

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognozie

Marcela SEDLÁŘOVÁ

Kultury léčivých rostlin in vitro – V.

Diplomová práce

Zadáno dne: 15.11.2006

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, Csc.

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, Csc.

Datum odevzdání: 15.5.2008

Oponent: PharmDr. Jan Martin

Obhajoba: 4.6.2008

Počet stran: 71

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Kultury léčivých rostlin in vitro“ vypracovala samostatně a s použitím odborné literatury, která se týká daného tématu a je uvedena v diplomové práci

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Doc. PharmDr. Lence Tůmové, Csc. za odbornou konzultaci a pomoc při práci na tomto úkolu, PharmDr. Janu Martinovi za technickou výpomoc s analyzátozem HPLC a kolektivu katedry farmakognozie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Úvod..... | 7 |
| 2. | Cíl práce..... | 10 |
| 3. | Teoretická část..... | 11 |
| 3.1 | Explantátové kultury..... | 11 |
| 3.1.1 | Rozdělení kultur rostlinných explantátů..... | 11 |
| 3.1.2 | Faktory ovlivňující růst tkáňových kultur a produkci sekundárních metabolitů..... | 12 |
| 3.2 | Elicitované kultury..... | 14 |
| 3.2.1 | Klasifikace elicitorů..... | 15 |
| 3.2.2 | Faktory ovlivňující licitaci..... | 15 |
| 3.3 | Ultrafialové záření..... | 16 |
| 3.3.1 | Poškození DNA UV radiací..... | 17 |
| 3.3.2 | Fyziologické reakce rostlin na UV záření..... | 18 |
| 3.4 | Genista tinctoria..... | 20 |
| 3.4.1 | Charakteristika rostliny..... | 20 |
| 3.4.2 | Droga..... | 21 |
| 3.4.3 | Obsahové látky..... | 21 |
| 4. | Experimentální část..... | 31 |
| 4.1 | Rostlinný materiál..... | 31 |
| 4.2 | Přístroje a vybavení..... | 31 |
| 4.3 | Chemikálie a pomocné látky..... | 32 |
| 4.4 | Kultivace tkáňových kultur..... | 33 |
| 4.4.1 | Příprava kultivačních nádob a nástrojů..... | 33 |
| 4.4.2 | Složení a příprava živného média..... | 33 |
| 4.4.3 | Pasážování a kultivace..... | 35 |
| 4.5 | Elicitace..... | 36 |
| 4.6 | Hodnocení růstu..... | 36 |
| 4.7 | Stanovení obsahu flavonoidů..... | 37 |
| 4.7.1 | Příprava vzorků..... | 37 |
| 4.7.2 | Parametry HPLC analýzy..... | 37 |
| 4.8 | Sestavení kalibrační křivky..... | 39 |
| 4.9 | Statistické zhodnocení..... | 44 |

| | | |
|----|-------------------------|----|
| 5. | Výsledky..... | 46 |
| 6. | Diskuze..... | 63 |
| 7. | Závěr..... | 67 |
| 8. | Použitá literatura..... | 68 |

1. Úvod

Rostliny jsou pro život na Zemi natolik významné, že si jejich základní důležitost jen málokdy uvědomujeme. Jejich existenci, úlohu i působení přijímáme obvykle tak samozřejmě, jako samu existenci života na Zemi i existenci svou vlastní. Dotýkají se našeho každodenního života, počínaje ranní mátou v zubní pastě a konče večer bavlněným prostěradlem. (1,2)

Snaha obracet se při léčení různých neduhů o pomoc k rostlinám je instinktem starým jak lidstvo samo. S vývojem člověka se vyvíjel i názor na to, co pomáhá život udržovat a které faktory jej mohou zkracovat. Většina léčiv byla vybrána na základě dlouhodobých pozorování a zkušeností. Tyto poznatky jsou využívány od léčitelů domorodých kmenů, přes tradiční čínskou medicínu nebo ajurvědu až k modernímu lékařství dneška. (2)

Rostliny jsou zdrojem celé řady terapeuticky významných látek, např. alkaloidů, glykosidů, tríslovin, saponinů atd. Tyto látky označované jako vedlejší, sekundární, jsou vysoce specializované a rostlinami vytvářené ze základních látek řadou složitých pochodů, tzv. sekundární látkové výměny. V rostlině se nacházejí zpravidla v malém množství a bývají charakteristické pro určité čeledě či dokonce pro jednotlivé druhy rostlin. (3)

Rostliny musíme stále ještě považovat za dosud málo prozkoumanou zásobárnu terapeuticky významných látek. K jejich průzkumu slouží metody kultivace rostlinných tkání a buněk. Rychlý rozvoj technik explantátových kultur dosáhl takové úrovně, že je možno seriózně hodnotit jejich biologické aplikace pro výrobu farmaceuticky důležitých rostlinných produktů. Řada rostlinných látek je pro člověka nenahraditelná jako farmaka a požadavky na tato látky rychle stoupají.

Rostlinné explantáty mají mnohé přednosti jako:

- a) možnost vést proces produkce užitečných látek za řízených podmínek, bez závislosti na ročním období, na klimatických podmínkách a půdních poměrech.
- b) výsledné produkty jsou po kvalitativní stránce homogenní, prosté kontaminujících zárodků, hmyzu a chemikálií používaných k ochraně kultur
- c) získávání produktů, které jsou obsaženy v nesnadno pěstovaných kulturách

d) získávání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátových rostlinných buněk (z explantátových kultur byly izolovány látky, které nebyly zjištěny v mateřských rostlinách, z nichž byly kultury odvozeny).

Nevýhodou explantátových rostlinných kultur, mimo poměrně dlouhé doby kultivace, jsou ekonomické důvody. Výtěžnost produktů sekundárního metabolismu je v rostlinných explantátech v mnoha případech nižší než v mateřských rostlinách.

Hlavním úkolem je nalezení takových způsobů kultivace, které by urychlily růst a množení buněk a které by zároveň zvýšily produkci sekundárních metabolitů. Jednou z možností zvýšení produkce sekundárních metabolitů je i využití elicitovaných kultur a účinků ultrafialového záření. (4)

Seznam zkratk

| | |
|-------|--|
| 2,4 D | kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová |
| BIOA | biochanin A |
| DAD | diode array detection (detekce diodového pole) |
| DAID | daidzein |

| | |
|----------------|---|
| FORM | formononetin |
| G ₁ | tkáňová kultura odvozená z klíčící rostliny <i>Genista tinctoria</i> v 15.-31. pasáži |
| G ₂ | nově odvozená tkáňová kultura z klíčící rostliny <i>Genista tinctoria</i> v 3.-15. pasáži |
| GEN | genistenin |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| MeOH | methanol |
| MS médium | živné médium podle Murashigeho a Skooga |
| SH médium | živné médium podle Schenk a Hildebrandta |
| UV | detekce absorpcí v ultrafialové oblasti spektra |

2. Cíl práce

Cílem práce bylo seznámení se s metodikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále také sledování vlivu UV záření, jakožto abiotického elicitoru, na produkci metabolitů kalusové kultury *Genista tinctoria in vitro*.

3. Teoretická část

3.1 Rostlinné explantáty

Jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů.

Vegetativní množení rostlin v explantátových kulturách je možné díky totipotenci rostlinné buňky, což znamená, že i diferencované rostlinné buňky obsahují veškerý genetický materiál potřebný pro regeneraci celé rostliny. (4)

3.1.1 Rozdělení kultur rostlinných explantátů

Podle morfologické a anatomické charakteristiky lze kultury rostlinných explantátů členit do 5 kategorií:

1. kultury orgánové – orgánové systémy, orgány nebo jejich části kultivované *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a téměř zachovává jejich stavbu a funkci
2. kultury tkáňové (resp. pletivové) – mnohobuněčné komplexy pletiva do určitého stupně soudržné a morfologicky dezorganizované, které jsou pomnožené na polotuhých nebo pevných nosičích nasycených živnou půdou, výjimečně v tekutém médiu
3. kultury suspenzní – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendované v tekuté živné půdě, promíchané a provzdušňované
4. kultury buněčné – volné jednotlivé buňky nebo jejich nejbližší potomstvo pomnožované v tekuté či polotekuté půdě nebo na nosiči nasyceném půdou
5. kultury protoplastů – buňky jsou zbaveny buněčných stěn, buněčný obsah je obalen pružnou elastickou plasmolemou (5)

3.1.2 Faktory ovlivňující růst tkáňových kultur a produkci sekundárních metabolitů

Složení živného média

Složení živného média ovlivňuje růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin. Živné médium je tvořeno:

- makroelementy (směs anorganických makroprvků: dusík, síra, fosfor, hořčík, vápník, chlór a draslík, jejichž zastoupení v médiu je větší než 30 mg/l)
- mikroelementy (směs anorganických mikroprvků: železo, bór, mangan, jód, molybden, a také měď a zinek)
- zdroji organického uhlíku jako základními stavebními jednotkami pro nově vznikající tkáň (sacharosa)
- vitamíny (vitamíny skupiny B, vitamín C) a bios faktory (myo-inositol, biotin)
- nedefinovanými směsmi přírodních látek (hydrolyzát kaseinu)
- a v případě pevné živné půdy i agarem (5)

Růstové regulátory

Růstové regulátory koordinují metabolismus a regulují růstové a vývojové procesy rostlin. Mezi přirozené růstové regulátory patří rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou, která může být jak stimulační, tak inhibiční.

Látky působící pozitivně na růst:

- auxiny (např. auxin, kyselina naftyloctová)
- gibereliny (např. kyselina giberelová)
- cytokininy (např. kinetin)
- brassiny (např. brassinolid)

Nejlépe známými růstovými regulátory jsou auxiny. Ve své práci jsem jako růstový regulátor použila kyselinu 2,4-dichlorfenoxycetovou, která spolu s např. kyselinou naftyloctovou a indolylmáselem patří mezi syntetické auxiny. Syntetické látky nejsou enzymově rozkládány a nacházejí cílenější použití v produkci a ochraně rostlin.

Látky působící negativně na růst:

- přirozené: kyselina abscisová (všeobecně rozšířená u krytosemenných rostlin)

ethylen (přirodní zrání plodů)

- syntetické: kumariny
fenolické kyseliny
herbicide
ethrel (kys. 2-chlorethanfosfonová)
morfaktiny (deriváty kys. fluorenkarboxylové)
anticytokininy
arzenitan olovnatý (36)

Fyzikální podmínky kultivace

Mezi fyzikální podmínky, které optimalizují růst tkáňových kultur, patří:

- teplota (má vliv na růst a organogenezi, teplota kultivace byla v úzkém rozmezí kolem 25°C)
- světlo (ovlivňuje intenzitu biosyntézy sekundárních metabolitů a diferenciaci orgánů)
- pH půdy (optimální hodnota závisí na typu půdy, ale nejvhodnější je slabě kyselé pH) (5)

Sterilita

Sterilita je jedna ze základních podmínek úspěšné kultivace. Kultury je nutné chránit před mikroorganismy ve všech stupních kultivace.

K zachování sterility se sterilizuje rostlinný materiál, živná média, nástroje a pomůcky využívané při kultivaci. Veškeré manipulace s tkáňovou kulturou se provádí za aseptických podmínek. (35)

3.2 Elicitované kultury

Rostliny jsou téměř nevyčerpatelné zdroje chemických látek. Produkují různé sekundární metabolity, které jsou potřebné k jejich interakcím s okolním prostředím. Široké pole vnějších stimulů (atak patogenů, hmyz, býložravci, mechanické poranění) spouští změny, které vedou ke kaskádě obranných mechanismů, včetně indukce biosyntézy sekundárních metabolitů jako

jsou fytoalexiny, hypersenzitivních reakcí a strukturálních obranných bariér jako jsou depozita ligninu ve stěnách buněk. (6,8)

Fytoalexiny jsou antimikrobiální sekundární metabolity. Reprezentují velmi ekonomický způsob jak působit proti napadení, protože uhlík a zdroje energie nutné pro syntézu fytoalexinů jsou rostlinou poskytovány pouze napadeným buňkám a pouze v počátečním období útoku. Výskyt fenalenonových chromoforů ve fytoalexinech rostlin, které nejsou původně fototoxické, napovídá, že tyto rostliny odpovídají na napadení patogeny pomocí biosyntézy fotosenzitizérů singletového kyslíku, které jsou schopné využít k obraně sluneční energii. (7)

Obranná odpověď a sekundární metabolismus rostlin jsou spolu úzce propojeny. Studie hromadění fytoalexinů indukovaného pomocí *Phytophthora megasperma* v sojových bobech ukazují, že malé molekuly (mikrobiální oligosacharidy) pocházející z patogenu spouští stejné reakce jako sám „útočník“. Tyto signály vyvolávající odpověď v podobě hromadění sekundárních metabolitů se nazývají elicitory. (8)

3.2.1 Klasifikace elicitorů

Elicitory jsou klasifikovány na základě jejich původu a molekulové struktury. Každý typ elicitoru, vzhledem k jeho charakteristikám, je schopen indukovat specifické odpovědi na základě interakce elicitor – rostlina. Rozlišujeme elicitory biotické a abiotické.

Biotické elicitory jsou odvozené z patogenů nebo z rostliny samotné (někdy se nazývají endogenní elicitory). Mohou mít definované složení (pokud je jejich molekulární struktura známá, např. chitosan, alginát, pektin, chinin) nebo jsou tvořeny komplexem složek (pokud jsou složeny z několika různých skupin molekul, u nichž je nemožné určit chemickou identitu, např. spory hub, kvasničný extrakt).

Abiotické elicitory se dělí na fyzikální (např. teplo, osmotické jevy, ultrafialové záření) a chemické (např. soli těžkých kovů). „Dostávají“ rostlinu do stresu, který spouští další reakce.(8)

3.2.2 Faktory ovlivňující elicitaci

Efektivita elicitace jako prostředku ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů závisí na komplexu vzájemných interakcí mezi elicitorem a rostlinnou buňkou.

a) specifita elicitoru

Stejný elicitor může stimulovat sekundární metabolismus v různých buněčných kulturách a na druhé straně, jedna rostlinná kultura může reagovat na různé elicitory produkcí stejných látek, protože jsou pro danou rostlinu specifické. Na příklad vlášení durmanu *Brugmansia candida* po elicitaci biotickými a abiotickými elicitory sice produkovalo hyoscyamin a skopolamin, ale v různé míře a s různou kinetikou indukce.

b) koncentrace elicitoru a délka elicitace

Pro maximální produkci metabolitů potřebují různé rostliny různou koncentraci stejného elicitoru. Například u *Rubia akane Nakai* je produkce antrachinonů maximální při koncentraci elicitoru chitosanu 20 mg/l, ale kultura máty peprné dosahuje maximálních hodnot produkce mentolu u koncentrace chitosanu 200 mg/l.

c) růstové stádium, složení živného média a světlo

Tyto faktory jsou velmi významné. Poznatky pro vytvoření optimálních podmínek elicitace jsou získávány empiricky. (8)

3.3 Ultrafialové záření

Světlo patří mezi nejvýznamnější podněty prostředí, které regulují vývoj rostliny. V závislosti na kvalitě světla, rostliny posuzují kvalitu, směr a periodicitu dopadajícího světla a využívají získané informace k optimalizaci růstu a vývoje vzhledem k převažujícím podmínkám prostředí. Rostliny využívají prostřednictvím fotosyntézy světelnou energii ve formě slunečního záření. Součástí slunečního záření je i ultrafialové záření a rostliny jsou tudíž vystaveny jeho účinkům. (9)

UV záření je elektromagnetické záření. Dělí se z několika hledisek. Z hlediska biologických účinků se dělí na 3 typy:

- UV –A
- UV - B
- UV- C

UV - A má vlnovou délku od 315 do 400 nm. Považuje se za méně škodlivé; nebylo prokázáno, že je pro živé organizmy zhoubné. Asi 99 % UV záření, které dopadne na zemský povrch je ze spektrální oblasti UV - A.

UV – B má vlnovou délku v rozsahu od 280 do 315 nm. Je z převážné většiny absorbováno ozónem ve stratosféře, resp. ozónové vrstvě. Z typického slunečního záření 350 - 900 W/m², které dopadá na nejvyšší vrstvy atmosféry neproniká prakticky žádné UV záření s vlnovou délkou pod cca 295 nm. Jinými slovy lze říci, že ozón a kyslík propustí na povrch Země zhruba třetinu UV záření. Záření UV - B je zhoubné pro živé organizmy. Jeho energie je schopná rozkládat nebo narušovat bílkoviny nebo jiné životně důležité organické sloučeniny s vážnými následky pro metabolismus postihnutého jedince. Dlouhodobé působení zvýšeného působení UV - B záření by vyústilo v nepředvídatelné změny v morfologii biosféry (každý živočišný či rostlinný druh je na UV záření různě citlivý; a trend směřující k dominanci odolnějších druhů nad méně odolnějšími by odstartoval nesmírně složitou síť kauzálních mezidruhových vztahů, jejichž důsledky není možné odhadnout).

