

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognozie

Tereza ŠÁRKOVÁ

Růstové a produkční charakteristiky kultury *Genista tinctoria in vitro* – I.

Diplomová práce

Zadáno dne: 29.10.2004

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

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

Datum odevzdání: 15.5.2006

Oponent: Mgr. Jan Martin

Obhajoba: 6.6.2006

Počet stran: 75

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Růstové a produkční charakteristiky kultury *Genista tinctoria in vitro*“ vypracovala samostatně a s použitím pramenů uvedených v diplomové práci.

Yakov

Děkuji Doc. PharmDr. Lence Tůmové, Csc. za odborné vedení a pomoc při vypracování této práce, Mgr. Janu Martinovi za překonání technických obtíží s analyzátozem HPLC, kolektivu katedry farmakognozie Farmaceutické fakulty UK za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

1.	Úvod.....	5
2.	Cíl práce.....	8
3.	Teoretická část.....	9
3.1.	Rostlinné kultury <i>in vitro</i>	9
3.1.1.	Rostlinné explantáty.....	9
3.1.2.	Rozdělení kultur rostlinných explantátů.....	9
3.1.3.	Vlastnosti kultur rostlinných explantátů.....	10
3.1.4.	Faktory ovlivňující růst tkáňových kultur a produkci sekundárních metabolitů.....	10
3.1.5.	Fáze růstu kultury.....	13
3.1.6.	Produkce sekundárních metabolitů kulturami rostlinných buněk <i>in vitro</i>	13
3.2.	Růstové regulátory.....	14
3.2.1.	Auxiny.....	15
3.2.2.	Cytokininy.....	16
3.2.3.	Gibereliny.....	16
3.2.4.	Ostatní růstové regulátory.....	16
3.3.	<i>Genista tinctoria</i>	17
3.3.1.	Charakteristika.....	17
3.3.2.	Droga.....	18
3.3.3.	Obsahové látky.....	18
3.3.4.	Izolace a stanovení obsahových látek <i>Genista tinctoria</i>	24
3.3.5.	<i>Genista tinctoria in vitro</i>	26
4.	Experimentální část.....	29
4.1.	Rostlinný materiál.....	29
4.2.	Přístroje a vybavení.....	29
4.3.	Chemikálie a pomocné látky.....	29
4.4.	Kultivace tkáňových kultur.....	31
4.4.1.	Příprava kultivačních nádob a nástrojů.....	31
4.4.2.	Složení a příprava živného media.....	31
4.4.3.	Odvození kultury.....	32
4.4.4.	Pasážování a kultivace.....	33
4.5.	Hodnocení růstu.....	34
4.6.	Ztráta sušením.....	34
4.7.	Stanovení obsahu flavonoidů.....	35
4.7.1.	Příprava vzorků:.....	35
4.7.2.	Parametry HPLC analýzy.....	35
4.8.	Sestrojení kalibrační křivky.....	36
4.9.	Růstová a produkční charakteristika.....	40
5.	Výsledky.....	42
Růstová a produkční charakteristika.....	55	
6.	Diskuze.....	64
7.	Závěr.....	69
8.	Literatura.....	70
9.	Příloha.....	74

1. Úvod

Rychlý rozvoj technik explantátových kultur dosáhl takové úrovně, že je možno seriózně hodnotit jejich biotechnologické aplikace pro výrobu farmaceuticky důležitých produktů. Řada rostlinných látek je pro člověka nenahraditelná jako farmaka a požadavky na tyto látky rychle stoupají. Proto kromě zemědělské produkce jsou středem zájmu jiné alternativní zdroje. (1)

Rostliny musíme stále ještě považovat za dosud málo prozkoumanou zásobárnu farmaceutických látek. Další využití explantátových kultur spočívá v rozmnožování a šlechtění rostlin. (1)

Mezi využitelné produkty biomasy získané pěstováním explantátových kultur patří enzymy, aminokyseliny a především sekundární metabolity (alkaloidy, terpeny, barviva a aroma apod.)

Ve srovnání se získáním těchto látek z intaktních rostlin má jejich produkce rostlinnými buňkami pěstovanými *in vitro* některé přednosti:

1. užitečné sloučeniny mohou být produkovány za řízených podmínek nezávisle na půdním fondu a klimatických změnách.
2. Kultivované buňky jsou prosté mikroorganismů i hmyzu, které napadají rostliny.
3. Mohou být pěstovány buňky rostlin libovolného původu, a to kontinuálně po celý rok.
4. Ke zvýšení produkce žádaných látek lze využít metod selekce na buněčné úrovni.
5. Získaný materiál dosahuje uniformity, jaké nelze v přírodních podmínkách nikdy dosáhnout.
6. Kultury buněk se v rostlině nevyskytují. (2)

Nevýhodou rostlinných explantátů je zatím nerentabilita, protože produkce sekundárních metabolitů bývá nižší než v intaktní rostlině.

Výzkum v oblasti rostlinných explantátů využívaných pro farmaceutické účely je proto zaměřen na dosažení optimálního růstu kultury a vysoké produkce specifických metabolitů. Je třeba co nejvíce optimalizovat kultivační podmínky buněk, které ovlivňují růst a biosyntézu sekundárních metabolitů. (1)

Seznam zkratek

2,4 D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
ACN	acetonitril
AcOH	kyselina octová
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BAP	6-benzylaminopurin
BIOA	biochanin A
CE	kapilární elektroforéza
DAD	diode array detection
DAID	daidzein
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DW	hmotnost sušiny
ED	elektrochemická detekce
FORM	formononetin
Fw	čerstvá hmotnost kalusu po 4 týdnech kultivace
Fwo	čerstvá hmotnost inokula
GC	plynová chromatografie
GEN	genistenin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
K	kinetin
MCPA	kyselina 2-methyl-4-chlorfenoxyoctová
MeOH	methanol
MS médium	živné médium podle Murashigeho a Skooga
MS	hmotností spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonanční spektroskopie
NO	režim neustálého osvětlení 100 W 1 m nad kalusem
NR	světelný režim s normální fotoperiodou (16 h světlo, 8 h tma)
PAA	kyselina fenylloctová
PVP	polyvinyl pyrrolidon

R	růstový faktor
RNA	kyselina ribonukleová
RVS	respirační syncytiální virus
SH	živné médium podle Schenk a Hildebrandt
SPE	extrakce v pevné fázi
TFA	kyselina trifluor octová
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMA	světelný režim neustálého zatemnění
UV	detekce absorpcí v ultrafialové oblasti spektra
α -NAA	kyselina α -naftyloctová
dicamba	kyselina 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová

2. Cíl práce

Cílem práce bylo seznámení se s metodikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále založení kalusové kultury *Genista tinctoria* a odvození růstové charakteristiky této kultury při růstu na médiu s obsahem různých růstových regulátorů při zvolených koncentracích. Zároveň byly stanoveny obsahové látky metodou HPLC.

3. Teoretická část

3.1. Rostlinné kultury in vitro

3.1.1. Rostlinné explantáty

Jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných orgánů vyňatých z rostlin, jejich částí, meristemických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. (1)

Kultivací *in vitro* se rozumí pěstování v podmínkách co nejúplněji definovatelných po stránce chemické i fyzikální a zabráňujících nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organismy a buňkami. (3)

3.1.2. 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 není obalen pevnou buněčnou stěnou, ale pružnou elastickou plasmolemou. (3)

3.1.3. Vlastnosti kultur rostlinných expantátů

Za základní vlastnosti rostlinných expantátů jsou považovány tyto znaky:

- možnost odvození kultury z buňky (až na výjimky – buňky sítkovic, tracheid a sklereidů) nebo komplexu buněk pletiva kteréhokoliv orgánu rostlinného těla,
- pěstování kultury *in vitro* za vhodných kultivačních podmínek neomezeně dlouho,
- dediferenciace, tj. ztráta původního morfologického a fyziologického charakteru, přesto však se kultura nestává homogenní, neboť obsahuje buňky různého stupně diference,
- schopnost trvalého růstu na plně syntetických půdách,
- schopnost dorůstání explantovaných orgánů v kultuře *in vitro*.

3.1.4. Faktory ovlivňující růst tkáňových kultur a produkci sekundárních metabolitů

Složení živného média

Složení živného média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin. (4)

Složky živných půd se podle množství v půdě resp. svého charakteru či fyziologických účinků rozdělují do následujících skupin: směs anorganických makroprvků, směs anorganických mikroprvků, zdroje organického uhlíku, vitaminy a bios faktory, nedefinované směsi přírodních látek a růstové faktory. (3)

Směs anorganických makroprvků = makroelementy

Makroelementy jsou biogenní prvky nezbytné pro růst intaktních rostlin. Jejich kvantitativní zastoupení v médiu je větší než 30 mg/l. Jedná se o dusík, síru, fosfor, hořčík, vápník, chlór a draslík. Ionty se do živného média přidávají ve formě solí. (3)

Směs anorganických mikroprvků = mikroelementy

K esenciálním mikroelementům patří: železo, bor, mangan, jod a molybden. V mnoha případech jsou nepostradatelné měď a zinek. Význam niklu, kobaltu a hliníku pro růst kultivovaných rostlinných tkání je zatím sporný. (3)

Zdroje organického uhlíku

Rostlinné tkáně kultivované *in vitro* jsou schopné využívat uhlík jako základní stavební jednotku pro nově vznikající tkáň z cukrů, alkoholů a organických kyselin.

Pro většinu rostlinných tkáňových kultur se jako nejlepší zdroj uhlíku osvědčila sacharosa v koncentraci 2 – 5%. (3)

Vitaminy a bios faktory

Většina tkáňových kultur je schopna syntetizovat vitamíny, ale v nedostatečném množství. Proto dodání vitamínů může mít zásadní vliv na růst kultury. Největší význam mají vitamíny skupiny B, vitamin C a kyselina nikotinová. Mezi bios faktory se počítá Myo-inositol a biotin. (3)

Nedefinované směsi přírodních látek

Růst explantátových kultur se dá stimulovat přidáním různých organických extraktů. Mezi nejznámější patří kokosové mléko, extrakty z koňského kaštanu, extrakty z pšenice, extrakty z kvasnic. Nejčastěji se používá hydrolyzát kaseinu a pepton. V současné době se dává přednost definovaným kombinacím látek. (3)

Látky používané pro zpevnění média

Kalusovou kulturu je možné pěstovat na pevné živné půdě – živná půda s přísadkou agaru. Kalus tak roste na povrchu půdy. U tekutého živného média roste kalus na kotech z filtračního papíru. (4)

Růstové regulátory

Jsou zpracovány v samostatné kapitole.

Fyzikální podmínky kultivace

Je nutné volit takové fyzikální podmínky, které umožní optimální růst explantátových kultur.

Mezi fyzikální faktory řadíme teplotu, světlo a pH živného média.

Teplota

Kultivační teplota je jedním z faktorů, který ovlivňuje průběh kultivace tkáňových kultur. Teplotní optima metabolických reakcí leží většinou při 28 °C. Teplota kultivace byla empiricky zvolena v těsném rozmezí kolem 25 °C. Její hodnota má vliv na dobu zdvojení počtu buněk a její zvýšení může indukovat organogenezi. (3)

Na začátku pěstování je vhodnější kulturu vystavit nižším teplotám, které zabezpečují zvýšení životaschopnosti rostlinných explantátů a snižují možnost šíření infekcí. (5)

Světlo

Světlo má vliv na intenzitu biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů v tkáňové kultuře, což je v mnoha případech spojeno s anatomickou diferenciací. Světlo může být také induktorem biosyntetických pochodů např. syntézy flavonoidů v buňkách petržele, anthokyanů v buňkách mrkve apod.

Byl popsán i vliv různých vlnových délek světla na rostlinné kultury. Světlo může také ovlivňovat orgánovou diferenciací. (3)

pH půdy

Rostlinné tkáňové kultury nejsou tak citlivé na přesně stanovené pH jako živočišné kultury. Optimální hodnota pH živného média je závislá na typu kultury. Nejvhodnější prostředí je slabě kyselé v rozmezí pH 5,3 – 6,0. (3)

Sterilita

Zachování sterility je jednou ze základních podmínek kultivace explantátových kultur. Explantáty je nutné chránit před mikroorganismy – bakteriemi, kvasinkami a plísněmi, ve všech stupních kultivace.

Růstový cyklus buňky je obecně mnohem pomalejší než u mikroorganismů, a proto každá životaschopná spora či kvasinka rostlinnou kulturu velmi rychle přerostou. (6)

Je nezbytné sterilizovat rostlinný materiál, používaný jako explantát, kultivační média, nástroje a pomůcky používané při kultivaci. Všechny manipulace s explantátem je nutné provádět za aseptických podmínek. (4)

3.1.5. Fáze růstu kultury

Intenzita růstu kalusové kultury závisí nejen na velikosti explantátu, citlivosti buněk nebo pletiv na pěstování *in vitro*, koncentraci růstových stimulantů nebo inhibitorů ale i na dalších faktorech kultivačního prostředí.

Kalusová kultura prochází během růstu několika fázemi, které charakterizuje růstová křivka. Těchto fází růstového cyklu je pět. První fází je laterální nebo-li lag-fáze, ve které se zpomaluje růst a uskutečňuje se aktivní proces spotřeby vody a minerálních látek jako příprava na dělení buněk. Dále následuje exponenciální fáze růstu, ve které se prudce zvyšuje intenzita růstu. Třetí je fáze zpomaleného růstu, kdy se intenzita růstu zpomaluje a následuje čtvrtá fáze, která je fází stacionární. V této fázi se růst zastavuje. Poslední, tedy pátou fází, je fáze odumírání buněk, kterou charakterizuje úbytek čerstvé hmotnosti a sušiny s příznaky nekrózy.

Při průchodu buněk jednotlivými fázemi se mění nejen struktura, ale i metabolická aktivita. V lag-fázi značně narůstá počet polyribosomů a mitochondrií. V buňce se zvyšuje obsah RNA, bílkovin a také volných nukleotidů. V exponenciální fázi se snižuje obsah škrobu a volných sacharidů, často v této fázi začíná syntéza sekundárních metabolitů - fenolů, steroidů apod. (5)

3.1.6. Produkce sekundárních metabolitů kulturami rostlinných buněk *in vitro*

Sekundární metabolismus, nebo-li biosyntéza, transport, vzájemná přeměna, odbourávání, akumulace a případně exkrece značného počtu sekundárních metabolitů probíhá pouze během určitých omezených vývojových stádií organismu. Tyto procesy v intaktní rostlině podléhají složité regulaci. Jen zřídka kdy jsou sekundární metabolity tvořeny ve všech částech životního cyklu rostliny.

Kultivace kultury *in vitro* představuje pro buňky šok z poraněné tkáně a následně stres způsobený radikální změnou prostředí. Buňky kultury odmítají aktivovat stejné metabolické dráhy jako v intaktní rostlině. Metabolismus buněk *in vitro* je často změněn použitím nepřirozených růstových regulátorů, buňky jsou často utopeny v živném médiu, v prostředí s nadbytkem O₂ a bez CO₂.

