitolu výskumu v rastlinnej fyziológii a neskôr aj v odbore explantátových kultúr rastlín. Jeho značná autorita ovplyvnila na pomerne dlhú dobu počiatočný vývoj v rámci kultivácií *in vitro*. Dlho sa získavali len negatívne výsledky pri kultivácii vysoko diferencovaných buniek na médiach, ktoré vzhľadom na ich nepostačujúce zloženie viedli jeho následníkov k neúspešným modifikáciám.

Hänning (1904), Dietrich (1924), Tukey (1933), La Rue (1936) už úspešne kultivovali rastlinné embryá.

Nobécourt (1937), Gautheret (1938), White (1939) voľbou vhodného materiálu dosiahli neobmedzene rastúce kalusové kultúry.

Prácami týchto autorov boli splnené základné požiadavky kladené na kultúru explantátov *in vitro*, totiž dosiahnutia časovo neobmedzeného rastu.

Rada výsledkov tohto historického obdobia zaznamenala nielen konštituovanie techník, ale tiež zostrojenie vednej oblasti, ktorá si- podobne ako v prípade tkanivovej kultúry živočíšnej a ľudskej- prebojovala svoje miesto na slnku nielen v oblasti teoretickej, ale ktorá ukazovala od počiatku aj radu možností praktických aplikácií

V priebehu pomerne dlhého obdobia, ktoré nasledovalo, boli realizované explantátové kultúry najrozmanitejších rastlinných druhov a pletív. Došlo k objavom, ktoré výrazne posilnili význam štúdia rastlinných explantátov *in vitro* ako v teoretickej oblasti, tak aj vo sfére aplikácií.

Bol to:

Objav možnosti masovo získať haploidy cestou kultivácie peľníc *in vitro*,

Objav možnosti hromadne získavať rastlinné protoplasty cestou enzymatického rozrušenia bunkovej steny.

Metóda peľovej kultivácie vychádza historicky z pozorovania Nemcova. Úspešnú indukciu kalusu z peľových kultúr oznámil Tulecke (1953) u *Gingko biloba*. Kalus z ginka bol overený ako haploidný, organogéza nebola dosiahnutá.

Explantátovými kultúrami a ich využitím a novými metódami sa zaoberalo ešte mnoho ďalších autorov. Títo autori sa však zaoberali explantátovými kultúrami rôznych druhov rastlín.

1.1.2 Rozdelenie explantátových kultúr a ich charakteristika

Z aspektu *východiskového explantátu* rozoznávame nasledujúce explantátové kultúry:

1. Orgánové kultúry - východiskový explantát je diferencovaný orgán,

- embryokultúry,
- peľnicové kultúry.

2. Pletivové kultúry – východiskový explantát je časť somatického pletiva,

- meristémové kultúry (koreňové špičky, vegetačné vrcholy),
- iné pletivá (šupiny cibúľ, kvetné časti, kambiálne pletivo).

3. Bunkové kultúry – východiskový explantát je izolovaná bunka.

4. Protoplastové kultúry – východiskový explantát je bunka, zbavená bunkovej steny.

Rozdelenie explantátových kultúr podľa *charakteru pletiva* alebo *kultivovaného explantátu*:

Organizované štruktúry

Embryokultúry,

Kultúry vegetatívnych orgánov a ich častí

meristémová kultúra,

nodálna kultúra,

kultúra izolovaných koreňov,

Kultúry generatívnych orgánov

peľnicové kultúry,

peľové kultúry.

neorganizované kultúry

kalusové kultúry,

bunkové kultúry,

protoplastové kultúry.

Rozdelenie explantátových kultúr podľa schopnosti zachovania *genetickej stability* explantátovej kultúry:

Explantátové kultúry zachovávajúce relatívnu genetickú stabilitu

embryokultúry,

meristémové kultúry,

mikrorozmnožovanie (mikropropagácia) in vitro.

Explantátové kultúry rozširujúce genetickú variabilitu:

kalusové kultúry,

bunkové (suspenné) kultúry,

protoplastové kultúry (Hrubíková et al., 2009).

Regeneráciou rastlín *in vitro* a presadenie regenerantov do podmienok poľnej a skleníkovej kultúry sa umožnilo analyzovať spontánnu a indukovanú genetickú variabilitu systému *in vitro* na úrovni celého organizmu s následným využitím v šľachtení. Došlo tak

k prepojeniu genetiky somatickej bunky s klasickou genetickou, t.j. hybridologickou analýzou (Semán, 1990).

1. Orgánové kultúry

Embryokultúry

Embryokultúra predstavuje sterilnú izoláciu a rast nezrelého alebo zrelého embrya v podmienkach *in vitro*, s cieľom získania životaschopnej rastliny. Primárnym explantátom pri zakladaní embryokultúry *in vitro* je embryo. Embryo rastlín predstavuje samostatnú časť rastliny, ktorá tvorí základ nového organizmu. Embryo vzniká zo zygoty pri pohlavnom rozmnožovaní rastlín (Hrubíková et al., 2009).

Raghavan (1980) rozdelil embryokultúry do dvoch kategórií:

Kultúra semenných embryí, pri ktorej sa ako explantát používa plne vyvinutá bipolárna štruktúra obsahujúca koreňový a stonkový meristém,

Kultúra proembryí, za ktorú považuje všetky štádia nezrelých zárodkov predchádzajúce diferenciáciu kotyledonov.

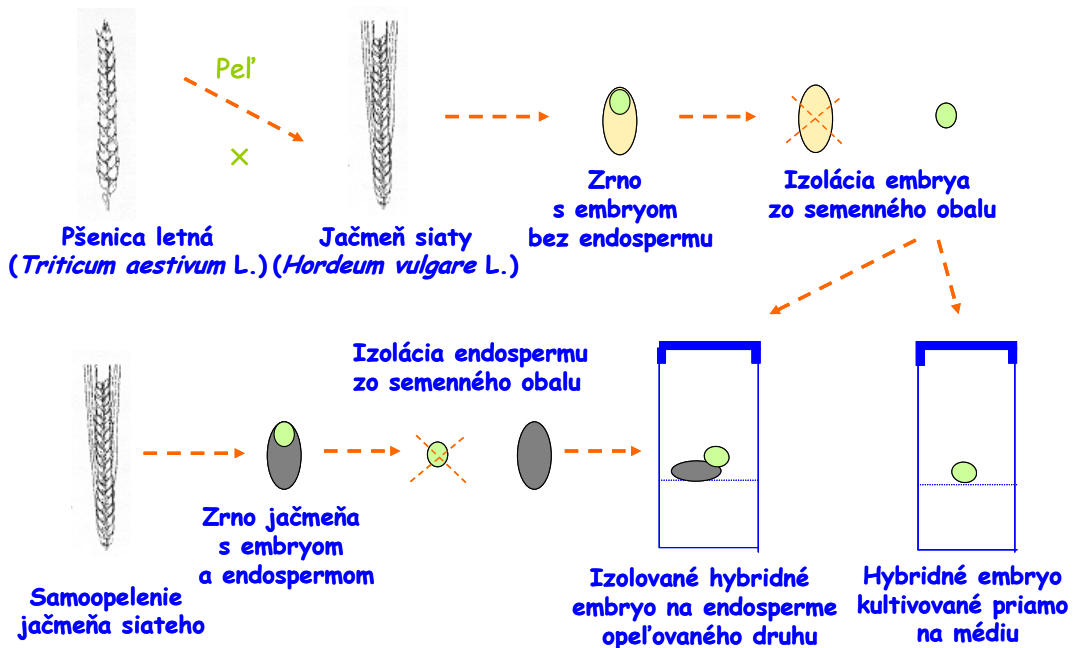
Existuje medzi nimi základný rozdiel- semenné embryá sú viac- menej autotrofné, kým proembryá sú heterotrofné. Tento fakt sa prejavuje aj v kultúre *in vitro* v rôznych výživových nárokoch embryí rozličného stupňa diferenciácie. Plne diferencované embryá majú jednoduché nároky na médium- často stačia hlavné minerálne soli a sacharóza. Kultúry nezrelých embryí vyžadujú pre svoj rast okrem základných zložiek kultivačného média aj vitamíny, aminokyseliny a regulátory rastlín.

