



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

244688

(11)

(B2)

(22) Přihlášeno 21 06 84
(21) PV 4737-84
(32) (31) (33) Právo přednosti od 29 06 83
(P 33 23 411.6) Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 17 09 85

(45) Vydáno 15 04 88

(51) Int. Cl.⁴

A 01 H 1/06

A 01 H 5/02

(72) Autor vynálezu

CHLUDWIG FRANZ dr. habil. dipl. agr., MNICHOV, ISAAC OTTO dr., HANAU
(NSR)

(73) Majitel patentu

DEGUSSA AG, FRANKFURT/M. (NSR)

(54) Způsob získávání nové odrůdy heřmánku

Způsob získávání nové odrůdy heřmánku (označení Manzana), jejíž květy sušené při teplotě 40 °C obsahují 150 mg % chamazulenu a nejméně 300 mg % (-)-alfa-bisabololu, přičemž obsah ostatních bisaboloidů leží pod 50 mg %, tetraploidizací diploidní odrůdy heřmánku DEGUMILL a následující selekcí a množením.

Způsob přípravy nové odrůdy heřmánku (označení Manzana).

Přípravky květních hlaviček heřmánku pravého (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, synonymního s *Matricaria chamomilla* L.) nacházejí v důsledku antiflogistického a spasmolytického účinku široké terapeutické použití a tvoří důležitou součást sortimentu léčivých rostlin. Mimořádný terapeutický význam mají přitom účinné látky (-)-alfa-bisabolol a chamazulen. Kvalitní droga heřmánku by měla tudíž obsahovat co možná nejvyšší obsah těchto obou látek.

Pod označení DEGUMILL (jedná se přitom o druh heřmánku uvedený v německém patentovém spise č. 24 02 802; NDR - ochranné právo druhu DEGUMILL; italský patentový spis č. 1 035 096) je znám druh heřmánku, který má současně vysoký obsah (-)-alfa-bisabololu i chamazulenu.

Obsah chamazulenu a bisanololu je trvalý jenom tehdy, když se zabrání náhodnému zkřížení, případně cizímu opylení jinými druhy heřmánku, jejichž obsah bisabololu a chamazulenu je podstatně nižší, případně s divokým heřmánkem chudým na obsahové látky, který je všude přítomen.

Toto nebezpečí zkřížení cizím opylením hrozí téměř vždy, protože divoký heřmánek se vyskytuje prakticky všude.

Dále jsou známy tetraploidní druhy heřmánku (například BODEGOLD, NDR; POHOŘELICKÝ ČSSR; ZLOTY LAN, Polsko, BK-2, Maďarsko). Tyto tetraploidní druhy heřmánku mají obsah chamazulenu, který není v podstatě nižší než u druhu Manzana.

Na druhé straně je u těchto známých tetraploidních druhů účinná látka (-)-alfa-bisabolol přítomna ve velice malém množství a v důsledku toho převládají ostatní bisaboloidy (bisaboloxid A a B jakož i bisabolonoxid), které vytvářejí více než polovinu etherického oleje u známých tetraploidních druhů heřmánku.

Nyní byl nalezen způsob výroby nového tetraploidního druhu heřmánku s výhodnými vlastnostmi.

Vynález se týká tudíž bodů vymezených předmětem vynálezu, případně sběhu věcí.

Nový tetraploidní druh heřmánku podle vynálezu označený jako Manzana se ve srovnání se známým druhem heřmánku DEGUMILL, jako i ostatními známými tetraploidními druhy heřmánku vyznačuje překvapivě řadou nových a výhodných vlastností.

Ve srovnání s DEGUMILLEM odolává cizímu opylení přirozeně se vyskytujícími populacemi heřmánku (divokého heřmánku). Kromě toho má podstatně vyšší obsah důležité účinné látky (-)-alfa-bisabololu než druh DEGUMILL.

Ve srovnání se známými tetraploidními druhy heřmánku, druh Manzana podle vynálezu se odlišuje překvapivě nesrovnatelně vyšším obsahem důležité účinné látky (-)-alfa-bisabololu, jakož i velice nízkým obsahem ostatních bisaboloidů.

Dále se odlišuje druh Manzana od známých tetraploidních druhů heřmánku překvapivě ještě dalšími vlastnostmi: zlepšenou klíčivostí semen; menším odpadem nepoužitelné části rostliny (tj. vyšším výnosem květů); nižším obsahem vody v květech (tj. vyšším výnosem sušených květů a kratší dobou sušení); je vhodnější pro strojovou sklizeň, protože květy jsou likalizovány v jedné rovině a většina květů kvete současně (to umožňuje i jednotný termín sklizně); lepší skladovatelností drogy (menší sklon k rozpadavosti a tvorby drtě); vyznačuje se obzvláště aromatickou a typickou vůní heřmánku.

Dále je druh heřmánku *Manzana* podle vynálezu ve srovnání s dosud známými tetraploidními druhy heřmánku homogenní pokud se týká obsahových látek, přičemž vlastnosti obsahu chamazulenu a (α)-alfa-bisabololu (tj. homozygotní) zůstávají trvalé.

Proti tomu dokazují zkoušky s jednotlivými rostlinami známých tetraploidních druhů, že jedinci mají různý obsah látek, to znamená, že každý námkou odebraný vzorek z takto získané drogy se liší jak kvalitativně, tak kvantitativně, je nehomogenní.

Úkolem vynálezu je výroba nového tetraploidního druhu heřmánku se zlepšenými vlastnostmi, zejména vyšším obsahem (-)-alfa-bisabololu.

Výroba nového druhu heřmánku podle vynálezu se provádí převedením v tetraploidní formu u druhu heřmánku DEGUMILL (genovou mutací) a na to navazující další kroky selekce a množení (vypěstování matečných rostlin pro vegetativně množené cizí oploďňovatele). Druh *Manzana* se skládá ze kmenů případně linií, které byly při udržování pěstování odděleně zpracovány.