Mnoho důležitých sloučenin vzniká kombinací biosyntetických drah. Také proto je složité indukovat nadprodukcí ve většině kultur, protože několik metabolických

drah musí mít současně nebo postupně změněnou regulaci. Objem produkce určité látky závisí do značné míry na přebytečných základních metabolických drah (primárního metabolismu), které jsou k dispozici. Toto biochemické soutěžení o klíčové meziprodukty nabízí částečné vysvětlení často se vyskytující nepřímé závislosti mezi růstem a produkcí. Posunutí metabolismu směrem k vyšší produkci lze dosáhnout zvýšením stupně diferenciacce buněk a snížením rychlosti růstu kultury. (6)

3.2. Růstové regulátory

Růstové regulátory jsou látky, které regulují růstové a vývojové procesy rostlin. (7)

Na základě určitých analogií s působením hormonů živočišných je pět skupin endogenních růstových regulátorů považováno za hormony. Jsou to auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová a ethylen. Mimo ně existuje v rostlinách množství látek s růstově regulační aktivitou, které mezi hormony řazeny nejsou, neboť jsou účinné ve vyšších koncentracích či neznáme dostatečně mechanismus jejich působení. Jsou to zejména brassinosteroidy, polyamidy, kyselina jasmonová, oligosachariny a velká skupina fenolických látek. (7)

Předpokládá se, že fytohormony působí jednak na úrovni genů a v určitých případech stimulací syntézy i-RNA také umožňují syntézu bílkovin enzymů, které se podílejí na metabolických a fyziologických procesech v rostlinách.

Možnosti působení hormonů se dají shrnout takto:

- Mohou působit na systémy buněčných stěn, a tak umožňovat, aby jimi pronikaly substráty a voda.
- Mohou uvolňovat vázaný substrát pro předem vytvořený enzym.
- Mohou kontrolovat koncentraci ATP a ADP.
- Mohou působit na využití iontů kovů, které mají centrální úlohu v působení mnoha enzymů.
- Mohou ovlivnit využití různých koenzymů.
- Mohou být samy koenzymy, takže vznikne spojení – hormon – protein.
- Mohou působit v mitochondriích a převážný celkový účinek se pak jeví změnou dýchání.

- Mohou ovlivňovat rovnováhu a uvolňování jiných hormonů z jejich prekurzorů.
- Mohou alostericky regulovat aktivitu enzymů.
- Mohou působit na proteosyntetický aparát, tj. na replikaci DNA, transkripci RNA nebo translaci (proteosyntézu), a to zejména na hormonální kontrolu DNA- a RNA- polymeráz nebo molekulárních depresorů. (8)

Rozlišujeme dvě základní skupiny přírodních regulátorů:

1. regulátory vznikající při metabolismu aminokyselin, mezi které patří auxiny, některé fenolové látky, ethylen a kyselina glutamová
2. regulátory odvozené od kyseliny mevalonové, které jsou tvořeny isoprenovými jednotkami - cytokininy, abscisiny, giberiliny.

Auxiny a giberiliny a cytokininy jsou stimulatory růstu. (8)

3.2.1. Auxiny

Auxin je nejlépe známým rostlinným hormonem. Jedná se v podstatě o kyselinu indolyl-3-octovou (IAA). V poslední době byly v rostlinách nalezeny ještě další auxiny: kyselina indolyl-3-máselná (IBA) a 4-chlor-IAA. Dalším přírodním auxinem je kyselina fenylloctová (PAA). Vyskytuje se řádově v nižších koncentracích a její účinnost je výrazně nižší než účinnost IAA. Při hledání látek s růstově regulační aktivitou byla nalezena řada syntetických látek s účinky podobnými účinkům IAA. Jsou nazývány syntetické auxiny. Ty jsou děleny do čtyř skupin. (7)

1. naftalenové kyseliny: α -naftylloctová kyselina (α -NAA),
2. chlorfenoxykyseliny: kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T) a 2-methyl-4-chlorfenoxyoctová (MCPA),
3. benzoové kyseliny 2,3,6- a 2,4,5-trichlorbenzoová kyselina, dicamba,
4. deriváty kyseliny pikolinové: picloram, (7)

Místem tvorby auxinů ve vyšších rostlinách jsou oblasti relativně vysoké metabolické aktivity. Jedná se především o meristémy a to jak primární (protoderm), tak i sekundární (kambium a felogen). Auxin ovlivňuje buněčnou stěnu buňky, příjem vody a metabolismus. (8)

Dále zesiluje mitotickou aktivitu pletiva, podněcuje tvorbu adventivních či postranních kořenů a cibulí, zesiluje apikální dominanci. (9)

Pro kultivaci rostlinných tkání mají hlavní význam syntetické auxiny.

3.2.2. Cytokininy

Cytokininy jsou N⁶ substituované deriváty adeninu, které hrají roli téměř ve všech aspektech růstu a vývoje rostlin. Podporují dělení buněk, jejich růst a diferenciaci, rozvoj cévnatosti, stimulují diferenciaci chloroplastů a syntézu chlorofilu, potlačují apikální dominanci (antagonistický účinek auxinů) a výrazně zpomalují proces stárnutí. (8,9,10)

Účinek regenerace orgánů je vždy ve spojení s účinky auxinů základem regeneračních procesů *in vitro*. Poměr koncentrací auxinů a cytokininů rozhoduje o tom, jak bude regenerace probíhat. Jejich vyrovnaný poměr vede většinou k tvorbě nediferencovaného pletiva, kalusu, nadbytek cytokininů vyvolává regeneraci prýtu a nadbytek auxinů regeneraci kořenů.

Cytokininy se vytvářejí ve vzrostných vrcholech kořenů a velké množství je jich v semenech i plodech. Nejdůležitější jsou 6-furfuryladenin (kinetin), 6-benzylaminopurin (BAP). (8)

3.2.3. Gibereliny

Jsou produkovány houbou *Gibberella fujikuroi*. Jsou to látky diterpenické povahy, které stimulují tvorbu hydroláz, proteáz a ribonukleáz. Vznikají v mladých listech a plodech, zvláště potom v kořenech. Charakteristickým představitelem je kyselina giberelová. Mezi hlavní fyziologické účinky giberelinů patří stimulace prodlužovacího růstu, nahrazující jarovizační požadavek některých rostlin, indukují kvetení, stimulují klíčení, brzdí tvorbu adventivních kořenů a podporují syntézu IAA. Gibereliny nepůsobí na růst bezprostředně, ale prostřednictvím zlepšení biosyntézy auxinů a snížením aktivity IAA – oxidázy. (5,7,8,9)

3.2.4. Ostatní růstové regulátory

Kyselina abscisová

Na rozdíl od předešlých třech skupin růstových regulátorů, které mají účinek spíše stimulační, je kyselina abscisová látkou inhibující růstové a vývojové procesy. Jedná se o seskviterpenickou kyselinu. (9)

Podporuje opadávání lisů a dormanci pupenů stromů. Mezi hlavní účinky patří inhibice prodlužovacího růstu, stimulace opadu, urychlení stárnutí, inhibice klíčení, regulace dormance a vodního režimu rostlin.

Kyselina abscisová je považována za důležitý faktor obrany rostlin vůči stresu tím, že redukuje nejen negativní vliv nedostatku vláhy, ale i dalších stresů, které nedostatek vody v buňce vyvolávají, jako nízká teplota, zasolení apod. Využití kyseliny abscisové je poměrně omezené. Největší využití nacházejí strukturní analoga kyseliny abscisové, kterými lze zvýšit odolnost rostlin vůči stresovým podmínkám, zejména vůči nedostatku vody a působení nízkých teplot. (7)

Ethylen

Ethylen je rostlinný hormon, který je normálním produktem metabolismu rostlin. Je to jediný dosud známý plynný hormon. Jeho koncentrace v buňce je velmi nízká, daná rozpustností v cytoplazmě. Většina ethylenu difunduje do mezibuněčných prostorů a dále průduchy do atmosféry. Ethylen inhibuje prodlužování růst a stimuluje růst radiální. Urychluje zrání plodů, stimuluje stárnutí a opad listů, květů, nahrazuje účinek IAA na udržení apikální dominance. Zvýšení tvorby ethylenu je jednou z prvních reakcí rostliny na působení stresorů např.: nedostatku i nadbytku vody, teplotních výkyvů, zasolení, poranění, napadení patogeny i toxickými látkami. (7)

3.3. *Genista tinctoria*

3.3.1. Charakteristika

Genista tinctoria - kručinka barvířská, Fabaceae, je 20 - 60 (až 200) cm vysoký polokeř rozšířený téměř po celé Evropě i Asii. Je to typická rostlina světlých lesů (doubrav), sušších luk, mezí, pastvin, slunných strání od nížin do podhorského pásma. (11,12,37)

Stonek je krátký, beztrnný, vystoupavý, brázditý, většinou lysý a hustě větvený. Listy jsou jednoduché, malé, přisedlé, střídavé, eliptické až kopinaté, špičaté, na lici tmavozelené a lysé, na rubu světlejší a brvitě se silnými postranními žilkami. Palisty jsou zakrnělé. Zlatožluté květy s lysým kalichem korunou vyrůstají v koncových

mnohokvětých hroznech. Kvete v červnu až srpnu. Plodem je malý (15 - 22 mm) rovný, lysý lusk s 6 - 10 tmavými okrouhlými semeny. (11,13) viz obr. č. 3 a 4.

Celá rostlina je jedovatá.

3.3.2. 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. (12)

Použití

V lidovém léčitelství se používá pro svůj značně močopudný účinek při chorobách ledvin a močových cest jako diuretikum. Diuretický účinek způsobují hlavně flavony a silice. Též se podává při nedostatečné srdeční činnosti a při otocích. Zrychluje střevní peristaltiku. (12,14,37)

Aplikuje se formou nálevu.

3.3.3. Obsahové látky

Rostlina obsahuje chinolizidinové alkaloidy, flavonové glykosidy, silice, třísloviny, kumariny, slizy, vedle toho také hořčiny, anthokyanidy, saponiny a další. (11,14,15,16)

Chinolizidinové alkaloidy

Chinolizidinové alkaloidy jsou charakteristické alkaloidy pro čeleď Fabaceae.

Jsou budovány z lysinu, resp. jeho metabolického ekvivalentu, kadaverinu. Lupinin vzniká ze dvou, spartein ze tří molekul tohoto prekursoru. Cytisin se považuje za štěpný produkt sparteinu. Terapeutický význam mají hlavně spartein a cytisin. (16)

V rodu *Genista* byly prokázány Luczkiewiczem tyto chinolizidinové alkaloidy: cytisin, retamin, L-isospartein, methylcytizin, spartein. V intaktní rostlině *Genista tinctoria* prokázal cytisin, retamin, spartein a L-isospartein. V kalusové kultuře *Genista tinctoria* stanovil pouze retamin a spartein. (17)

V literatuře se ještě zmiňuje obsah anagyrinu a lupaninu (16,19)

Dr. Dieter Knöfel ve své studii uvádí také nový alkaloid tinctorin. (18)

Biologická aktivita všech zmíněných alkaloidů není v literatuře podrobně popsána, zaměřím se tedy jen na hlavní představitele této skupiny alkaloidů obsažené v kalusové kultuře.

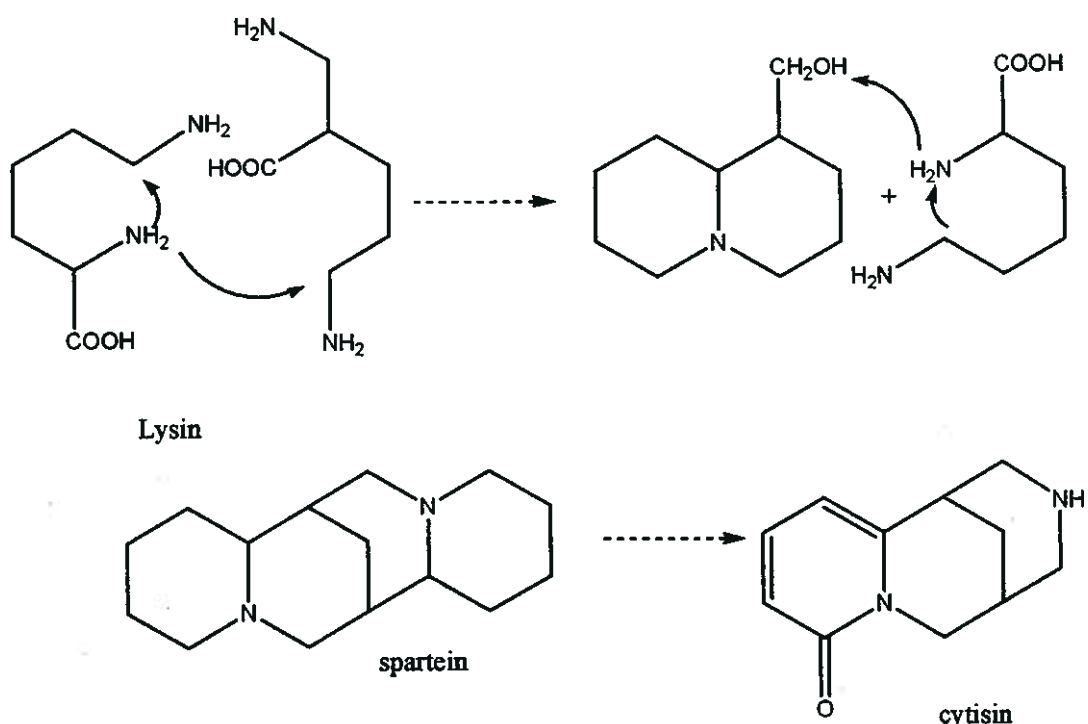
U anagyrinu se zkoumá působení na RVS (respiratory syncytial virus). (12)

Cytisin působí jako agonista na neuronálních nikotin acetylcholinových receptorech, vykazuje také analgetický účinek, antihypertenzní a inotropní působení.

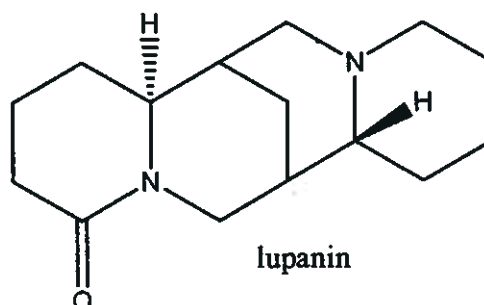
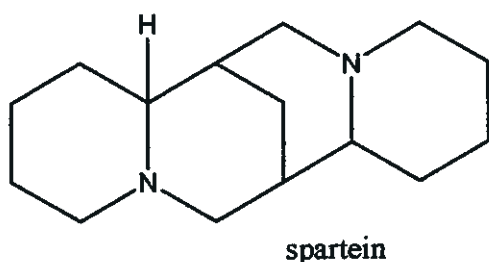
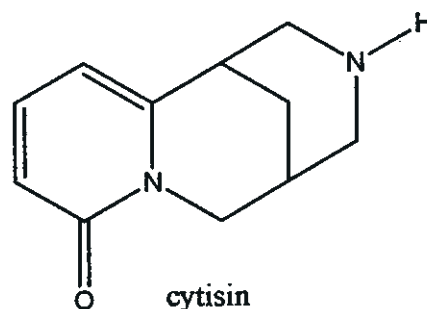
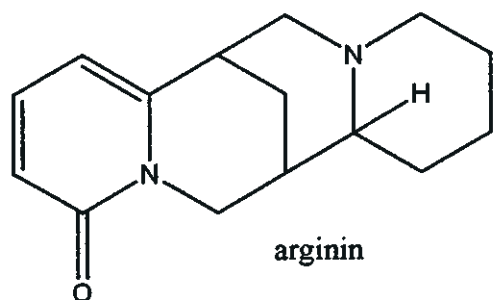
Spartein působí jako profylaktikum předsíňových dysrytmií a sinusové tachykardie.