UV – C je nejtvrďší UV záření, jeho vlnová délka je nižší než 280 nm. Toto záření je jedním ze dvou způsobů vzniku ozónu- při dopadu na dvouatomární molekulu kyslíku, jí toto záření dodá energii pro vznik ozónu, který je touto reakcí absorbován. Jinými slovy, plynný kyslík je významný inhibitor dopadu UV - C záření na zemský povrch. (10)

Všechny typy radiace poškozují různé rostlinné procesy. Taková poškození mohou být klasifikována do dvou kategorií:

- poškození DNA
- poškození fyziologických funkcí. (3)

3.3.1 Poškození DNA UV radiací

Záření UV - C je prokazatelně zhoubné (karcinogenní) pro živé organizmy. Na rozdíl od UV - B, které dokáže proniknout jen několika vrstvami buněk, je penetrace UV - C pletivy a tkáněmi živých organismů poměrně větší. (10)

Elicitace rostliny UV – B zářením vede ke změně ve velkém množství genů. Předtím než UV – B radiace vyvolá buněčnou odpověď, je záření zachyceno fotoreceptorem a informace o něm je přenesena pomocí druhých posílů a jiných signálních molekul k cílovým strukturám, proteinům v cytoplasmě nebo genetickému materiálu v jádře. Nízké hladiny UV – B záření do svých signálních drah začleňují jako druhé posly vápenaté ionty, kinázy a ROS (reactive oxygen species). Vysoké hladiny UV – B radiace způsobují buněčné poškození a oxidativní stres pomocí aktivace generální stresové signální transdukční dráhy. (11)

Nejfrekventovanějším poškozením DNA jsou cyklobutylpirimidin dimer (CPD) a pyrimidin (6-4) pirimidon dimer (6-4PP). Nejjednodušší a zároveň nejspecializovanější z opravných procesů je fotoreaktivace uskutečněná fotoenzymatickou reparací. CPD jsou opravovány CPD fotolyázou prostřednictvím UV – A dependentních mechanismů. Což bylo prokázáno například u studie fotolyázy deficitní *Escherichie coli*, do které byl vpraven gen CPD lyázy ze *Spinacia oleracea* (cDNA). Po transformaci s cDNA byly fotoreaktivací aktivity částečně obnoveny. Po osvětlení fotoreaktivacím světlem poklesl obsah CPD v genomu *E. coli*.(3, 12)

Tvorba CPD a 6-4PP je závislá na teplotě stejně tak jako fotoreaktivací procesy. Tvorba CPD a 6-4PP indukovaných UV – B zářením byla u *Arabidopsis thaliana* pomalejší za nižší než za vyšší teploty. Fotooprava CPD a 6-4PP byla sledována za teploty 0°C, 12°C a 24°C. U CPD i 6-4PP byla oprava výrazně rychlejší u teploty 24°C. U lišejníku *Cladonia arbuscula* ssp. *mita* byla též prokázána závislost na příjmu vody. Pokud byl tento lišejník vysušen, nebyl schopen opravit poškození vyvolané UV – B kompletně. (13, 14)

K dalším opravným mechanismům DNA rostlin patří více obecné způsoby jako vyříznutí nukleotidů (NER, nucleotide excision repair), vyříznutí bazí (base excision repair) a také bypassové polymerázy, které umožňují rostlině replikovat DNA v nepřítomnosti DNA oprav. Fotoreaktivace pomocí CPD lyázy je hlavním opravným mechanismem DNA v neproliferativních buňkách, zatímco v proliferativních buňkách je aktivní fotoreaktivace i opravy pomocí vyříznutí nukleotidů a bazí. (15, 16)

3.3.2 Fyziologické reakce rostlin na UV záření

Škodlivé účinky UV – B radiace, jako poškození DNA, proteinů, membrán a další účinky vedoucí ke změnám v metabolismu, jsou často důsledkem působení reaktivního kyslíku (ROS). Hlavním zdrojem ROS je fotosyntetický elektronový transportní systém. Dokonce i při nezměněném metabolismu jsou rostlinné buňky náchylné k tvorbě H_2O_2 a $1O_2$, jejichž tvorba může být indukována vlivem stresových podmínek.

Nepostradatelnou funkci v ochraně fotosyntetického systému před fotooxidativním poškozením mají karotenoidy xantofylového cyklu, které rozptylují nadbytek excitační energie. K tomu, aby rostliny zvládly ROS toxicitu, disponují rostlinné buňky početným, vysoce efektivním obranným systémem zahrnujícím jak enzymatické, tak neenzymatické složky.

Neenzymatické antioxidanty jsou celkově tvořeny malými molekulami, jako askorbát a glutathion, činnými ve vodné fázi, zatímco lipofilní antioxidanty (tokoferoly a karotenoidy) jsou aktivní v prostředí membrány.

Rostliny jsou schopné se preventivně chránit před působením UV – B záření syntézou flavonoidů. Jedná se o skupinu složek absorbujících ultrafialové záření, která je lokalizovaná hlavně v epidermis a která slouží jako vnitřní filtr. Indukce jejich metabolické dráhy je jedna z nejcharakterističtějších a nejrozšířenějších rostlinných odpovědí na ozáření UV zářením.

Současné poznatky svědčí o vzniku řetězce událostí, který se spustí po expozici UV – B zářením. Zatímco v epidermis probíhá syntéza screeningových pigmentů, prodělávají thylakoidní membrány poměrně velký oxidační stres, který vede k degradaci zásob α – tokoferolu a karotenoidů, které slouží jako „vychytávači“ ROS. Fotooxidativní stres vyvolaný nadbytkem energie absorbované chlorofyly a další redukce elektronového transportního systému vedou k odpovědi v EPS xantofylového cyklu. Oxidativní stres v thylakoidech je pravděpodobně způsobený přímou interakcí mezi UV radiací a membránovým systémem.

(17)

Efekt slunečního záření na syntézu flavonoidů byl studován na vrchních listech borůvky (*Vaccinium myrtillus L.*), které jsou vystavené přímému slunečnímu světlu, a zastíněných spodních listech, které rostly na téže rostlině. Po ozáření byl pozorován vzrůst exprese genů flavonoidních drah v listech rostoucích na přímém slunci a také se zvýšily koncentrace

antokyaninů, katechinů, flavonolů a hydroxyskořicových kyselin. Tyto výsledky svědčí o protektivní roli flavonoidů. (18)

Po expozici kukuřičných semen UV – B zářením došlo ke zvýšení koncentrací antioxidantů a ochranných pigmentů v takové míře, která dokazuje, že je kukuřice schopná odolávat oxidativnímu stresu indukovanému UV – B radiací po delší časové období.(17)

3.4 Genista tinctoria

3.4.1 Charakteristika rostliny

Genista tinctoria – kručinka barvířská, čeleď Fabaceae (bobovité) je rozšířená téměř po celé Evropě a nepatrně zasahuje i do Asie. Roste na světlých a teplých místech, na stráních, ve světlých lesích a křovinách, na okrajích lesů, na pastvinách, u cest a na mezích. V ČR se vyskytuje na celém území roztroušeně až hojně od nížin po nižší polohy hor. Preferuje mírně vlhké, hluboké a na dusík chudé půdy.

Je to polokeř o výšce 20 – 100 cm. Větve jsou krátké, hustě větvené, vystoupavé. Mají zelenou barvu, jsou lysé nebo jen nahoře přitiskle chlupaté, rýhované a beztrnné. Listy jsou přisedlé, malé a mají eliptický až kopinatý tvar. Jsou špičaté, vyrůstají střídavě. Na rubu jsou brvitě, světlejší, s výraznými postranními žilkami. Lícni strana je lysá a má tmavší barvu. Palisty jsou zakrnělé. Květy se skládají v mnohokvěté koncové hrozny, které jsou dlouhé až 6 cm. Květní stopky nesou dva kopinaté listence. Lysý pěticípý kalich je opadavý, nevýrazně dvoupyský. Zlatožlutá koruna je lysá, s pavézou vejčitého tvaru. Člunek je stejně dlouhý jako pavéza. Plodem je malý (15-20), lysý, čárkovitý lusk s 5 – 10 semeny. Kvete od května do června. Celá rostlina je jedovatá. (19, 20, 21)

Je to jeden z nejpobulárnějších druhů, ze kterých se získává barvivo pro barvení vlny a látek. Barviva se získávají ze žlutých květů nebo vrcholků větviček s poupaty. Jako druh není ohrožena, avšak její poddruh, kručinka barvířská vyšší, je na našem území zařazen do kategorie ohrožení A3, tedy mezi nejasné případy vyhynulých a nezvěstných druhů. Květy a mladé větvičky kručinky se po zavaření s kamencem žlutě zbarvují. Užívají se k falšování *Verbasci flos*. (19, 22)

Do rodu *Genista* patří i další druhy, např. *Genista saharae* vyskytující se v pouštních oblastech Tuniska, *Genista tenera* endemicky rostoucí na ostrově Madeira a *Genista umbellata*, která spolu s druhy *Genista pulchella*, *Genista parnassica* (oblast Řecka) a *Genista desoleana* (okolí pobřeží Tyrhénského moře) pochází se ve Středomoří. (40, 41, 42, 44) Jen v Turecku roste 13 druhů rodu *Genista*. (48)

3.4.2 Droga

Kvetoucí nať se sbírá od května do srpna. Suší se ve stínu. Umělá teplota při sušení nesmí být vyšší než 35 °C. Droga je bez pachu a chutná nahořkle svíravě.

Použití

V lidovém léčitelství se používá při chorobách ledvin a močových cest, jako diuretikum. Podává při nedostatečné srdeční činnosti a při otocích. Aplikuje se formou nálevu. (22)

3.4.3 Obsahové látky

Rostlina obsahuje chinolizidinové alkaloidy, flavonové glykosidy, isoflavonoidy, silice, hořčiny, třísloviny a jiné látky. (22, 23)

Chinolizidinové alkaloidy

Chinolizidinové alkaloidy jsou obsahové látky typické pro čeleď Fabaceae. Jsou odvozené od lysinu. Jedná se o poměrně rozsáhlou skupinu látek.

V rodu *Genista* a v tkáňové kultuře *Genista tinctoria* prokázal Łuczkiwicz pomocí tenkovrstvé chromatografie tyto látky: retamin, cytisin, spartein, L-a-isosparteín, lupanin a methylcytisin. V dalších zdrojích se také zmiňuje obsah anagyrinu. (22, 24)

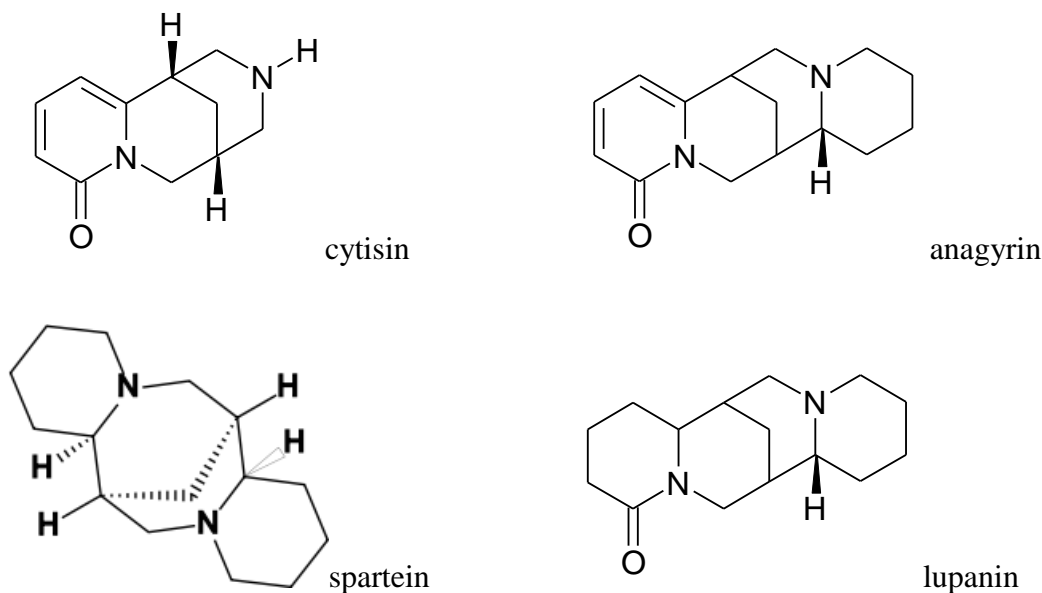
Účinky těchto látek na lidský organismus nejsou ve všech případech popsány, proto se zaměřím na nejvýznamnější představitele.

Cytisin je agonista neuronálních nikotinových acetylcholinových receptorech. Jeho N-substituenti vykazují analgetické, antihypertenzní a ionotropní účinky.

Sparteín působí jako profylaktikum předsíňových arytmií a sinusové tachykardie.

Lupanin má baktericidní účinky na *Pseudomonas synergae* P. U. „phaseolica“, *Pseudomonas synergae* P. V. tomato, *Pseudomonas putida*, *Erwinia carotvora*. Vyznačuje se také herbicidním působením.

U anagyrynu se zkoumá jeho působení na syncytiálně respirační virus (RSV). (22)



Obr. 1: Chinolizidinové alkaloidy (10, 22)

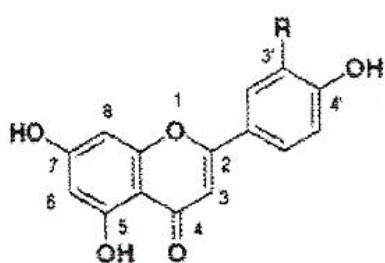
Flavonoidy

Flavonoidy jsou v rostlinné říši velmi rozšířeny. Jedná se o ve vodě rozpustná barviva, která jsou zodpovědná za barvu květů, plodů a někdy i listů. Uložení flavonoidů v rostlinném organismu je podmíněné druhem rostliny. Všeobecně však platí, že ve vodě rozpustné glykosidy jsou nejčastěji uloženy ve vakuolách. Methoxylované deriváty jsou lipofilní a vyskytují se v silicích. (22)

Termín flavonoidy zahrňuje několik typů biogeneticky blízce příbuzných látek, jejichž společným základem v chemické struktuře je fenylchroman – flavony, flavanoly, flavanony, dihydroflavanoly, biflavonoidy, chalkony, aurony, katechiny, isoflavonoidy a homoisoflavonoidy. Poslední dvě skupiny jsou některými autory považovány za samostatné. (25)

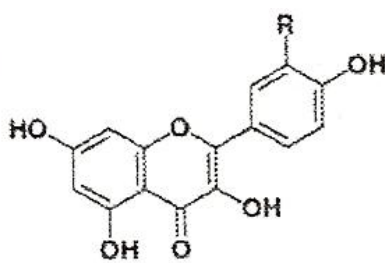
Łuczkiwicz prokázal kvantitativní analýzou v intaktní rostlině a kalusu několika zástupců rodu *Genista* tyto flavonoidy: genistein-7-O-glykosid, purearin, 2'-hydroxygenistein-7-O-glykosid, daidzin, apigenin-7-O-glykosid, luteolin-7-O-glykosid,

genistin, genistin malonát, 3', 4', 7'-trihydroxyisoflavon, genistin acetát, ononin, equol, daidzein, liquiritigenin, sissotrin, genistein, luteolin, coumestrol, isoliquiritigenin. (26)



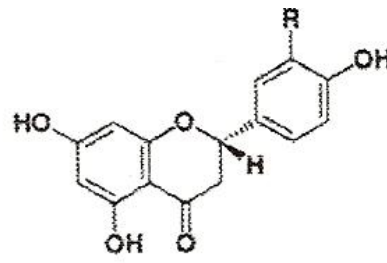
FLAVONES

R = H: *Apigenin*
R = OH: *Luteolin*



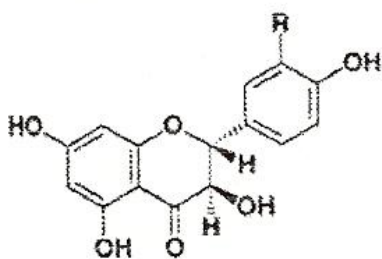
FLAVONOLS

R = H: *Kaempferol*
R = OH: *Quercetin*



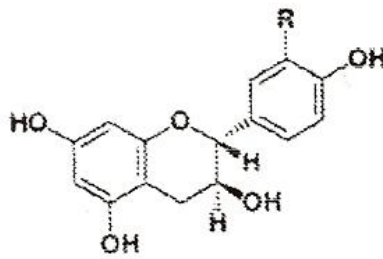
FLAVANONES

R = H: *Naringenin*
R = OH: *Eriodictyol*



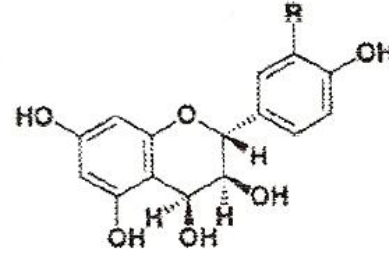
DIHYDROFLAVONOLS

R = H: *Dihydrokaempferol*
R = OH: *Dihydroquercetin*
(= *taxifolin*)



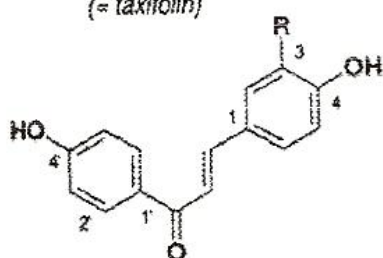
FLAVAN-3-OLS

R = H: *Afzelechin*
R = OH: *Catechin*



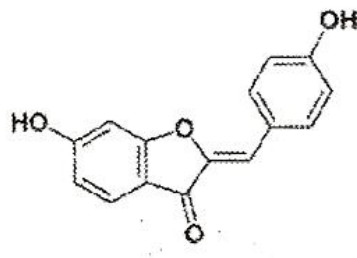
FLAVAN-3,4-DIOLS

R = H: *Leucopelargonidin*
R = OH: *Leucocyanidin*



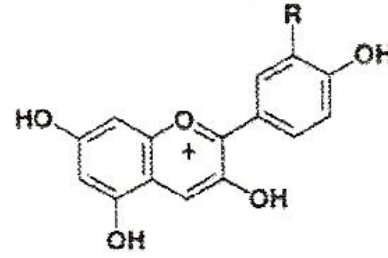
CHALCONES

R = H: *Isoliquiritigenin*
R = OH: *Butein*



AURONES

Hispidol



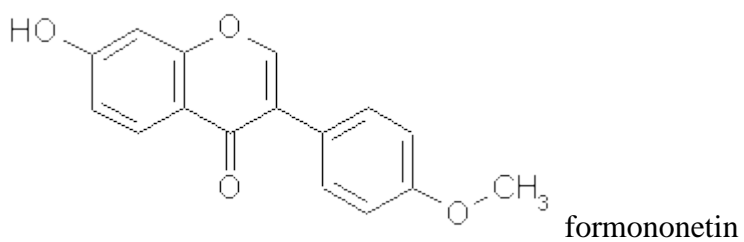
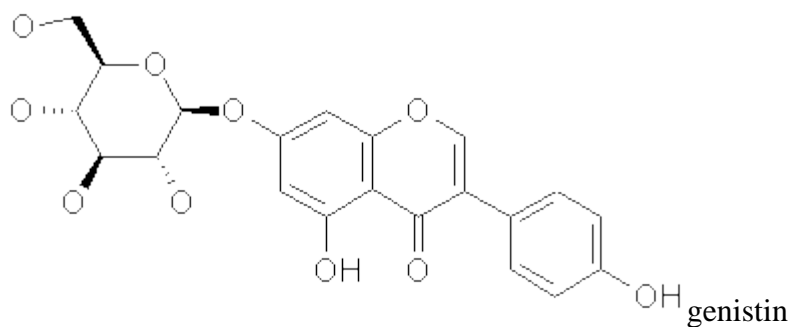
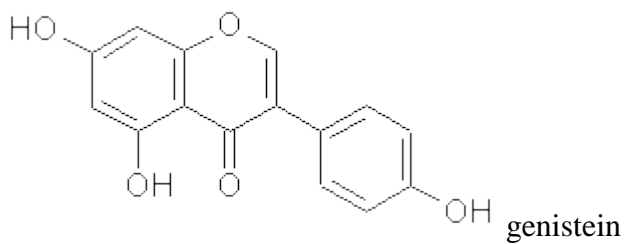
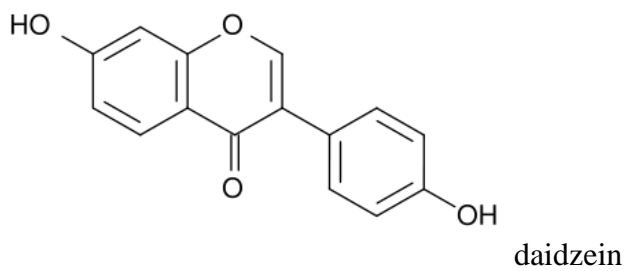
ANTHOCYANIDINS