Převádění na tetraploidní formu lze provádět například působením na části rostlin (semena, kořeny, vrcholy výhonků, klíčky, poupata, vpaždí) nebo tkáně heřmánku DEGUMILL pomocí chemikálií, rentgenovými paprsky, gama-paprsky, uř-paprsky. Dále to lze provádět způsobem dakepitací kalusu, pomocí prašnickových kultur, použitím vysokých ale i nízkých teplot na rostliny heřmánku druhu DEGUMILL, případně části rostlin nebo tkáně rostlin DEGUMILL.

Lze příkladně odkázat na knihu Wenera Gottschalka "die Bedeutung der Polyploidie für die Entwicklung der Pflanzen", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1976, zejména na strany 13 až 22.

Převádění na tetraploidní formu pomocí chemikálií.

K převádění na tetraploidní formu přicházejí v úvahu například tyto chemikálie: Kolchicin, acnaften, alkaloidy jako atropin, veratrin, nikotin, sanguinarin, deriváty benzenu, difenylu a fenathrenu, naftalinu a deriváty naftalinu, difenylamin, tribromanilin, p-dichlorbenzen, methylnaftochinon, methylnaftohydrochinon, kyselina salicylová a příbuzné látky, hexachlorhexan, pervitin (hydrochlorid), alkykarbamáty alkalických kovů, jako isopropylkarbamát sodný, fenylurethan, soli kyseliny kakodylové (například sodná sůl), glykosidy z *Convallaria* jako Convallarin, convallatoxin a convallamarin, heteroauxin, Germisan (fenylmerkuripyrkatechin), organické deriváty rtuti jako ethyl-rtuť-fosfát, ethyl-rtuť-chlorid, fenyl-rtuť-hydroxid, fenyl-rtuťnaftylmethandisulfonát, chloroform, tzv. rajský plyn (N_2O), jakož i směsi těchto látek. V úvahu přicházejí dále pokrutiny, kompost a kravská mrva.

Působení výše uvedenými látkami se provádí příkladně při teplotách mezi 0 a 35 °C s výhodou mezi 12 a 30 °C zejména 25 a 25 °C.

Aplikace se provádí například působením na semena, vrcholy výhonků, kořeny (zejména kořenová zakončení, nebo kořeny klíčků), plodenství, plochy řezů na listech nebo lodyh, na buněčné suspenze z mezistémové tkáně, na kalusové kultury nebo pomocí injekce do bazální oblasti lodyhy nebo do oblasti poupat v paždí.

Chemikálií se používá zpravidla ve formě roztoků ve vodě, slabě alkoholických roztoků (obsah alkoholu je zpravidla méně než 5 %) nebo se používá slabě kyselých roztoků. Hodnota pH slabě kyselých roztoků je mezi 5,5 až 6,5, přičemž okyselení se provádí pomocí nízkých organických alifatických kyselin, jako kyseliny octové.

Použije-li se alkoholických roztoků mohou být tyto rovněž slabě kyselé. Koncentrace chemikálií v těchto roztocích může být příkladně 0,01 až 0,5 %, s výhodou 0,02 až 0,2 %, obzvláště 0,05 až 0,1 %. Plynné látky přicházejí v úvahu k použití případně pod tlakem

(například 1 až 10 barů). Doba působení je příkladně 1 až 36, s výhodou 2 až 12, zejména 4 až 6 hodin.

Nejúčinnější koncentrace stejně jako doba působení musely být účelně pokaždé hodnoceny v předpokusech. Obzvláště příznivé je například působení kolchicinu při teplotách mezi 0 a 35 °C, s výhodou 12 až 30 °C, zejména 12 až 25 °C.

To se může například provádět tak, že semena druhu heřmánku DEGUMILL se přivádějí k bobtnání v 0,01 až 0,2%, zejména 0,01 až 0,1% s výhodou 0,05% roztoku kolchicinu, nebo vyklíčené, 5 až 7 dní staré, dobře vyvinuté druhy heřmánku DEGUMILL (s klíčovými listy dolů) se ponoří do 0,01 až 0,1%, zejména 0,02 až 0,1%, s výhodou do 0,05% roztoku kolchicinu.

Při posledním způsobu má okolní atmosféra mít přibližně 100% relativní vlhkost. Doba kolchicinového ošetření činí přibližně 3 až 36 hodin, zejména 4 až 10 hodin. Při použití sazenic je obecně postačující doba působení až 10 hodin. Při použití semen se může doba působení prodloužit až na 36 hodin.

Po působení chemikálií se nabobtnalá semena, klíčící rostliny, popřípadě jednotlivé části rostlin promyjí opakovaně vodou. Nabobtnalá semena se příkladně vysejí. Rostliny s ošetřenými kořeny nebo části rostlin nebo ošetření klíčící rostliny se příkladně pikyrují do truhlíku pro rostliny.

Z takto ošetřených semen případně klíčících rostlin se vypěstují rostliny, například skleníku při teplotě mezi 18 až 25 °C ve dne a 10 až 16 °C v noci a vybírají se rostliny jejichž pyl je asi 1,5x větší než pyl výchozího materiálu, případně počet chromosomů somatických buněk je 36.

V případě, že se ošetřují jednotlivé díly rostlin (nadzemní nebo podzemní díly) chemikáliemi podrobí se pozdějšímu vyšetření a převádění v tetraploidní formy jenom výhonky vyňané z ošetřených dílů, kořeny nebo květy/semena. Když bylo například provedeno ošetření výhonků nebo ošetření paždí, vyšetřuje se potom jenom z tohoto paždí, případně z tohoto očka vyňaný výhonek a vyšetřují se na něm vytvořené květy, případně semena na počet chromosomů.