Lupanin má baktericidní účinek na *Pseudomonas Syringae P.V. tomato*, *Pseudomonas Syringae P.U. „phaselolica“*, *Erurnia carotvora*, *Pseudomonas libida*.(12)

Schéma pravděpodobného vzniku cytisinu a sparteinu. (16)



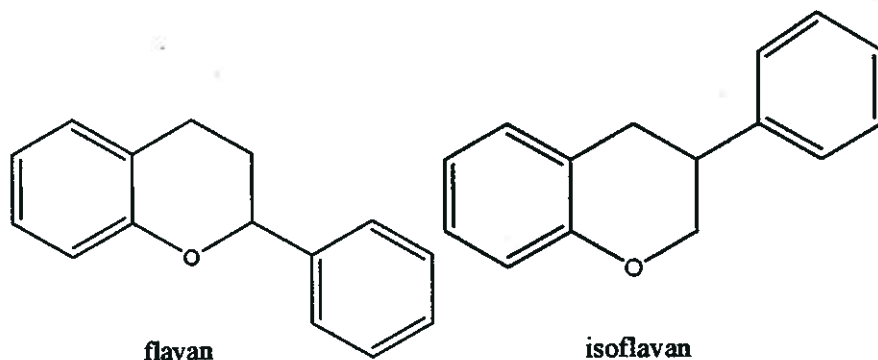
Chinolizidnové alkaloidy:

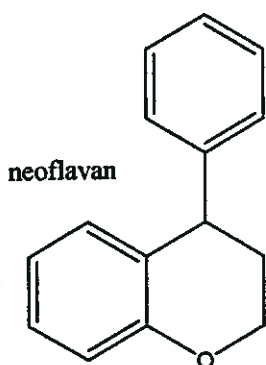


Flavonoidy

Flavonoidy jsou velmi rozsáhlou skupinou přírodních látek, dosud bylo izolováno kolem 4000 sloučenin. Termín „flavonoidy“ zahrnuje několik typů biogeneticky blízce příbuzných látek – flavony, flavanoly, flavanony, dihydroflavanoly, biflavonoidy, chalkony, aurony, anthocyaniny, katechiny, isoflavonoidy a homoisoflavonoidy. Poslední dvě skupiny jsou některými autory považovány za samostatné skupiny. (20)

Základem chemické struktury flavonoidů je fenylchroman. Flavany obsahují chromanové jádro arylované v poloze 2, isoflavany jsou substituovány v poloze 3 a neoflavany v poloze 4. (16)





Oxidací pyranového kruhu flavanů vznikají další deriváty, které se od sebe liší počtem a polohou hydroxylových skupin na aromatických kruzích, také napojením molekul cukrů nebo organických kyselin.

Flavonoidy se v rostlinách většinou vyskytují glykosidicky vázané s cukry. Tyto hydrofilní formy se zpravidla nacházejí rozpuštěné v buněčné šťávě vakuoly. Lipofilní methoxylované deriváty jsou obsaženy v silicích.

Luczkiewicz prokázal v intaktní rostlině tyto flavonoidy: genistein-7-O-glykosid, purearin, 2'-hydroxy-genistein-7-O-glykosid, genistin, genistin malonát, 3',4',7'-trihydroxyisoflavon, genistin acetát, genistein, daidzin, ononin, equol, liquiritgenin, sissotrin, apigenin-7-O-glykosid, luteolin-7-O-glykosid a luteolin. (21)

Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou charakteristické látky pro řád Fabales.

Genista tinctoria obsahuje převážně isoflavonoidy. Luczkiewicz ve své práci prokázal, že kalusové kultury rodu *Genista* produkují větší množství isoflavonoidů než mateřská rostlina. (21)

Kalusová kultura produkovala 14 isoflavonoidů se zřetelnou dominací v produkci genistinu. (21)

Isoflavonoidy prokázané Luczkiewiczem v kalusové kultuře *Genista tinctoria*: genistein-7-O-glykosid, purearin, 2'-hydroxy-genistein-7-O-glykosid, genistin, genistin malonát, 3',4',7'-trihydroxyisoflavon, genistin acetát, genistein, daidzein, daidzin, ononin, equol, liquiritgenin, sissotrin. (21)

Biologické účinky flavonoidů

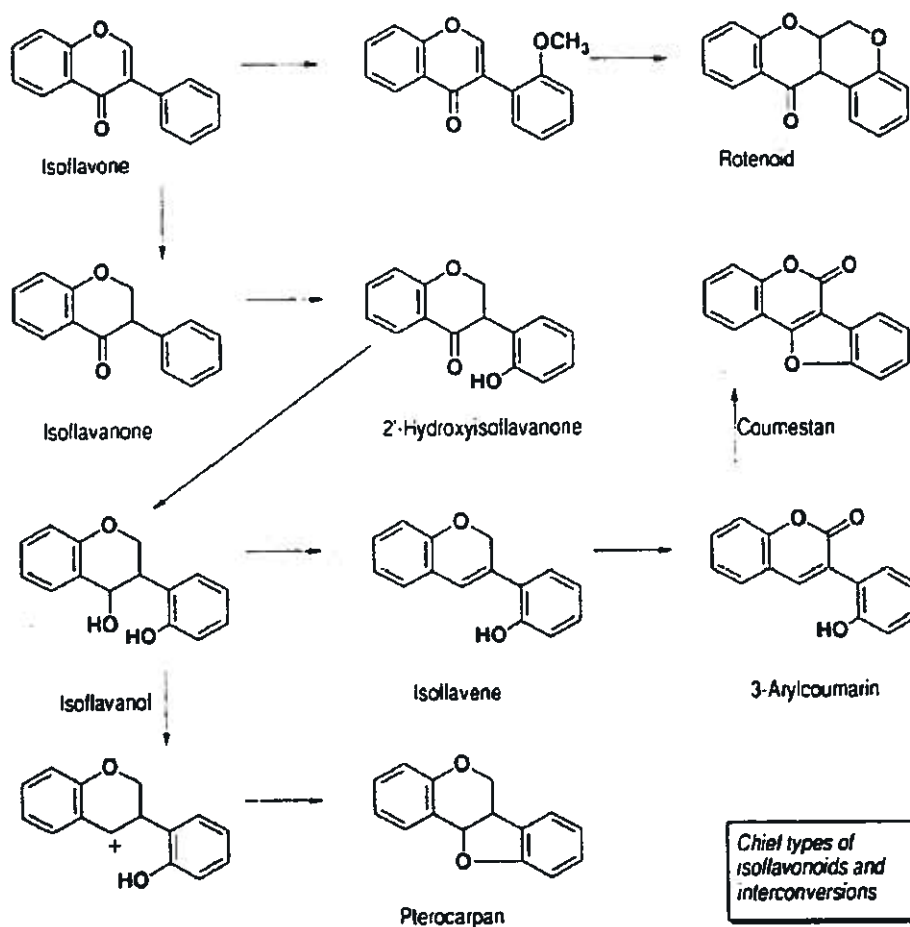
Isoflavonoidy plní funkce v obranném systému rostliny jako přirozená ochrana proti infekci při klíčení semen, napadení hmyzem a poškození škůdci. (22)

Biologické účinky isoflavonoidů jsou podmíněny vazbou fenylu na třetí uhlík. Byl prokázán antivirotický, antimykotický, protizánětlivý účinek, také analgetický účinek, ulceroprotektivní účinek, snižují krevní tlak a mohou navodit hypoglykémii. Některá literatura uvádí i spasmolytický účinek, ale studie zaměřená na farmakologický screening methanolvých extraktů z rodu *Genista* tento účinek nepotvrdila. Další vlastností je antagonismus a agonismus na estrogeních receptorech. (21,23,24,25,26,27,40,42)

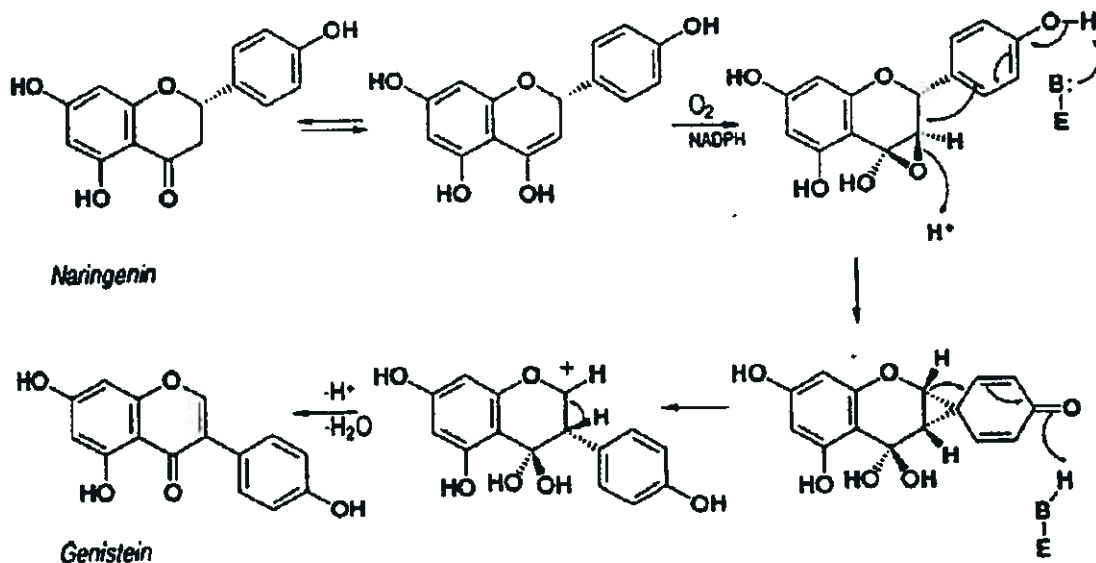
Isoflavonoidy totiž patří k nejznámějším fytoestrogenům. Fytoestrogeny jsou rozmanitá skupina látek získaných z rostlin, které strukturně nebo funkčně kopírují savčí estrogény. Fytoestrogeny hrají důležitou roli v prevenci menopauzálních příznaků, osteoporózy, aterosklerózy, kardiovaskulárních onemocnění a inhibují rozvoj a růst buněk nádorů prsu, vaječníků, prostaty a štítné žlázy. (21,23,24,25,26,28,42,43)

Role fytoestrogenů v prevenci rakoviny je stále dále zkoumána a diskutována. (43)

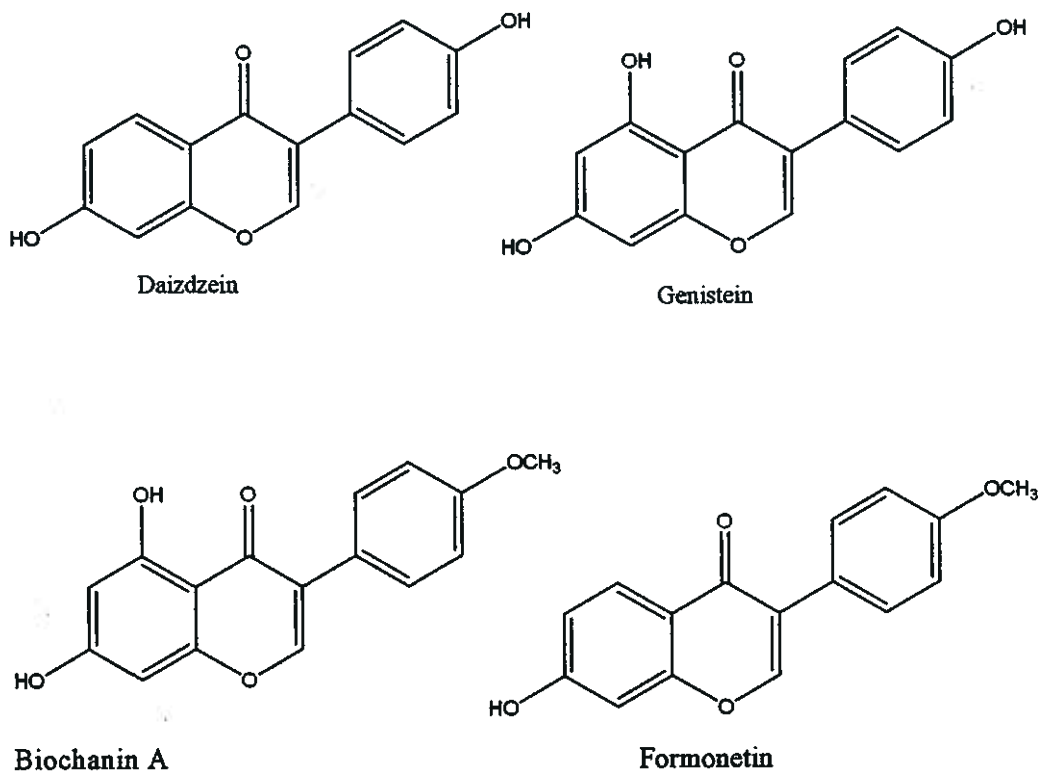
Vzájemná konverze jednotlivých typů isoflavonoidů (29):

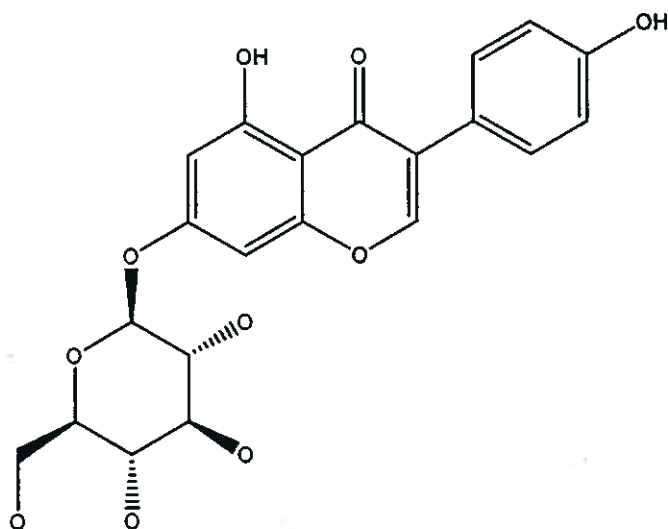


Pravděpodobný vznik isoflavonoidů (29):



Chemická struktura stanovovaných isoflavonoidů v diplomové práci:





Genistin

3.3.4. Izolace a stanovení obsahových látek *Genista tinctoria*

Quinuli Wu a Mingfu Wang ve své studii zkoumali optimální analytické metody pro stanovení látek s fytoestrogenní aktivitou obsažených v rostlinách. Metody jsou rozděleny na chromatografické a nechromatografické. Do chromatografických metod jsou zahrnuty: plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE) propojených s UV, DAD, ED, fluorescenčním detektorem, MS a NMR. Z nechromatografických metod je zmíněna imunoanalýza. (30)

Kombinace GC s MS umožňuje velmi spolehlivou identifikaci a přesné stanovení obsahu fytoestrogenů a jejich metabolitů v rostlinném materiálu. I přes vysokou spolehlivost a citlivost této metody se kvůli vysokým nákladům na provoz tato kombinace nevyužívá. Častěji se využívá kombinace HPLC-MS, nebo HPLC s UV, DAD a fluorescenčními detektory. Fytoestrogeny mají ve struktuře minimálně 1 aromatický kruh s maximem UV absorpce v rozmezí 230 - 280 nm, proto lze k detekci použít UV detektor nebo dokonalejší detektor s nastavitelnou vlnovou délkou. Nevýhodou UV detekce je snížená citlivost a potřeba aplikace relativně vysoké koncentrace fytoestrogenů ve vzorku. Fluorescenční a elektrochemický detektor jsou mnohem citlivější. (30,41)

Luczkiewicz používal k určení a stanovení komplexu isoflavonoidů a flavonů (volných aglykonů, monoglykosidů, diglykosidů a esterů) obsažených v *Genista tinctoria* HPLC s DAD UV a MS detektory. Zjistil, že použití tenkovrstvé

chromatografie (TLC) s desintometrickou detekcí k analýze fytoestrogenů obsažených v *Genista tinctoria* je nevhodné, stejně jako použití GC, které vyžaduje velice drahou derivatizaci látek. (17, 21, 28)

DAD detekce spektra byla stanovena v rozmezí vlnových délek 220 - 500 nm. Isoflavonoidy vykazují typické spektrum v UV oblasti. Luckiewicz upozorňuje, že malonáty a acetáty isoflavonoidů vykazují signál ve stejné oblasti UV spektra jako glykosidy. MS detekce umožňuje komplexnější identifikaci sekundárních metabolitů. Estery a glykosidy mají mnohem slabší odezvu než aglykony. (28)

K HPLC separaci fytoestrogenů se obecně používají tyto mobilní fáze 80% methanol (MeOH) nebo acetonitril (CH₃CN, ACN) a voda s přídavkem malého množství kyseliny. Struktura fytoestrogenů a jejich metabolitů často obsahuje hydroxylové skupiny vázané na fenylech, které mají slabě kyselý charakter. Proto se přidává k mobilní fázi malé množství kyseliny – nejčastěji kyseliny mravenčí (HCOOH), octové (AcOH), trifluoroctové (TFA) a fosforečné (H₃PO₄). (30)

Luczkiewicz extrahoval isoflavonoidy z lyofilizovaného rostlinného materiálu. Rostlinného materiál homogenizoval v 80% MeOH, suspenzi zfiltraval. Pročištěný extrakt byl nastříknut do kolony.

Flavonoidy byly separovány gradientovou elucí s použitím mobilních fází:

- A (voda: AcOH, 99,9 : 0,1)
- B (ACN: AcOH, 99,9 : 0,1)

Eluční profil: 0 - 35 min: 10 → 35% B v A

35 - 80 min: 35 → 80% B v A

Průtok: 1,5 ml/min

Detekce byla prováděna při 262 nm (21).

Mikelová ve své práci ke stanovení isoflavonoidů používala rovněž metodu HPLC s detekcí pod diodovým polem. Extrakt z rostliny *Glycine max* byl získán převedením upráškované drogy do 80% MeOH a extrahováním za pomoci ultrazvuku. Nežádoucí interferující látky byly odstraněny na kolonách SPE (solid phase extraction). Isoflavony jsou z kolony eluovány 60, 80, 100% MeOH s 2% hydroxidem amonným.

Mobilní fáze: 0,3% HCOOH (v/v) a acetonitril v různých koncentracích (mobilní fáze A)

Eluční profil: 0 - 20 min 10 → 20% A

20 - 25 min 20 → 50% A

25 – 30 min 50 → 60 % A

30 – 45 min 60 → 10 % A

Průtok: 0,8 ml/min

Detekce byla prováděna při 254 nm. (22)

3.3.5. *Genista tinctoria in vitro*

Luczkiewicz odvodil kalusové kultury z šesti druhů rodu *Genista* s cílem co nejvyšší produkce isoflavonoidů s fytoestrogenní aktivitou konkrétně genisteinu a genistinu. (21)

Fotochemickým průzkumem bylo zjištěno, že kalusová kultura *Genista tinctoria* produkuje vysoké množství isoflavonoidů. V případě *in vitro* kultur *Genista tinctoria* bylo množství isoflavonoidů mnohem větší než v intaktní rostlině i v rostlině *Glycine max*, která je dosud považována za nejbohatší zdroj těchto látek. (21)

Biotechnologický výzkum zahrnoval těchto šest druhů: *Genista tinctoria*, *Genista sagittalis*, *Genista germanica*, *Genista radiata*, *Genista aethnesis* a *Genista monosperulana*. U kultur byly optimalizovány podmínky pro růst a produkci isoflavonoidů obměnou různých živných médií a přítomností nebo absencí světla. (21)

Luczkiewicz použil jak média bohatá na minerály a organické látky (SH médium, MS médium, MS médium s přídavkem 100mg/l PVP) tak média ochuzená o minerály a organické látky (G-5 médium, NN médium, Mill médium, MC médium). Ke všem médiím byly přidány růstové regulátory 2,4-D (22,6 $\mu\text{mol/l}$), kinetin (23,2 $\mu\text{mol/l}$), 3% (m/v) sacharosy a 0,7% (m/v) agaru. Kultury byly vystaveny nepřetržitému osvětlení (o intenzitě $88 \pm 8 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$) a teplotě $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Výjimkou bylo SH médium, kdy byla kalusová kultura pěstována jak za nepřetržitého osvětlení tak za nepřetržitého zatemnění. (21)

Výzkum ukázal, že rod *Genista* se jen obtížně kultivuje *in vitro*. Na G-5 médiu ze všech druhů explantátů jen 20% vytvořilo kalus se silným sklonem k odumírání a na MS médiu 45 % explantátů vytvořilo krémový až hnědý kalus s omezenou životaschopností.

Experiment ukázal, že změna složení média i světelného režimu má významný dopad jak na růst kalusové kultury, tak na produkci isoflavonoidů. (21)

Nejlepšího růstu a nejvyšší produkce isoflavonoidů bylo dosaženo pod nepřetržitým osvětlením na SH médiu s přidavkem 2,4-D (22,6 $\mu\text{mol/l}$), kinetinu (23,2 $\mu\text{mol/l}$), 3% (m/v) sacharosy. Kalusové kultury všech druhů produkovaly více isoflavonoidů než mateřská rostlina. Skupina vyprodukovaných isoflavonoidů byla složena ze 14 sloučenin s jasnou převahou genistinu. (21)

Isoflavonoidy prokázané v kalusové kultuře: genistein-7-O-glykosid, purearin, 2'-hydroxy-genistein-7-O-glykosid, genistin, genistin malonát, 3',4',7'-trihydroxyisoflavon, genistin acetát, genistein, daidzein, daidzin, ononin, equol, liquiritgenin, sissotrin. (21)

Kalus s nejvyšším obsahem isoflavonoidů byl získán z *Genista tinctoria*, produkující 6586,5 mg celkových isoflavonoidů na 100g DW, ze kterých byl HPLC analýzou identifikován genistin v množství 3016,3 mg.

Kromě SH média relativně vysoký nárůst kalusu byl také na MS médiu, což ukázalo, že kalusová kultura rodu *Genista* vyžaduje média bohatá na minerály a organické látky. Nejmenší růst i produkce byla prokázána na MC médiu. Výjimkou mezi médii s nízkým obsahem minerálních a organických látek bylo Mill médium, kde navzdory malému růstu kalus produkoval značné množství isoflavonů. Luczkiewicz se domnívá, že produkci v případě Mill média ovlivňuje obsah aminokyselin (fenylalaninu, glycinu, cytisinu) a jejich komplexu (hydrolyzát kaseinu).

Přítomnost světla nebo jeho absence se projevila na biosyntéze esterů genisteinu. Kalus *Genista tinctoria* kultivovaný na SH médiu při nepřetržitém osvětlení produkoval mnohem více genistein malonátu než genistein acetátu. Naopak za nepřetržitého zatemnění byla produkce acetátu větší než malonátu.

Světelný režim měl dopad i na růst kalusu. Kalus *Genista tinctoria* měl nižší hodnotu růstového faktoru ve tmě než za nepřetržitého osvětlení.

Ve všech médiích byly hlavní komponenty ze zkoumaných isoflavonoidů deriváty genisteinu ve formě monoglykosidů, diglykosidů, esterů kyseliny malonové a octové. Ostatní isoflavonoidy byly přítomny v podstatně menším množství. (21)

Další Luczkiewiczova studie se zaměřila na závislost morfogeneze na akumulaci fytoestrogenů v *in vitro* kultuře *Genista tinctoria*. Zabývala se hledáním vztahu mezi metabolismem genisteinu a daidzeinu během růstu v buněčné suspenzi kultuře,

zárodečné kultuře, výhonkové kultuře a kořenové kultuře. Studie ukázala, že akumulace isoflavonoidů závisí na typu použité kultury.

Neorganizovaná suspenzí kultura produkovala největší množství glykosidů i aglykonů isoflavonoidů (9445 mg/100 g DW).

Výhonkové kultury jsou charakterizovány největším obsahem esterů genistinu, což ukazuje, že biosyntéza těchto látek také souvisela s diferenciací.

Kořenové kultury kumulovaly velké množství primárního metabolitu isoliquiritigeninu (978,4 mg/100 g DW), jedná se o prekursor isoflavonů, který se nevyskytuje v intaktní rostlině.

Poměr akumulovaných isoflavonů byl ovlivněn tkáňovou diferenciací. (31)

4. Experimentální část

4.1. Rostlinný materiál

Byla použita tkáňová kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Genista tinctoria* v 3.-11. pasáži.

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 Fatran LF, Výrobné družstvo Pokrok, Slovensko

Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko

Fluorescenční detektor Jasco MD-2020, Japonsko

Horkovzdušný sterilizátor Chirana SVS9/1, 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

Vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc, ČR

Vodní lázeň, typ 1042, GFL, Německo

4.3. Chemikálie a pomocné látky

Agar, Dufci Laboratoriem, USA

Ajatin, Profarma-Produkt, ČR

Benzylaminopurin, Lachema, 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
Dusičnan amonný, p.a., Penta, ČR
Dusičnan draselný p.a., Lach-Ner, ČR
Ethanol 96%, Lachema, ČR
Ethylester kyseliny octové p.a., 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
Chlorové vápno, Spolana, ČR
Jodid draselný p.a., Lachema, ČR
Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová, Aldrich, USA
Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR
Kyselina nikotinová, Lachema, ČR
Kyselina o-fosforečná, Lachema, ČR
Kyselina α -naftylocová, Sigma, USA
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
Superčistá voda, Katedra analytické chemie, Faf UK HK, ČR
Thiamin, Koch-Light Laboratories, Velká Británie

4.4. Kultivace tkáňových kultur

4.4.1. Příprava kultivačních nádob a nástrojů

Všechny používané skleněné nádoby byly z varného skla zn. SIAL, odolného vůči výkyvům teplot a vůči působení chemikálií. Pro kultivace byly použity 100 ml Erlenmayerovy baňky, do kterých byly vloženy můstky z filtračního papíru a nalito 30 ml živného média. Hrdla baněk byla překryta hliníkovou fólií, a sterilizována v autoklávu 20 minut při 121°C a 100kPa. Hliníkové fólie a baňky byly před manipulací sterilizovány ajatinem. Pasážování a odvozování kultur bylo prováděno v laminárním boxu vymytém roztokem ajatinu (1:10) a vyzářeném germicidní zářivkou. Pinzety se před použitím očistily a opláchly 96% ethanolem. V hliníkové fólii se sterilizovaly v horkovzdušném sterilizátoru 2 hodiny při teplotě 200°C.

4.4.2. Složení a příprava živného media

Kalusy byly pěstovány na půdě sestavené podle Murashigeho a Skooga (MS). K této půdě byly přidány růstové stimulanty:

kyselina α -naftylocová v koncentracích 0,1 mg/l, 1,0 mg/l a 10,0 mg/l

kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová v koncentracích 0,1 mg/l, 1,0 mg/l a 10,0 mg/l

benzylaminopurin v koncentracích 0,1 mg/l, 1,0 mg/l a 10,0 mg/l media.

Jednotlivé složky půdy byly odváženy na analytických vahách. Velmi malá množství byla odměřena ze zásobních roztoků odpipetováním. Všechny součásti byly rozpuštěny v destilované vodě v odměrné baňce na 1000 ml a doplněny vodou po rysku. Pro každou koncentraci růstových regulátorů bylo zvoleno 7 Erlenmayerových baněk s vloženým můstkem z filtračního papíru. Živné médium s růstovými regulátory bylo rozplněno do vysterilizovaných baněk, do jedné baňky 30 ml živného média s růstovými regulátory. Po uzavření hliníkovou fólií byly sterilizovány v autoklávu 20 minut při 121°C a 100 kPa.

Složení půdy sestavené podle Murashigeho a Skooga (v mg) (32)

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-insitol	100,0
Hydrolyzát kaseinu	1000,0
Glycin	2,0
Kyselina nikotinová	0,5
Pyridoxin hydrochlorid	0,5
Thiamin hydrochlorid	0,1
Sacharosa	30,0

Uvedená množství substancí odpovídají 11 media.

4.4.3. Odvození kultury

Byla použita tkáňová kultura odvozená z kořenové části klíčící rostliny *Genista tinctoria*. Semena byla před kultivací povrchově sterilizována následujícím způsobem:

1. opláchnutím ve sterilizované destilované vodě,
2. ponořením do 70% ethanolu (v/v) po dobu 3 minut a následným opláchnutím sterilní destilovanou vodou,

3. ponořením do 10% roztoku chloraminu (m/v) na 2 minuty s následným opláchnutím sterilní destilovanou vodou,
4. ponořením do 2% roztoku chloraminu (m/v) na 10 minut a následným opláchnutím sterilní destilovanou vodou. (33)

Po sterilizaci byla semena jednotlivě přenesena do sterilních Erlenmayerových baněk s živnou půdou Murashigeho a Skooga (MS) s přídavkem agaru a růstového hormonu 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny v koncentraci 1,0 mg/l. Erlenmayerovy baňky se semeny byly uloženy do kultivační místnosti. Kultivace probíhala za normálního režimu světelné periody tzn. 16 h světlo, 8 h tma a při teplotě 25 °C.