Význam a využitie embryokultúr

1) *Zabránenie odumretia embryí medzidruhových a medzirodových hybridov.*

Technikou kultivácie izolovaného embrya boli úspešne získané medzidruhové hybridy bavlníka, jačmeňa a ľanu (Obr.1). Známe sú vnútrodruhové hybridy pšenice a jačmeňa (*tritordeum*), pšenice a raže (*triticum*) a ďalšie. Niektoré hybridné rastliny

získané pomocou techniky embryokultúr získali gény podmieňujúce požadované vlastnosti, ako je skorosť, odolnosť voči chorobám a škodcom.



Obr. 1
Technika a kultivácia izolovaného

ovaného embrya pri vzdialenej hybridizácii rastlín (BEŽO, 1996).

2) Tvorba haploidov.

Embryokultúry je možné uplatniť v procese tvorby haploidov alebo monoploidov. Napríklad, monoploidy jačmeňa je možné získať medzidruhovým krížením s *Hordeum bulbosum* (opeľovač). Vzniknuté hybridné embryá vykazujúce elimináciu chromozómov charakteristickú pre *H. bulbosum*, sú teda monoploidné obsahujúce chromozómy len samičieho komponenta kríženia (*H. vulgare*).

3) Skrátenie alebo vylúčenie obdobia dormancie semien.

Dormanciu semien môžu podmieňovať rôzne endogénne, chemické a mechanické faktory, napríklad vnútorné inhibítory, špecifické svetelné požiadavky, nízke teploty,

nezrelosť embrya. Izoláciou embrya je možné vylúčiť tieto vplyvy a tak navodiť klíčenie v ktorejkoľvek fáze dozrievania semien.

Potenciálne využitie embryokultúr je aj produkcií semenáčikov zo semien rastlín, ktoré sa prirodzene rozmnožujú vegetatívne, napr. banánovník.

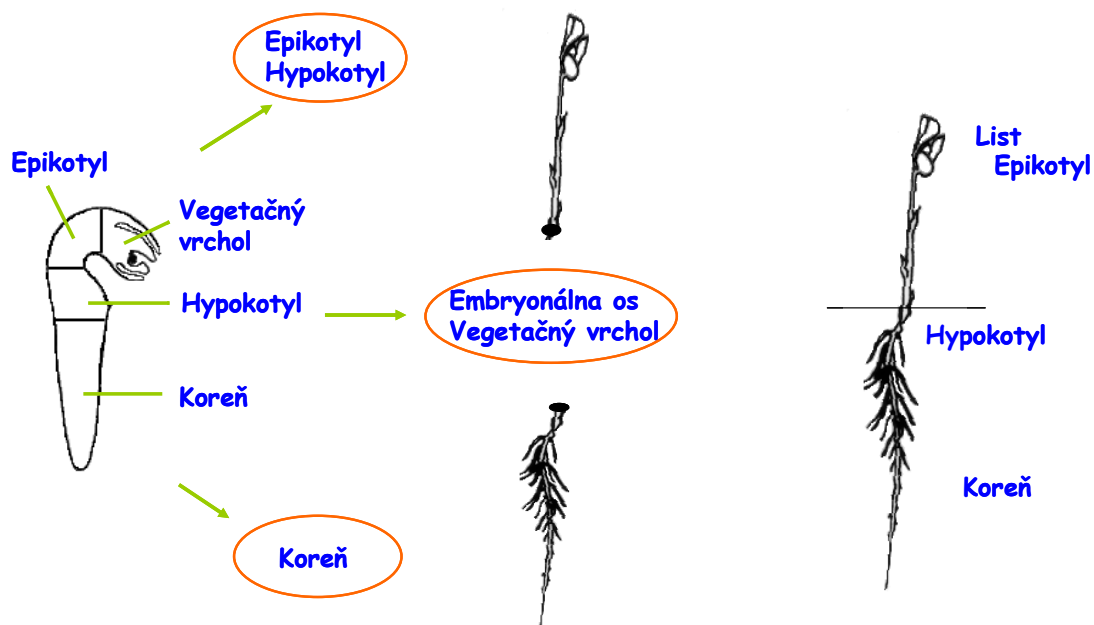
4) Skrátenie šľachtiteľského cyklu elimináciou inhibície klíčenia semien.

Inhibítory klíčenia sú väčšinou prítomné v obalových vrstvách semien alebo v endosperme. Absorpcia vody a kyslíka je pri niektorých druhoch semien veľmi nízka. Odstránením týchto inhibítorov, dochádza k navodeniu klíčenia. Medzi druhy s nízkou intenzitou klíčenia patrí ružičkový kel, jablone, ruže, olivová palma, irisy a cezmina ostrolistá.

5) Vegetatívne rozmnožovanie

Embryá sú vhodným materiálom pre *in vitro* mikropropagáciu (klonovanie), najmä pre ihličnaté druhy a druhy čeľade *Graminae* (trávy) (Obr. 2).

Klíčenie semien obligatórných parazitov v podmienkach *in vivo* je bez hostiteľského organizmu nemožné, ale pomocou embryokultúr je možné sa tomuto problému vyhnúť.



Obr. 2 Klonovanie rastlín z embryonálnej osi druhu hrach siaty (*Pisum sativum* L.) (BEŽO, 1996).

Peľnicové kultúry

Predstavujú techniky využívajúce androgenézu, čiže proces tvorby haploidných rastlín zo samčieho gametofytu. Princípom využitia tejto techniky je pozastaviť rast peľníc a peľových zŕn a tým zabrániť, aby sa vyvinuli na pohlavné bunky a pomocou regulátorov rastu usmerniť ich vývoj smerom k celistvému rastlinnému organizmu. Aj pred využívaním samotným peľnicových a peľových kultúr boli snahy získať haploidné rastliny pomocou vzdialenej hybridizácie, metódou oneskoreného opelenia, aplikáciou ožiarených peľových zŕn, použitím hormónov a tepelných šokov. Žiadna z týchto metód však neposkytla opakovateľné výsledky. Ako primárny explantát pre založenie týchto kultúr sa používajú mladé kvetné púčiky obsahujúce nezrelé peľnice, v ktorých sa nachádzajú peľové zrná v príslušnej vývinovej fáze. Kvetné púčiky sú povrchovo sterilizované a po odstránení kvetných lupienkov sa izolujú peľnice a následne sa kultivujú na príslušnom kultivačnom médiu. Pre založenie peľovej kultúry je postup rovnaký pričom sa z peľníc vyizolujú nezrelé peľové zrná (Hrubíková et al. , 2009).

2.Pletivové kultúry

Meristémové kultúry

„Meristém“ vhodný pre založenie kultúry *in vitro* definoval Hollings (1965) ako štruktúru obsahujúcu vlastný apikálny meristém a jeden až dva páry listových primordií. Pre tento typ kultúry sa bežne používa označenie „meristémová kultúra“. Pre rast izolovaných meristémov sú vhodné bežné kultivačné médiá MS (Murashige, T.– Skoog, F., 1962) alebo B5 (Gamborg et al., 1968). Meristémy sa kultivujú na rovnom alebo šikmom agare, v tekutom médiu na podložkách z filtračného papiera alebo priamo v tekutom kultivačnom médiu.