Měření velikosti pylu a určení počtu chromosomů lze provádět například tak, jak je to udáno v příkladu 1.

Převádění v tetraploidní formu pomocí paprsků.

Působení se provádí například na semena nebo kořenové zakončení při teplotách mezi 0 a 35 °C, s výhodou 10 až 30 °C, zejména 15 a 25 °C. Množství ozáření: 5 x 10krát. V úvahu přicházejí s výhodou gama-a rentgenové paprsky. Jako uř-paprsky přicházejí v úvahu takové, které mají vlnovou délku 400 až 300 nm, s výhodou 350 nm.

Ozářené rostliny, případně jejich části se ošetřují dále, jako rostliny po působení chemikálií.

Použití vyšších a nižších teplot.

Jako vysoké teploty přicházejí v úvahu příkladně teploty mezi 33 a 50 °C, s výhodou mezi 42 až 45 °C. Těmto teplotám jsou například vystaveny: nabobtnalá semena, konce výhonků a meristematické tkáně.

Doba působení: například 1 až 48, s výhodou 12 až 24 hodin. Jako nízké teploty přicházejí v úvahu: 0 až 5 °C, s výhodou 0,5 až 4 °C, zejména 2 °C. Těmto teplotám jsou například vystaveny: nabobtnalá semena, klíčící rostlinky, výhonky a meristemové tkáně. Doba působení: například 1 až 100, s výhodou 20 až 40 dní. Takto ošetřené rostliny, případně jejich části se zpracují dále jako po ošetření chemikáliemi.

Způsob dekapitace kalusu (dekapitace = odstranění hlavičky nebo odstraňování špiček nebo zpětný řez. Dekapitace se provádí například na mladých rostlinách na lodyze, s výhodou na konci vegetačního kuželu, po vytvoření 4 až 6 listů nebo také na řapících listů nebo postranních výhoncích.

Pupeny vznikající ze zraněné tkáně (kalusové tkáně), případně výhonky se odříznou, přivedou ke kořenění, kultivují dále v kořenáčích a tetraploidní rostliny se vyselektují stejně jako při zpracování chemikáliemi.

Prašníkové kultury (příprava rostlin s jednoduchým počtem chromosomů z práškových váčků s následnou spontánní nebo umělou tetraploidní přeměnou.

U kvetoucích rostlin se sklídí zavřené trubkovité květy, jejichž prašníky, prašníkové váčky se nalézají ve stadiu první pylové mitózy. Prašníky se vyjmou pomocí mikromanipulátoru z květních pupenů, přenesou na Petriho misky, které jsou plněny například živným prostředím podle Nitsche a Nitsche (tabulka 1).

Potom se Petriho misky uchovávají v kultivačním prostoru po dobu 16 dní při teplotě 28 °C ve dne a 20 °C v noci. Asi po uplynutí doby 4 týdnů začnou prašníky pukát a rostliny vyrůstat. Tyto jsou u diploidní rodičovské části haploidní, u tetraploidní rodičovské části dihaploidní; po vytvoření kořenového systému se přesadí do zahradní země do kořenáčů a ve skleníku se přivedou ke květu.

Tyto dihaploidní rostliny jsou sterilní, mohou však být ošetřeny konců výhonků, kořenů, nebo lodyhy chemikáliemi, jako například kolchicinem převáděny v polyploidní formy, přičemž vznikají homozygotní rostliny, které lze množit dále pomocí semen. Další postup viz při působení chemikáliemi (například působení kolchicinu).

T a b u l k a 1

Živné prostředí podle Nitsche a Nitsche (Science, 1969)

	mg/l
KNO ₃	950
NH ₄ NO ₃	720
MgSO ₄ × 7H ₂ O	185
CaCl ₂	166
KH ₂ PO ₄	68
MnSO ₄ × 4H ₂ O	25
H ₃ BO ₃	10
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	10
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,025
5 ml roztoku z 7,24 g	
dvojsodná sůl kyseliny ethylendiamino-	
tetraoctové a 5,57 g FeSO ₄ × 7H ₂ O	
na 1 000 ml	
myoinosit	100
glycin	2
kyselina nikotinová	5
pyridoxin hydrochlorid	0,5
thiamin hydrochlorid	0,5
kyselina listová	0,5
biotin	0,05
sacharóza	20 g
živná půda (DIFCO-Bacto-agar)	8 g
kyselina indolyloctová	0,1
pH media nastaveno na hodnotu 5,5	

Z měření velikosti pylu a/nebo počtu chromosomů vyselektovaných tetraploidních rostlin heřmánku, které se získávají dříve popsanými možnostmi, se ještě vyselektují rostliny, které splňují následující podmínky:

- a) Kvetení v přibližně stejnou dobu
- b) Rovnoměrné, základní větvení a úzká zóna květu asi 5 cm
- c) Velké hlavičky květu vnějšího průměru asi 30 mm/25 až 35 mm/,
- d) Minimální obsah chamazulenu 150 mg % a bisabololu 300 mg % a obsahu ostatních bisaboloidů (pod 50 mg %) vztaženo na vysušené květy, viz příklad).

Takto vyhledané rostliny se nyní množí vegetativně sazeničkami (pomocí klonů) a sledují se po dobu 3 až 5 generací, přičemž volba probíhá stále podle výše uvedených kritérií a) až d). To znamená rostliny vyhledané podle kritérií a) až d) se klonují, z klonovaných rostlin se získává osivo, z něj získané rostliny se vyselektují podle kritérií a) až d) a od posledních se opět získává osivo.

Sekvenční výsev - selekce podle a) až d) získání osiva lze 2 až 4x opakovat. Potom se provádí závěrečný sekvenční výsev - selekce podle a) až d) - klonování - získání osiva.