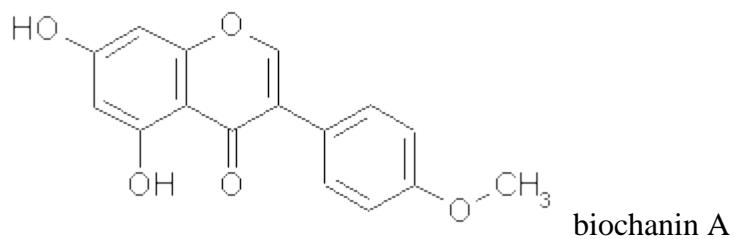
R = H: *Pelargonidin*
R = OH: *Cyanidin*

Obr. 2: Obecné vzorce flavonoidů (37)

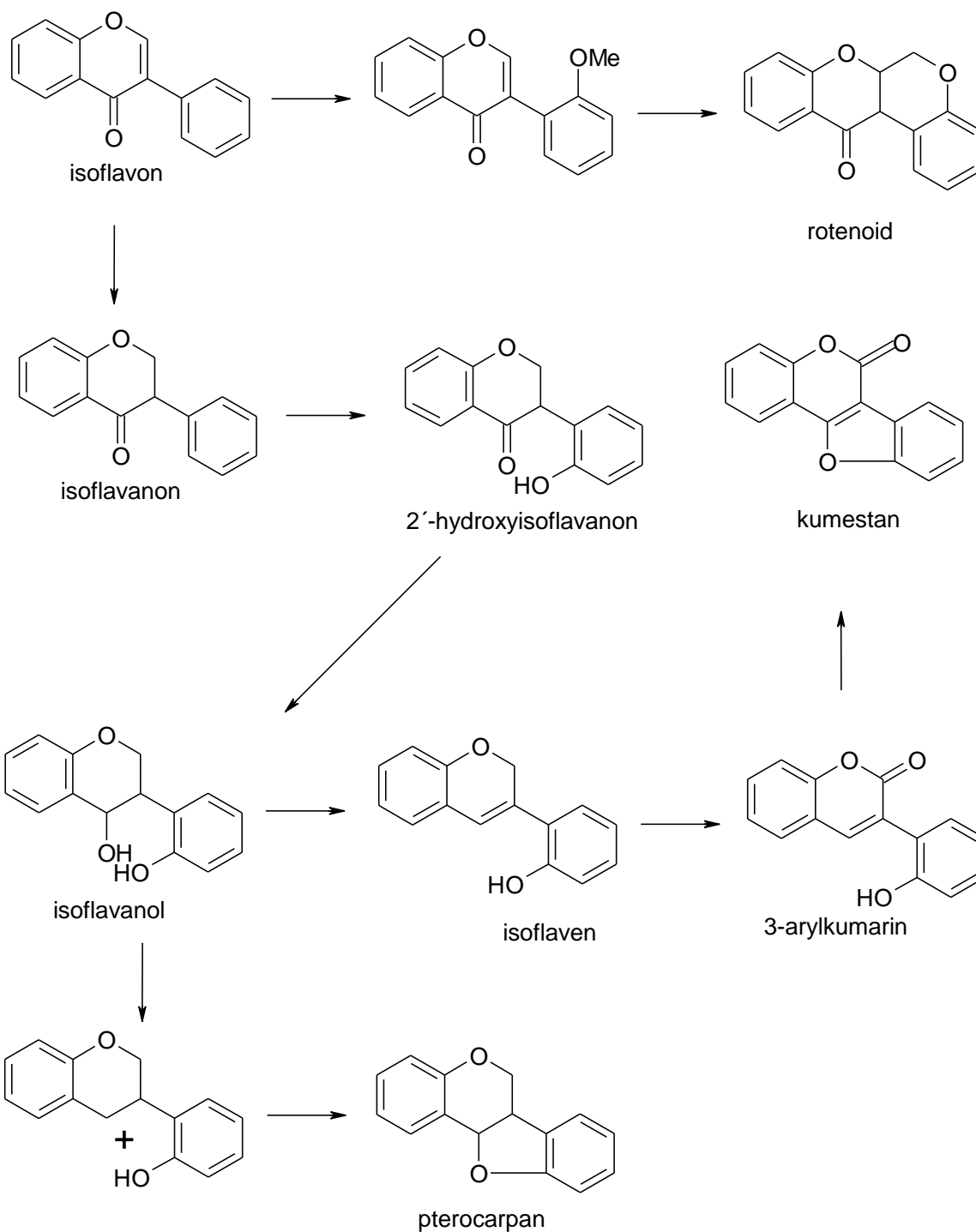
Łuczkiwicz ve své práci věnované isoflavonoidům tkáňových kultur rodu *Genista* zjistil, že tkáňové kultury všech druhů produkovaly více isoflavonoidů než mateřská rostlina. Skupina isoflavonoidů obsahovala 14 sloučenin se zřetelnou dominancí genistinu. (26)

Kvantitativní analýzou kalusu *Genista tinctoria* Łuczkiwicz prokázal přítomnost těchto flavonoidů: genistein-7-O-glykosid, purearin, 2'-hydroxygenistein-7-O-glykosid, daidzin, genistin, genistin malonát, 3', 4', 7'-trihydroxyisoflavon, genistin acetát, ononin, equol, daidzein, liquiritigenin, sissotrin, genistein. (26)





Obr. 4: Isoflavoniody (10, 22)



Obr. 5: Vzájemná konverze jednotlivých typů isoflavonoidů. (38)

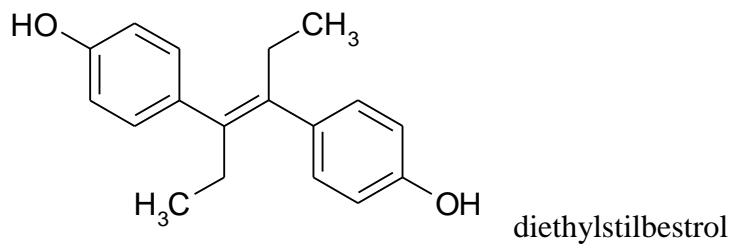
Boumaza a kolektiv ve své studii poprvé zkoumali intaktní rostlinu *Genista tricuspidata* vyskytující se endemiticky v Alžírsku. Spektrální analýzou bylo detekováno 6 isoflavonoidů, z nichž soforicosid, isoprunitin, 4',5,7-trihydroxy-3',8-dimethoxy-3-O-glucosylflavon, isorhamnetin 3-glukosid a quercetin 3-glukosid byly u rodu *Genista* identifikovány poprvé. (47)

Biologické účinky isoflavonoidů

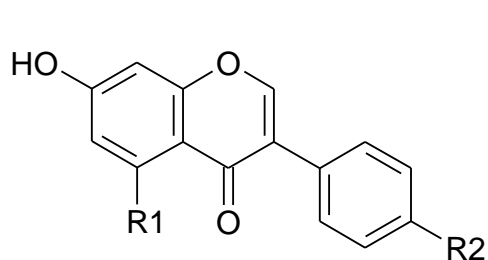
Biologické účinky těchto látek jsou podmíněny vazbou fenylového kruhu na třetí uhlík benzo- γ -pyronu a ne na druhý uhlík jak je tomu většiny flavonoidů. Mají protizánětlivé, antimykotické, antibakteriální, hypoglykemické, antivirotické, „anti-aging účinky“, efekt na cévní systém (genistein, a v menší míře i daidzein, má silné vasorelaxační účinky), také mají schopnost „vychytávat“ volné radikály a působit jak estrogeně, tak i antiestrogeně. (22, 26, 27, 31)

Isoflavonoidy většinou vykazují fytoestrogenní účinky. Fytoestrogeny jsou sloučeniny získané z rostlin, které strukturně nebo funkčně napodobují savčí estrogény. Hrají důležitou roli v prevenci menopauzálních symptomů, osteoporózy, srdečních chorob a vzniku rakoviny. Zabraňují formování a růstu nádorových buněk u rakoviny prsu, vaječníků, prostaty a kůže. Mají též vliv na kognitivní schopnosti. (26,28)

Zájem o genistein v posledních letech stoupá díky jeho účinkům a množstvem jeho využití. V současné době se ale objevují zprávy o jeho škodlivých účincích, které jsou závislé na načasování expozice a dávce. Studie provedené v letech 1998 a 1999 popisují preventivní působení genisteinu na rakovinu prsní žlázy, pokud došlo k expozici v prepubertálním období. Zatímco jiná studie ukazuje nárůst incidence rakoviny prsní žlázy, pokud se expozice posune do období prenatalního vývoje a studie Wendy N. Jefferson také popisují výskyt adenokarcinomu dělohy v pozdějším životě myši v případě neonatální expozice. Tyto škodlivé účinky genisteinu mohou souviset s jeho podobností se diethylstilbestrolem, který se používal v gynekologii (substituční léčba nedostatku estrogenu) od roku 1941. V roce 1971 bylo objeveno jeho teratogenní působení při podávání těhotným ženám. U matek došlo ke vzrůstu incidence rakoviny prsu a u dcer byla popsána vyšší náchylnost k adenokarcinomu vaginy a děložního krčku, neplodnost a autoimunitní onemocnění. (32)



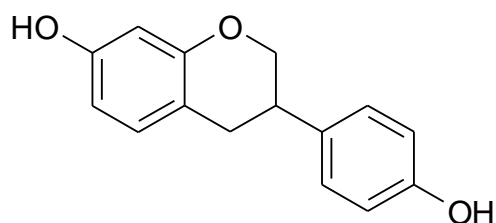
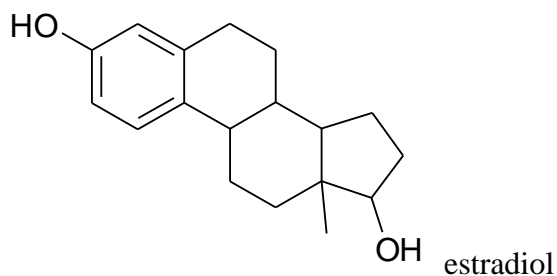
Obr. 6: Diethylstilbestrol (10)



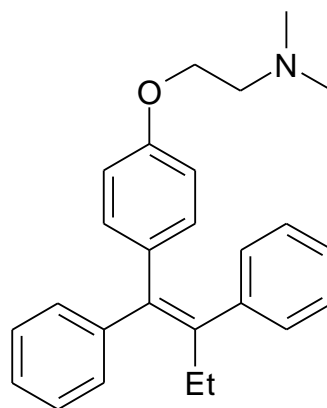
genistein R1: OH, R2: OH

daidzein R1: H, R2: OH

biochanin A R1: OH, R2: OMe



equol



tamoxifen

Obr. 7: Struktura isoflavonoidních fytoestrogenů ve vztahu k podobnosti s estradiolem a tamoxifenem (33)

Vyšší dávky genisteinu působí cytotoxicky. Choi zkoumal působení genistinu a genisteinu na proliferaci a apoptózu lidských ovariálních buněk. Zjistil, že cytotoxicita indukovaná genisteinem a genistinem byla ovlivněná uvolněním LDH (laktát dehydrogenázy). Genistein způsoboval apoptózu a také výrazně zvyšoval uvolňování LDH, zatímco genistin uvolnění LDH neovlivnil. Při kombinaci obou isoflavonoidů došlo

k vyvolání apopózy bez vzrůstu uvolnění LDH. Kombinace těchto látek by mohla být v léčbě rakoviny užitečná. (34)

4. Experimentální část

4.1 Rostlinný materiál

Byla použita kalusová kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Genista tinctoria* v 15. – 31. pasáži (G₁) a nově odvozená kalusová kultura z kořenové části klíčící rostliny *Genista tinctoria* v 3.- 15. pasáži (G₂).

4.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy A 200S, Sartorius, Německo

Autokláv PS 20 A, Chirana, ČR

Autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko

Box s laminárním prouděním Fartan LF, Výhodné družstvo Pokrok, Slovensko

Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko

Fluorescenční detektor Jasco MD-2020, Japonsko

Horkovzdušný sterilizátor Chirana SVS/1, ČR

Kolona Li ChroCART 250-4, sorbent Li Chrospher 5 μ m

Mikrofiltry (0,45 μ m), Tessek, ČR

Pipetovací balónek, Filip, Německo

Předkolona Li ChroCART 4-4, sorbent Li Chrospher 5 μ m

Pumpa Jasco PU-2089 Plus, Japonsko

Sušárna HS 61A Chirana, ČR

Termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko

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

UV lampa, CAMAG, Švýcarsko

Vialky, LABICOM s. r. o. Olomouc, ČR

Vodní lázeň, typ 1042, GFL, Německo

4.3 Chemikálie a pomocné látky

Ajatin, Profarma-Produkt, ČR

Biochanin A p.a., Sigma, USA
Daidzein p. a., Fluka, Švýcarsko
Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK HK, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný p. a., Lachema, ČR
Dihydrogenfosforečnan amonný, Lachema, ČR
Dusičnan amonný p. a., Penta, ČR
Dusičnan draselný p. a., Lach-Ner, ČR
Ethanol 96%, Lachema, ČR
Formononetin p. a., Fluka, Švýcarsko
Genistein p. a., Sigma, USA
Genistin p. a., Fluka, Švýcarsko
Glycin, Aldrich, USA
Hydrolyzát kaseinu, Imuna, Slovensko
Chlorid kobaltnatý p. a., ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), Lachema, ČR
Chlorid vápenatý p. a., Penta, ČR
Jodid draselný p. a., Lachema, ČR
Kinetin, Serva, Německo
Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová, Aldrich, USA
Kyselina boritá p. a., Lachema, ČR
Kyselina nikotinová, Lachema, ČR
Methanol HPLC grade, Merk, Německo
Methanol p. a., Penta, ČR
Molibdenan sodný, Lachema, ČR
Myo-inositol, Fluka, Švýcarsko
Propylether p.a., Lachema, ČR
Pyridoxin piriss., Koch-Light Laboratories, Velká Británie
Sacharosa čistá, Lachema, ČR
Síran hořečnatý p. a., Lachema, ČR
Síran manganatý p. a., Lachema, ČR
Síran měďnatý p. a., Lachema, ČR
Síran zinečnatý ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), Lachema, ČR
Síran železnatý čistý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), Lachema, ČR
Sodná sůl kyseliny elthylendiamintetraoctové, Lachema, ČR
Superčistá voda, Katedra analytické chemie, FaF UK HK, ČR

Thiamin, Koch-Light Laboratories, Velká Británie

Železnato-sodná sůl kyseliny elthylendiamintetraoctové, Fluka, Švýcarsko

4.4 Kultivace tkáňových kultur

4.4.1. Příprava kultivačních nádob a nástrojů

Všechny použité skleněné nádoby byly vyrobeny z varného skla zn. SIAL, které je odolné vůči teplotním výkyvům a působení chemikálií. Pro kultivace byly použity 100 ml Erlenmayerovy baňky, do kterých byly vloženy můstky z filtračního papíru a bylo nalito 30 ml živného média. Hrdla baněk byla uzavřena hliníkovou fólií a baňky byly sterilizovány v autoklávu 20 minut při 121°C a 100 kPa. Před další manipulací byly hliníkové fólie i baňky omyty ajatinem. Pasážování bylo prováděno v laminárním boxu vysterilizovaném ajatinem a vyzářeném germicidní zářivkou.

Pinzety byly před použitím očištěny a opláchnuty 96% ethanolem. Po zabalení do hliníkové fólie byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru 2 hodiny při teplotě 200°C.

4.4.2. Složení a příprava živného média

Část kalusů kultury G₁ (15. – 22. pasáž) byla pěstována na půdě sestavené dle Murashigeho a Skooga (MS). K této půdě byl přidán růstový regulátor kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová v koncentraci 1 mg/l.

Kalusy kultury G₂ a část kalusů kultury G₁ (23. – 31. pasáž) byly pěstovány na půdě sestavené dle Schenk a Hildebrandta (SH). K této půdě byly přidány růstové regulátory:

kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová v koncentraci 0,5 mg/l,

kinetin v koncentraci 0,1 mg/l.

Jednotlivé složky půd byly odváženy na analytických vahách. Velmi malá množství byla odpipetována ze zásobních roztoků. Všechny součásti byly rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněny destilovanou vodou po značku. Živné médium bylo

rozlito do vysterilizovaných Erlenmayerových baněk, do každé baňky 30 ml živného média.
Po uzavření hliníkovou fólií byly sterilizovány v autoklávu 20 minut při 121 °C a 100 kPa.

Složení půdy sestavené dle Murashigeho a Skooga (v mg/l) (29)

| | |
|--|---------|
| CaCl ₂ .2 H ₂ O | 440,0 |
| KNO ₃ | 1900,0 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650,0 |
| MgSO ₄ .7 H ₂ O | 370,0 |
| KH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 170,0 |
| FeSO ₄ .7 H ₂ O | 27,84 |
| Na ₂ EDTA | 37,34 |
| MnSO ₄ .4 H ₂ O | 22,30 |
| ZnSO ₄ .7 H ₂ O | 11,50 |
| H ₃ BO ₃ | 6,20 |
| KI | 0,83 |
| CuSO ₄ .5 H ₂ O | 0,025 |
| Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O | 0,25 |
| CoCl ₂ .6 H ₂ O | 0,025 |
| Myo-inositol | 100,0 |
| Hydrolyzát kaseinu | 1000,0 |
| Glycin | 2,0 |
| Kyselina nikotinová | 0,50 |
| Pyridoxin hydrochlorid | 0,50 |
| Thiamin hydrochlorid | 0,10 |
| Sacharosa | 30000,0 |

Složení půdy sestavené dle Schenk a Hildebrandta (mg/l) (30)

| | |
|--|-------|
| CoCl ₂ .6 H ₂ O | 0,10 |
| CuSO ₄ .5 H ₂ O | 0,20 |
| FeNaEDTA | 19,80 |
| H ₃ BO ₃ | 5,00 |
| KI | 1,00 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 10,00 |
| Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O | 0,10 |

| | |
|--|---------|
| ZnSO ₄ ·7 H ₂ O | 1,00 |
| CaCl ₂ | 151,00 |
| KNO ₃ | 2500,0 |
| MgSO ₄ | 195,05 |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 300,0 |
| Myo-inositol | 1000,0 |
| Kyselina nikotinová | 5,0 |
| Pyridoxin hydrochlorid | 0,5 |
| Thiamin hydrochlorid | 5,0 |
| Sacharosa | 30000,0 |

4.4.3. Pasážování a kultivace

Pasážování probíhalo v prostředí laminárního boxu. Do vysterilizovaných Erlenmayerových baněk s živným médiem bylo přeneseno inokulum (část kalusu z předchozí kultivace) na můstek z filtračního papíru. Baňky s naočkovanými kulturami byly opět zakryty hliníkovou fólií.