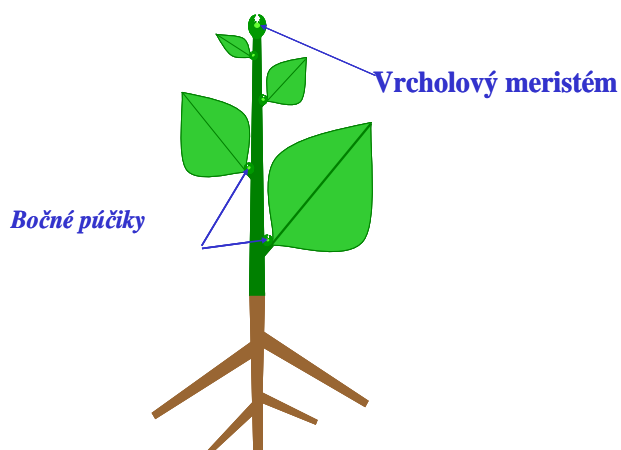
Z odobratých meristemických buniek sa počas úspešnej kultivácie v podmienkach *in vitro* vytvoria výhonky nových rastliniek. Vyrastené výhonky možno po čase oddeliť od pôvodného primárneho explantátu, prípadne ich ešte aj rozdeliť na jednonodálne segmenty a potom ich preniesť na čerstvé kultivačné médium. V priebehu niekoľkých pasáží sa z jedného pôvodného explantátu získa veľký počet geneticky identických rastlín (Semán, 1990).

Ak je do vývinového cyklu explantátovej kultúry zahrnutá fáza dediferenciácie a neorganizovaného rastu (kalusové, bunkové a protoplastové kultúry), je genotyp regenerantov ovplyvnený touto cytogeneticky nestabilnou fázou kultúry *in vitro*. Výsledkom sú genetické a karyologické zmeny (zmena počtu chromozómov) a tým samozrejme aj odlišný genotyp a fenotyp regenerantov.

Podľa D' Amata (1977) kľúčové momenty genetickej stability meristemických buniek sú:

striktná kontrola postupu syntézy DNA a mitózy neumožňujúca vznik endopolyploidie,

kontinuálne mitotické delenie meristemických buniek eliminujúce spontánne vznikajúce chromozomálne aberácie a mitotické nepravidelnosti.



Obr. 3 Meristémy rastlín najčastejšie používané na založenie pletivových kultúr. Súčasťou bočných púčikov je meristém pazuchových púčikov. Vrcholový meristém tvorí základ pre tvorbu listov, stonky, bočného rozkonárenia a kvetov

Meristémové kultúry majú významné uplatnenie pri ozdravovaní rastlín od vírusov vďaka intenzívnemu mitotickému deleniu a neprítomnosti vaskulárnych prvkov, čo je pre meristémy charakteristické. Kultivácia izolovaného meristému bez primordií (základov pre vznik nových orgánov, listov) z rastového vrcholu stonky predstavuje jediný spôsob získania bezvírusových rastlín.

Meristém s veľkosťou od 0,2 do 0,3 mm sa z vrcholového púčika izoluje pod binokulárnou lupou. Čím menší je primárny explantát, tým je vyššia pravdepodobnosť získania zdravého jedinca. Technika môže byť spojená s termoterapiou, pôsobením vyšších teplôt (36 – 40 °C) na kultúru pre potlačenie aktivity vírusov. Ozdravenie rastlín má význam pre druhy rastlín, ktoré sa rozmnožujú hl'uzami (ľuľok zemiakový), poplazmi (jahoda obyčajná) a podobne.

Produktom meristémovej kultúry je fenotypovo jednotné, geneticky stabilné a ozdravené potomstvo. Genetická stabilita meristémových kultúr je podmienená kontrolou autoreplikácie DNA, mitotického delenia buniek a nepretržitým mitotickým delením meristemických buniek (Hrubíková et al., 2009).

Kalusové kultúry

Zaradenie kalusových kultúr do systému rozdelenia techník *in vitro* je dosť problematické z toho dôvodu, že základom pre založenie tejto kultúry môže byť ktorokoľvek vydifferentované pletivo rastliny. Dôležitosť kalusových kultúr, v rámci techník *in vitro*, je v ich nezastupiteľnosti pri zakladaní bunkových kultúr aj protoplastových kultúr *in vitro*.

Primárnym explantátom pre založenie kalusovej kultúry *in vitro* sú differentované bunky pletív alebo orgánov rastlín. V procese dedifferentiácie sa organizovaná štruktúra pletív alebo orgánov mení na zhuk nedifferentovaných buniek – kalus. Dedifferentiácia je schopnosť differentovaných buniek navrátiť sa do štádia meristémových buniek a tvoriť nedifferentované kalusové pletivo (Obr. 4).

V prírode sa kalus tvorí na rane rastliny. Potlačenie differentiácie buniek v pletivách dvojkličnolistových rastlín spôsobuje, po infekcii, baktéria *Agrobacterium tumefaciens*. V kultúre *in vitro* je differentiácia buniek potlačená prídavkami rastových regulátorov do kultivačného média (Hrubíková et al., 2009).



Obr. 4 Kalusové kultúry ľanu siateho vytvorené dediferenciáciou zrelého zygotového embrya.
Foto: K. HRUBÍKOVÁ.

Bunky kalusu sú schopné, za určitých špecifických podmienok, spätne sa diferencovať

a vytvoriť organizovanú štruktúru. Tento proces je možný vďaka totipotencii buniek.

Kalusovú kultúru možno odvodiť z každého druhu pletiva rastliny. Typ a koncentrácia použitého rastového regulátora v kultivačnom médiu závisí od genotypu a obsahu endogénnych hormónov explantátu. Primárne explantáty sa najčastejšie kultivujú na médiách obsahujúcich samotný auxín (zvyčajne pri jednoklíčnolistových druhoch), samotný cytokinín alebo kombináciu auxínov a cytokinínov.

Ak je navodenie kalusovej kultúry problematické, je vhodné ako primárny explantát použiť nezrelé embryá, semenáčky alebo časti týchto typov explantátov.

Po navodení tvorby kalusu, prebieha ďalšia kultivácia kalusov procesom *subkultivácie* alebo *pasážovania*, t.j. prenosom kalusových kultúr z pôvodného kultivačného média na čerstvé. Proces pasážovania pravdepodobne ovplyvňuje nielen fenotypovú variabilitu, ale má vplyv aj na morfogenetickú reakciu pletivových kultúr.

Niekoľkonásobná subkultivácia je vhodným mechanizmom navodenia a udržiavania procesu dediferenciácie pletivových kultúr.

Fázy rastu kalusovej kultúry:

1. Lag fáza – bunky sú pripravené na delenie.
2. Exponenciálna fáza – intenzita bunkového delenia je najvyššia.
3. Lineárna fáza – intenzita bunkového delenia klesá, ale rýchlosť expanzie buniek sa zvyšuje.

-
4. Fáza znižovania rastu – intenzita bunkového delenia a predlžovacieho rastu sa znižuje.
 5. Stacionárna fáza – počet a veľkosť buniek sa nemení.

Fenotypová variabilita kalusových kultúr

Nielen kalusové kultúry pochádzajúce z rôznych rastlinných druhov, ale aj v rámci jedného druhu, sa vyznačujú výraznou fenotypovou variabilitou štruktúry (jemnozrnné – bunky s malými rozmermi až po hrubozrnné – samostatne sa oddeľujúce bunky z kalusovej hmoty), konzistencie (jemné - vodnaté, kompaktné), farbou (biele alebo rôzne sfarbené), veľkosťou a tvarom kalusovej hmoty.