Nakonec získané osivo je potom osivo k množení druhu heřmánku *Manzana* podle vynálezu.

Množení sazeničkami se provádí následujícím způsobem: K množení sazeničkami musí výchozí rostliny (klonové mateřské rostliny) vytvořit za podmínek krátkého dne krátké výhonky prosté květních pupenů. K tomuto dochází v zimní polovině roku ve skleníku bez dalšího osvětlování nebo v klimatizované komoře denní délky 6 až 10, případně 8 hodin a teplotách 10 až 15 °C s výhodou 12 °C.

Ke klonování, případně množení jsou vhodné listové, výhonkové a zejména sazeničky s krátkými výhonky (postranními výhonky). Ke tvorbě kořenů dochází při teplotě 12 až 18 °C, s výhodou při 15 °C a délce dne 12 až 16, s výhodou 14 hodin v upravené atmosféře (asi 100% relativní vlhkosti vzduchu).

Jako substrátu lze použít například směs rašelina-písek v poměru 1:1, je vhodný i čistý křemičitý písek, kamenná drť - krychličky pro sazenice, rašelina - krychličky pro sazenice a podobně.

Pro výsev přicházejí přitom v úvahu: zahradní půda, humózní středně těžké hlinité půdy, hlinité nebo humózní písčité půdy. Mohou být vysety ve skleníku nebo volné zemi. Teploty klíčení a růstu leží například mezi 12 až 24 °C zejména 18 až 20 °C. V případě volného vysetí se seje s výhodou na podzim (září/říjen) nebo brzy na jaře (březen/duben). Tyto termíny platí pro všechna území přicházející v úvahu (například severní hemisféru, mírné až subtropické klima).

Nový druh heřmánku podle vynálezu náleží k pěstovanému rostlinnému druhu pravého heřmánku botanického označení *Matricaria Chamomilla* L. (synonymum *Chamomilla recutita* /L./ Rauschert) a je derivována údají o účinných látkách podle bodu 1.

Tam udané hodnoty o obsahu účinných látek se vztahují na ta vývojová květní stadia, kterých je dosaženo, když 30 až 70 % zejména 40 až 60 % všech trubkovitých květů květní hlavičky je otevřeno (to znamená, pro stanovení účinných látek použité květy byly v této době očišvány a potom sušeny po dobu 72 hodin při teplotě 40 °C v sušárně).

Provádí-li se sklizeň heřmánkových květů v čase, kdy vývojové stadium květů dále pokročilo, tj. kupříkladu kdy 100 % nebo až téměř 100 % všech trubkovitých květů květenství se již rozevřelo (např. ve stadiu úplného rozkvětu) nebo/a děje-li se sušení sklizených květů při teplotě vyšší než 40 °C, je obsah účinných látek (-) - alfa-bisabololu a chamazulenu nižší.

Provádí-li se tedy sklizeň ve vegetačním stadiu, kdy 30 až 100 % trubkovitých květů květenství je rozevřeno a suší se přitom za teploty do 60 °C (výhodně při vyloučení slunečního světla, např. za takových podmínek sušení, jako je uvedeno dále v následujícím výkladu v popisu tohoto výálezu), obsahuje takto získaná heřmánková droga alespoň 120 mg % chamazulenu a alespoň 200 mg % (-)-alfa-bisabololu, zatímco obsah ostatních bisaboloidů zůstává, stejně jako v předešlém výkladu, pod 50 mg %.

Pod označením "ostatní bisaboloidy" v definici předmětu vynálezu je zejména míněno:

(-)-alfa-bisaboloxid 1 a B; (-)-alfa-bisabolonoxid A; další podíly etherického oleje druhu heřmánku podle vynálezu jsou En-In-dicykloether, farnesen, spathulenol a malých koncentracích snadno těkavé terpenické uhlovodíky.

Například květy sušené v sušárně při teplotě 40 °C (sklizené ve stadiu vývoje květů, kdy je rozevřeno 30 až 70 % trubkovitých květů květenství) druhu Manzana podle vynálezu, obsahuje mezi 150 až 200 mg % chamazulenu, mezi 300 až 450 mg % (-)-alfa-bisabololu a jenom málo, to znamená mezi 5 až 50 mg % jiných bisaboloidů, vztaženo na suchou drogu (to znamená vztaženo na absolutní suchou hmotnost květů).

Tato absolutní hmotnost sušiny se určuje sušením separátního vzorku květů heřmánku podle vynálezu druhu Manzana v sušárně při teplotě 105 °C až do konstantní hmotnosti (po dobu 72 až 96 hodin). Obsah účinných látek, například při 35 až 50 °C sušených květů (drogy), se potom přepočte na květy sušené při teplotě 105 °C.

Ve svém fenotypu je druh Manzana podle vynálezu podobný dosud známým tetraploidním druhům heřmánku (například Bodegolg, Zloty Lan, BK-2, Pohořelický Velkokvětý); liší se od nich zejména tím, že u druhu Manzana podle vynálezu je (-)-alfa-bisabolol hlavní složkou etherického oleje květů, že kromě toho má vyšší obsah chamazulenu a obsah ostatních bisaboloidů (bisaboloxid A a B; bisabolonoxid) podstatně nižší. Dalšími složkami etherického oleje druhu manzana je farnesen, spathulenol a En-In-dicykloether.

Druh heřmánku podle vynálezu může být pěstován úspěšně na všech půdách obsahu více než 20 % organických látek (humusovité látky a půdní organismy) není požadováno žádné zvláštní agrotechnické opatření nebo kultivační opatření; pěstování vyžaduje jenom tzv. dlouhý den o délce více než 13 hodin, to znamená pro pěstování jsou nejvhodnější mírné zóny a subtropy.