Kultivace probíhala za normálního světelného režimu (16 hodin světlo, 8 hodin tma). Kultura rostla po dobu přibližně 4 týdnů při pokojové teplotě.

4.5 Elicitace

Přibližně po 4 týdnech od inokulace byly kalusy ozářeny v laminárním boxu, který byl předem vysterilizován ajatinem a vyzářen germicidní zářivkou. Po odkrytí hliníkové fólie byly kalusy vystaveny UV – radiaci o vlnových délkách 254 nm a 366 nm po dobu 30 s, 60 s, 120 s, 240 s a 300 s. Pro každou časovou jednotku bylo vyčleněno 6 Erlenmayerových baněk s narostlým kalusem. Poté byly baňky opět uzavřeny.

Jednotlivé odběry kalusů byly provedeny po 24 hodinovém a 48 hodinovém intervalu po ozáření a porovnány s kontrolním vzorkem (baňky s neozářeným kalusem). Ústí Erlenmayerovy baňky bylo od zdroje ozáření vzdáleno přibližně 5 cm.

4.6 Hodnocení růstu

U kalusů G_1 ze 23. pasáže a G_2 ze 7. pasáže, které byly vybrány pro hodnocení růstu na SH mediu, byla změřena hmotnost baněk před a po naočkování inokula na vahách s přesností na 0,0001 g. Po čtyřech týdnech byla stanovena hmotnost narostlých kalusů a hmotnost baněk bez kalusů.

Vyhodnocení růstu bylo provedeno pomocí růstového faktoru R.

Nejdříve byla zjištěna hmotnost inokula (rozdíl hmotnosti baňky s půdou a inokulem a hmotnosti baňky s půdou bez inokula) a hmotnost kalusu (rozdíl hmotnosti baňky s půdou a kalusem po čtyřech týdnech kultivace a hmotnosti baňky s půdou bez kalusu). Hodnota růstového faktoru byla získána pomocí vztahu:

$$R = \frac{F_w - F_{w0}}{F_{w0}}$$

R růstový faktor

F_w čerstvá hmotnost kalusu po 4 týdnech kultivace (g)

F_{w0} čerstvá hmotnost inokula (g)

Hodnocení růstu bylo zjišťováno u kalusových kultur G_1 a G_2 rostoucích na SH mediu a pro pokus bylo vyčleněno 10 Erlenmayerových baněk s kalusovou kulturou G_1 a 10 Erlenmayerových baněk s kalusovou kulturou G_2 . Výsledná hodnota intenzity růstu je průměrnou hodnotou z deseti baněk, kultivovaných za stejných podmínek.

Intenzita růstu byla hodnocena jako přírůstek čerstvé hmotnosti inokula v gramech a procentech (hmotnost inokula = 100%) a růstovým faktorem. (35)

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 2 a 3.

4.7 Stanovení obsahu flavonoidů (49)

4.7.1 Příprava vzorků

Sušené vzorky kalusů byly upráškovány v třecí misce a zváženy. Více než 0,100 g drogy se vařilo s 10 ml 80 % methanolu na vodní lázni pod zpětným chladičem 20 – 30 min. Po ochlazení se výluh zfiltraval přes chomáček vaty. Pak se celý postup s drogou a použitou vatou zopakoval. Výluhy se spojily a byly doplněny na 25 ml. Vytřepáváním v 10 ml petroletheru byl extrakt zbaven tuků a chlorofylu. Cca 2 ml výluhu byly přefiltrovány přes mikrofiltr do označených vialek a analyzovány pomocí metody HPLC.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 4 – 15.

4.7.2 Parametry HPLC analýzy

Chromatograf: sestava Jasco

Čerpadlo: PU - 2089

Autosampler: AS - 2055

Kolona: Kolona Li Chrospher RP - 18 250 x 4, sorbent Li Chrospher 5 µm, předkolonový filtr, ochranná předkolonka

Objem nástřiku: 20 µl

Detekce: DAD MD – 2015, $\lambda = 190 - 450$ nm, vyhodnoceno při $\lambda = 260$ nm

Mobilní fáze: methanolický roztok kyseliny 0,15% fosforečné

Eluční profil: 0 – 9 min. gradientová eluce, z t = 0 min. 30% MeOH na t = 9 min. 80% MeOH
9 – 15 min. isokratická eluce, 80% MeOH

Standardy: genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A

Průtoky: 1,1 ml/min

4.8 Sestavení kalibrační křivky

Jednotlivé standardy byly rozpuštěny v 80 % MeOH do těchto koncentrací:

Genistin 2,0 mg/ 100 ml, 4,0 mg/100 ml, 8,0 mg/100 ml

Daidzein 2,0 mg/100 ml, 5,2 mg/100 ml, 10,4 mg/100 ml

Genistein 2,4 mg/100 ml, 4,8 mg/100 ml, 9,6 mg/100 ml

Formononetin 2,6 mg/100 ml, 5,2 mg/100 ml, 10,4 mg/100 ml

Biochanin A 2,0 mg/ 100ml, 4,0 mg/100 ml, 8,0 mg/100 ml

Z těchto hodnot byly sestrojeny kalibrační křivky.

Kalibrační křivky

1. kalibrační křivka genistinu

x: koncentrace (mg/100ml)

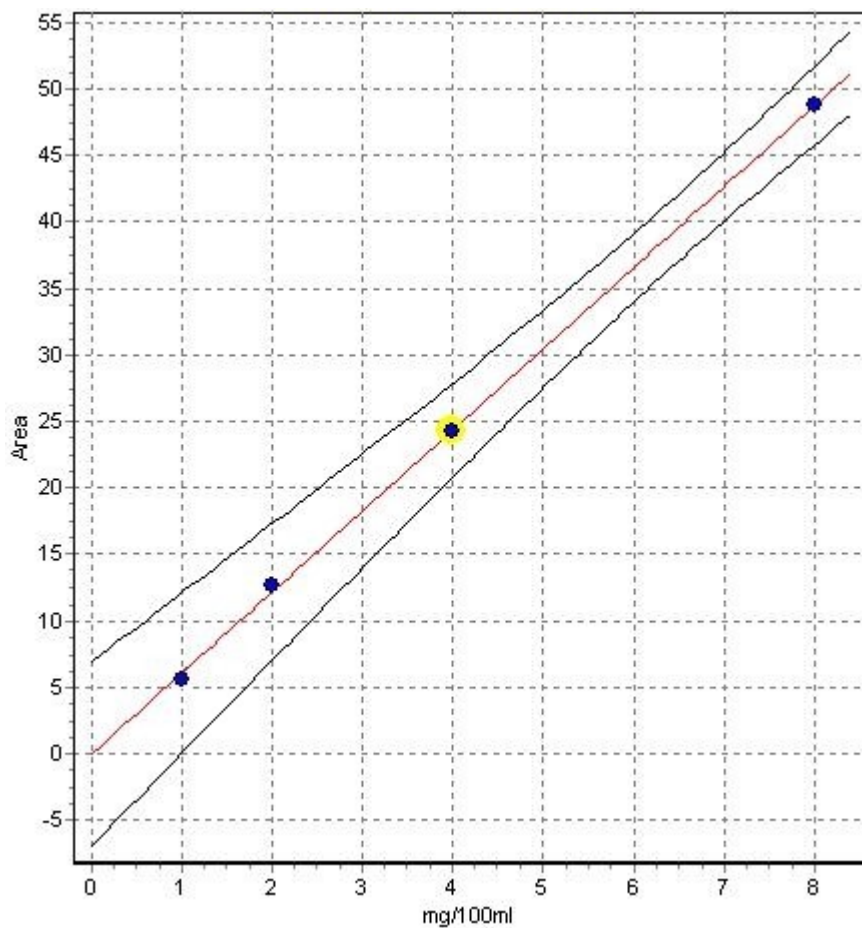
y: plocha

regresní koeficient: 0,9998

$y = bx + a$

$a = 0$

$b = 6,08940$



2. kalibrační křivka daidzeinu

x: koncentrace (mg/100 ml)

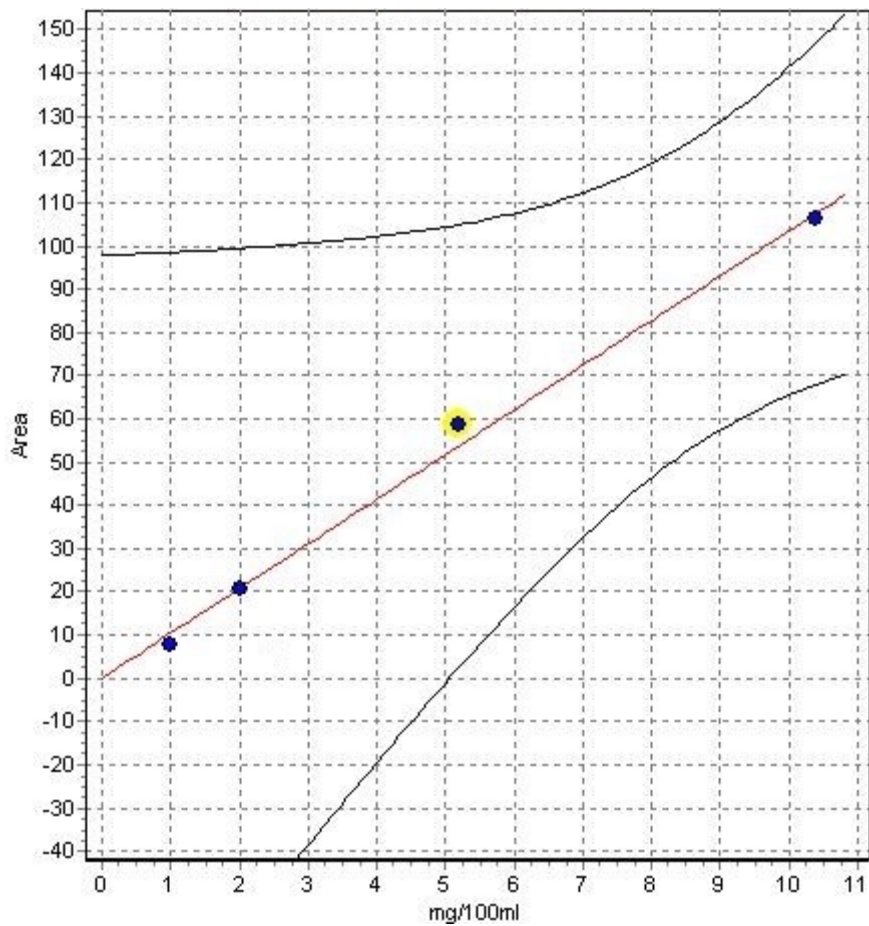
y: plocha

regresní koeficient: 0,9938

$y = bx + a$

$a = 0$

$b = 10,34026$



3. kalibrační křivka genisteinu

x: koncentrace (mg/100 ml)

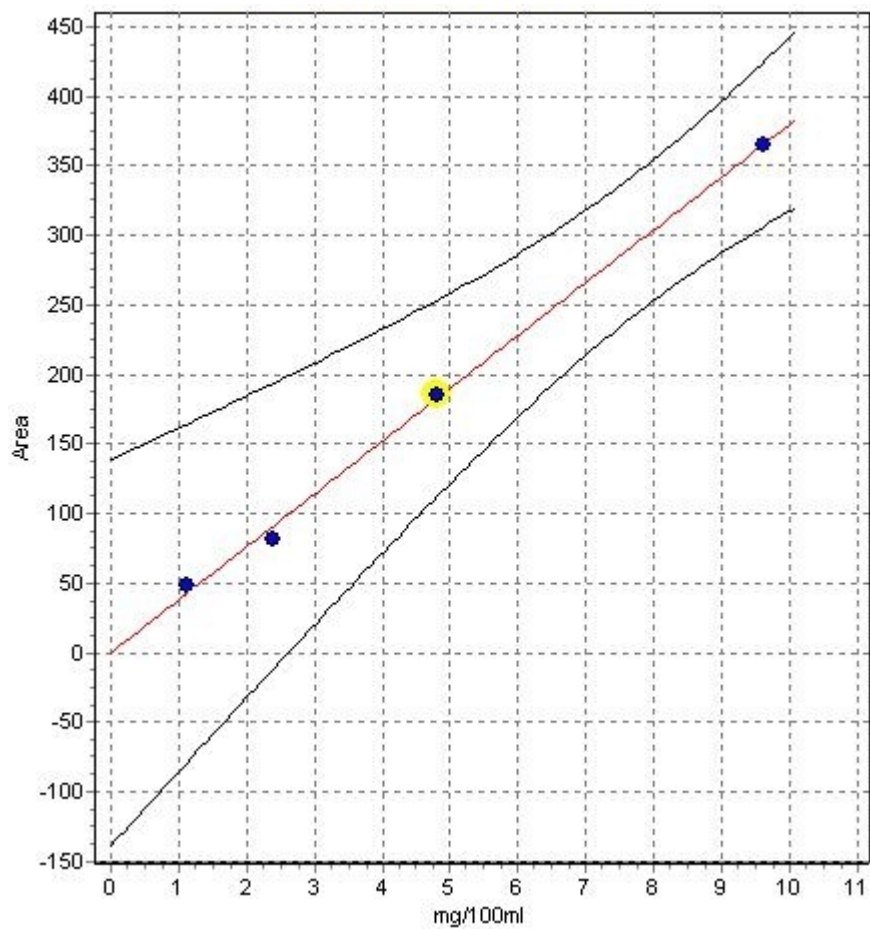
y: plocha

regresní koeficient: 0,9997

$$y = bx + a$$

$$a = 0$$

$$b = 42,98035$$



4. kalibrační křivka formononetinu

x: koncentrace (mg/100 ml)

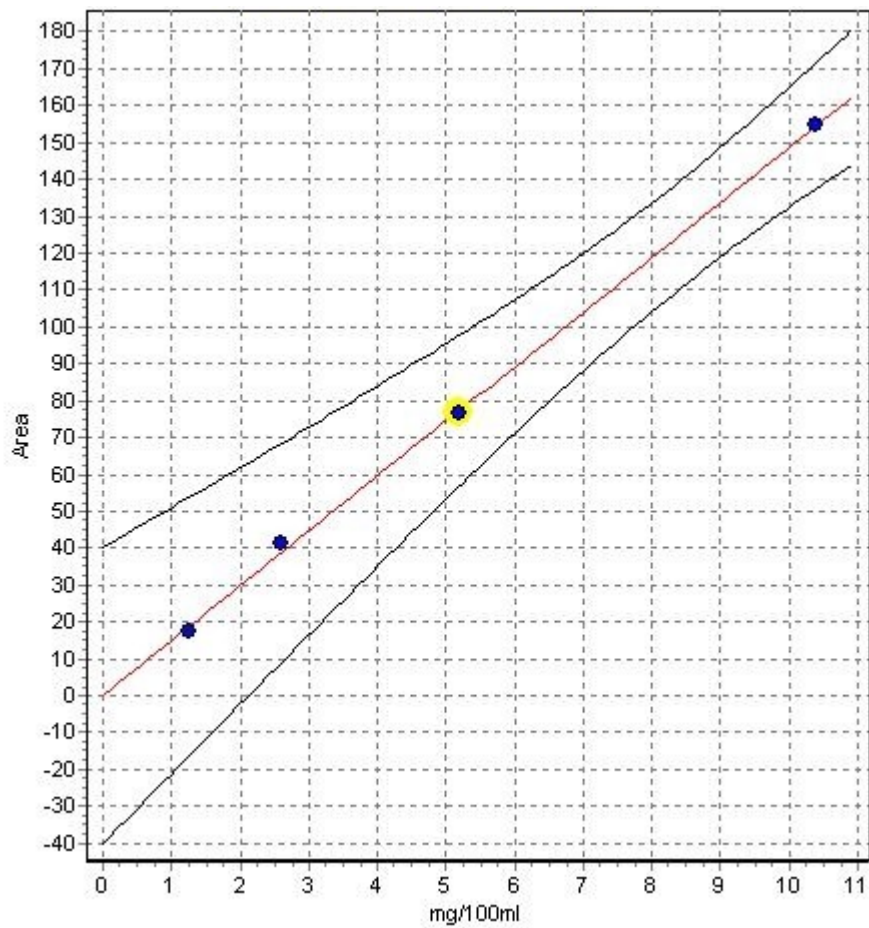
y: plocha

regresní koeficient: 0,9994

$$y = bx + a$$

$$a = 0$$

$$b = 14,86045$$



5. kalibrační křivka biochaninu A

x: koncentrace (mg/100 ml)

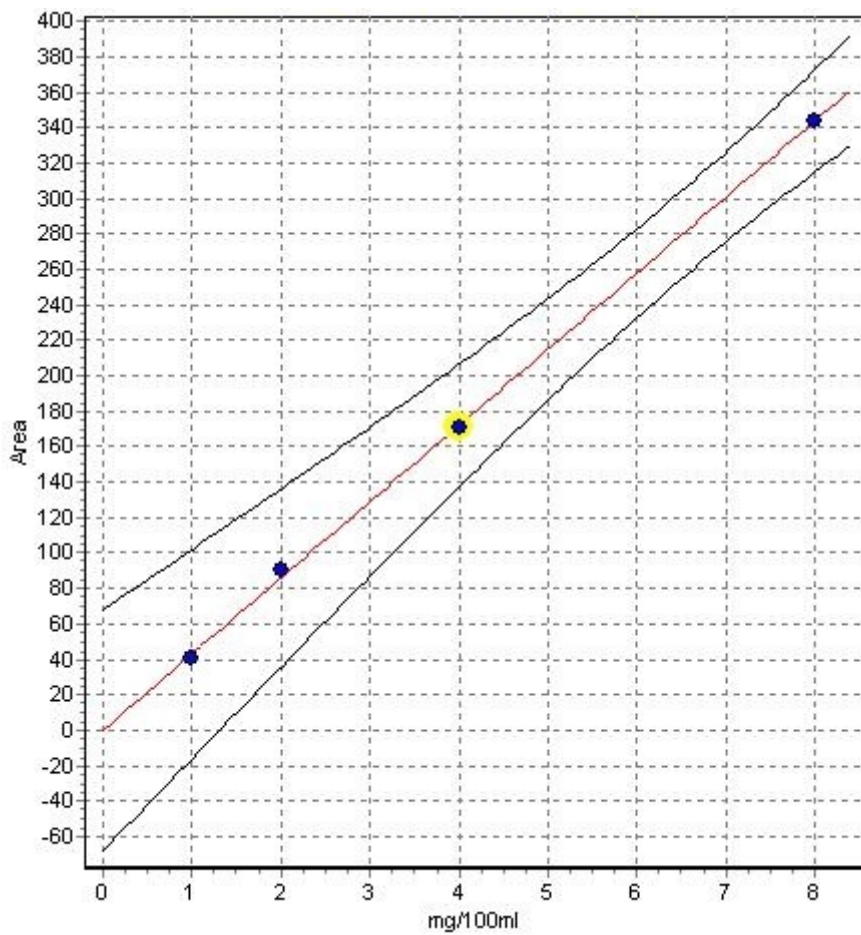
y: plocha

regresní koeficient: 0,9997

$y = bx + a$

$a = 0$

$b = 42,98045$



4.9 Statistické zhodnocení

Pro zjištění statistické významnosti u hodnocení růstu jsem použila t-test rozdílu výběrového průměru a známého průměru kontrolního souboru a použila jsem následující vzorce:

Aritmetický průměr

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Směrodatná odchylka

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

n...rozsah souboru (počet případů)

x_i ... naměřené hodnoty

\bar{x} ...aritmetický průměr

s...směrodatná odchylka

Vzorec pro testovací kritérium

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

t...testovací kritérium

\bar{x} ...aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x} ... aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 ...směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 ...směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 ...počet členů kontrolního souboru

n_2 ...počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu t přísluší t-rozdělení s $\nu = n_1 + n_2 - 2$ stupni volnosti. Počet členů v kontrolním souboru byl $n_1 = 7$ a počet členů v pokusném souboru byl $n_2 = 10$. Z toho vyplývá, že počet stupňů volnosti byl $\nu = 15$.

Pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$ a patnáct stupňů volnosti je tabulková kritická hodnota $t_p = 2,131$. Výsledky jsou statisticky významné, je-li hodnota testovacího kritéria vyšší než tabulková kritická hodnota. (43)

Zjištění statistické významnosti u hodnocení růstu jsem provedla srovnáním výsledků experimentu s výsledky získanými z Diplomové práce Terezy Šárkové. Jako kontrolní soubor jsem použila růst *Genisty tinctoria* na MS médiu s obsahem 1 mg/l 2,4 – D za normálního světelného režimu. Směrodatná odchylka a hodnoty testovacího kritéria jsou uvedeny v tabulkách č. 1-3.

5. Výsledky

Tabulka č. 1

Růst kalusové kultury G₁ na MS médiu – kontrolní soubor (35)

| číslo baňky | hmotnost inokula (g) | hmotnost kalusu (g) | přírůstek (g) | přírůstek (%) | růstový faktor 0,790 |
|----------------|----------------------------|------------------------|------------------|------------------|--|
| 1 | 0,63 | 1,40 | 0,77 | 122,22 | směrodatná odchylka 0,568 |
| 2 | 0,52 | 0,63 | 0,11 | 21,15 | |
| 3 | 0,46 | 1,32 | 0,86 | 186,95 | |
| 4 | 0,70 | 1,14 | 0,44 | 62,86 | |
| 5 | 0,54 | 0,78 | 0,24 | 44,44 | |
| 6 | 0,68 | 1,35 | 0,67 | 98,53 | testovací kritérium – |
| 7 | 0,59 | 0,69 | 0,10 | 16,95 | |
| součet | 5,70 | 7,31 | 3,19 | 553,10 | |
| průměr | 0,59 | 1,04 | 0,46 | 79,01 | |

Tabulka č. 2

Růst kalusové kultury G₁ na SH mediu v 23. pasáži

| číslo baňky | hmotnost inokula (g) | hmotnost kalusu (g) | přírůstek (g) | přírůstek (%) | růstový faktor 2,350 |
|----------------|----------------------------|------------------------|------------------|------------------|--|
| 1 | 0,66 | 0,88 | 0,22 | 32,32 | směrodatná odchylka 1,581 |
| 2 | 0,90 | 4,02 | 3,12 | 347,09 | |
| 3 | 0,56 | 0,77 | 0,21 | 37,11 | |
| 4 | 0,69 | 0,74 | 0,05 | 6,96 | |
| 5 | 0,86 | 3,22 | 2,36 | 274,08 | |
| 6 | 1,02 | 2,91 | 1,89 | 185,73 | testovací kritérium 2,348 |
| 7 | 0,62 | 2,98 | 2,36 | 382,96 | |
| 8 | 1,23 | 3,93 | 2,71 | 220,90 | |
| 9 | 0,64 | 3,20 | 2,56 | 398,74 | |
| 10 | 0,76 | 4,30 | 3,54 | 464,04 | |
| součet | 7,94 | 26,94 | 19,01 | 2349,95 | |
| průměr | 0,79 | 2,69 | 1,90 | 235,00 | |

Tabulka č. 3

Růst kalusové kultury G₂ na SH mediu v 7. pasáži

| číslo baňky | hmotnost inokula (g) | hmotnost kalusu (g) | přírůstek (g) | přírůstek (%) | růstový faktor 1,193 |
|----------------|----------------------------|------------------------|------------------|------------------|-----------------------------------|
|----------------|----------------------------|------------------------|------------------|------------------|-----------------------------------|

| | | | | | |
|---------------|-------------|-------------|-------------|---------------|--|
| 1 | 0,45 | 0,95 | 0,50 | 109,75 | |
| 2 | 0,59 | 1,22 | 0,62 | 105,65 | |
| 3 | 0,75 | 1,42 | 0,67 | 89,03 | směrodatná odchylka 0,819 |
| 4 | 0,44 | 1,24 | 0,80 | 182,18 | |
| 5 | 0,35 | 0,92 | 0,57 | 160,88 | |
| 6 | 0,54 | 0,71 | 0,18 | 32,49 | |
| 7 | 0,58 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 8 | 0,72 | 1,39 | 0,67 | 92,75 | |
| 9 | 0,61 | 1,26 | 0,65 | 107,40 | |
| 10 | 0,68 | 2,80 | 2,12 | 312,52 | |
| součet | 5,70 | 11,90 | 6,77 | 1192,65 | |
| průměr | 0,57 | 1,19 | 0,68 | 119,26 | |

Tabulka č. 4

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ (20. pasáž) rostoucí na MS mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2556 |
| 60 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2592 |
| 120 | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 | 0,2576 |
| 240 | 0,02 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0,2147 |
| 300 | 0,03 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2430 |
| kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2604 |

Tabulka č. 5

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ (19.pasáž) rostoucí na MS mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,4498 |
| 60 | 0,01 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0,3077 |
| 120 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2676 |
| 240 | 0,04 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0,2952 |
| 300 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,3820 |
| kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2604 |

Tabulka č.6

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ (17. pasáž) rostoucí na MS mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,1642 |
| 60 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2778 |
| 120 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,4140 |
| 240 | 0,01 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0,3512 |
| 300 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,3379 |
| kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2604 |

Tabulka č.7

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ (17. pasáž) rostoucí na MS mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,4103 |
| 60 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,5391 |
| 120 | 0,01 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0,4862 |
| 240 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,3440 |
| 300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,4343 |
| kontrola | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2604 |

Tabulka č.8

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ (23. pasáž) rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0,2567 |
| 60 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2417 |
| 120 | 0,02 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0,1930 |
| 240 | 0,07 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0,2715 |
| 300 | 0,01 | 0,04 | 0,01 | 0 | 0,01 | 0,2779 |
| kontrola | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2166 |

Tabulka č.9

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ (26. pasáž) rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0,01 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0,2639 |
| 60 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2696 |
| 120 | 0 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0,2488 |
| 240 | 0,03 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2531 |
| 300 | 0,01 | 0,09 | 0 | 0 | 0 | 0,2701 |
| kontrola | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2166 |

Tabulka č.10

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ (24. pasáž) rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2182 |
| 60 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,231 |
| 120 | 0 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 | 0,2244 |
| 240 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2461 |
| 300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2248 |
| kontrola | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2166 |

Tabulka č.11

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ (31. pasáž) rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0,04 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0,1781 |
| 60 | 0 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0,2213 |
| 120 | 0 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0,2975 |
| 240 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0,2842 |
| 300 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2191 |
| kontrola | 0 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0,2166 |

Tabulka č.12

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₂ (7. pasáž) rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0,93 | 0 | 0,16 | 0 | 0,01 | 0,4861 |
| 60 | 0,30 | 0 | 0,12 | 0 | 0 | 0,4077 |
| 120 | 0,79 | 0 | 0,11 | 0 | 0 | 0,4228 |
| 240 | 0,99 | 0 | 0,17 | 0 | 0 | 0,4897 |
| 300 | 0,22 | 0 | 0,09 | 0 | 0,01 | 0,4169 |
| kontrola | 0,97 | 0 | 0,15 | 0 | 0 | 0,4227 |

Tabulka č.13

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₂ (10. pasáž) rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 1,61 | 0,01 | 0,10 | 0 | 0 | 0,3215 |
| 60 | 1,71 | 0,01 | 0,06 | 0 | 0 | 0,3757 |
| 120 | 1,35 | 0,01 | 0,08 | 0 | 0 | 0,3703 |
| 240 | 1,30 | 0,01 | 0,05 | 0 | 0 | 0,3452 |
| 300 | 3,03 | 0,01 | 0,09 | 0 | 0 | 0,3672 |
| kontrola | 0,97 | 0 | 0,15 | 0 | 0 | 0,4227 |

Tabulka č.14

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₂ (15. pasáž) rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 1,93 | 0,05 | 0,12 | 0,07 | 0 | 0,6614 |
| 60 | 1,83 | 0,01 | 0,08 | 0,04 | 0 | 0,3589 |
| 120 | 1,63 | 0,04 | 0,07 | 0,01 | 0 | 0,2990 |
| 240 | 1,86 | 0,04 | 0,09 | 0 | 0 | 0,3596 |
| 300 | 1,79 | 0,01 | 0,13 | 0 | 0 | 0,3591 |
| kontrola | 0,97 | 0 | 0,15 | 0 | 0 | 0,4227 |

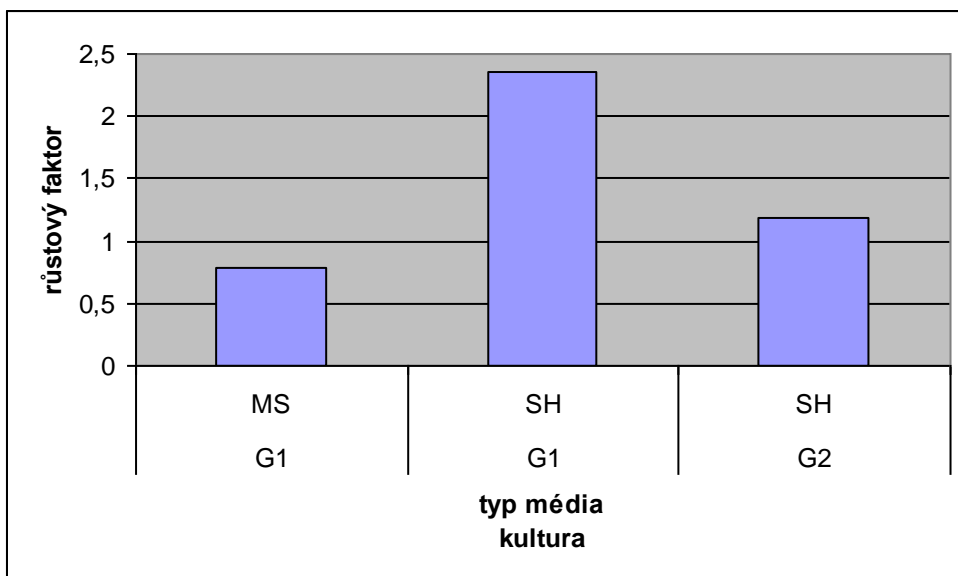
Tabulka č.15

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₂ (15. pasáž) rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.

| čas ozářování (s) | genistin (%) | daidzein (%) | genistein (%) | form (%) | biochanin A (%) | navážka (g) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|----------|-----------------|-------------|
| 30 | 0,67 | 0,01 | 0,04 | 0,04 | 0 | 0,3171 |
| 60 | 1,36 | 0,01 | 0,05 | 0,03 | 0 | 0,4192 |
| 120 | 2,06 | 0,01 | 0,08 | 0 | 0 | 0,3581 |
| 240 | 1,69 | 0,01 | 0,03 | 0 | 0 | 0,3160 |
| 300 | 0,22 | 0,01 | 0,04 | 0,04 | 0 | 0,3900 |
| kontrola | 0,97 | 0 | 0,15 | 0 | 0 | 0,4227 |

Graf č. 1

Růst kalusové kultury *Genista tinctoria* na různých médiích



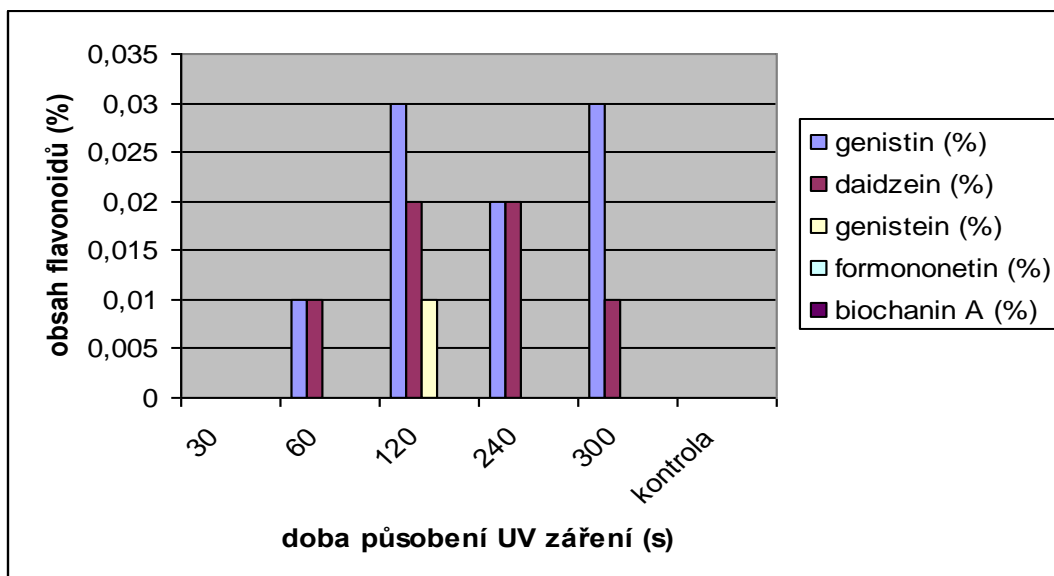
G1 tkáňová kultura odvozená z klíčnicí rostliny *Genista tinctoria* v 15.-31. pasáži

G2 nově odvozená tkáňová kultura z klíčnicí rostliny *Genista tinctoria* v 3.-15. pasáži

v 3.-

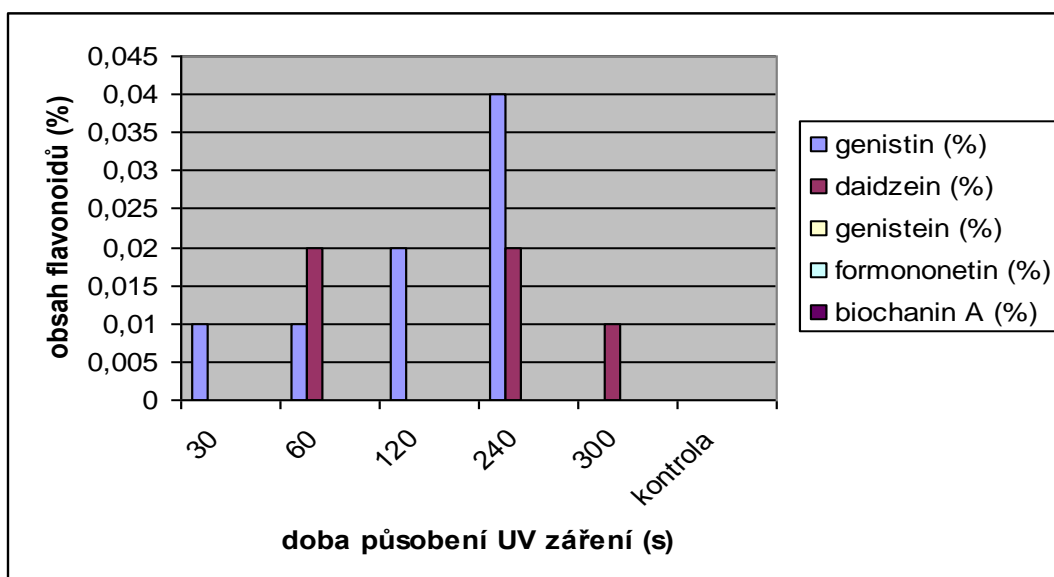
Graf č. 2

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ rostoucí na MS médiu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozaření.



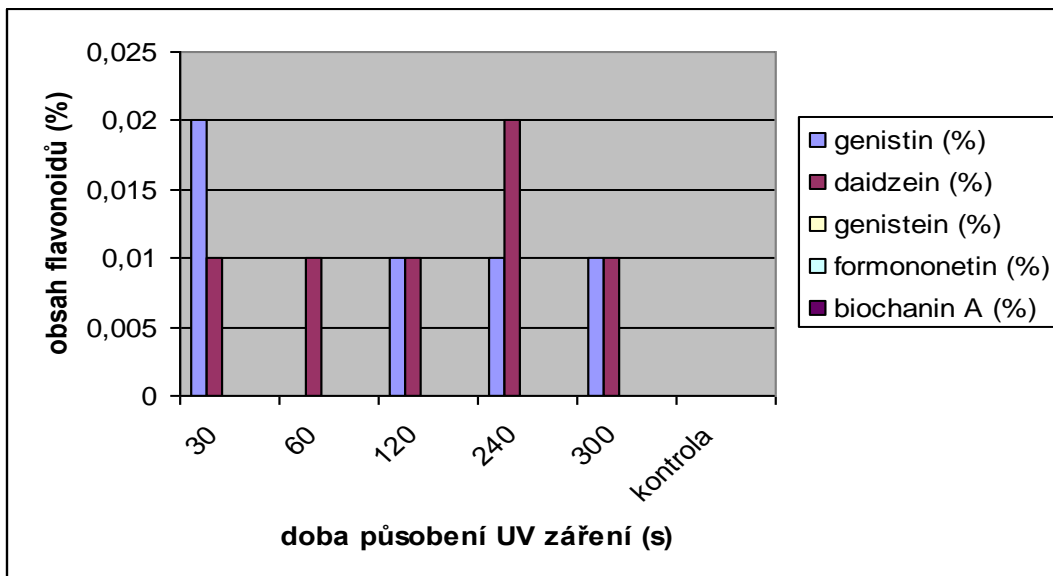
Graf č. 3

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ rostoucí na MS mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.