Kalus vytvořený z kořenové části klíčící rostliny byl přenesen do sterilní Erlenmayerovy baňky na papírový můstek s obsahem MS media s přídavkem růstového regulátoru 2,4 D o koncentraci 1,0 mg/l. Za těchto podmínek probíhala kultivace kultury do 3. pasáže. Od 3. pasáže byly do živného média přidány růstové regulátory α -NAA, BAP o koncentracích 0,1; 1,0; 10,0 mg/l, 2,4 D o koncentraci 0,1; 1,0 mg/l a 2,4 D s přídavkem kinetinu o koncentraci 0,1 + 0,1; 0,1 + 1,0; 1,0 + 0,1; 1,0 + 1,0 mg/l.

K pokusům byla použita kalusová kultura z 3. – 11. pasáže.

4.4.4. Pasážování a kultivace

V prostředí laminárního boxu bylo z vysterilizovaných Erlenmayerových baněk přeneseno inokulum (část kalusu z předchozí kultivace) na můstek z filtračního papíru. Baňky s naočkovanými kulturami byly opět uzavřeny hliníkovou folií. Kultivace probíhala buď za normálního světelného režimu (16 h světlo, 8 h tma) nebo za tmy (kultura byla zatemněna po celou dobu růstu) a při nepřetržitém osvětlení (kultura byla vystavena nepřetržitému osvětlení lampou 100 W 1m nad kulturou). Kultura rostla po dobu 4 týdnů při pokojové teplotě. Baňky byly zváženy před a po naočkování na vahách s přesností na 0,01 g. Po čtyř týdnech byla stanovena hmotnost narostlých kalusů a hmotnost baňky bez kalusu. Narostlé kalusy byly usušeny při pokojové teplotě na filtračním papíře a byl u nich stanoven obsah flavonoidů.

4.5. Hodnocení růstu

Vyhodnocení růstu bylo provedeno pomocí růstového faktoru R. (34)

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). Výpočet růstového faktoru byl proveden podle 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)

Hmotnost kalusu a inokula je průměrnou hmotností ze šesti baněk, kultivovaných za stejných podmínek.

Intenzita růstu kalusové kultury byla hodnocena také přírůstkem čerstvé hmotnosti inokula v gramech a procentech (hmotnosti inokula = 100%).

Výsledky byly uvedeny v tabulkách č. 1 - 36.

4.6. Ztráta sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti materiálu vyjádřená v hmotnostních procentech (m/m). (35)

Asi 0,200 g upráškovaného kalusu bylo odváženo na analytických vahách do vytárované váženky a sušeno 2 h při 105°C do konstantní hmotnosti. Po vychlazení v exikátoru byla váženka s obsahem znovu zvážena. Ze získaných údajů byla vypočítána ztráta sušením.

Hmotnost kalusu před sušením	0,2453 g
Hmotnost kalusu po 2 h sušení	0,2326 g
Ztráta sušením	5,18 % (m/m)

4.7. Stanovení obsahu flavonoidů

Stanovení bylo provedeno na HPLC. (36)

4.7.1. Příprava vzorků:

Sušené vzorky kalusů byly po rozdrobnění v třecí misce naváženy a dvakrát extrahovány vždy 10 ml 80% methanolu po dobu 20 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Oba extrakty byly spojeny a doplněny na 20 ml a zbaveny chlorofylu vytřepáním s petroletherem. Po filtraci byl asi 1,7 ml roztoku převeden přes mikrofiltr do vialek a analyzován metodou HPLC.

4.7.2. Parametry HPLC analýzy

Chromatograf : Jasco (AS-2055 Plus, PU-2089 Plus, MD-2015, MD-2020)

Kolona: Kolona Li ChroCART 250 x 4, sorbent Li Chrospher 5 μm

Objem nástřiku: 20 μl

Detekce: DAD Jasco MD-2015, $\lambda = 200\text{-}650\text{ nm}$, vyhodnoceno při 260-266 nm

Fluorescenční detektor Jasco MD-2020, $\lambda_{\text{ex}} = 340\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470\text{ nm}$

Mobilní fáze: fáze A: methanolický roztok kyseliny o-fosforečné (0,15 % m/v)

fáze B: vodný roztok kyseliny o-fosforečné (0,15 % m/v)

Eluční profil: 0 – 4 min, 50 % A a 50 % B (isokratická eluce)

4 – 13 min z 50 % A v B \rightarrow 100 % A (gradientová eluce)

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

Průtok: 1,1 ml/min

4.8. Sestrojení 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

Genisein 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/100 ml, 4,0 mg/100 ml, 8,0 mg/100 ml

Z následných hodnot byly vytvořeny kalibrační křivky

Kalibrační křivky

1. Kalibrační křivka genistinu

x: koncentrace (mg/100 ml)

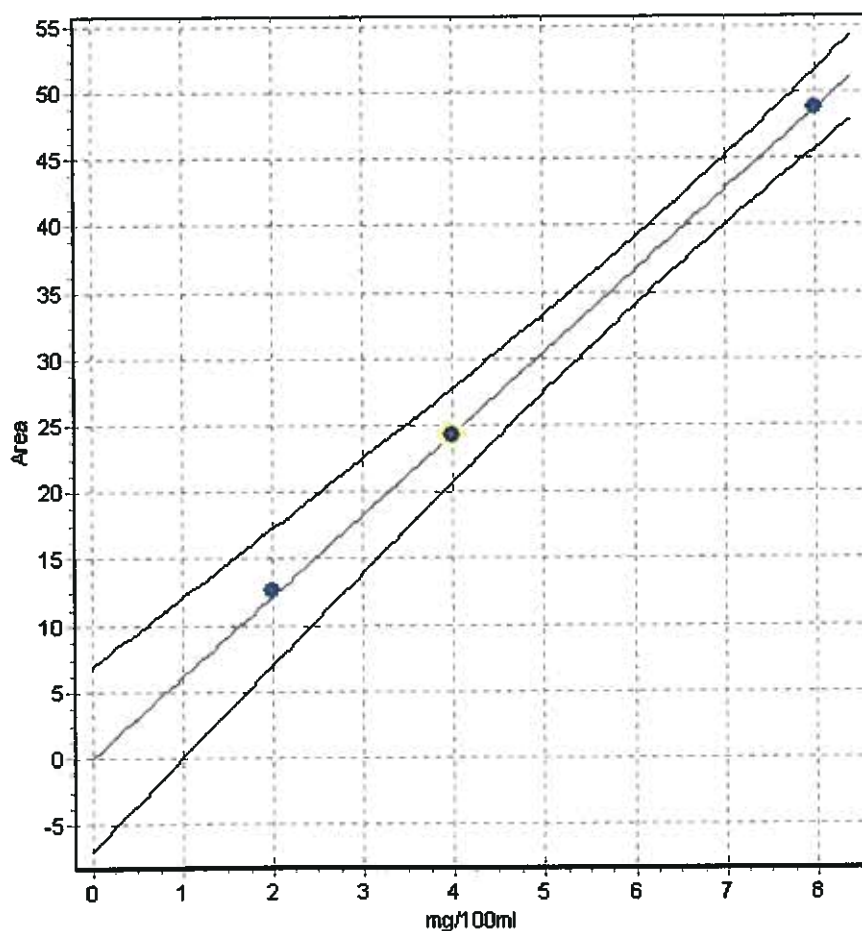
y: plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9998

$a = 0$

$b = 6,08940$



2. Kalibrační křivka daidzeinu

x: koncentrace (mg/100 ml)

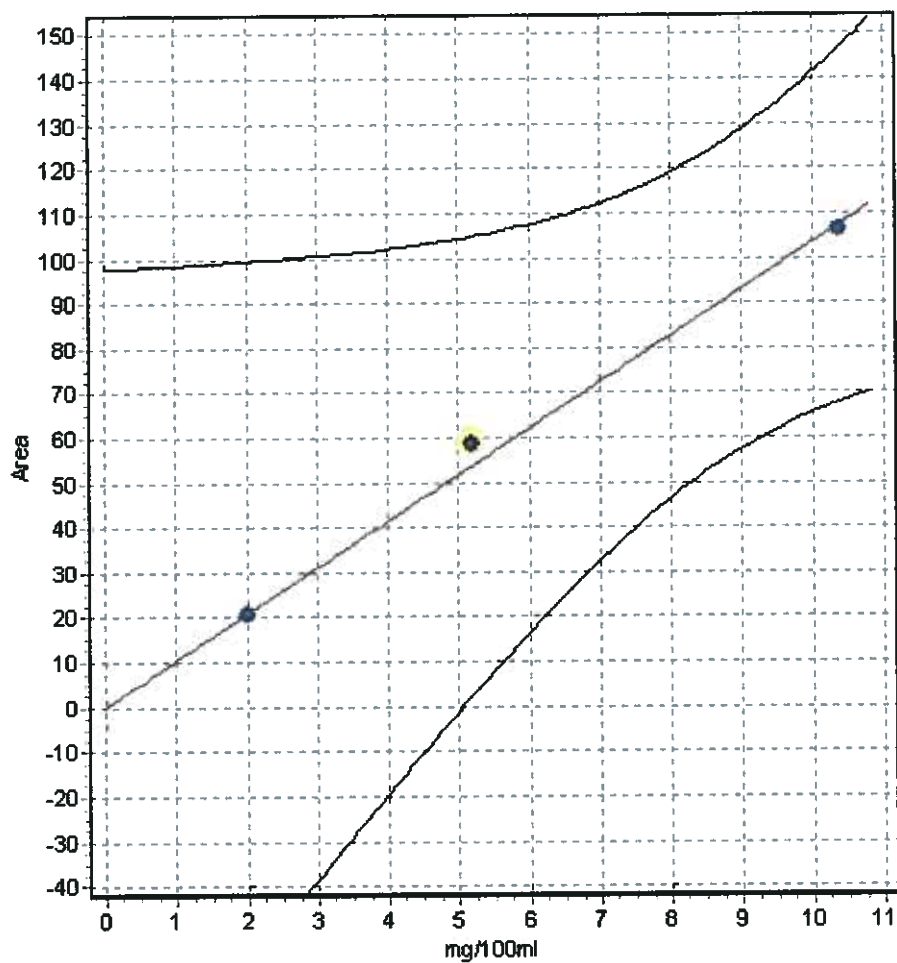
y: plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9938

a = 0

b = 10,34026



3. Kalibrační křivka formononetinu

x: koncentrace (mg/100 ml)

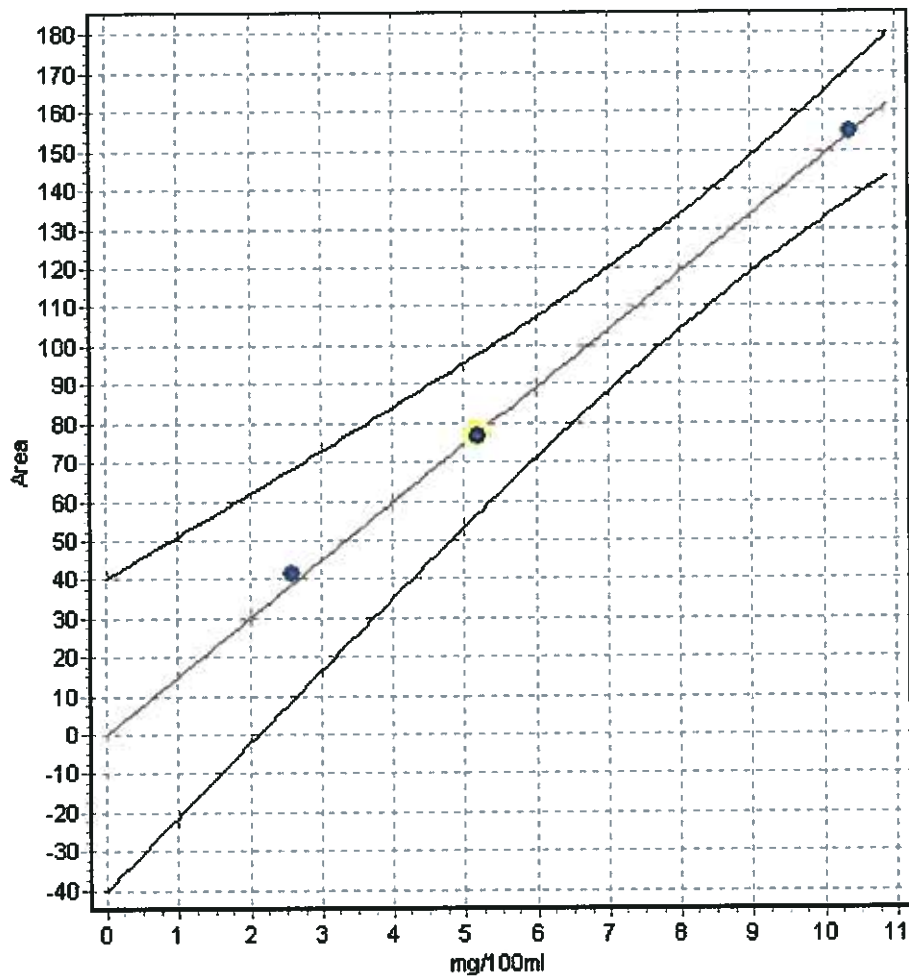
y: plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9994

$a = 0$

$b = 14,86045$



4. kalibrační křivka biochaninu A

x: koncentrace (mg/100 ml)

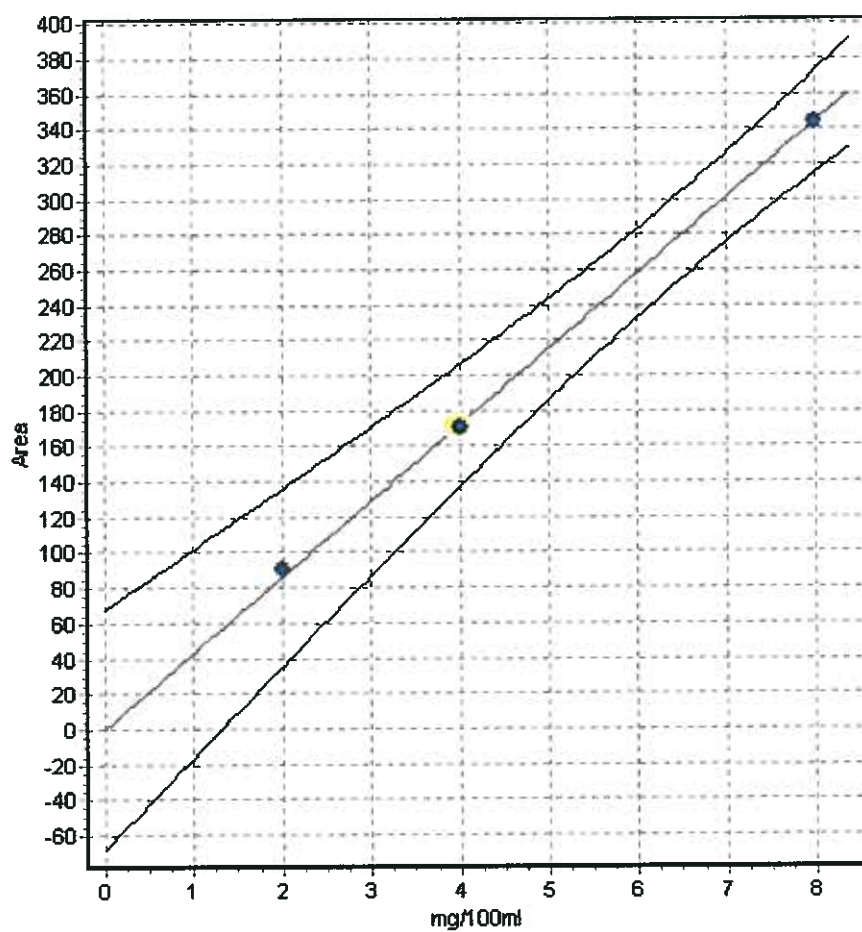
y: plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9997