Druh heřmánku Manzana podle vynálezu má středně pozdní dobu sklizně, jednotnou výšku růstu s úzkou zónou květů a velkými hlavicemi květů a je tudíž obzvláště vhodný pro mechanickou sklizeň. Dále, ve stejnou dobu vyseté rostliny druhu Manzana kvetou prakticky společně v tutéž dobu, takže sklizeň je velice zjednodušena a ulehčena.

Heřmánek druhu Manzana podle vynálezu přináší vysoký výnos. Možnosti použití jsou například: získání heřmánku jako drogy, heřmánkového oleje, heřmánkových extraktů, jakož i přirozeného (-)-alfa-bisabololu.

Droga heřmánku druhu Manzana podle vynálezu má maximální obsah účinných látek chamazulenu a bisabololu když se květní hlavice sklídí ve vegetačním stadiu, kdy je například 30 až 70 % s výhodou 40 až 60 %, to znamená obecně 50 % trubkových květů květních hlavic otevřeno, a provede se sušení při teplotě vzduchu maximálně 50 °C, například 35 až 50 °C.

Sušení lze přitom provádět buď umělým přívodem vzduchu nebo rovněž sušením ve stínu, případně i na slunci, přičemž je třeba dbát na to, aby přívod tepla nebyl vyšší než je třeba k dokonalému vysušení.

Je rovněž výhodné přesvědčit se občasným zvážením o dosažené konstantní hmotnosti. Suše-

ní může být spontánní nebo umělé (například umělým teplým vzduchem). Výtěžek účinných látek je nejvyšší po spontánním sušení za vyloučení slunečního světla. Proces sušení je třeba provádět brzy, případně současně se sklizní. Sušení má probíhat v tenkých vrstvách, například 5 až 20 cm, s výhodou v 10 cm tloušťce vrstvy.

Stanovení chamazulenu se provádí spektrofotometricky jako u obvyklých heřmánkových extraktů. Stanovení (-)-alfa-bisabololu jakož i ostatních obsahových látek heřmánkového oleje se provádí obvyklými chromatografickými způsoby.

Přesné vylíčení analytických postupů obsahuje příloha A.

Účinná látka chamazulen je přítomen v květech heřmánku nikoliv jako takový, ale ve formě seskviterpenického laktonu matricinu. Matricin je farmakologicky účinný, účinek odpovídá chamazulenu. Z předstupně matricinu vzniká například zahřátím (například destilací s vodní párou) nálevem čaje okamžitě chamazulen. Je tudíž obvyklé udávat u heřmánku nikoliv obsah matricinu, nýbrž analytický obsah z něj vznikajícího chamazulenu.

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Semena druhu heřmánku DEGUMILL se nanesou na filtrační papír s 0,05% vodným roztokem kolchicinu a při teplotě místnosti (20 °C) se nechají po dobu 6 hodin bobtnat. Potom se odstraní z filtračního papíru, opakovaně se promyjí vodou a vysejí se do truhlíku ve skleníku: půda: rašelina-písek v poměru 1:1, teplota: 18 až 20 °C, relativní vlhkost vzduchu asi 60 %, délka dne při umělém osvětlení: 14 hodin.

Klíčící rostliny byly pozorovány až k době květu, výsledek přeměny v polyploidní formu byl hodnocen srovnávacím měřením velikosti pylu a semen i počtu chromosomů (F_1 -potomstvo = = prvé ze semen získané potomstvo, které představuje prvé tetraploidní rostliny po působení kolchicinu).

Přeměnu v tetraploidní formu lze provádět i takto: Na vodou navlhčeném filtračním papíru vyklíčené, 5 až 7 dní staré heřmánkové sazeničky druhu DEGUMILL při teplotě místnosti (10 °C) po dobu 4 až 6 hodin s klíčovými lístky směrem dolů, byly přeneseny do 0,05% roztoku kolchicinu. Přitom byly šetřeny klíčkové kořeny; aby se zabránilo škodám vysušením musí mít obklopující atmosféra přibližně 100% relativní vlhkost vzduchu.

Po působení byly sazeničky několikrát promyty vodou a pikýrovány v truhlících pro rostliny. Následovalo stejné ošetření jako u semen.

Měření velikosti pylu bylo prováděno Leitzovým binokulárním výzkumným mikroskopem s měrným okulárem opatřeným mikrometrem a podložním sklíčkem s mikrometrem.

Chromosomy se počítají na kořenových zakončeních: Od mladých rostlin nebo sazeniček vypěstovaných ve skleníku byly sbírány 1 až 2 cm dlouhé čerstvé konce kořenů: 5 hodin byly naloženy do 0,002 molárního roztoku hydroxychinolinu a potom po dobu 15 minut do 1N kyseliny chlorovodíkové.

K mikroskopickému vyšetření byly asi 1 mm dlouhé konce kořenů vybarveny 2% směsí orcein-kyselina octová a mikroskopicky vyšetřeny v olejové imerzi. U buněk nalézajících se ve stadiu mitózy lze tak určit čtyřnásobný počet chromosomů somatických buněk ($4n = 36$).

Ty rostliny, u kterých byl průměr pylu asi o 50 % větší než u diploidního výchozího materiálu, (asi 30 místo asi 20 μm) a u kterých byl počet chromosomů somatických buněk zdvojen na 36 (u diploidního materiálu je odpovídající počet 18) jsou tetraploidní.