Využitie kalusových kultúr

- Produkcia sekundárnych metabolitov a enzýmov v pletivových kultúrach.
- Tvorba špecifických látok v biomase kalusu.
- Východiskový materiál na vegetatívne množenie rastlín.
- Východiskový materiál v šľachtení nových odrôd rastlín.
- Dlhodobé uchovávanie ozdravených genotypov rastlín (bez patogénnych vírusov, baktérií a húb) a odolných voči patogénom.

Bunkové kultúry

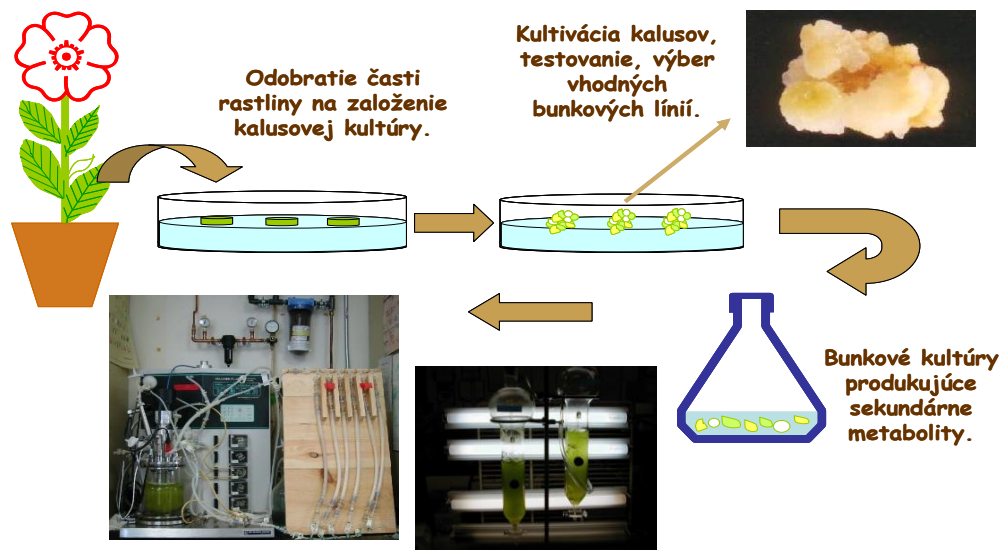
Suspenné (bunkové) kultúry tvoria dediferencované rastlinné bunky rozptýlené v premiešavanom tekutom médiu. Založiť bunkovú suspenziu možno z rozpadavého friabilného kalusu preneseného do tekutého média. Pri postupnom premiešavaní sa kalus rozpadne na zmes rôzne veľkých zhlukov buniek, až na jednotlivé bunky. Ich delením vznikajú retiazky a zhluky, ktoré sa opäť rozpadávajú (George, Sherrington, 1984).

Pretože bunky majú prirodzenú tendenciu sa spájať, je nemožné získať suspenziu tvorenú len oddelenými jednotlivými bunkami. Použitím relatívne vysokej koncentrácie auxínu a nízkej koncentrácie cytokinínu v médiu zvyčajne možno zvýšiť disperziu buniek (Narayanawamy, 1977).

Využitie bunkových kultúr

Bunkové kultúry majú využitie hlavne v produkcii sekundárnych metabolitov. Každá bunka v kultúre *in vitro* je schopná produkovať rovnaké chemické zlúčeniny, ktoré vytvára jej materská rastlina – biosyntetická totipotencia. Viaceré bunkové kultúry rastlín dokážu

produkovať vyššie množstvá sekundárnych metabolitov, ako produkujú celistvé materské rastliny.



Obr

. 5 Využitie bunkových kultúr pre produkciu sekundárnych metabolitov rastlín (www1.coe.neu.edu/~clee/research/overview_2.html, www.biology.lsu.edu/grads/prospect/image_plan...).

Protoplastové kultúry

Protoplast je výraz odvodený z gréckych slov protos(prvý) a plastos(vytvorený). Vo všeobecnosti znamená originál, prototyp niečoho. V biológii sa termínom protoplast označuje metabolicky aktívna časť bunky.

Protoplasty sa získavajú vo veľkom množstve z rozličných pletív alebo bunkových kultúr ich vystavením pôsobeniu celulolytických a pektolytických enzýmov rozpúšťajúcich bunkovú stenu. Protoplasty sú tvorené intaktným jadrom s cytoplazmou obalenou tenkou plazmolemou. Izolované rastlinné protoplasty sú veľmi citlivé na fyzikálne a chemické poškodenie. Tekuté médium musí mať vysoký osmotický potenciál. Následne po odstránení enzýmov z média sa dá pozorovať tvorba bunkovej steny. Po jej vytvorení treba znížiť osmotický potenciál média a za 3-5 dní sa bunky začínajú deliť (George, Sherrington, 1984).

Metódy získavania protoplastov rastlín:

- a) plazmolýzou bunky,
- b) enzymatickým rozkladom bunkovej steny.

Plazmolýza je oddelenie protoplazmy živej bunky od bunkovej steny zmenšovaním objemu stratou vody v protoplazme. Protoplazma je cytoplazmatickou membránou uzavretý obsah živej bunky. V hypertonickom roztoku dochádza k oddeleniu protoplazmy od bunkovej steny.

Na získanie protoplastov rastlín enzýmami sa odoberajú rôzne časti rastliny, listy, stonky, peľnice alebo sa používajú kalusy a bunkové suspenzie. Pletivá sa pred pôsobením enzýmov mechanicky rozdrvia. Celuláza a pektináza zabezpečí rozklad bunkovej steny. Izolované protoplasty sa premyjú od enzýmov a od zvyškov nepoškodených buniek oštiepujú filtrovaním, odlučovaním pomocou vzduchových bublín a centrifugovaním.

Význam protoplastových rastlín:

- 1) Biotechnologické úpravy.
- 2) Somatická hybridizácia.
- 3) Izolácia bunkových organel.
- 4) Množenie rastlín (Hrubíková et al. , 2009).

1.1.3 Význam explantátových kultúr

Klonové hospodárstvo v lesníctve až donedávna bolo založené na klasickom autovegetatívnom rozmnožovaní lesných drevín odrezkami a špecificky na heterovegetatívnom rozmnožovaní štiepením pre zakladanie semenných sádov.

Doteraz nebolo reálne aby sa klonové hospodárstvo stalo zásadnou alternatívou k lesnému hospodáreniu využívajúcemu k obnove lesa a zalesňovaniu reprodukčného materiálu generatívneho pôvodu, a to buď prirodzenou cestou alebo cestou umelou. Napriek tomu, že explantátové kultúry nie sú celkom novou metódou rozmnožovania lesných drevín, predsa len boli po určitú dobu logicky vnímané ako laboratorná záležitosť bez väčšieho významu pre prax.

Predovšetkým vzhľadom k výraznému technologickému pokroku posledných rokov u radov druhov lesných drevín predovšetkým listnatých sa vytvára nová situácia, ktorá je historický významná.

Tento historický prelom je daný reálnou možnosťou masového rozmnožovania niektorých drevín týmito metódami, masového zavádzania vysoko výkonných alebo inak cenných klonov do lesníckej praxe. Pritom toto masové klonovanie môže zohrať významnú úlohu v záchrane cenných genotypov a vo využití výsledku šľachtenia-klonovaním stromov selektovaných, hybridných, mutantných a geneticky modifikovaných metódami bunkového a genového inžinierstva.

Veľký význam explantátových kultúr jednak spočíva mimo iného vo fakte, že materiálu získaného náročnejšími metódami nebýva veľké množstvo a pritom týmito metódami možno zaistiť jeho značné rozmnožovanie. (Kobliha, 2000).