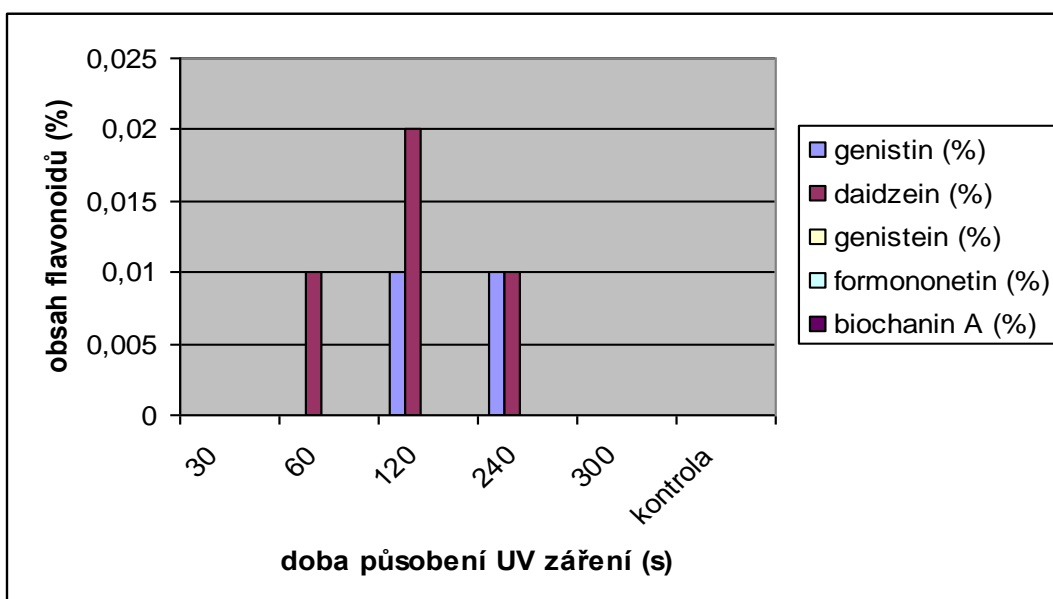
Graf č. 4

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ rostoucí na MS mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.



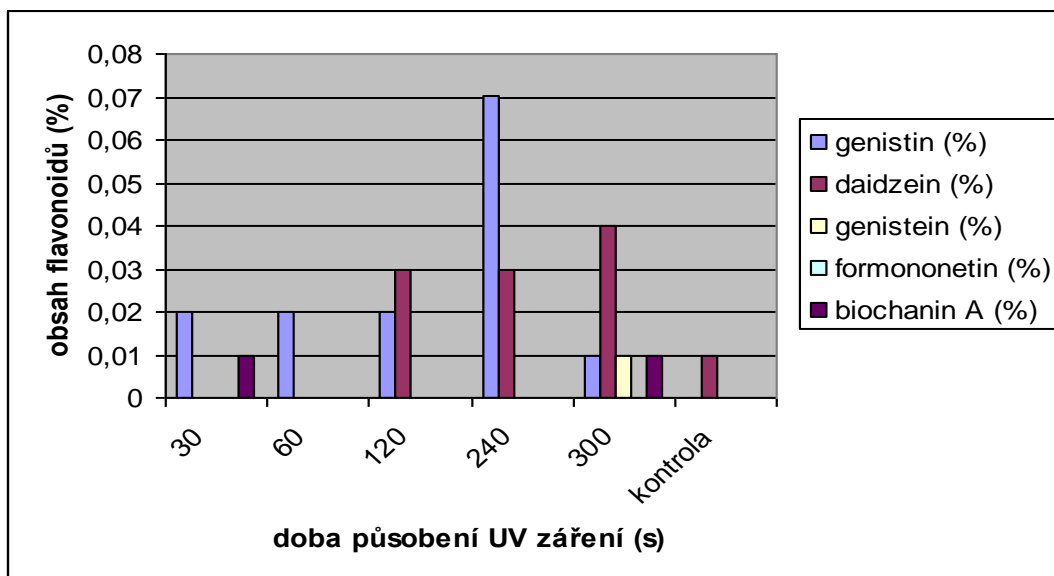
Graf č. 5

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G_1 rostoucí na MS mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.



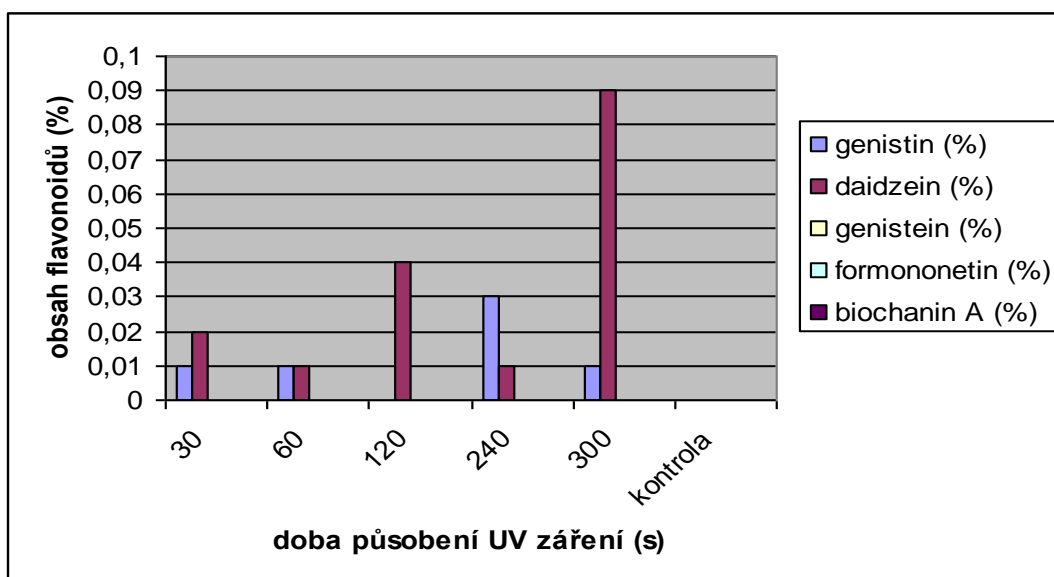
Graf č. 6

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G_1 rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.



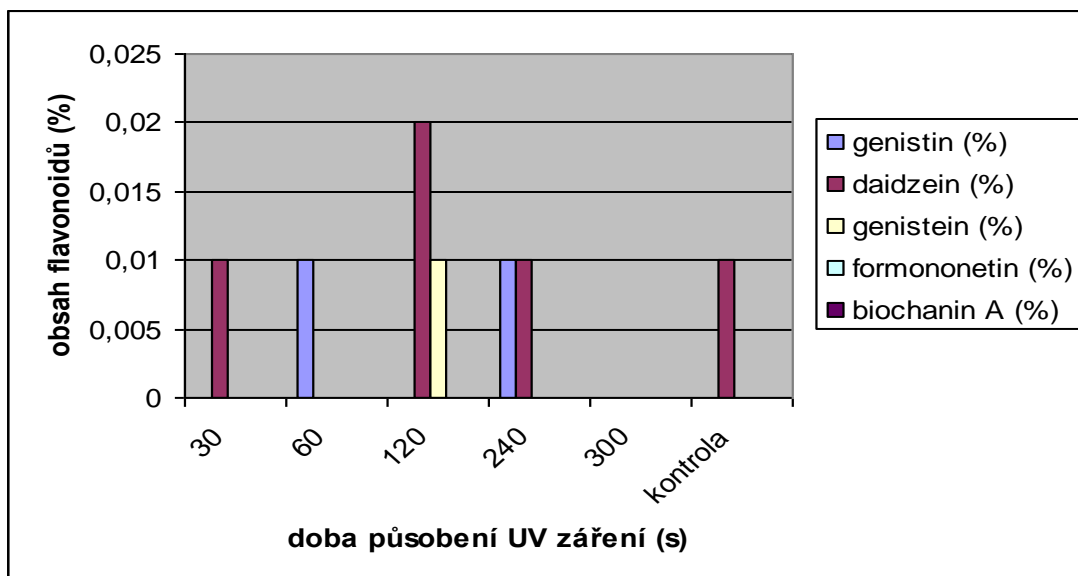
Graf č. 7

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G_1 rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.



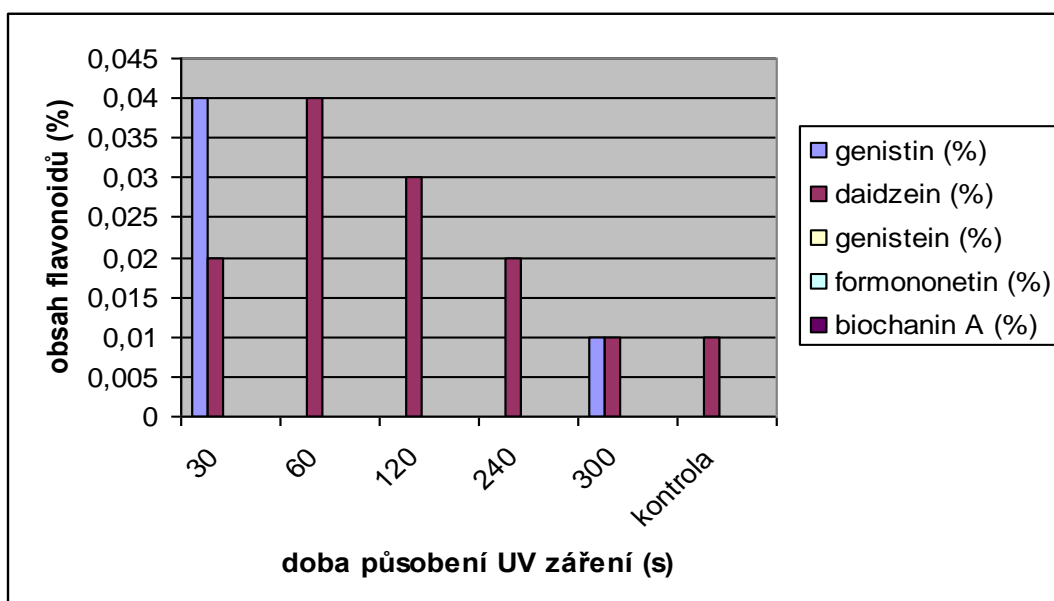
Graf č.8

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G_1 rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.



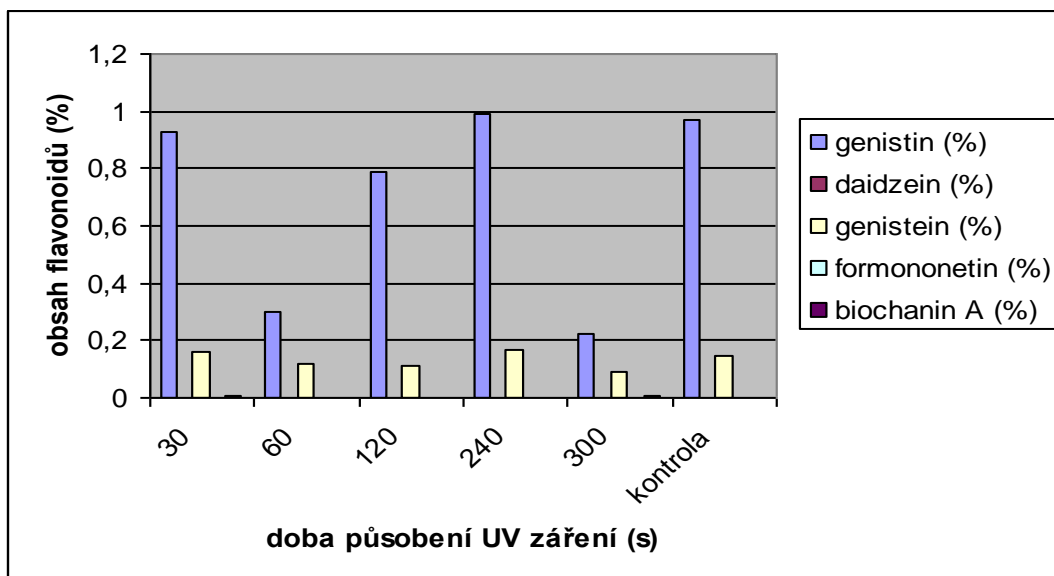
Graf č. 9

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₁ rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.



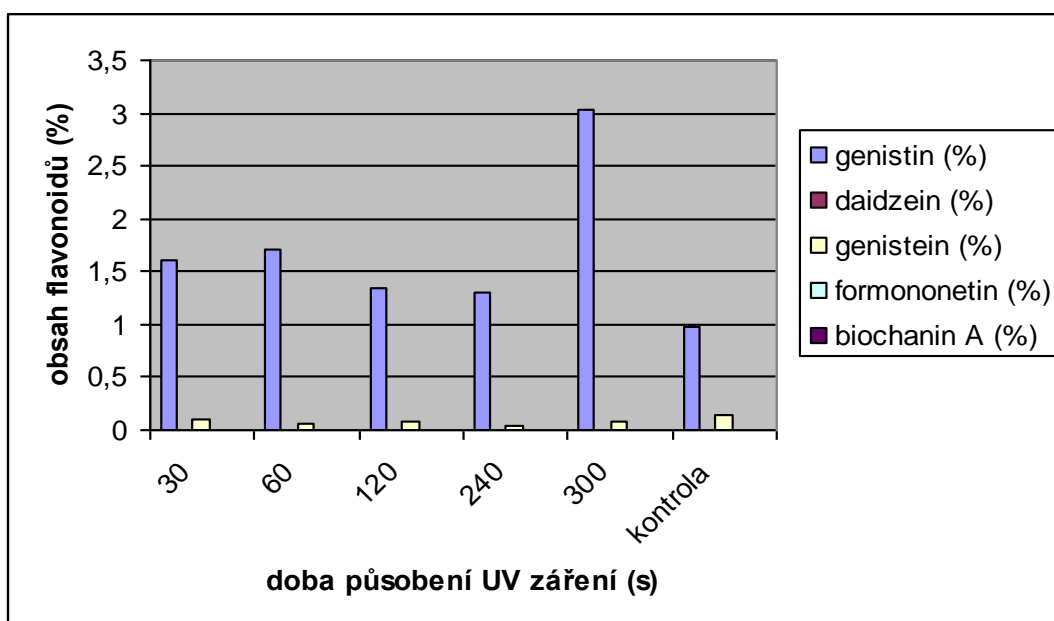
Graf č. 10

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₂ rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.



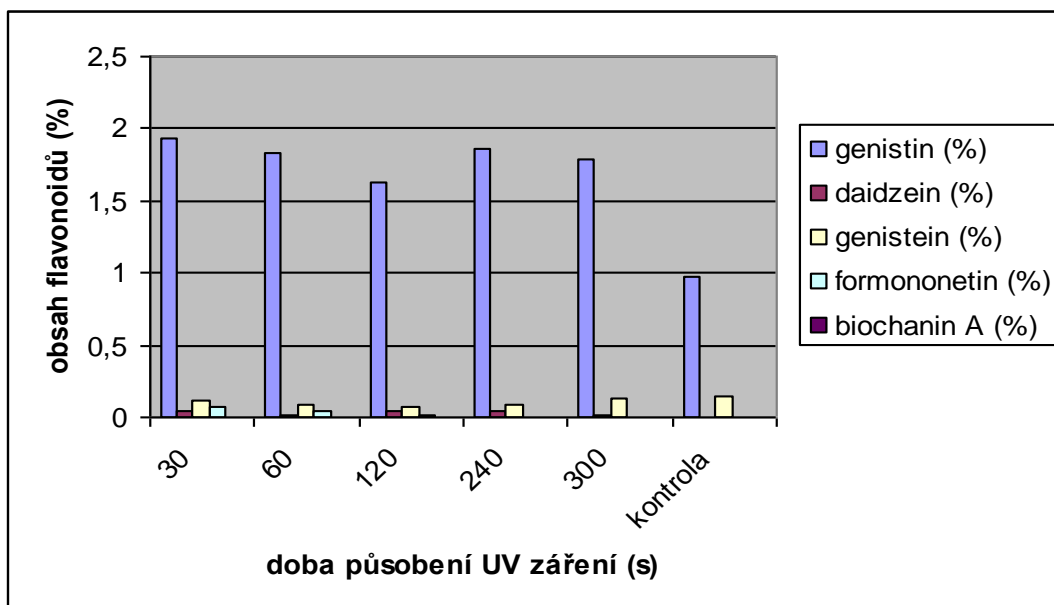
Graf č.11

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₂ rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 254 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozáření.



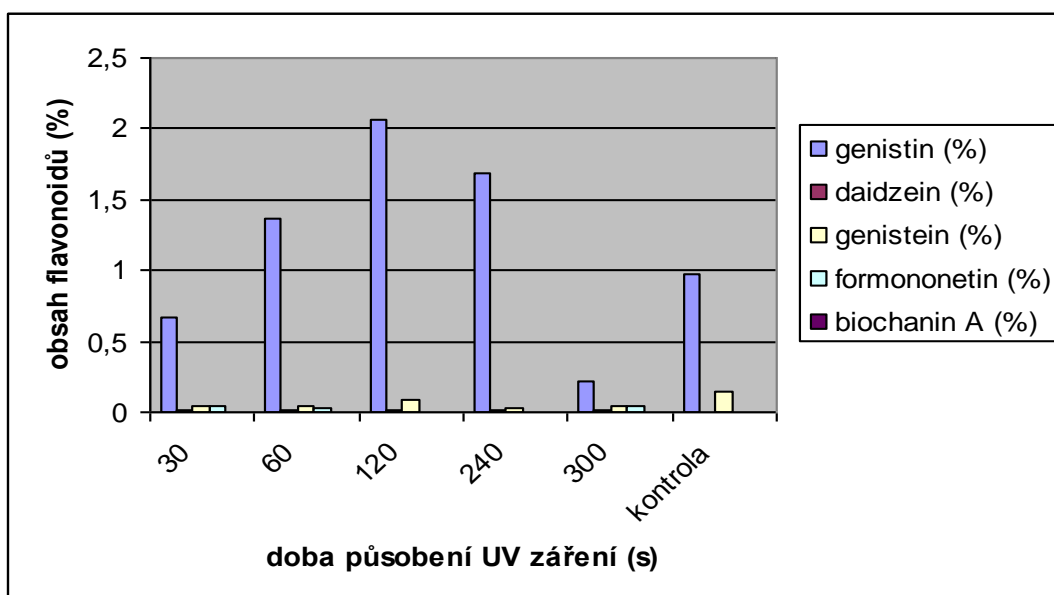
Graf č.12

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G₂ rostoucí na SH mediu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 24 hodinách od ozáření.