Tyto byly vyselektovány. Asi 0,1 až 0,5 % semen případně klíčnicích rostlin byly výše uvedeným způsobem převedeny v tetraploidní formu a poskytly květuschné, nedotčené rostliny. Další postup je následující:

Krok 1:

Z (jak je popsáno výše) vyselektovaných tetraploidních rostlin heřmánku byly vybrány ty rostliny, které

- a) téměř současně kvetou,
- b) mají rovnoměrné, základní větvení a úzké květní pásmo asi 5 cm,
- c) mají velké hlavice květů vnitřního průměru asi 30 mm,
- d) dosahují minimálního obsahu pro chamazulen 150 mg% a 300 mg% bisabololu nebo jej překročí a jejichž obsah ostatních bisaboloidů (zejména bisabololoxidů) je zřetelně pod 50 mg% všechny hodnoty jsou vztaženy na květní hlavice, které byly sušeny při teplotě 40 °C a jejichž sklizeň byla provedena ve stadiu, kdy teprve asi 50 % (40 až 60 %) trubkovitých květů hlaviček rozkvetlo.

Tyto rostliny byly klonovány. K tomu účelu byly rostliny (klonované matečné rostliny) nařezané nejprve na asi 15 cm dlouhé výhonky a při délce dne 8 až 10 hodin a teplotě 12 až 14 °C přivedeny k novým výhonkům (krátké postranní výhonky). Krátké výhonky byly odřezány a vloženy do směsi rašelina-písek. Při asi 100% relativní vlhkosti vzduchu, teplotě vzduchu 15 °C a délce dne 14 hodin trval vývoj kořenového systému sazeniček po dobu 7 až 14 dní.

Místo uvedeného obvyklého klonování (množení sazeniček) lze použít i množení tkáňových partií schopných dělení in vitro) tzv. meristemové množení). K etablování heřmánkové kultury jsou vhodné různé díly rostliny s výhodou konce výhonků nebo poupata v paždí.

Po opláchnutí rostlin H_2O_2 se za aseptických podmínek v "laminárním proudění" (vysokovýkonných podmínek v "laminárním proudění" (vysokovýkonný filtr s vytěšňovacím prouděním omezujícím turbulaci) se odnímají konce výhonků poupat v paždí listů a přenášejí do reagenčních nádob, které jsou plněny živným médiem například podle Murashigeho a Skoopa (Physiol. Plant. 15, 473-497, 1962).

Reagenční nádoby se odstaví v klimatizačním prostoru po dobu 12 až 18 s výhodou po 16 hodin délky dne (dosažené fluorescenční zářivkou), světelné intenzity 500 až 10 000 luxů s výhodou 1 000 až 3 000 luxů a teplotě 15 až 30 °C, s výhodou 22 až 27 °C.

Jakmile explantáty dosáhnou dobrého růstu, převedou se na výše uvedené živné prostředí, avšak s vyšší koncentrací cytokininu (30 mg/l N^6 -isopentenyladeninu) a s málem, případně žádným auxinem (0 až 0,3 mg/l kyseliny indolyloctové). Důsledkem toho se protahují osy a tvoří se adventivní orgány, jakož i zmnožená poupata v paždí. Tyto mohou být dříve uvedeným způsobem odňaty a pěstovány.

Explantáty určené ve větším množství k rozmnožování rostlin (třetí pasáže = třetí generace množení) se přenesou po růstu a vytvoření listů na zprvu uvedeném živném prostředí přeneseny na živnou půdu, která obsahuje 10 mg/l kyseliny indolyloctové nebo 3-indolylmáslé nebo 0,1 až 0,3 mg kyseliny alfa-naftilyloctové.

Rostlinky zakoření a asi po 4 týdnech mohou být pěstovány v kořenáčích se sterilní zahradnickou půdou (propařenou po dobu 12 hodin při teplotě 120 °C) a ve skleníku (za podmínek obvyklých jako u konvenčního množení sazeničkami) pěstovány dále.

Živné prostředí podle Murashigeho a Skoga

	mg/l		mg/l
NH_4NO_3	400	Indolyloctová kyselina	2,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	144	furfuryladenin	0,1
KNO_3	80	thiamin	0,1
KH_2PO_4	12,5	nikotinová kyselina	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	72	pyridoxin	0,5
KCl	65	glycin	2,0
NaFe-EDTA	25	myoinosit	100
H_3BO_3	1,6	Kasein-hydrol.	1 000
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	6,5	sacharóza	2 %
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,7	čištěný práškovitý agar	1 %

Stupeň 2:

Rostliny získané podle stupně 1 kvetly za izolovaných podmínek společně ve skleníku. Rostliny přitom stály v 11-cm-kořenáčích plněných zahradní zemí při teplotě 18 až 24 °C ve dne a 12 až 14 °C v noci. Délka dne činila nejméně 14 hodin a v zimní polovině roku byla dosahována přidavným osvětlením (200 Watt/m²). Voda byla dodávána podle potřeby.

Ze selektovaných jedinců byly po dobu 4 týdnů sklizeny na semeno průběžně ty hlavičky, které kvetly a byly krátce před rozpadem. Osivo bylo získáno po vysušení sklizených květů při teplotě místnosti vyfoukáním lehčích květních částí.

Stupeň 3:

Z osiva získaného ve stupni 2 byl odebrán námtkový vzorek a z toho získáno asi 2 000 potomků (ekologické podmínky jako ve stupni 2) a selektováno podle stejných kritérií jako u a) až d) ve stupni 1. S takto selektivovanými jedinci bylo postupováno podle stupně 2.

Stupeň 4:

Z osiva podle stupně 3 byla na podzim vyseta část na dvou rozdílných stanovištích.

Stanoviště A)

450 m NN, 48,5 °N/11,5 °O
 750 mm ročních srážek
 vlhké, mírné klima,
 leden -10 až 0 °C,
 červenec +10 až +20 °C,
 NN = severní zákl. rovina pro měření výšky nad mořem = mořská výška
 °N = severní šířka (ngrad)
 °O = východní délka (ngrad)

Stanoviště B)

200 m NN, 42 °N/L °O,
 400 mm ročních srážek
 středozevní klima,
 leden 0 až +10 °C,
 červenec +20 až +30 °C.