Ide sa o metódu, pri ktorej možno masovo produkovať geneticky identický materiál cestou mikropropagácie, a tým rýchlo namnožiť nové vyšľachtené odrody a iné ekonomicky či biologicky významné rastliny. Ďalšie a nie menej dôležité je uchovávanie jednotlivých druhov a kultivátov v genetických bankách. Významné je tiež odzdravovanie rastlín a produkcia bezvírozného materiálu. Z toho vyplýva produkcia haploidných rastlín ako východiskového materiálu pre šľachtiteľské programy ako napríklad využitie

v programoch pracujúcich s rekombinantnou DNA (génové inžinierstvo) alebo somatická hybridizácia a somaklonálna variabilita. (Roule, 2009)

Začlenením metód explantátových kultúr do šľachtiteľského a semenárskeho procesu sa dosahuje najmä:

- a) rýchle rozmnožovanie cenných rastlinných genotypov vzniknutých šľachtiteľskou činnosťou a tým aj rýchlejšia tvorba nových výkonných odrôd,
- b) ozdravenie šľachtiteľských materiálov od patogénov, najmä od vírusov a tým dosahovanie vyšších úrod a nižších strát,
- c) prekonanie nekrížiteľnosti systematicky vzdialených rastlinných taxónov a umožnenie vyšľachtenia nových genotypov poľnohospodárskych a záhradných plodín a nových odrôd s významnými hospodárskymi znakmi a vlastnosťami,
- d) dlhodobé udržiavanie genetických zdrojov v kultúre in vitro a tým podstatné zlacnenie a zrýchlenie šľachtiteľského procesu,
- e) možnosť indukcie vzniku haploidných a polyploidných organizmov využitím premenlivosti rastlinných pletív a tým možnosť získania nových odrôd poľnohospodárskych a záhradných plodín v kratšom čase
- f) možnosť využitia predselekcie v kultúrach in vitro a tým urýchlenie a skvalitnenie šľachtiteľskej práce,
- g) získanie nových a udržanie existujúcich genotypov s peľovou stilitou a tým možnosť podstatne skrátiť šľachtiteľský proces,
- h) možnosť produkcie haploidov androgenézou a gynogenézou in vitro a tým rýchlejšie získavanie nových odrôd,
- i) možnosť konštrukcie úplne nových genotypov kultúrnych rastlín (Seman et al., 1990).

Výskum a využitie explantátových kultúr sa orientuje predovšetkým na dva smery:

- množenie a šľachtenie rastlín
- produkcia sekundárnych metabolitov (Dušek, Dušková, 1997).

1.1.4 Výhody a nevýhody explantátových kultúr

Výhody

V súčasnosti sa metodám explantátových kultúr venuje veľká pozornosť. Oproti tradičnému prístupu prinášajú viacero výhod:

- ozdravenie šľachtiteľských materiálov od patogénov, najmä od vírusov a tým dosahovanie vyšších úrod a nižších strát
- rýchle rozmnoženie cenných rastlinných genotypov vzniknutých šľachtiteľskou činnosťou a tým aj rýchlejšia tvorba nových, výkonných odrôd
- dlhodobé skladovanie drevín vo forme orgánových alebo kalusových kultúr pri nízkych teplotách, ktoré sú základom na budovanie genobáň vzácnych, ustupujúcich alebo vysoko produkčných druhov drevín a ich hybridov
- rozmnožovanie aj takých druhov drevín, ktoré sa veľmi ťažko zakoreňujú alebo sa vôbec nedajú získať klasickým vegetatívnym alebo generatívnym spôsobom
- zvýšenie koeficientu rozmnožovania
- získanie haploidného potomstva
- heterotrofný charakter rastu
- šetrenie priestorov, pretože tieto metódy umožňujú na malej ploche dopestovať väčší počet regenerantov
- prekonanie nekrížiteľnosti systematicky vzdialených rastlín a umožnenie vyšľachtienia nových odrôd s významnými hospodárskymi znakmi a vlastnosťami
- na regeneráciu sa používa menšia časť rastliny
- nezávislosť od ročného obdobia, vývinovej fázy rastliny
- umelé, sterilné a riadené prostredie
- somatická hybridizácia a genetické manipulácie vrátane génového inžinierstva
- možnosť uskutočnenia bunečnej selekcie s cieľom získania odolných regenerantov proti herbicídom, zasoleniu, suchu, herbicídom, toxickým prvkom, atď. (Seman, 1990; Kamenická, Vizárová, 1991)

Pri kultivácii rastlinných explantátov treba zabezpečiť predovšetkým sterilitu, pretože živné médiá heterotrofných organizmov v kultúre in vitro obsahujú organické látky a tak sa môžu kontaminovať mikroorganizmami, ktorých zárodky sa nachádzajú v ovzduší. Ďalšou podmienkou úspešnej kultivácie rastlinných explantátov in vitro je zabezpečenie vhodného zloženia živného média, vhodnej kultivačnej teploty a svetelných podmienok.

Výhody explantátových kultúr:

- na malom priestore sa produkuje veľký počet rastlín
- sú rýchle (možnosť ovplyvniť podmienky)
- produkcia klonov ktorých rozmnožovanie tradičnými metódami prebieha pomaly alebo vôbec
- celoročná produkcia rastlín
- zkrátenie šľachtiteľského cyklu

Nevýhody

Za nevýhody možno uviesť:

- relatívne drahé vybavenie laboratória
- pracnosť
- drahé riadenie laboratória
- náročná aklimatizácia rastlín na poľné podmienky

Získali trvalé uplatnenie v metodológii experimentálnej botaniky. Sú predmetom záujmov biochemikov, fyziológov, cytológov, fytopatológov a genetikov. V súčasnej dobe, nehľadiac na prevažné metodické problémy, bude treba riešiť, či preukazujú rastlinné explantátové kultúry možnosti prínosu pre šľachtiteľskú prax, okrasné záhradníctvo, ozdravovanie rastlín, šľachtenie nových foriem a odrôd hospodársky významných kultúrnych rastlín.

Nové metodické postupy vo svojich výhladoch hraničia so since fiction- a to najmä v oblasti genetického inžinierstva bunkových a protoplastových kultúr.

Tento vývoj metódy nie je zatiaľ možné realisticky odhadnúť. Práve tak je potrebné si uvedomiť, že mnohé laboratorne či realizované metodické postupy môžu byť pre šľachtiteľskú prax- vzhľadom k svojej obtiažnosti, nákladnosti, či spoľahlivosti- nepoužiteľné.

Zo všetkých týchto dôvodov si rastlinné explantátové kultúry a metóda explantátového šľachtenia – zaslúžia si stať sa predmetom sústredeného záujmu ako teoretického výskumu, tak aj šľachtiteľskej praxe (Landa, 1980) .

1.2 Ginko dvojlaločné

1.2.1 Pôvod slova

Tento termín pochádza z čínskeho (neskôr aj japonského) slova Ginkyo, čo v preklade znamená „strieborná marhuľa“ (Gin- striebro, Kyo-marhuľa).

Veľa vedcov si kladlo otázku, prečo Engelbert Kaempfer dal vo svojom diele "Amoenitates Exoticae" tomuto stromu taký zvláštny názov - ginkyô. Výskum profesora Wolganga Michel- Zaitsu v roku 2005 na Kyshu univerzite v Japonsku našiel odpoveď na túto otázku. Zohnal totižto kópie obrázkového slovníka „Kinmôzui“. Jeho lingvistické informácie o ginku boli prevzaté práve z tejto knihy. V knihe „Colectiana Japonica“ ktorá je podobná tomuto slovníku je znak ginkyô vysvetlený ako Ginnan a zle ako Ginkgo. Dospel k tomu, že došlo k preklepu, respektíve nedorozumeniu. Bol to sám Kaempfer, ktorý urobil malú chybu s dlho trvajúcimi následkami.(Kwant, 1999).