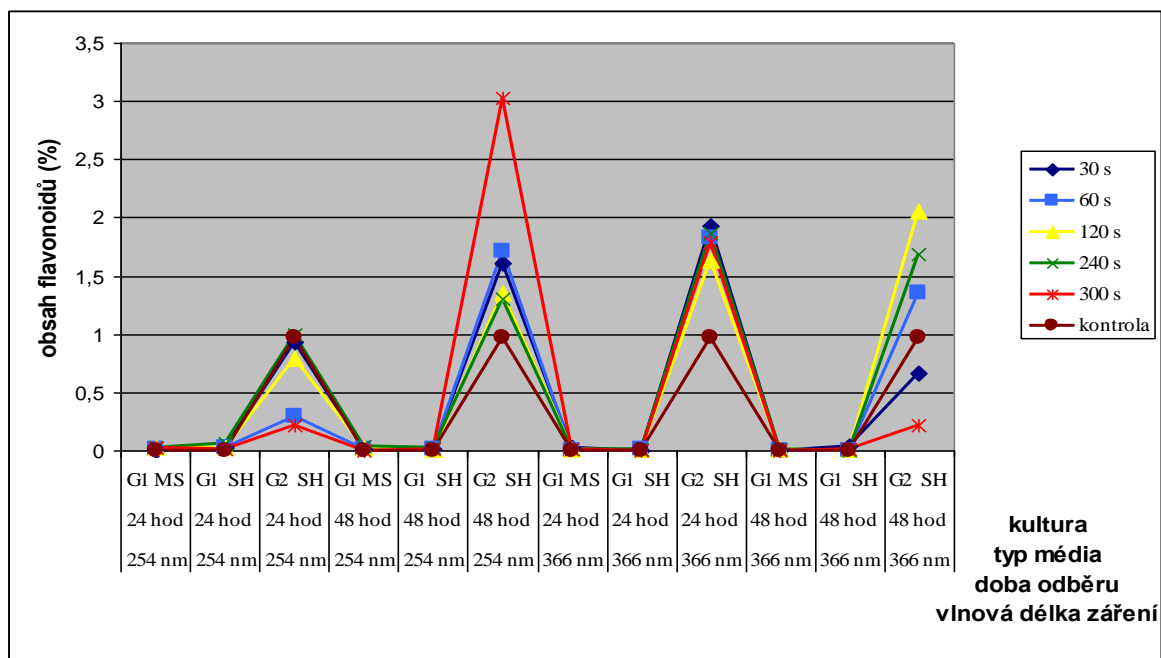
Graf č. 13

Obsah flavonoidů v kalusové kultuře G_2 rostoucí na SH médiu po ozařování ultrafialovým zářením o vlnové délce 366 nm a odběrem provedeným po 48 hodinách od ozaření.



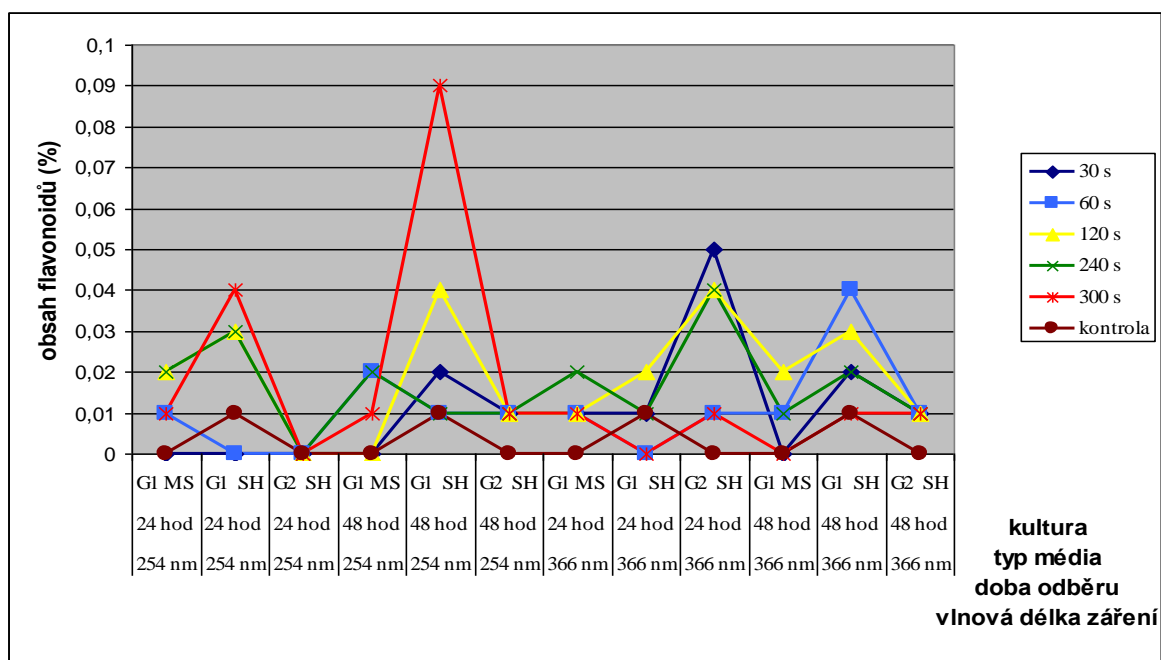
Graf č. 14

Obsah genistinu v různých kalusových kulturách *Genista tinctoria* pěstovaných na různém médiu, ozářených vlnovou délkou 254 nm nebo 366 nm, s různou dobou odběru po ozaření



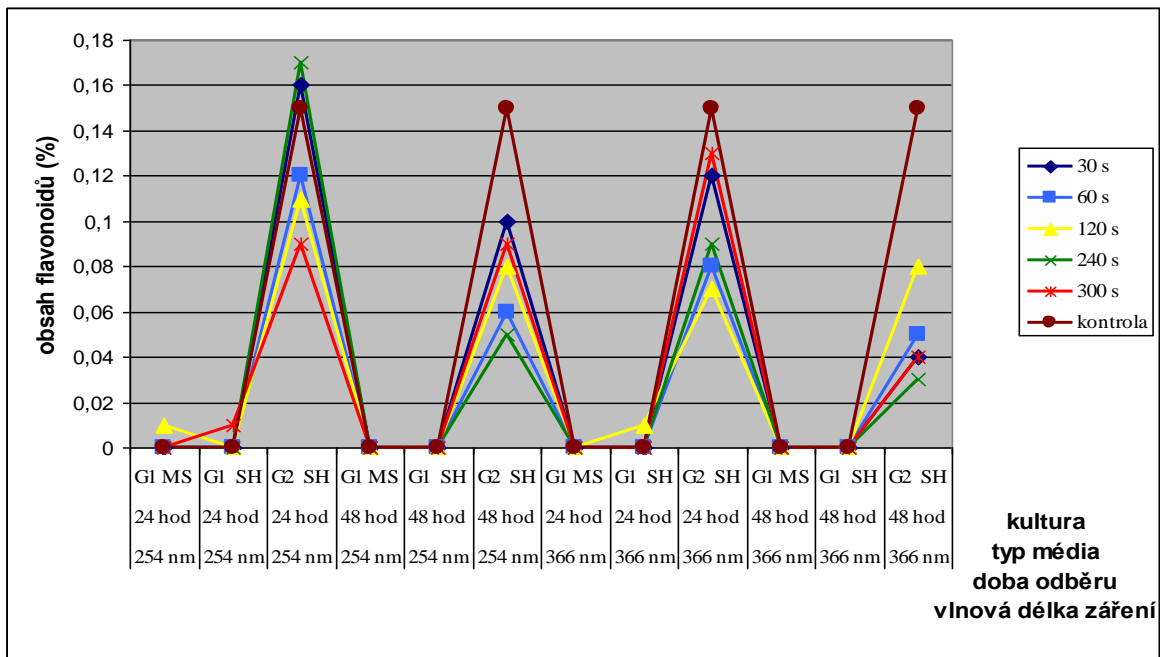
Graf č. 15

Obsah daidzeinu v různých kalusových kulturách *Genista tinctoria* pěstovaných na různém médiu, ozářených vlnovou délkou 254 nm nebo 366 nm, s různou dobou odběru po ozáření



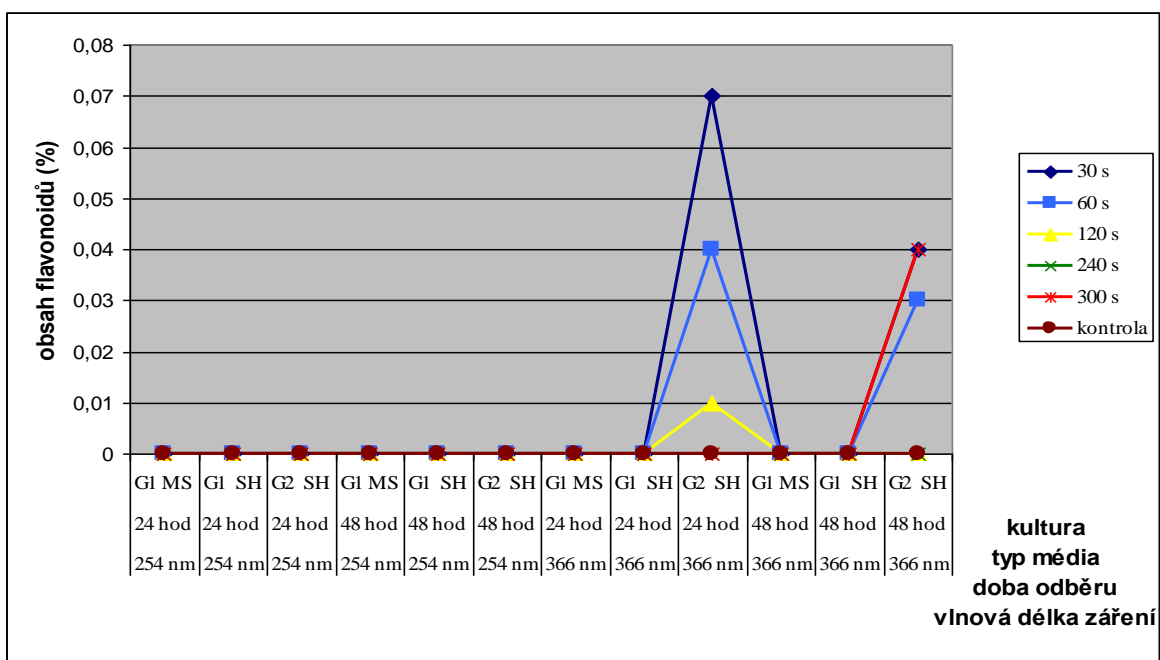
Graf č. 16

Obsah genisteinu v různých kalusových kulturách *Genista tinctoria* pěstovaných na různém médiu, ozářených vlnovou délkou 254 nm nebo 366 nm, s různou dobou odběru po ozáření



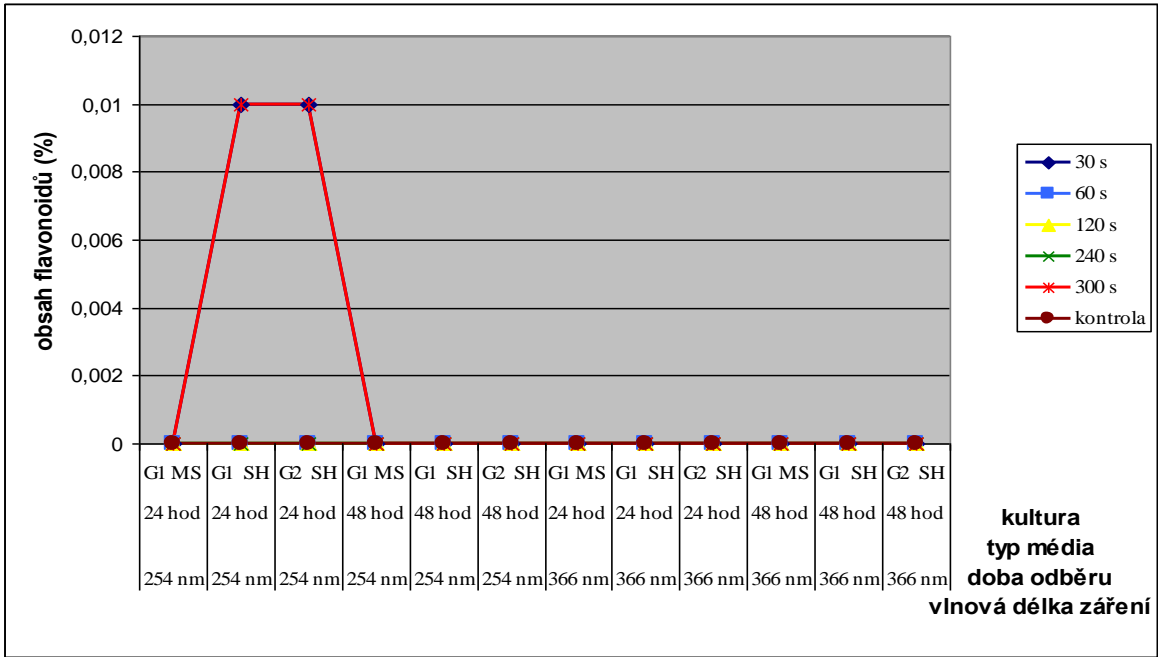
Graf č. 17

Obsah formononetinu v různých kulturách *Genista tinctoria* in vitro pěstovaných na různém médiu, ozářených vlnovou délkou 254 nm nebo 366 nm, s různou dobou odběru po ozáření

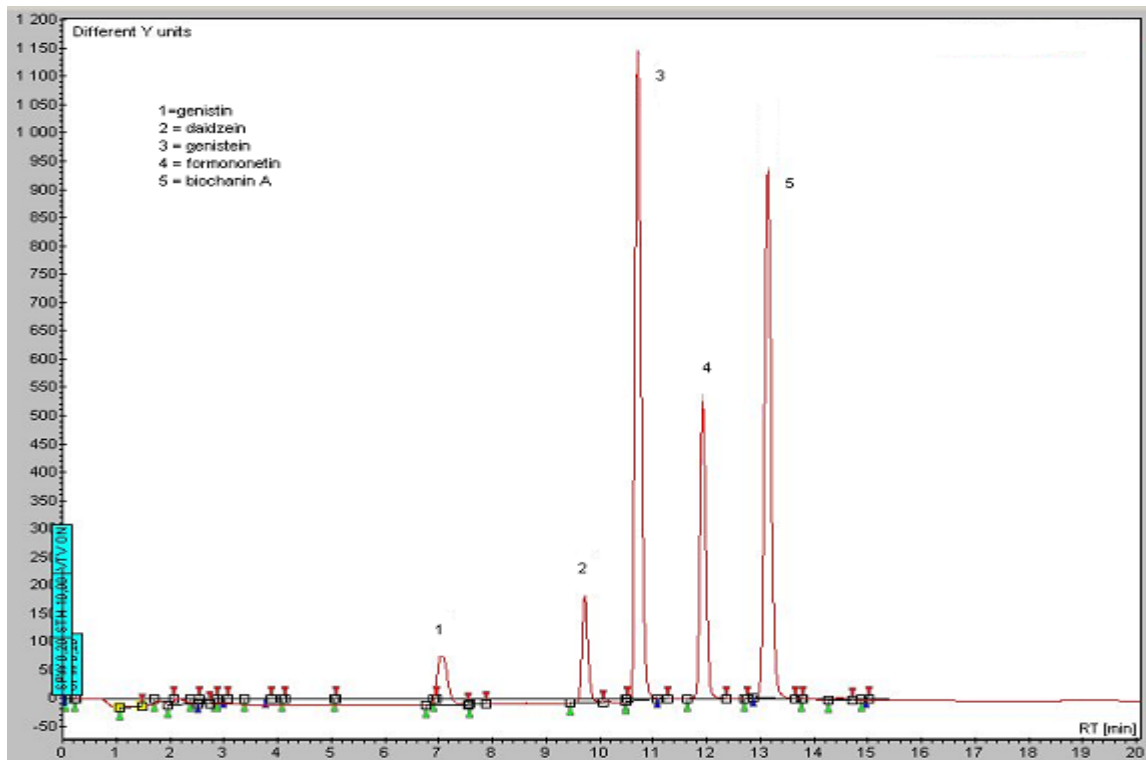


Graf č. 18

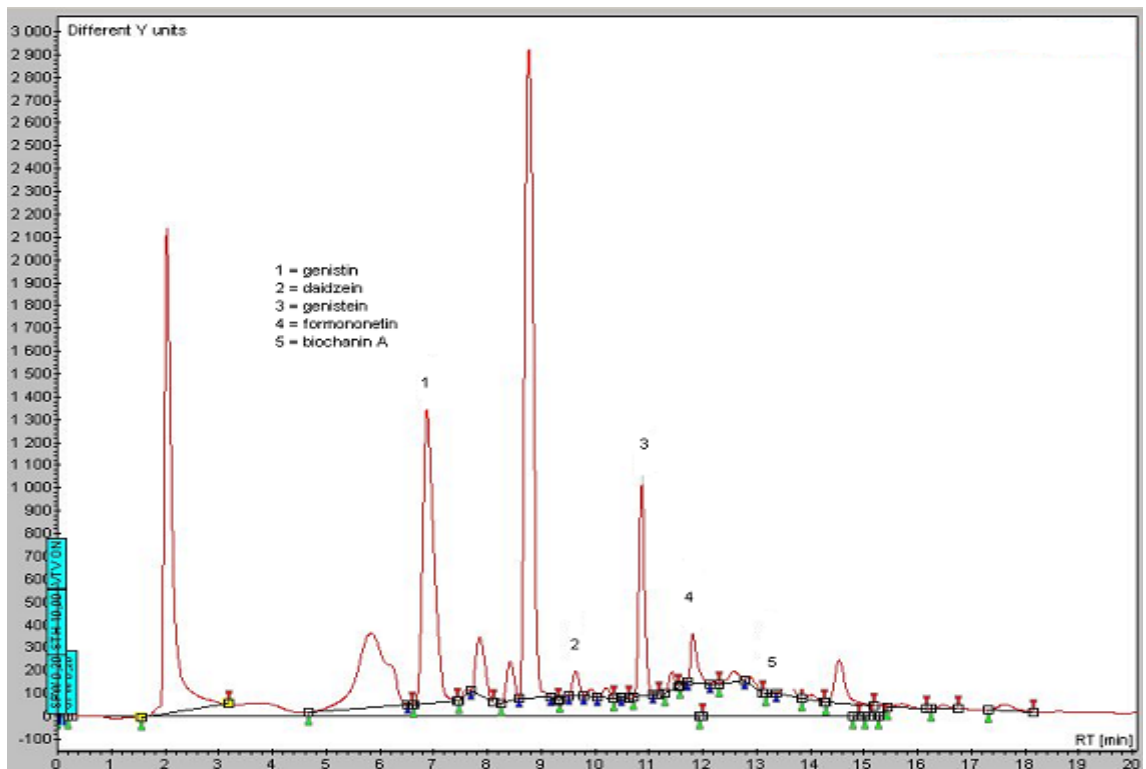
Obsah biochaninu A v různých kalusových kulturách *Genista tinctoria* pěstovaných na různém médiu, ozářených vlnovou délkou 254 nm nebo 366 nm, s různou dobou odběru po ozáření



Stanovení obsahu isoflavonoidů v kalusové kultuře *Genista tinctoria*



Obr. 8 Záznam HPLC analýzy standardů



Obr. 9: Záznam HPLC analýzy kultury G_2 rostoucí na SH médiu po UV ozařování o vlnové délce 366 nm po 120 s a odběrem provedeným po 48 hod. od ozaření.

6. Diskuze

Cílem mé práce bylo seznámení se s metodikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále také sledování vlivu UV záření, jakožto abiotického elicitoru, na produkci flavonoidů v kultuře *Genista tinctoria in vitro*.