$a = 0$

$b = 42,98035$



5. kalibrační křivka genisteinu

x: koncentrace (mg/100 ml)

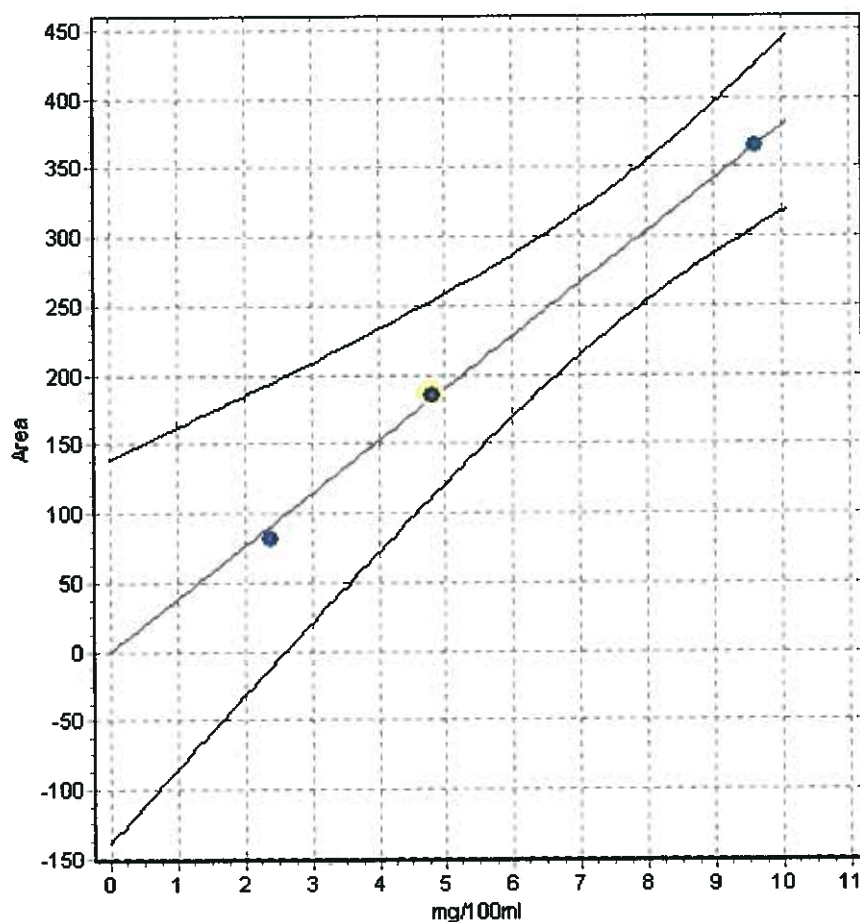
y: plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0,9997

a = 0

b = 42,98035



4.9. Růstová a produkční charakteristika

Pro zjištění vztahu mezi růstem kultury a produkcí flavonoidů byla stanovena růstová a produkční charakteristika. Při jejím stanovení bylo použito na kultivaci kultury MS médium s přidavkem 1,0 mg/l BAP za normálního světelného režimu.

V laminárním boxu bylo do 54 vysterilizovaných baněk s živným médiem s přidavkem regulátoru přeneseno na můstek z filtračního papíru inokulum. Postup kultivace byl podrobně popsán v kapitole kultivace tkáňových kultur. Kultura rostla 50 dní při 25 °C za normálního světelného režimu (16 h světlo, 8 h tma). Po 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 dnech bylo odebráno vždy šest baněk s narostlým kalusem.

Odebrané kalusy byly sušeny při pokojové teplotě na filtračním papíře. Baňky byly zvaženy před a po naočkování a před a po odebrání narostlého kalusu. Byl vyhodnocen růst a stanoven obsah flavonoidů. Výsledky byly uvedeny v tabulkách č. 38 - 47. Růstová a produkční křivka byla zobrazena v grafu č. 1.

Tabulky jsou za sebou řazeny podle dnů odběru vzorků.

5. Výsledky

Tabulka č. 1

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem α -NAA v koncentraci 0,1 mg/l za normálního světelného režimu

0,1 mg/l α -NAA NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,48	0,73	0,25	52,08	0,52
2	0,34	0,68	0,34	100,00	1,00
3	0,48	0,63	0,15	31,25	0,31
4	0,47	1,40	0,93	197,87	1,98
5	0,50	0,63	0,13	26,00	0,26
6	0,42	0,70	0,28	66,67	0,67
7	0,42	1,24	0,82	195,24	1,95
součet	3,11	6,01	2,90	669,11	6,69
průměr	0,44428571	0,858571	0,414286	93,24759	0,932476

Tabulka č. 2

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem α -NAA v koncentraci 1 mg/l za normálního světelného režimu

1,0 mg/l α -NAA NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,45	0,72	0,27	60,00	0,60
2	0,34	0,75	0,41	120,59	1,21
3	0,53	0,96	0,43	81,13	0,81
4	0,48	1,32	0,84	175,00	1,75
5	0,29	0,57	0,28	96,55	0,96
6	0,30	0,40	0,10	33,33	0,33
7	0,24	1,41	1,17	487,50	4,88
součet	2,63	6,13	3,50	1054,10	10,54
průměr	0,37571429	0,875714	0,5	133,0798	1,330798

Tabulka č. 3

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem α -NAA v koncentraci 10,0 mg/l za normálního světelného režimu

10 mg/l α -NAA NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,36	0,61	0,25	69,44	0,69
2	0,48	0,74	0,26	54,16	0,54
3	0,37	0,87	0,50	135,13	1,35
4	0,57	0,92	0,35	61,40	0,61
5	0,53	0,82	0,29	54,72	0,55
6	0,35	0,99	0,64	182,86	1,83
7	0,38	1,35	0,97	255,26	2,55
součet	3,04	6,30	3,26	812,99	8,13
průměr	0,43428571	0,90	0,465714	107,2368	1,072368

Tabulka č.4

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem α -NAA v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého zatemnění

0,1 mg/l α -NAA TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,57	0,62	0,05	8,77	0,09
2	0,53	0,58	0,05	9,43	0,09
3	0,66	0,70	0,04	6,06	0,06
4	0,73	0,75	0,02	2,74	0,03
5	0,53	0,72	0,19	35,85	0,36
6	1,08	1,22	0,14	12,96	0,13
7	0,67	0,82	0,15	22,39	0,22
součet	4,77	5,41	0,64	98,21	0,98
průměr	0,68142857	0,772857	0,091429	14,02947	0,140295

Tabulka č.5

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem α -NAA v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého zatemnění

1,0 mg/l α -NAA TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,68	0,74	0,06	8,82	0,09
2	1,24	1,30	0,06	4,84	0,05
3	1,42	1,45	0,03	2,11	0,02
4	0,64	0,76	0,12	18,75	0,18
5	0,33	0,42	0,09	27,27	0,27
6	0,96	1,00	0,04	4,16	0,04
7	0,72	0,79	0,07	9,72	0,10
součet	5,99	6,46	0,47	75,68	0,75
průměr	0,85571429	0,922857	0,067143	7,846411	0,078464

Tabulka č.6

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem α -NAA v koncentraci 10,0 mg/l za neustálého zatemnění

10,0 mg/l α -NAA TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,46	0,61	0,15	32,61	0,33
2	1,04	1,15	0,11	10,57	0,10
3	0,65	0,71	0,06	9,23	0,09
4	0,71	0,83	0,12	16,90	0,17
5	0,74	0,92	0,18	24,32	0,24
6	1,10	1,24	0,14	12,72	0,13
7	0,72	0,85	0,13	18,05	0,18
součet	5,42	6,31	0,89	124,42	1,24
průměr	0,77428571	0,901429	0,127143	16,42066	0,164207

Tabulka č.7

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem α -NAA v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého osvětlení

0,1 mg/l α -NAA NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,83	0,96	0,13	15,66	0,15
2	0,54	0,55	0,01	1,85	0,02
3	0,39	0,51	0,12	30,77	0,30
4	0,47	0,50	0,03	6,38	0,06
5	0,62	0,66	0,04	6,45	0,06
6	0,41	0,49	0,08	19,51	0,19
7	0,42	0,46	0,04	9,52	0,09
součet	3,68	4,13	0,45	90,15	0,90
průměr	0,52571429	0,59	0,064286	12,22826	0,122283

Tabulka č.8

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem α -NAA v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého osvětlení

1,0 mg/l α -NAA NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,50	0,55	0,05	10,00	0,10
2	0,53	0,65	0,12	22,640	0,22
3	0,51	0,58	0,07	13,72	0,14
4	0,66	0,68	0,02	3,03	0,03
5	0,83	0,97	0,14	16,86	0,19
6	0,49	0,52	0,03	6,12	0,06
7	0,50	0,53	0,03	6,00	0,06
součet	4,02	4,48	0,46	78,38	0,78
průměr	0,57428571	0,64	0,065714	11,44279	0,114428

Tabulka č.9

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem α -NAA v koncentraci 10,0 mg/l za neustálého osvětlení

10,0 mg/l α -NAA NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,54	0,58	0,04	7,41	0,07
2	0,60	0,80	0,20	33,33	0,33
3	0,45	0,64	0,19	42,22	0,42
4	0,44	0,58	0,14	31,89	0,32
5	0,56	0,60	0,04	7,14	0,07
6	1,42	1,64	0,22	15,49	0,15
7	0,81	0,86	0,05	6,17	0,06
součet	4,82	5,70	0,88	143,59	1,44
průměr	0,68857143	0,814286	0,125714	18,25726	0,182573

Tabulka č.10

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 0,1 mg/l za normálního světelného režimu

0,1 mg/l 2,4D NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přirůstek [g]	přirůstek [%]	růstový faktor
1	0,33	1,10	0,77	233,33	2,33
2	0,35	0,73	0,38	108,57	1,08
3	0,48	1,21	0,73	152,08	1,52
4	0,53	0,96	0,43	81,13	0,81
5	0,22	0,44	0,22	100,00	1,00
6	0,30	1,10	0,80	266,66	2,66
7	0,29	0,87	0,58	200,00	2,00
součet	2,50	6,41	3,91	1141,78	11,41
průměr	0,35714286	0,915714	0,558571	156,400	1,564

Tabulka č.11

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 1,0 mg/l za normálního světelného režimu

1,0 mg/l 2,4D NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přirůstek [g]	přirůstek [%]	růstový faktor
1	0,63	1,40	0,77	122,22	1,22
2	0,52	0,63	0,11	21,15	0,21
3	0,46	1,32	0,86	186,95	1,87
4	0,70	1,14	0,44	62,86	0,63
5	0,54	0,78	0,24	44,44	0,44
6	0,68	1,35	0,67	98,53	0,98
7	0,59	0,69	0,10	16,95	0,17
součet	4,12	7,31	3,19	553,11	5,53
průměr	0,58857143	1,044286	0,455714	77,42718	0,774272

Tabulka č.12

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého zatemnění

0,1 mg/l 2,4D TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přirůstek [g]	přirůstek [%]	růstový faktor
1	1,30	1,50	0,20	15,38	0,15
2	0,62	0,73	0,11	17,74	0,18
3	0,83	0,94	0,11	13,25	0,13
4	0,67	0,73	0,06	8,95	0,09
5	0,91	1,10	0,19	20,88	0,21
6	0,69	0,75	0,06	8,69	0,08
7	1,05	1,20	0,15	14,28	0,14
součet	6,07	6,95	0,88	99,19	0,99
průměr	0,86714286	0,992857	0,125714	14,49753	0,144975

Tabulka č.13

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého zatemnění

1,0 mg/l 2,4D TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přirůstek [g]	přirůstek [%]	růstový faktor
1	0,91	1,05	0,14	15,38	0,15
2	1,24	1,32	0,08	6,45	0,06
3	0,74	0,78	0,04	5,40	0,05
4	0,53	0,63	0,10	18,87	0,19
5	0,37	0,54	0,17	45,94	0,46
6	0,51	0,62	0,11	21,57	0,21
7	0,50	0,63	0,13	26,00	0,26
součet	4,80	5,57	0,77	139,62	1,40
průměr	0,68571429	0,795714	0,11	16,04167	0,160417

Tabulka č.14

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého osvětlení

0,1 mg/l 2,4D NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přirůstek [g]	přirůstek [%]	růstový faktor
1	0,38	0,47	0,09	23,68	0,24
2	0,53	0,64	0,11	20,75	0,21
3	0,47	0,58	0,11	23,40	0,23
4	0,40	0,41	0,01	2,50	0,02
5	0,44	0,61	0,17	38,63	0,39
6	0,84	0,90	0,06	7,14	0,07
7	0,47	0,66	0,19	40,42	0,40
součet	3,53	4,27	0,74	156,55	1,56
průměr	0,50428571	0,61	0,105714	20,96317	0,209632

Tabulka č.15

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého osvětlení

1,0 mg/l 2,4D NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přirůstek [g]	přirůstek [%]	růstový faktor
1	0,46	0,58	0,12	26,08	0,26
2	0,82	0,85	0,03	3,66	0,04
3	0,82	0,96	0,14	17,07	0,17
4	0,49	0,54	0,05	10,20	0,10
5	0,46	0,46	0,00	0,00	0,00
6	0,21	0,69	0,48	228,57	2,28
7	0,41	0,61	0,20	48,78	0,48
součet	3,67	4,69	1,02	334,37	3,34
průměr	0,52428571	0,67	0,145714	27,79292	0,277929

Tabulka č.16

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 0,1 mg/l a kinetinu v koncentraci 0,1 mg/l za normálního světelného režimu

0,1 mg/l 2,4D + 0,1 mg/l K NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,38	0,92	0,54	142,10	1,42
2	0,51	1,12	0,61	119,61	1,19
3	0,49	1,06	0,57	116,32	1,16
4	0,52	0,96	0,44	84,61	0,84
5	0,24	0,46	0,22	91,67	0,92
6	0,25	0,65	0,40	160,00	1,60
7	0,33	0,43	0,10	30,30	0,30
součet	2,72	5,60	2,88	744,62	7,45
průměr	0,38857143	0,8	0,411429	106,375	1,06375

Tabulka č.17

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 0,1 mg/l a kinetinu v koncentraci 1,0 mg/l za normálního světelného režimu

0,1 mg/l 2,4D + 1,0 mg/l K NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,47	1,17	0,70	148,94	1,49
2	0,22	0,47	0,25	113,64	1,14
3	0,36	0,75	0,39	108,33	1,08
4	0,35	0,53	0,18	51,43	0,51
5	0,31	0,81	0,50	161,29	1,61
6	0,43	2,25	1,82	423,25	4,23
7	0,75	0,83	0,08	10,66	2,55
součet	2,89	6,81	3,92	1017,54	12,62
průměr	0,41285714	0,972857	0,56	135,6401	1,356401