1.2.2 História ginka dvojlaločného

Ginko dvojlaločné sa pokladá za najpôvodnejší druh stromu na Zemi. Na tejto planéte rastie už 100 miliónov rokov, od doby druhohôr. Táto živá fosília rástla divoko na miestach, kde sa našli aj najstaršie stromy čaju - v čínskych horách provincie Jün-nan. Avšak už dávno sa vo voľnej prírode nevyskytuje. Napriek svojim krásnym dvojlaločným listom patrí ginko medzi ihličnaté stromy.

Ginko dlho rástlo ako jeden z najposvätnějších stromov pri chrámoch a kláštoroch v Číne, Japonsku, Kóreji v hlbokoj opatere mníchov, ktorý ho zachránili pre dnešný svet. Práve z týchto chrámových záhrad sa dostalo v roku 1730 do parkov Európy, kde vedci a lekári v posledných rokoch ocenili jeho výnimočné zdravotné účinky, ktoré popísali Číňania vo svojom herbári Pen Tsao Ching už pred 2800 rokmi.

Dvojlaločné listy ginka sa podobajú na srdce alebo plúca a podľa tradičnej čínskej medicíny majú na tieto orgány blahodarný vplyv. V našich končinách tieto čudesné listy nadchli aj J. W. Goetheho, ktorý v nich videl symbol priateľstva a lásky dvoch ľudí a inšpirovaný napísal báseň Ginkgo biloba (Ondrejčík, Ondrejčíková, 2004).

Prvé ginká sa objavili na našej Zemi v dobe permskej (210 mil. rokov) a v treťohorách zasa väčšinou vyhynuli. Ginko dvojlaločné rástlo po celej Euroázii od kriedy až po ľadovú dobu, ktorá ho napokon zatlačila do juhovýchodnej Ázie. Prirodzené porasty ginka sa našli v severozápadnej časti Číny (Sečuan) a z Číny ho už v stredoveku preniesli do Japonska. Považuje sa tam za posvätnú rastlinu a všade sa pestuje. Od 18. storočia sa často pestuje ako zvláštnosť aj v parkoch po celej zemeguli (Baranec et al. , 2007).

Ginkgo biloba je prastarou kultúrnou pamiatkou a kultovou rastlinou v Japonsku, Číne, Kóreji. Do súčasnosti sa zachoval predovšetkým v kultúre v okolí budhistických chrámov, modlitební a palácov, prípadne uličných stromoradiach. Správy o jeho pestovaní sú už z 11. storočia. Pôvodne bol považovaný za v prírode vyhynutý druh, neskôr bol však nájdený v menšom rozsahu v juhovýchodnej Číne. Je často označovaný termínom „žijúca“ či „oživená fosília“(Hrubík et al. , 2009).



Obr.6 Skamenelina ginka dvojlaločného (<http://www.proginkgo.org/histcz.html>)

1.2.3 Taxonómia ginka dvojlaločného

Podľa Baranec et al. (2007) možno ginko zaradiť:

Doména: ***Eucaryota* (Eukaryota)**

Ríša: ***Plantae* (Rastliny)**

Podríša: ***Chlorobionta* (zelené)**

Oddelenie: ***Spermatophyta*- rastliny semenné**

Pododdelenie: ***Gymnospermatophytina* (*Gymnospermae*)- nahosemenné**

Sú to dreviny s monodiálnym, zriedkavejšie sympodiálnym rozkonárením stonky, ktoré v sekundárnom dreve majú len tracheidy s dvorčekovitými stenčeninami. Koratelárne cieвне звázky sú otvorené, kruhovito usporiadané a vytvárajú kambialný kruh, ktorým nahosemenné rastliny druhotne hrubnú. V pletivách orgánov sú živicové alebo slizové kanáliky. Väčšina druhov má vždy zelené listy mikrofylového alebo makrofylového pôvodu, čo je dôležité pre systematiku nahosemenných rastlín.

Dnešné nahosemenné rastliny sú jednodomé a dvojdomé (ginko). Vývoj reprodukčných orgánov prebieha 2 smermi. Samostatne a nezávisle od listov, samčie a samičie výtrusnice (mikrosporangia a merosporangia) sa tvoria na sporangioforoch, útvaroch stonkového pôvodu. Rozoznávame teda mikrosporangiofory (tyčinky), ktoré majú dve až niekoľko vzájomne nezrastených mikrospórangii (peľové komôrky) s veľkým počtom mikrospór (peľové zrná) a megasporangiofory s terminálnymi vajíčkami s jedným vajíčkovým obalom. Vajíčka nie sú chránené (obalené) listovými časťami- sú holé (nahé), preto všetky druhy rastlín, ktoré majú túto vlastnosť sa nazývajú nahosemennými rastlinami. Vývoj orgánov s výtrusnicami na makrofyloch je viazaný na pravé listy, ktoré nazývame výtrusnými listami, sporofylmi, na ktorých vznikajú na okraji alebo na ich čepeli sporangia. Tyčinky sú mikrosporofyly a plodolisty megasporofily. Tvoria jednoduchú a zloženú šišku.

Nahosemenné rastliny sa vyvinuli zo semenných papradí a dosiahli vrchol svojho vývoja už v karbone a v perme, iné sa rozvinuli v druhohorách alebo až v treťohorách. Niektoré vo vrchnej kriede vyhynuli a iné prežili až doteraz.

Trieda: *Ginkgopsida*- ginká

Rad: *Ginkgoales*- ginkotvaré

Rod: **Ginkgo- Ginko**

Druh: **Ginkgo biloba- ginko dvojlaločné**

|

1.2.4 Morfológická charakteristika ginka dvojlaločného

Ginko dvojlaločné je strom dorastajúci do výšky 30- 40 metrov. Koruna je kužeľovitá, ale pomerne premenlivá. Pri samčích jedincoch býva štíhlejšia, pri samičích košatejšia. Konáre vyrastajú v závitnici, sú pomerne hrubé, šikmo odklonené až vystupujúce. Kôra je

hladká, sivá, pomerne rýchlo sa mení na hnedosivú borku, ktorá je rozpukaná v pozdĺžnych nepravidelných platničkách.

Púčiky sú postavené špirálovito, sú 3-5 x 3-4 mm, široko vajcovité (bočné sú menšie), zaoblené, sediace. Púčikové šupiny sú hnedasté, viaceré.