Výsev na obou stanovištích byl proveden koncem září/začátkem října.

Takto získané výsledky, polního pokusu byly zkoušeny a souzeny z hlediska homogenního růstu, velikosti květů, doby sklizně, kromě toho byly sledovány namátkové vzorky květů na obsah účinných látek. Z polního výsledku pokusu byly opět selektovány ti jednotlivci, kteří odpovídají parametrům uvedeným ve stupni 1. Z nich bylo získáno osivo odpovídající stupni 2.

Stupeň 5:

S osivem podle stupně 4 byly v udaném pořadí a způsobu opakovány stupně 3 a 4.

Stupeň 6:

Z osiva získaného podle stupně 5 bylo získáno asi 1 500 jedinců (ekologické podmínky jako ve stupni 2) a selektovány podle téhož principu jak je udáno ve stupni 1. Z takto vyselektovaných rostlin bylo voleno 34 jednotlivců a klonováno podle stupně 1.

Vždy 10 rostlin každého klonu bylo pěstováno v náhodném rozdělení ve vzdálenosti 40 x 30 cm na volném poli (stanoviště A, viz stupeň 4) na izolovaném místě. Půda byla z propustného jílu, o hodnotě pH 7,0; s pěstěním se začalo začátkem června, první sklizeň semen byly uprostřed července, potom byly rostliny posečeny, kvetly ještě jednou a poskytly uprostřed a koncem srpna další sklizeň osiva.

Získání osiva tohoto materiálu bylo provedeno podle stupně 2.

Osivo získané podle stupně 6 je osivo k množení heřmánku druhu *Manzana*. Květy rostlin z tohoto množícího osiva (výsev září/říjen, sklizeň začátkem června následujícího roku, které byly k určenému termínu očesány, když asi 50 % (40 až 60 %) trubkovitých květů hlavičky jsou otevřeny a které jsou potom sušeny po dobu 72 hodin při teplotě 40 °C v sušárně obsahující, vztaženo na hmotnost sušených květů (suchá látka) například: 150 mg % chamazulenu, 300 mg % (-)-alfa-bisabololu a maximálně 50 mg % ostatních bisaboloidů.

Další příkladné údaje k rostlinám získaným podle příkladu druhu heřmánku podle vynálezu:

1. Růst

Jednotná výška růstu (vyrovnanost) s úzkou květní zónou, tudíž mimořádně vhodná pro mechanizovanou sklizeň, velké hlavice květů, středně vysoká sklizeň;

Tvar: základní rozvětvený (troj. až pětinasobně)

Kužel: přímý, málo větvený

2. Olistění

List: zpeřené, dvoj až trojnásobně

Síla: střední;

Zpeřený list, barva středně zelená

Zpeřený list (střed kužele); zpeření středně až silně

3. Stav květenství

Košíčky květů (hlavičky květů):

asi 30 mm vnější průměr,

asi 15 mm vnitřní průměr;

Hmotnost jednotlivého košíčku (suchého): asi 45 mg

Květní výhonek, délka (mm): asi 700, je však závislé na místě pěstování (klíma), době vysetí, půdě, hnojení, ošetření rostlin, větrání;

Počátek květu (od 1. ledna):

asi 160. den (výsev září, stanoviště Freising Německá spolková republika, jinak závislý na výše uvedených faktorech).

Květ: střed června (viz výše);

Květy bez řapíku, obsah etherického oleje (% suché látky): asi 1,0 %, obsah azulenu v etherickém oleji; nejméně 15 %;

Rozpad vysušených květů, květní drogy: mírný, pokud bylo sklizeno před otevřením posledních trubkovitých květů;

Průměr pylu: asi 30 μ m;

Délka semene: asi 1,25 mm;

Počet chromosomů v somatických buňkách: 4 n : 36.

4. Plod

Hmota tisíce semen (TKM) semen: 0,06 až 0,13

5. Klíčivost (KF)

75,75 %

6. Čistota

94 - 95 %

7. Další znaky

Poměr vysychání čerstvých: suchým (květům) = 5,5 až 6:1, význačná aromatická vůně drogy, jemná aromatická typická chuť čajového nálevu.

P ř í l o h a A

Získání etherického oleje

Výchozím materiálem je droga z druhu heřmánku Manzana. K výrobě drogy se používají ty trubkové květy, kde je 30 až 70 %, zejména 40 až 60 % trubkových květů otevřeno. Sušení se provádí v sušárně při teplotě 40 °C po dobu 72 hodin.

Etherický olej z květů heřmánku se získává tak, jak je popsáno v následujícím dvouhodinovou destilací drogy vodní parou:

2,0 h nerozmělněné drogy se smísí v litrové kulaté baňce podrobí dvouhodinové destilaci v refluxní aparatuře (aparatura pro vodní destilaci pro gravimetrické stanovení malých množství etherických olejů). Jako předloha slouží 1 ml pentanu pro analýsu. Refluxní rychlost je 40 $\pm$ 4 kapky za minutu.

Po skončené destilaci se v pentanu obsažený etherický olej oddělí pokud možno od vody a v aparatuře vězící případně zbytkový etherický olej vymyje pentanem. K odstranění případných zbytků vody se k roztoku přidá malé množství bezvodého síranu sodného a roztok se potom zfiltruje přes skleněnou fritu hustoty D 3 nebo D 4 do zábrusových baněk.

Po odpaření pentanu při teplotě 40 °C na vodní lázni a sušení v eksikátoru se olej hodnotí gravimetricky.

K takto získanému oleji (cca 20 mg) se potom stanoví chamazulen a bisabolol.

Spektrálně fotometrické hodnocení chamazulenu

Stanovený roztok: Celkový ze 2 g drogy získaný etherický olej (asi 20 mg) získaného dříve popsaným způsobem, se rozpustí ve 25 ml n-hexanu nebo cyklohexanu.