Tabulka č.18

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 0,1 mg/l a kinetinu v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého zatemnění

0,1 mg/l 2,4D + 0,1 mg/l K TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,78	0,83	0,05	6,41	0,06
2	0,54	0,62	0,08	14,81	0,15
3	0,50	0,88	0,38	76,00	0,76
4	0,73	0,79	0,06	8,21	0,08
5	0,48	0,70	0,22	45,83	0,46
6	0,56	0,97	0,41	73,21	0,73
7	0,57	0,75	0,18	31,58	0,31
součet	4,16	5,54	1,38	256,07	2,56
průměr	0,59428571	0,791429	0,197143	33,17308	0,331731

Tabulka č.19

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 0,1 mg/l a kinetinu v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého zatmění

0,1 mg/l 2,4D + 1,0 mg/l K TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,74	0,81	0,07	9,46	0,09
2	0,49	0,59	0,10	20,41	0,20
3	0,83	0,94	0,11	13,25	0,13
4	0,71	0,83	0,12	16,90	0,17
5	0,71	0,82	0,11	15,49	0,15
6	0,93	1,12	0,19	20,43	0,20
7	0,60	0,83	0,23	38,33	0,38
součet	5,01	5,94	0,93	134,27	1,34
průměr	0,71571429	0,848571	0,132857	18,56287	0,185629

Tabulka č.20

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 0,1 mg/l a kinetinu v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého osvětlení

0,1 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l K NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,43	0,49	0,06	13,95	0,14
2	0,33	0,34	0,01	3,03	0,03
3	0,46	0,52	0,06	13,04	0,13
4	0,67	0,73	0,06	8,95	0,09
5	0,43	0,89	0,46	106,98	1,07
6	0,29	0,47	0,18	62,07	0,62
7	0,38	0,41	0,03	7,89	0,08
součet	2,99	3,85	0,86	215,92	2,16
průměr	0,42714286	0,55	0,122857	28,76254	0,287625

Tabulka č.21

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 0,1 mg/l a kinetinu v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého osvětlení

0,1 mg/l 2,4 D + 1,0 mg/l K NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,39	0,53	0,14	35,90	0,36
2	0,28	0,30	0,02	7,14	0,07
3	0,44	0,55	0,11	25,00	0,25
4	0,39	0,70	0,31	79,49	0,79
5	0,77	0,85	0,08	10,39	0,10
6	0,31	0,34	0,03	9,68	0,097
7	0,23	0,28	0,05	21,74	0,22
součet	2,81	3,55	0,74	189,33	1,89
průměr	0,40142857	0,507143	0,105714	26,33452	0,263345

Tabulka č.22

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 1,0 mg/l a kinetinu v koncentraci 0,1 mg/l za normálního světelného režimu

1,0 mg/l 2,4D + 0,1 K mg/l NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,60	0,67	0,07	11,67	0,17
2	0,83	0,85	0,02	2,41	0,02
3	0,42	0,63	0,21	50,00	0,50
4	0,31	0,47	0,16	51,61	0,52
5	0,29	0,35	0,06	20,69	0,21
6	0,37	0,44	0,07	18,92	0,19
7	0,52	0,61	0,09	17,32	0,17
součet	3,34	4,02	0,68	172,60	1,72
průměr	0,47714286	0,574286	0,097143	20,35928	0,203593

Tabulka č.23

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 1,0 mg/l a kinetinu v koncentraci 1,0 mg/l za normálního světelného režimu

1,0 mg/l 2,4D + 1K mg/l NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,30	0,36	0,06	20,00	0,20
2	0,24	0,31	0,07	29,17	0,29
3	0,30	0,33	0,03	10,00	0,10
4	0,47	0,62	0,15	31,91	0,32
5	0,62	0,74	0,12	19,35	0,19
6	0,55	0,65	0,10	18,18	0,18
7	0,52	0,58	0,06	11,54	0,11
součet	3,00	3,59	0,59	140,15	1,40
průměr	0,42857143	0,512857	0,084286	19,66667	0,196667

Tabulka č.24

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 1,0 mg/l a kinetinu v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého zatemnění

1,0 mg/l 2,4D + 0,1 mg/l K TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,49	0,60	0,11	22,45	0,22
2	0,41	0,46	0,05	12,19	0,12
3	0,35	0,51	0,16	45,71	0,46
4	0,37	0,46	0,09	24,32	0,24
5	0,46	0,52	0,06	13,04	0,13
6	0,51	0,57	0,06	11,76	0,12
7	0,45	0,54	0,09	20,00	0,20
součet	3,04	3,66	0,62	149,49	1,49
průměr	0,43428571	0,522857	0,088571	20,39474	0,203947

Tabulka č.25

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 1,0 mg/l a kinetinu v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého zatemnění

1,0 mg/l 2,4D + 1,0 mg/l K TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,46	0,49	0,03	6,52	0,06
2	0,46	0,63	0,17	36,95	0,37
3	0,32	0,48	0,16	50,00	0,50
4	0,50	0,55	0,05	10,00	0,10
5	0,37	0,40	0,03	8,10	0,08
6	0,32	0,40	0,08	25,00	0,25
7	0,43	0,50	0,07	16,28	0,16
součet	2,86	3,45	0,59	152,86	1,53
průměr	0,40857143	0,492857	0,084286	20,62937	0,206294

Tabulka č.26

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 1,0 mg/l a kinetinu v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého osvětlení

1,0 mg/l 2,4D + 0,1 mg/l K NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,29	0,38	0,09	31,030	0,31
2	0,24	0,34	0,10	41,67	0,42
3	0,34	0,44	0,10	29,41	0,29
4	0,42	0,50	0,08	19,05	0,19
5	0,48	0,64	0,16	33,33	0,33
6	0,54	0,72	0,18	33,33	0,33
7	0,39	0,51	0,12	30,77	0,31
součet	2,70	3,53	0,83	218,60	2,18
průměr	0,38571429	0,504286	0,118571	30,74074	0,307407

Tabulka č.27

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem 2,4 D v koncentraci 1,0 mg/l a kinetinu v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého osvětlení

1,0 mg/l 2,4D + 1,0 mg/l K NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,37	0,51	0,14	37,84	0,38
2	0,42	0,52	0,10	23,81	0,24
3	0,61	0,83	0,22	36,06	0,36
4	0,68	0,79	0,11	16,18	0,16
5	0,72	0,92	0,20	27,78	0,28
6	0,86	0,94	0,08	9,30	0,09
7	0,73	0,81	0,08	10,96	0,11
součet	4,39	5,32	0,93	161,93	1,62
průměr	0,62714286	0,751667	0,141667	0,751667	0,198557

Tabulka č.28

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem BAP v koncentraci 0,1 mg/l za normálního světelného režimu

0,1 mg/l BAP NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,72	0,76	0,04	5,55	0,05
2					
3	0,17	0,35	0,18	105,88	1,06
4	0,40	0,42	0,02	5,00	0,05
5	0,49	0,53	0,04	8,16	0,08
6	0,38	0,40	0,02	5,26	0,05
7	0,53	0,57	0,04	7,55	0,07
součet	1,97	2,27	0,30	131,86	1,32
průměr	0,394	0,505	0,111	28,17259	0,281726

Tabulka č.29

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem BAP v koncentraci 1,0 mg/l za normálního světelného režimu

1,0 mg/l BAP NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,43	0,47	0,04	9,30	0,09
2	0,42	0,53	0,11	26,19	0,26
3	0,58	0,60	0,02	3,45	0,03
4	0,33	0,43	0,10	30,30	0,30
5	0,28	0,48	0,20	71,43	0,71
6	0,68	0,82	0,14	20,59	0,21
7	0,52	0,56	0,04	7,69	0,08
součet	3,24	3,89	0,65	168,95	1,69
průměr	0,46285714	0,555714	0,092857	20,06173	0,200617

Tabulka č.30

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem BAP v koncentraci 10,0 mg/l za normálního světelného režimu

10,0 mg/l BAP NR					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,45	0,48	0,03	6,67	0,06
2	0,59	1,52	0,93	157,62	1,58
3	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00
4	0,49	0,52	0,03	6,12	0,06
5	0,38	0,42	0,04	10,52	0,10
6	0,44	0,57	0,13	29,54	0,29
7	0,51	0,56	0,05	9,80	0,10
součet	3,36	4,57	1,21	220,29	2,20
průměr	0,48	0,652857	0,172857	36,0119	0,360119

Tabulka č.31

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem BAP v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého zatemnění

0,1 mg/l BAP TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přirůstek [g]	přirůstek [%]	růstový faktor
1	0,55	0,63	0,08	14,54	0,14
2	0,36	0,45	0,09	25,00	0,25
3	0,94	1,07	0,13	13,83	0,14
4	0,33	0,39	0,06	18,18	0,18
5	0,68	0,77	0,09	13,23	0,13
6	1,13	1,26	0,13	11,50	0,11
7	0,61	0,69	0,08	13,11	0,13
součet	4,60	5,26	0,66	109,41	1,09
průměr	0,65714286	0,751429	0,094286	14,34783	0,143478

Tabulka č.32

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem BAP v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého zatemnění

1,0 mg/l BAP TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přirůstek [g]	přirůstek [%]	růstový faktor
1	0,49	0,61	0,12	24,49	0,24
2	0,70	0,74	0,04	5,71	0,06
3	0,58	0,62	0,04	6,89	0,07
4	0,75	0,82	0,07	9,33	0,09
5	0,49	0,51	0,02	4,08	0,04
6	0,39	0,42	0,03	7,69	0,07
7	0,51	0,55	0,04	7,84	0,08
součet	3,91	4,27	0,36	66,05	0,66
průměr	0,55857143	0,61	0,051429	9,207161	0,092072

Tabulka č.33

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem BAP v koncentraci 10,0 mg/l za neustálého zatemnění

10,0 mg/l BAP TMA					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přirůstek [g]	přirůstek [%]	růstový faktor
1	0,44	0,59	0,15	34,09	0,34
2	0,59	0,86	0,27	45,76	0,45
3	0,50	0,64	0,14	28,00	0,28
4	0,55	0,72	0,17	30,91	0,31
5	0,71	0,86	0,15	21,12	0,21
6	0,81	0,87	0,06	7,41	0,07
7	0,63	0,78	0,15	23,81	0,24
součet	4,23	5,32	1,09	191,10	1,91
průměr	0,60428571	0,76	0,155714	25,76832	0,257683

Tabulka č.34

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem BAP v koncentraci 0,1 mg/l za neustálého osvětlení

0,1 mg/l BAP NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,76	0,86	0,10	13,16	0,13
2	0,51	0,61	0,10	19,61	0,19
3	0,59	0,66	0,07	11,86	0,12
4	0,78	0,85	0,07	8,97	0,09
5	0,51	0,66	0,15	29,41	0,29
6	0,39	0,43	0,04	10,25	0,10
7	0,45	0,53	0,08	17,78	0,18
součet	3,99	4,60	0,61	111,05	1,11
průměr	0,57	0,657143	0,087143	15,28822	0,152882

Tabulka č.35

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem BAP v koncentraci 1,0 mg/l za neustálého osvětlení

1,0 mg/l BAP NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,35	0,41	0,06	17,14	0,17
2	0,62	0,79	0,17	27,42	0,27
3	0,83	1,00	0,17	20,48	0,20
4	1,62	1,75	0,13	8,02	0,08
5	0,87	1,82	0,95	109,19	1,10
6	1,01	1,06	0,05	4,950	0,05
7	0,72	0,95	0,23	31,94	0,32
součet	6,02	7,78	1,76	219,16	2,19
průměr	0,86	1,111429	0,251429	31,30845	0,313085

Tabulka č.36

Růst tkáňové kultury na MS médiu s obsahem BAP v koncentraci 10,0 mg/l za neustálého osvětlení

10,0 mg/l BAP NO					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,79	0,80	0,01	1,260	0,01
2	0,43	0,52	0,09	20,930	0,21
3	0,69	0,86	0,17	24,64	0,25
4	1,40	1,64	0,24	17,14	0,17
5	0,75	10,90	10,15	1353,33	13,53
6	1,04	1,33	0,29	27,88	0,28
7	0,82	0,93	0,11	13,41	0,13
součet	5,92	16,98	11,06	1458,61	14,58
průměr	0,84571429	2,425714	1,58	186,8243	1,868243

Produkce genisteinu, genistinu, daidzeinu, formonetinu a biochaninu A v kalusové kultuře pěstované na MS médiu s obsahem různých koncentrací růstových regulátorů a za rozdílného světelného režimu. Na konci tabulky je pro srovnání stanoven obsah jednotlivých látek v intaktní rostlině.

Tabulka č.37

	GENISTIN [%]	DAID [%]	GEN [%]	FORM [%]	BIOA [%]	Navážka [g]
0,1 mg/l α-NAA NR	0	0,01				0,3618
1,0 mg/l α-NAA NR	0	0,02	0			0,2539
10,0 mg/l α-NAA NR	0	0	0	0		0,3493
0,1 mg/l α-NAA NO	0	0,01	0	0	0	0,2093
1,0 mg/l α-NAA NO	0,01	0	0	0	0	0,1811
10,0 mg/l α-NAA NO	0	0,1	0	0	0	0,1634
0,1 mg/l α-NAA TMA	0	0,01	0	0	0	0,2254
1,0 mg/l α-NAA TMA	0	0	0	0	0	0,3393
10,0 mg/l α-NAA TMA	0	0		0		0,2276
0,1 mg/l BAP NR	0,05	0,04	0	0	0	0,1948
1,0 mg/l BAP NR	0,03	0,02	0		0	0,2535
10,0 mg/l BAP NR	0,01	0,03	0	0	0	0,3717
0,1 mg/l BAP NO	0					0,1738
1,0 mg/l BAP NO	0		0	0		0,1485
10,0 mg/l BAP NO	0	0	0	0		0,261
0,1 mg/l BAP TMA	0	0	0	0	0	0,2608
1,0 mg/l BAP TMA				0		0,1421
10,0 mg/l BAP TMA	0			0	0	0,2187
0,1 mg/l 2,4D NR	0	0,01			0	0,1958
1,0 mg/l 2,4D NR	0	0	0	0	0	0,303
0,1 mg/l 2,4D NO	0	0,02		0		0,1938
1,0 mg/l 2,4D NO	0	0	0	0		0,2647
0,1 mg/l 2,4D TMA	0	0	0	0	0	0,2208
1,0 mg/l 2,4D TMA		0	0		0	0,2107
0,1 mg/l 2,4D + 0,1 mg/l K NR	0	0,01		0		0,1728
0,1 mg/l 2,4D + 0,1K mg/l K TMA			0	0		0,1552
0,1 mg/l 2,4D + 0,1K mg/l NO	0	0,02		0		0,398
0,1 mg/l 2,4D + 1,0 mg/l K NR	0	0,01		0		0,2432
0,1 mg/l 2,4D + 1,0 mg/l K TMA	0,01			0		0,2684
0,1 mg/l 2,4D + 1,0 mg/l K NO	0,02	0,04	0			0,2761
1,0 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l K NR	0			0		0,1237
1,0 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l K TMA	0		0,01	0	0	0,1489
1,0 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l K CO	0	0	0	0	0	0,1164
1,0 mg/l 2,4 D + 1,0 mg/l K NR	0			0		0,1094
1,0 mg/l 2,4 D + 1,0 mg/l K TMA	0			0	0	0,1229
1,0 mg/l 2,4 D + 1,0 mg/l K NO		0,01		0		0,1544
Nař intaktní rostliny	0	0,12	0,01	0	0,02	0,1388

Růstová a produkční charakteristika

Růstová charakteristika kalusové kultury *Genista tinctoria* kultivované na MS médiu s přidavkem 0,1 mg/l BAP za normálního osvětlení. Tabulky jsou za sebou řazeny podle dnů odběrů narostlých kalusů.