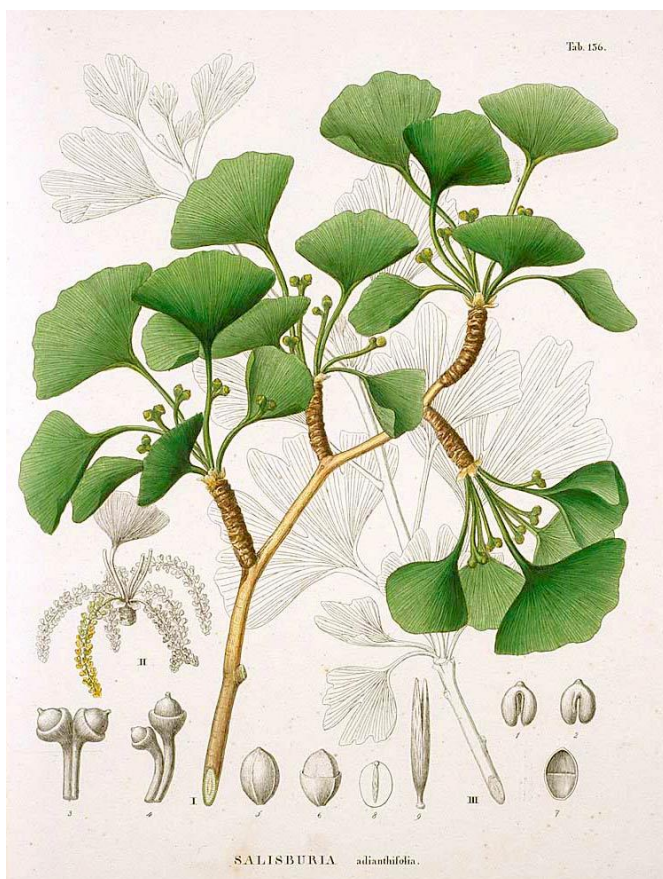
Ginko má dva typy výhonkov. Dlhé výhonky – makroblasty - sú hladké, svetlosivé až hnedasté, skrátene výhonky- brachyblasty - sa vytvárajú z púčikov na dvojročných a starších konároch, majú 30 - 50 x 6 - 10 mm, zvráskavený povrch a tmavosivé sfarbenie. Prirastajú pomaly.

Listy ginka sú 30-60 x 40-100 mm, vejárovité, v hornej časti, väčšinou v strede, sú rozdelené rôzne hlbokým výrezom na dva laloky alebo sú aj nepravidelne viaclaločné. Sú ploché, pevné, kožovité, svetlozelené, v jeseni pred opadnutím zlatožlté. Žilnatina je vidlicovito rozkonárená, takmer rovnobežná. Stopka je 40-80 mm dlhá. Listy vyrastajú v závitnici, na dlhých výhonkoch jednotlivo, na skrátene výhonkoch v zdanlivých zväzoch po 3-5 kusov.

Kvety sú dvojdomé, vyrastajú len na skrátene výhonkoch. Samčie jahňadovité šištice sú 20-30 x 5-7 mm, podlhovasto vajcovité, žlté, stopkaté, visiace, s mnohými tyčinkami. Pri samičích jedincoch vyrastá v pazuchách šupín alebo listov vzpriamená 25-40 mm dlhá stopka, ktorá je na konci rozšírená. Dva zakrpatené plodolisty vytvárajú pohárikovité priehlbiny, v ktorých sú umiestnené väčšinou dve priame vajíčka. Len výnimočne býva stopka ku koncu rozkonárená a nesie viacero vajíčok. Z nich sa vyvíja len jedno vajíčko, kým druhé ostáva zakrpatené a vidieť ho na stopke.

Semenná kôstkovička je 18-25 mm, guľovitá, najprv zelená, po dozretí na povrchu žltá, stredná časť osemenia je dužinatá a zapácha, vnútorná časť je zdrevnatená. „ Kôstka“ je

10-15 x 8-10 mm, oválna, stlačená, dvojhenná, belavá až svetlosivá (Hrubík et al., 2009).



Obr. 2 Morfológická stavba ginka dvojlaločného (<http://www.arboretum.sav.sk/sk/aktuality/ginko-dvojlalocne/>)

1.2.5 Využitie ginka dvojlaločného na farmaceutické účely

Usušený list ginka a taktiež jeho úlomky pôsobia ako droga. Flavónové glykozidy, ako sú napr. kempferol, kvercetín, izoramnetín a terpénové laktóny- sú súčasťou ginkolidov a bilobalidov.

Lieky a výživové doplnky obohatené o ginko sú kontraindikované u pacientov, u ktorých sa vyskutuje porucha zrážania krvi, pri krvácajúcich stavoch a výraznejšom znížení agregability erytrocytov alebo trombocytov, tiež u pacientov užívajúcich heparín a iné antikoagulanciá. Neodporúčajú sa v tehotenstve, počas dojčenia a ani deťom do 12 rokov.

Štandardizovaný extrakt z *Ginkgo biloba* (Egb761) má hemoreologické, antioxidačné, vazodilatačné a neuroprotektívne účinky, zvyšuje pamäťovú výkonnosť, prietok krvi mozgom, koronárny prietok a blokuje účinky PAF faktora aktivujúceho krvné doštičky. Už pred 5 000 rokmi využívala stará čínska medicína účinky ginka na terapiu porúch pamäte, na bolesti hlavy a závraty. V súčasnosti najnovšie poznatky poukazujú na

možnosti jeho širšieho využitia, najmä pri cerebrálnej, srdcovej a periférnej ischémii, pri traumatickom poškodení mozgu, pri poruchách duševnej výkonnosti, obzvlášť na podklade chronickej mozgovej cievnej nedostatočnosti. Potvrdená bola aj účinnosť pri terapii Alzheimerovej choroby.

Ginkolidy sú silnými inhibítormi PAF (faktora aktivujúceho krvné doštičky), preto nie je vhodná kombinácia ginka s antikoagulanciami a antitrombotikami. V skúškach in vitro flavónové aglykóny, najmä kvercetín, a z biflavonoidov amentoflavón, inhibuje enzým CYP 450 izoformu CYP 2C9. Tieto zistenia si však vyžadujú vyhodnotenie v klinických skúškach.

Výživové doplnky s obsahom kyseliny ginkolovej môžu spôsobiť tráviace ťažkosti a bolesti hlavy.

Semená ginka sú jedovaté (toxín 4-O-methylpyridoxín), ich užitie vo veľkom množstve môže spôsobiť vážne problémy, otravy až smrť.

1.3 Explantátové kultúry a ginko dvojlaločné

So stúpajúcim významom vegetatívneho množenia drevín vo svete, či už na báze konvenčného rezkovania a perspektívne stále viac na báze explantátových kultúr *in vitro*, je treba počítať s tým, že v blízkej budúcnosti bude masové klonovanie drevín späť práve s využitím explantátových kultúr *in vitro*.

Práve toto masové klonovanie v podmienkach *in vitro* zohráva a aj v budúcnosti bude zohrávať významnú úlohu pri záchrane cenných genotypov a pri ich množení a v rámci šľachtiteľskej práce poskytne dostatok východiskového materiálu pre rozširovanie genetickej variability biologických materiálov inými dostupnými šľachtiteľskými metódami v podmienkach *in vitro*. V súčasnej dobe sa javí ako veľmi perspektívna hlavne metóda somatickej embryogenézy v spojení s tvorbou umelých semien, ktoré klíčia ako semená vzniknuté prirodzenou cestou.

Použitie techník *in vitro* pri drevinách má svoje špecifiká. Nie všetky techniky explantátových kultúr sú pre ne použiteľné. Kým pri rastlinných materiáloch majú uplatnenie všetky techniky *in vitro*, pri drevinách to tak nie je. Najvyužívanejšou technikou *in vitro* pri drevinách je mikropropagácia (mikrorozmnožovanie). Je to technika, ktorá zabezpečuje klonové množenie biologického materiálu v podmienkach *in vitro*. Pri tomto systéme množenia je zachovaná genetická stabilita biologického materiálu, to znamená, že výsledkom je geneticky identické potomstvo s materskou rastlinou, z ktorej boli odobraté primárne explantáty.

Mikropropagácia sa uplatňuje aj pri vegetatívnom množení ginka dvojlaločného. Základom pre založenie tejto kultúry *in vitro* sú mladé výhonky ginka, ktoré sú schopné na modifikovaných kultivačných médiách, za prítomnosti špecifických rastových regulátorov, vytvoriť identické rastlinky ginka dvojlaločného.