Měřicí aparatura: Fotometr s filtrem (například Eppendorf).

Vlnová délka: 578 nm

Kyveta: 1 cm

Specifická extinkce chamazulenu

(1 g/100 ml; 1 cm) : 20,8

Kondenzační kapalina: n-hexan nebo cyklohexan

Nalezený obsah chamazulenu v mg/100 g: 120.E₅₇₈

Ne-li pro měření k dispozici fotometr s filtrem, lze stanovení provést i pomocí spektrálního fotometru.

Měřicí aparatura: Spektrální fotometr (například PM Q II) nebo PM Q III "Zeiss")

Vlnová délka 605 nm

Kyveta 1 cm

Specifická extinkce chamazulenu (1 g/100 ml; 1 cm) : 24,5

Kompenzační tekutina: n-hexan nebo cyklohexan

Nalezený obsah chamazulenu v mg/100 g: 102.E₆₀₅

V měřeném roztoku se potom měří bisabolol.

Plynově chromatografické stanovení bisabololu a ostatních bisaboloidů

pomocí plynové chromatografie

Hewlett Packard Modell 5 750, Erba Fractovap

2 350 nebo podobné zařízení

Detektor: Plamenový ionizační detektor

Sloupec: 0,031 cm; 200 cm; ocel

Náplň sloupce: 3 % silikonového kaučuku "XE 60" na silikonované křemelině "Chromosorb WAW HP" 125 až 150 µm jako nosič

Teplota:

Detektor: 320 °C

Vstřikovací blok: 220 °C

Sloupec: 85 až 220 °C

Programování teploty 4°/minuta

Roztok vzorku: Používá se měrného roztoku jako u chamazulenu

Srovnávací roztok: Asi 15 mg standardního bisabololu se rozpustí v cyklohexanu na objem 25 ml

Nastříkované množství: Z roztoku vzorku a srovnávacího roztoku vždy 5 µl

Vyhodnocení: Hodnocení se provádí srovnáním ploch maxim

Obsah bisabololu v mg 100 mg drogy: 10x navážka (kontrolní) [mg] x

Plocha/ vzorku:

Plocha/kontrolní

Hodnocení ostatních bisaboloidů lze provádět případně plynovou chromatografií, například z následujících podmínek:

Zařízení: Packard, Modell 7 721, Serie 800, případně Erba Fractovap Serie 2 350

Sloupec: Skleněné sloupce 3 m/2 mm v průměru; 2 m/2 mm v průměru

Náplň: 3 % methylfenylsilikonový kaučuk "OV 1" na silikonované křemelině "Gaschrom Q 125 až 150 µm jako nosný materiál.

Nosný plyn: 30 ml/minuta N₂
Teplotní program: 80 až 180 °C, 2,5 (3) °C/minuta
Teplota injektor/
detektor: 200 °C
Detektor: Plamenový ionizační detektor
Nastříkované
množství: asi 2 µl asi 1 : 50 naředěného etherického oleje

Hodnocení se provádí zčásti bez, zčásti s vnitřním standardem. Jako vnitřní standard je vhodný methylester kyseliny laurové nebo hexadekan pro chamazulenem chudé případně chamazulenu prosté oleje. U olejů s obsahem chamazulenu vyšším než 5 % je třeba chamazulenu použít jako vnitřní standardu, přičemž stanovení obsahu se provádí fotometricky (při 578 nm).

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob získávání nové tetraploidné odrůdy heřmánku (označení Manzana) kulturního rostlinného druhu heřmánku pravého (*Chamomilla recutita* L., synonymního s *Matricaria chamomilla* L., Asteraceae), jehož květy sušené při teplotě 40 °C obsahují nejméně 150 mg % chamazulenu, nejméně 300 mg % (-)-alfa-bisabololu a méně než 50 mg % ostatních bisaboloidů, vyznačující se tím, že diploidní odrůda heřmánku DEGUMILL se tetraploidizuje a vyselektované rostliny se podrobí dalším selekcím a množení, popřípadě se z rostlin heřmánku, které se získají z této odrůdy, získává množivo a/nebo heřmánková droga.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že tetraploidizace se provádí pomocí chemikálií při teplotách mezi 0 a 35 °C pomocí gama-záření, rentgenového záření nebo uř-paprsků při teplotách mezi 0 a 35 °C, pomocí vyšších teplot od 33 až 50 °C, pomocí nižších teplot od 0 do 5 °C, pomocí způsobu dekapitace kalusu nebo pomocí prašnickové kultury.

3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že po tetraploidizaci se provádí

a) selekce tetraploidních rostlin podle obsahu účinné látky (nejméně 150 mg % chamazulenu, nejméně 300 mg % bisabololu a méně než 50 mg % ostatních bisaboloidů, vše vztaženo na sušinu), podle současné doby květu, rovnoměrné doby květu, rovnoměrného větvení jakož i velikosti hlaviček květů 25 až 35 mm, takto selektované rostliny se klónují a z rostlin získaných klónováním se získává osivo,

b) z takto získaného osiva se získávají potomci, potom následuje selekce podle stupně a) a od vyselektovaných rostlin se získává opět osivo,

c) dvakrát až čtyřikrát se opakují opatření podle stupně b),

d) z osiva získaného podle stupně c) se získává potomstvo, toto se selektuje podle stupně a), takto vyselektované rostliny se klónují a z rostlin získaných klónováním se získává osivo.

4. Způsob výroby heřmánkové drogy z květů heřmánku podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že květy se sklízí ve vegetačním stadiu v době, kdy teprve 30 až 70 % trubkovitých květů v květenství je otevřeno a květy se suší při vzdušné teplotě ne vyšší než 50 °C.