Při kultivaci rostlinných kultur *in vitro* je nutné zajistit pro jejich růst optimální podmínky. Jedná se o složení živného média, přítomnost růstových regulátorů, ale také vliv světla, teploty a dodržování aseptických podmínek. Část kalusů kultury G₁ (15. – 22. pasáž) byla pěstována médiu Murashigeho a Skooga. K této půdě byl přidán růstový regulátor kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová v koncentraci 1 mg/l. Kalusy kultury G₂ (3.-15. pasáž) a část kalusů kultury G₁ (23. – 31. pasáž) rostly na půdě sestavené dle Schenk a Hildebrandta. K této půdě byla přidána kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová v koncentraci 0,5 mg/l a kinetin v koncentraci 0,1 mg/l.

UV záření stimuluje tvorbu flavonoidů a ty pak chrání rostlinu před fotooxidačním poškozením. Vliv UV záření byl sledován např. u kalusové kultury *Ononis arvensis*, kdy byly kalusy vystaveny UV záření o vlnové délce 254 nm a 366 nm po dobu 15 min, 30 min a 60 min a vzorky byly odebírány v intervalu 24 hod a 48 hod po ozáření. K významnému zvýšení obsahu flavonoidů došlo při ozáření UV světlem o vlnové délce 254 nm po dobu 15 min a 30 min při obou intervalech odběru a při ozáření UV světlem o vlnové délce 366 nm po dobu 15 min a 60 min (odběr po 48 hodinách). (3)

UV záření stimulovalo také tvorbu kumarinů u kalusové kultury *Glycyrrhiza glabra*. Vliv UV radiace na produkci umbeliferonu a herniarinu v buňkách kultury byl signifikantní po elicitaci UV zářením o vlnové délce 254 nm po dobu 30 min a u odběrů po 12, 48 a 168 hodinách. (46)

Ke zvýšení tvorby flavolignanů u kalusové kultury *Silybum marianum* bylo také použito UV záření. Po elicitaci UV zářením ale nebyla detekována žádná ze složek silymarinového komplexu. (46)

Kalusová kultura *Genista tinctoria* (3.-11. pasáž) rostoucí na MS médiu s přidavkem 2,4-D jako růstového regulátoru produkovala nedetekovatelné množství isoflavonoidů. (35) V kontrolní skupině, která nebyla vystavena vlivu UV záření také nebyly zaznamenány žádné isoflavonoidy. U kalusové kultury G₁ pěstované na MS médiu byly po elicitaci UV zářením

zaznamenány pouze isoflavonoidy genistin, daidzein a v minimálním zastoupení genistein, ostatní isoflavonoidy se vyskytovaly v nedetekovatelných množstvích. Obsah genistinu v buňkách byl zvýšen po elicitaci UV zářením o vlnové délce 254 nm po dobu 240 s s odběrem provedeným po 48 hod (tab. č. 5, graf č. 3). Kultura obsahovala 0,04 % genistinu. Další zvýšení obsahu genistinu bylo pozorováno také po 120 s a 300 s působení UV záření 254 nm u odběru po 24 hodinách (0,03 %, tab. č. 4, graf č. 2). Ke zvýšení obsahu daidzeinu došlo po ozáření UV 254 nm po dobu 120 s a 240 s (odběr po 24 hod po elicitaci, tab. č. 4, graf č. 2), 60 s a 240 s (odběr po 48 hod po elicitaci, tab. č. 5, graf č. 3), po ozáření UV zářením o vlnové délce 366 nm po dobu 240 s (odběr po 24 hod po elicitaci, tab. č. 6, graf č. 4) a 120 s (odběr po 48 hod po elicitaci, tab. č. 7, graf č. 5). Ve všech případech se jednalo o obsah 0,02 % daidzeinu v kalusové kultuře. Produkce genistinu a daidzeinu byla vyrovnaná.

Kontrolní skupina kalusové kultury G_1 rostoucí na SH médiu obsahovala pouze minimální množství daidzeinu. Obsah ostatních isoflavonoidů byl pod hranicí detekovatelnosti. Po ozáření byly detekovány isoflavonoidy genistin, daidzein a v minimálním zastoupení genistein a biochanin A, množství formononetinu bylo nedetekovatelné. Obsah genistinu byl signifikantně zvýšen po ozáření UV zářením o vlnové délce 254 nm po dobu 240 s s odběrem po 24 hod (tab. č. 8, graf č. 6). Obsah genistinu byl 0,07 %, což je o 1,75 krát více než u kultury G_1 pěstované na MS médiu. Mírnější zvýšení obsahu bylo pozorováno také za stejných podmínek u odběru po 48 hod (0,03 % genistinu, což je 1,3 krát méně než u kultury G_1 pěstované na MS médiu, tab. č. 9, graf č. 7) a po elicitaci UV zářením 366 nm po dobu 30 s a odběrem po 48 hod (0,04 % genistinu, tab. č. 11, graf č. 9). K nejvýraznějšímu zvýšení obsahu daidzeinu došlo po působení UV záření o vlnové délce 254 nm po dobu 300 s (odběr po 48 hod po elicitaci, tab. č. 9, graf č. 8). Daidzein byl v kultuře *in vitro* zastoupen z 0,09 %. Toto množství je 4,5 krát vyšší než u kultury G_1 pěstované na MS médiu. U kalusové kultury G_1 pěstované na SH médiu byla pozorována vyšší produkce daidzeinu než genistinu.

U nově odvozené kalusové kultury G_2 , která rostla SH médiu, se zastoupení jednotlivých isoflavonoidů měnilo v závislosti na vlnové délce UV záření, která byla použita při elicitaci. U neelicitované kultury (kontrola) byl zaznamenán pouze obsah genistinu a genisteinu. Při elicitaci UV zářením o vlnové délce 254 nm byly detekovány především isoflavonoidy genistin a genistein, daidzein a biochanin A v nepatrném množství a formononetin nebyl produkován. Zatímco při působení UV o vlnové délce 366 nm byl detekován genistin, genistein a formononetin, daidzein v nepatrném množství a biochanin A v množství

nedetekovatelném. Maximální obsah genistinu byl zjištěn po ozáření UV zářením o vlnové délce 254 nm po dobu 300 s (odběr po 48 hod, tab. č. 13, graf č. 11). Obsah genistinu byl 3,03 %, což je téměř 76 krát více než u kultury G₁ pěstované na MS médiu. Významného zvýšení obsahu genistinu bylo také dosaženo po elicitaci UV zářením o vlnové délce 366 nm po dobu 120 s (2,06 % genistinu – 51,5 krát více než u kultury G₁ pěstované na MS médiu, odběr po 48 hod, tab. č. 15, graf č. 13). Nejvyšší obsah daidzeinu byl detekován po působení UV záření o vlnové délce 366 nm po 30 s a s odběrem provedeným po 24 hod (0,05 %, což je 2,5 krát více než u kultury G₁ pěstované na MS médiu, tab. č. 14, graf č. 12). Ke zvýšení obsahu genisteinu došlo po působení UV záření o vlnové délce 254 po dobu 30 s a 240 s a odběru po 24 hodinách po elicitaci (0,16 % a 0,17 % genisteinu, tab. č. 12, graf č. 10). Nejvyšší produkce formononetinu bylo dosaženo po elicitaci UV zářením 366 nm po dobu 30 s a odběrem po 24 hod od ozáření (0,07 % formononetinu, tab. č. 14, graf č. 12). Kalusová kultura G₂ rostoucí na SH médiu produkovala nejvíce genistin.

Z výsledků vyplývá, že kalusová kultura G₁ produkuje méně isoflavonoidů než nově odvozená kultura G₂. Důvodem by mohl být počáteční růst kultury G₁ na MS médiu s nevhodným růstovým regulátorem. Šárková ve své práci při tvorbě růstové a produkční charakteristiky zjistila, že kalusová kultura G₁ dosahuje maximálního růstu a produkce isoflavonoidů při použití růstového regulátoru 6-benzylaminopurinu (BAP) o koncentraci 0,1 mg/l za normálního světelného režimu. (35) Dalším důvodem by mohla být i vyčerpanost kultury G₁ dlouhodobým pasážováním. Další pokusy byly prováděny s kalusovou kulturou G₂, která byla pěstována na SH médiu. U tohoto média, jak uvádí ve své studii i Łuczkiwicz, se dosahuje při kultivaci nejlepších výsledků z hlediska růstu a produkce. (26)

V intaktní rostlině byla stanovena přítomnost daidzeinu, genisteinu a biochaninu A. V kalusové kultuře bylo po elicitaci prokázáno všech pět stanovovaných isoflavonoidů. Dostupná literatura se o výskytu formononetinu v intaktní rostlině, v *in vitro* kultuře ani v elicitované kultuře nezmiňuje. Produkce isoflavonoidů v kalusové kultuře byla vyšší než v intaktní rostlině, která produkovala 0 % genistinu, 0,12 % daidzeinu, 0,01 % genisteinu, 0 % formononetinu a 0,02 % biochaninu A (35). Čímž se potvrdilo Łuczkiwiczovo zjištění, že kalusová kultura produkuje vyšší množství isoflavonoidů než intaktní rostlina. (26) Výjimkou byl biochanin A, jehož množství v intaktní rostlině bylo vyšší než v kultuře *in vitro*.

7. Závěr

Výsledky práce lze shrnout následovně:

- U kalusové kultury G_1 pěstované na MS médiu bylo zaznamenáno zvýšení obsahu genistinu po elicitaci UV zářením o vlnové délce 254 nm po dobu 240 s s odběrem provedeným po 48 hod a také při ozáření 120 s a 300s u odběru po 24 hodinách od ozáření. Ke zvýšení obsahu daidzeinu došlo po UV ozáření o vlnové délce 254 nm po dobu 120 s a 240 s (odběr po 24 hod po elicitaci), 60 s a 240 s (odběr po 48 hod po elicitaci), po ozáření UV zářením o vlnové délce 366 nm po dobu 240 s (odběr po 24 hod po elicitaci) a 120 s (odběr po 48 hod po elicitaci). Produkce genistinu a daidzeinu byla vyrovnaná.
- U kalusové kultury G_1 rostoucí na SH médiu byl obsah genistinu signifikantně zvýšen po ozáření UV zářením o vlnové délce po dobu 240 s s odběrem po 24 hod. Mírnější zvýšení obsahu bylo pozorováno také za stejných podmínek u odběru po 48 hod a po elicitaci UV zářením 366 nm po dobu 30 s a odběrem po 48 hod. Nejvýraznější zvýšení obsahu daidzeinu nastalo po UV ozáření o vlnové délce 254 nm po dobu 300 s

(odběr po 48 hod po elicítaci). U kalusové kultury G₁ pěstované na SH médiu byla prokázána vyšší produkce daidzeinu než genistinu.

- U nově odvozené kalusové kultury G₂, která rostla SH médiu, dosáhl genistin maximálního obsahu po působení UV zářením o vlnové délce 254 nm po dobu 300 s (odběr po 48 hod), významného zvýšení bylo také dosaženo po elicítaci UV zářením o vlnové délce 366 nm po dobu 120 s (odběr po 48 hod). Ke zvýšení obsahu genisteinu došlo vlivem UV záření o vlnové délce 254 po dobu 30 s a 240 s s dobou odběru 24 hodin po elicítaci. Formononetin dosáhl nejvyššího obsahu po elicítaci UV zářením 366 nm po dobu 30 s a odběrem po 24 hod od ozáření. Kalusová kultura G₂ rostoucí na SH médiu produkovala nejvíce genistin.

8. Použitá literatura

1. Pavlová L.: Fyziologie rostlin. Karolinum Praha, 2005, 10
2. Bremnessová L.: Užitkové rostliny. Euromedia Group, k. s.-Ikar Praha, 2005, 26-29, 104
3. Psotová R.: Vliv elicítovaných kultur na produkci sekundárních metabolitů – IV.(diplomová práce), UK, FaF, Hradec Králové, 1996
4. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum Praha, 2001, 75-83, 3. vydání
5. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum Praha, 1992, 84-94, 2. vydání
6. Sudha G., Ravishankar G. A.: Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71 (3) 2002, 181-212
7. Flors C., Nonell S.: Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: Phototoxic phenalenone phytoalexins, *Accounts of Chemical Research* 39 (5) 2006, 293-300
8. Vasconsuelo A., Boland R.: Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants, *Plant Science* 172 (5) 2007, 861-875

9. Franklin K. A., Lerner V. S., Whitelam G.C.: The signal transducing photoreceptors of plants, *International Journal of Developmental Biology* 49 (5-6) 2005, 653-664
10. http://cs.wikipedia.org/wiki/Ultrafialov%C3%A9_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD, 8.1.2008
11. Broshe M., Strid A.: Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants, *Physiologia Plantarum* 117 (1) 2003, 1-10
12. Yoshihara R., Imaki T., Hori M., Watanabe C., Yamamoto K. et al: CPD photolyase gene from *Spinacia Oleracea*: repair of UV-damaged DNA and expression in plant organs, *Journal of Radiation Research* 46 (2) 2005, 157-164
13. Li S.S., Wang Y., Bjorn L.O.: Effects of temperature on UV – B – induced DNA damage and photorepair in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Environmental Sciences – China* 16 (1) 2004, 173-176
14. Hall R.S.B., Paulusson M., Duncan K., Tobin A.K., et al: Water- and temperature-dependence of DNA damage and repair in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp *mitis* exposed to UV-B-radiation, *Physiologia Plantarum* 118 (3) 2003, 371-379
15. Britt A.B.: Repair of DNA damage induced by solar UV, *Photosynthesis Research* 81 (2) 2004, 105-112
16. Kimura S., Tahita Y., Ishibashi T., Mori Y., Mori T. et al: DNA repair in higher plants; photoreactivation is the major DNA repair pathway in non-proliferating cells while excision repair (nucleotide excision repair and base excision repair) is active in proliferating cells, *Nucleic Acids Research* 32 (9) 2004, 2760-2767
17. Carletti P., Masi A., Wonisch A., Grill D., Tausz M., Ferretti M.: Changes in antioxidant and pigment pool dimensions in UV – B irradiated maize seedlings, *Environmental and Experimental Botany* 50 (2) 2003, 149-157
18. Jaakola L., Maatta-Riihinen K., Karenlampi S., Hohtola A.: Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, *Planta* 218 (5) 2004, 721-728
19. <http://kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=64>, 17.12.2007
20. http://rosliny.prirodou.cz/?nazvy=cs&rostlina=genista_tinctoria, 17.12.2007
21. <http://botany.cz/cs/genista-tinctoria/>, 17.12.2007
22. <http://faf.vfu.cz/html/index2.html>, 8.1.2008
23. Janča J., Zentrich J. A.: *Herbář léčivých rostlin 2. díl*, Eminent Praha 1995, 264-267
24. Łuczkiwicz M., Migas P., Kokotkiewicz A., Walijewska M., Cisowski W.: Two-dimensional TLC with absorbent gradient for separation of quinolizidine alkaloids in

- the herb and in-vitro cultures of several *Genista* species, *Journal of Planar Chromatography* 17 (2) 2004, 89-94
25. Spilková J.: Flavonoidy a jejich uplatnění v terapii, *Časopis českých lékárníků* 8, 2001, 18-20
 26. Łuczkiwicz M., Głód D.: Callus cultures of *Genista* plants-in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity, *Plant Science* 165, 2003, 1101-1108
 27. Rauter A.P., Martins A., Borges C., Ferreira J. et al: Liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of *Genista tenera* structure elucidation of flavonoid-C-glycoside, *Journal of Chromatography A* 1089 (1-2), 2005, 59-64
 28. Ososki A. L., Kennely E.J.: Phytoestrogens: A review of the present state of research, *Phytotherapy research* 17, 2003, 845-869
 29. Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology* 15, 1962, 473
 30. Plant cell and tissue culture media, Catalogue 2003 – 2005, Duclea Biochemie B.V.,
 31. Xu Y.C., Leung S.W.S., Yeung D.K.Y., Hu L.H. et al: Structure–activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery, *Phytochemistry* 66 (8), 2007, 1179-1188
 32. Jefferson W.N., Padilla-Banks E., Newbold R.R.: Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein, *Reproductive Toxicology* 23 (3), 2007, 308-316
 33. Dixon R.A., Ferreira D.: Genistein, *Phytochemistry* 63 (22), 2002, 205-211
 34. Choi E.J., Kim T., Lee M.-S.: Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer SK-OV-3 cells, *Life Sciences* 80 (15), 2007, 1403-1408
 35. Šárková T.: Růstové a produkční charakteristiky kultury *Genista tinctoria in vitro* – I. (diplomová práce), Univerzita Karlova, fakulta farmaceutická, Hradec Králové, 2006
 36. Jahodář L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Karolinum Praha, 2000, 35-40, 2. vydání
 37. www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/docs/Compound/2-3-1_Flavonoidy%20ss.pdf, 21.2.2008
 38. www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/docs/Compound/2-3-2_Isoflavonoidy.pdf, 21.2.2008

39. Hubík J. a kol.: Obecná farmakognozie II. sekundární látky, Univerzita Karlova, Praha, 1989, 31-34
40. Mahdhi M., Nzoue A., et al.: Phenotypic and genotypic diversity of *Genista saharae* microsymbionts from the infra-arid region of Tunisia, Letters in Applied Mikrobiology 45 (6), 2007, 604-609
41. Padilla F.M., Miranda J.D., Pugnaire F.I.: Early root growth plasticity in seedlings of three Mediterranean woody species, Plant and Soil 296 (1-2), 2007, 103-113
42. Conti F.: Morphometric study and taxonomy of *Genista pulchella* Vis. s. l. (Fabaceae), a south European species, Botanical Journal of the Linnean Society 153, 2007, 245-254
43. Reisenauer R.: Metody matematické statistiky a jejich aplikace v technice, SNTL, 1970, 77-82, 207, 212
44. Edwards E.L., Rodrigues J.A., et al.: Capillary electrophoresis-mass spektrometry characterisation of secondary metabolites from the antihyperglycaemic plant *Genista tenera*, Electrophoresis 27 (11), 2006, 2164-2170
45. Weber S.: Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics 1707 (1), 2005, 1-23
46. Řimáková J.: Možnosti ovlivnění produkce sekundárních metabolitů kulturami léčivých rostlin *in vitro* (disertační práce), Univerzita Karlova, fakulta farmaceutická, Hradec Králové, 2005, 120-123, 130-133
47. Boumaza O., Mekkou R., et al: Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata*, Chemistry of Natural Compounds 42 (6), 2006
48. Erdemoglu N., Tosun F., Eroglu Y.: LC-MS analysis of daidzein in the Turkish *Genista* species, Chemistry of Natural Compounds 42 (5), 2006
49. de Rijke E., Joski H.C. et al: Natively fluorescent isoflavones exhibiting anomalous Stokes' shifts, Analytica chimica acta, 468 (1), 2002, 3-11