Ginko dvojlaločné je schopné vo svojom organizme syntetizovať veľké množstvo chemických látok, ktoré sú dôležité pre liečbu mnohých ochorení. Dôležitou drogou sú najmä listy ginka. Pre získanie liečivých látok z listov ginka sa javí ako veľmi perspektívna technika bunkových (suspenných) kultúr. V rámci kultivácie *in vitro* sú primárne explantáty odobraté z materskej rasliny a následne prevedené pomocou rastových regulátorov v procese dediferenciácie do podoby kalusov a tieto následne slúžia na založenie bunkovej kultúry *in vitro*. V tekutých kultivačných médiách bunky ginka sú

schopné produkovať sekundárne metabolity, ktoré majú veľké využitie vo farmaceutickom priemysle.

Semená drevín sa vyznačujú pomerne vysokým stupňom dormancie. Platí to aj pre ginko dvolaločné. Kultiváciou embryí ginka v podmienkach in vitro je možné eliminovať prirodzenú dormanciu jeho semien. Týmto spôsobom je možné zabezpečiť rast rastlín ginka prakticky celoročne.

2 Metodika práce

Pri vypracovaní bakalárskej práce bol zvolený nasledujúci postup:

1. Zhromažďovanie odbornej literatúry.

Pre získavanie potrebných informácií a materiálov bola využitá domáca literatúra, zahraničná literatúra, odborné časopisy a internetové zdroje.

2. Štúdium odbornej literatúry a oboznámenie s problematikou.

Po preštudovaní dostupných materiálov sa získal prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky.

3. Spracovanie získaných materiálov a informácií.

Nadobudnuté poznatky a zhromaždené literárne zdroje boli spracované formou kompilačnej práce.

3 Cieľ práce

Cieľom predloženej bakalárskej práce je na základe dostupnej literatúry spracovať informácie o explantátových kultúrach z pohľadu najviac využívaných techník *in vitro* a zhromaždiť čo najviac informácií o historickom strome ginko dvojlaločného. V práci je pozornosť venovaná:

- pôvodu slova ginko,
- histórii ginko dvojlaločného,
- taxonomickému zatriedeniu ginko,
- morfolologickej stavbe ginko dvojlaločného,
- využitiu ginko vo farmácii,
- technikám *in vitro* využívaným pri mikropropagácii ginko a získavaní sekundárnych metabolitov dôležitých pre farmaceutický priemysel.

Záver

V práci bol vytvorený prehľad o explantátových kultúrach, ich pôvode vzniku, rozdelení do jednotlivých skupín, a taktiež o ich pozitívach a negatívach z hľadiska využitia.

Medzi pozitíva explantátových kultúr možno zaradiť:

- na malom priestore sa produkuje veľký počet rastlín
- sú rýchle (možnosť ovplyvniť podmienky)
- produkcia klonov ktorých rozmnožovanie tradičnými metódami prebieha pomaly alebo vôbec
- celoročná produkcia rastlín
- zkrátenie šľachtiteľského cyklu.

Za nevýhody možno uviesť:

- relativne drahé vybavenie laboratórii
- pracnosť
- drahé riadenie laboratória
- náročná aklimatizácia rastlín na poľné podmienky.

Taktiež sme v práci vytvorili prehľad a ginku dvojlaločnom- vzniku slova ginko, jeho histórii, zatriedení z hľadiska taxonómie, morfolologickej charakteristike a použítí ginka v medicíne.

Získal sa aj prehľad o možnostiach explantátových kultúr ginka dvojlaločného. Vhodnom metódou získavania *in vitro* kultúr je mikropropagácia.

Použitá literatúra

BARANEC, Tibor – POLÁČIKOVÁ, Mária – KOŠŤÁL, Jaroslav. 2007. *Systematická botanika*. 2. vyd. Nitra: SPU, 2007. 210 s. ISBN 978-80-8069-868-3.

D'AMATO, F. : *Nuclear Cytology in Relation to Development*. Cambridge University Press, 1997, s. 283.

DUŠEK, J. – DUŠKOVÁ, J. 1997. Explantátové kultúry vyšších rastlín a jejich využití v biotechnologii. In *Naše liečivé rastliny*, roč.34, 1997, č.5, s. 164- 168.

GAMBORG, O. L. – MILLER, R. A. – OJIMA, K.: *Exp. Cell Res.* 50, 1968, s. 151.

GEORGE, E. F. – SHERRINGTON, P. D.: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited, Eversley, 1984.

HABERLANDT, G. 1902. *Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen*. Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien, Math- Natur. Kl. 111 : 69-72.

HRUBÍK, Pavel- KOLLÁR, Ján- HRUBÍKOVÁ, Katarína. 2009. Morfológické zvláštnosti ginka dvojlaločného (ginkgo biloba) na Slovensku. In *Vždyzelené dreviny v strednej Európe ich introdukcia a využitie*. Mlyňany: Arborétum, 2009, s. 87-93. ISBN 978-80-970254-4-1.

HRUBÍKOVÁ, Katarína- BEŽO, Milan- KUTIŠOVÁ, Jana- ŽIAROVSKÁ, Jana- GAJDOŠOVÁ, Alena- OSTROLUCKÁ, Mária Gabriela- HRICOVÁ, Andrea- LIBIAKOVÁ, Andrea. 2009. *Explantátové kultúry rastlín*. 1. vyd. Nitra: SPU, 2009. 128 s. ISBN 978-80-552-0323-2.

KAMENICKÁ, A. – VIZÁROVÁ, G. 2000. *Mikromnoženie okrasných drevín*. 1. vyd.

Nitra: SPU, 2000. 63 s. ISBN 80-7137-725-2.

KOBLIHA, Jaroslav. 2000. Explantátové kultury- historický předěl pro rozvoj klonového hospodářství lesních dřevin. In *Lesnícka práce* [online], roč. 79, č. 6, [cit. 2011-04-30]. Dostupné na: <<http://lesprace.silvarium.cz/content/view/1568/140/>>.

KWANT, Cor, 1999. Name about ginko. In *The Ginko pages* [online], [cit. 2011-04-30]. Dostupné na: <<http://www.xs4all.nl/~kwanten/name.htm>>.

LANDA, Zdeněk- NOVÁK, František J. – OPATRŇY, Zdeněk- LANDOVÁ, Běla- PETRŮ, Eva. 1980. *Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění rostlin*. 1. vyd. Praha: Academia, 1980. 62 s.

MURASHIGE, T. – SKOOG, F. : *Physiol. Plant.*, 15, 1962, s. 473.

NARAYASWAMY, S. : In. REINTER, J. – BAJAJ, Y. P. S. (eds.) : *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organe Culture*. Springer Verlag, Berlin, 1977.

NOVÁK, František J. 1990. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. 1. vyd. Praha: Academia, 1990. 208 s. ISBN 80-200-0344-4.

ONDEJČÍK, Vladimír- ONDEJČÍKOVÁ, Alena. 2004. Ginkgo biloba... z čínskej medicíny. In *Bonsaj a čaj* online, [online], č.1, [cit. 2011-04-30]. Dostupné na: <http://www.bonsajacaj.sk/cl_byl_1.htm>.

RAGHAVAN, V.: *Intern. Rev. Cytol.*, Suppl. 11, 1980, s. 209.

ROULE, Zdeněk. 2009. *Vegetativní množení střevidníkŮ (*Paphiopedilum spp.*) in vitro* : bakalárska práca. České Budejovice: Jihočeská univerzita, 2009. 36 s.

SEMAN, Ivan et al. 1990. *Biotechnologické metody v šlachtení polních plodin*. 1. vyd. Bratislava: Příroda, 1990. 272 s. ISBN 80-07-00237-5.

TULECKE, W.: A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. In: *An atlas of gymnosperm cultured in vitro*. 1953.