Tabulka č. 38

10. den					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,63	0,66	0,03	4,76	0,05
2	0,56	0,62	0,06	10,71	0,11
3	0,48	0,58	0,10	20,83	0,21
4	0,68	0,70	0,02	2,94	0,03
5	0,61	0,62	0,01	1,64	0,01
6	0,76	0,87	0,11	14,47	0,14
součet	3,72	4,05	0,33	55,36	0,55
průměr	0,62	0,675	0,055	0,000923	0,092273

Tabulka č.39

15.den					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,99	1,00	0,01	1,01	0,01
2	0,41	0,45	0,04	9,76	0,10
3	0,55	0,57	0,02	3,63	0,03
4	0,6	0,61	0,01	1,67	0,02
5	0,33	0,34	0,01	3,03	0,03
6	1,00	1,04	0,04	4,00	0,04
součet	3,88	4,01	0,13	23,10	0,23
průměr	0,646667	0,668333	0,021667	3,849922	0,038499

Tabulka č. 40

20.den					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,41	0,48	0,07	17,07	0,17
2	0,53	0,61	0,08	15,09	0,15
3	0,47	0,55	0,08	17,02	0,17
4	0,50	0,60	0,10	20,00	0,20
5	0,72	0,73	0,01	1,39	0,01
6	0,62	0,65	0,03	4,84	0,05
součet	3,25	3,62	0,37	75,42	0,75
průměr	0,541667	0,603333	0,061667	12,5694	0,125694

Tabulka č. 41

25.den					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	1,04	1,06	0,02	1,92	0,02
2	0,55	0,56	0,01	1,82	0,02
3	0,69	0,70	0,01	1,45	0,01
4	0,61	0,65	0,04	6,56	0,06
5	0,79	0,82	0,03	3,80	0,04
6	0,42	0,49	0,07	16,66	0,16
součet	4,10	4,28	0,18	32,21	0,32
průměr	0,683333	0,713333	0,03	5,368674	0,053687

Tabulka č. 42

30.den					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,42	0,47	0,05	11,90	0,12
2	0,89	0,92	0,03	3,37	0,03
3	0,70	0,91	0,21	30,00	0,30
4	0,59	0,81	0,22	37,29	0,37
5	0,94	1,15	0,21	22,34	0,22
6	0,66	0,77	0,11	16,67	0,16
součet	4,20	5,03	0,83	121,57	1,21
průměr	0,7	0,838333	0,138333	20,2618	0,202618

Tabulka č. 43

35.den					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,54	0,64	0,10	18,52	0,18
2	0,78	0,82	0,04	5,12	0,05
3	0,55	0,62	0,07	12,73	0,13
4	0,90	0,97	0,07	7,78	0,08
5	1,25	1,29	0,04	3,20	0,03
6	0,66	0,71	0,05	7,57	0,07
součet	4,68	5,05	0,37	54,93	0,55
průměr	0,78	0,841667	0,061667	9,154589	0,091546

Tabulka č. 44

40.den					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,41	0,81	0,40	97,56	0,97
2	0,51	0,74	0,23	45,10	0,45
3	0,68	0,71	0,03	4,41	0,04
4	0,64	0,86	0,22	34,37	0,34
5	0,31	0,45	0,14	45,16	0,45
6	0,43	0,63	0,20	46,51	0,46
součet	2,98	4,20	1,22	273,12	2,73
průměr	0,496667	0,70	0,203333	45,51978	0,455198

Tabulka č. 45

45.den					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,96	1,19	0,23	23,96	0,24
2	0,41	0,76	0,35	85,36	0,85
3	0,54	0,56	0,02	3,70	0,04
4	0,55	0,65	0,10	18,18	0,18
5	0,68	0,70	0,02	2,94	0,03
6	0,55	0,60	0,05	9,09	0,09
součet	3,69	4,46	0,77	143,24	1,43
průměr	0,615	0,743333	0,128333	23,87363	0,238736

Tabulka č. 46

50.den					
číslo baňky	hmotnost inokula [g]	hmotnost kalusu [g]	přírůstek [g]	přírůstek [%]	růstový faktor
1	0,51	0,59	0,08	15,68	0,16
2	0,81	0,88	0,07	8,64	0,09
3	0,53	0,75	0,22	41,51	0,41
4	1,21	1,31	0,10	8,26	0,08
5	0,59	0,61	0,02	3,39	0,03
6	0,44	0,46	0,02	4,54	0,04
součet	4,09	4,60	0,51	82,04	0,82
průměr	0,681667	0,766667	0,085	13,67291	0,136729

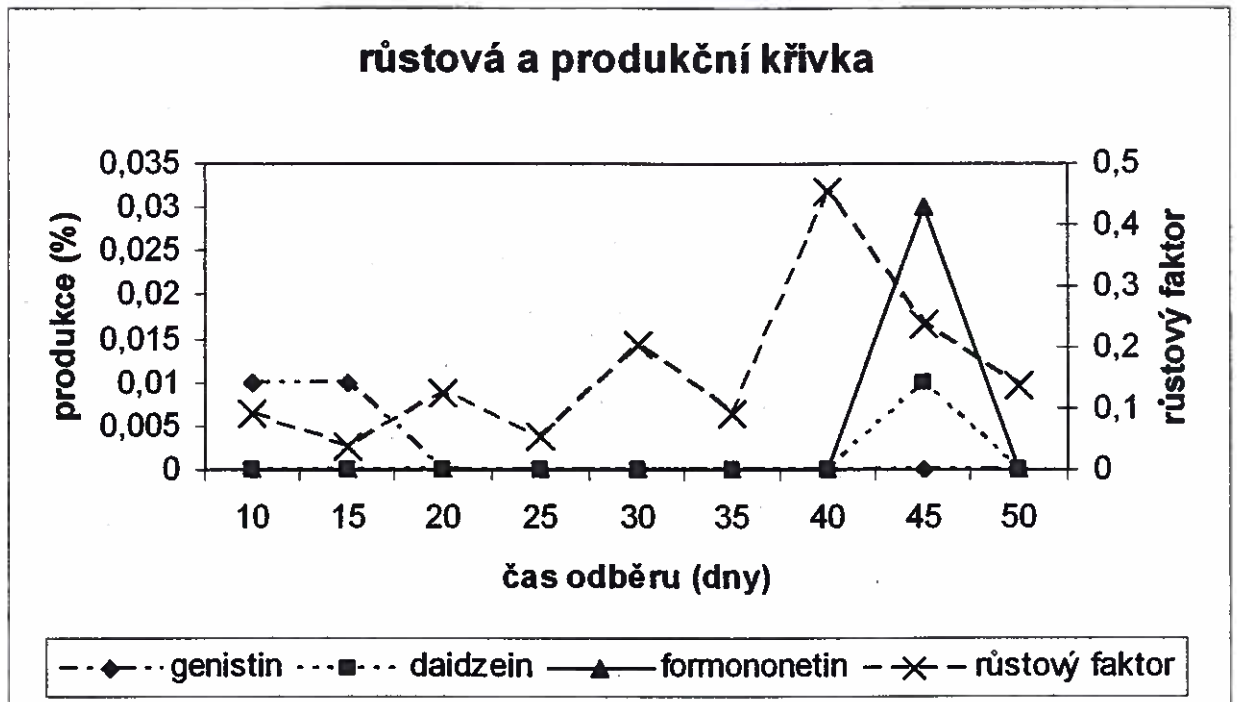
Produkce obsahových látek v kalusové kultuře v závislosti na délce kultivace.

Tabulka č.47

	GENISTIN [%]	DAID [%]	GEN [%]	FORM [%]	BIOA [%]	navážka [g]
10.den	0,01	0	0	0	0	0,1210
15.den	0,01	0	0	0	0	0,2149
20.den	0	0	0	0	0	0,1729
25.den	0	0	0	0	0	0,1363
30.den	0	0	0	0	0	0,2209
35.den	0	0	0	0	0	0,1829
40.den	0	0	0	0	0	0,1945
45.den	0	0,01	0	0,03	0	0,2948
50.den	0	0	0	0	0	0,2839

Graf č. 1

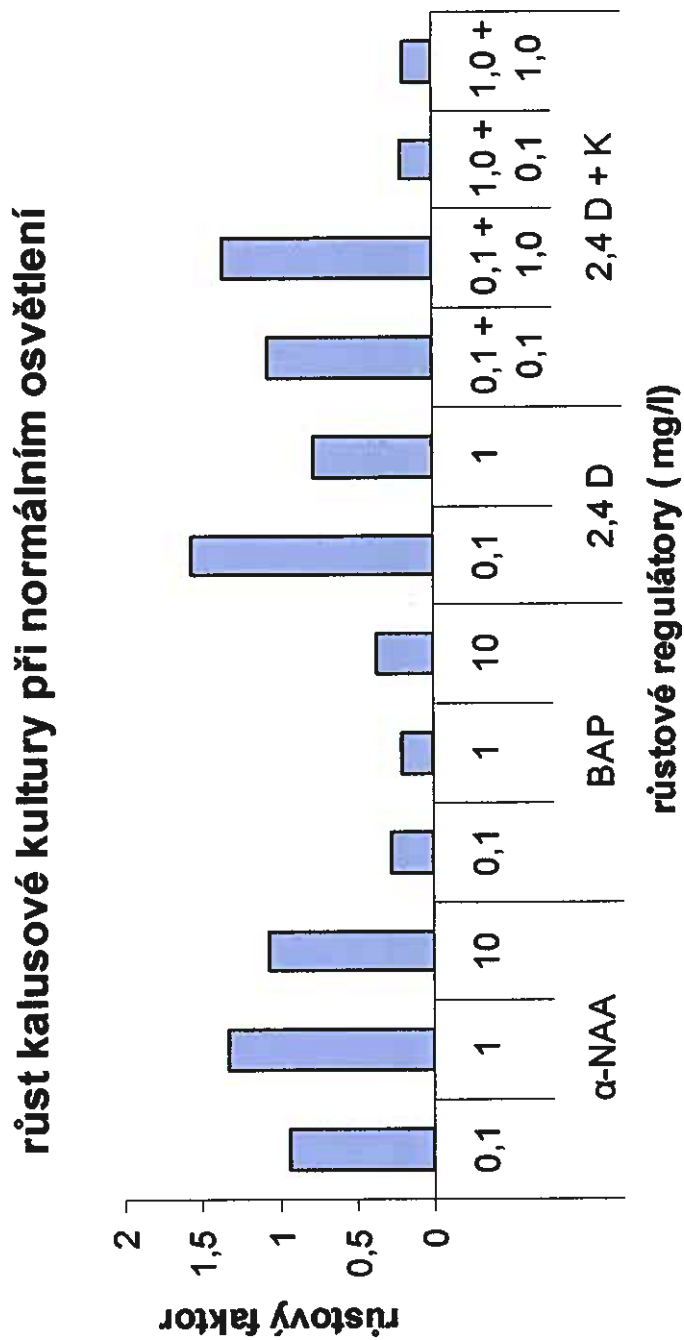
Růstová a produkční křivka kalusové kultury *Genista tinctoria* kultivované na MS médiu s přidavkem 0,1 mg/l BAP za normálního denního osvětlení.



Vliv osvětlení na růst kultury

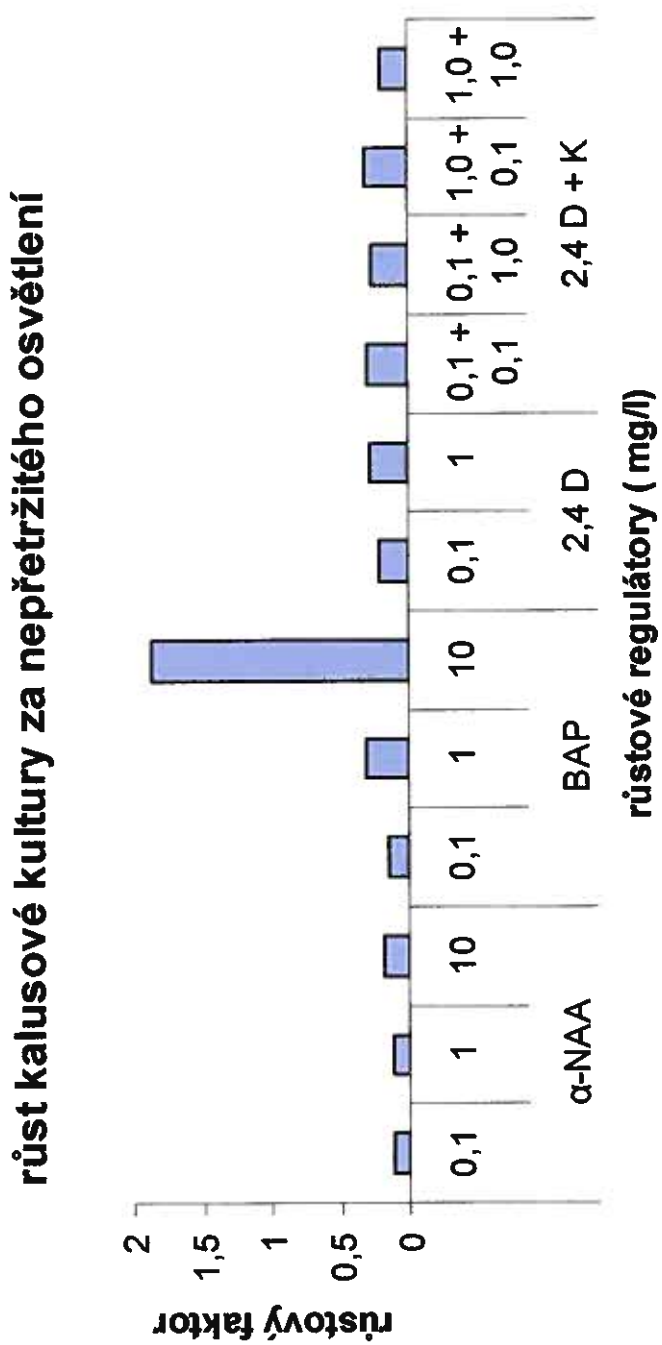
Graf č. 2

Růst kalusové kultury *Genista tinctoria* na MS médiu s přidavkem různých regulátorů o různých koncentracích za normálního světelného režimu.



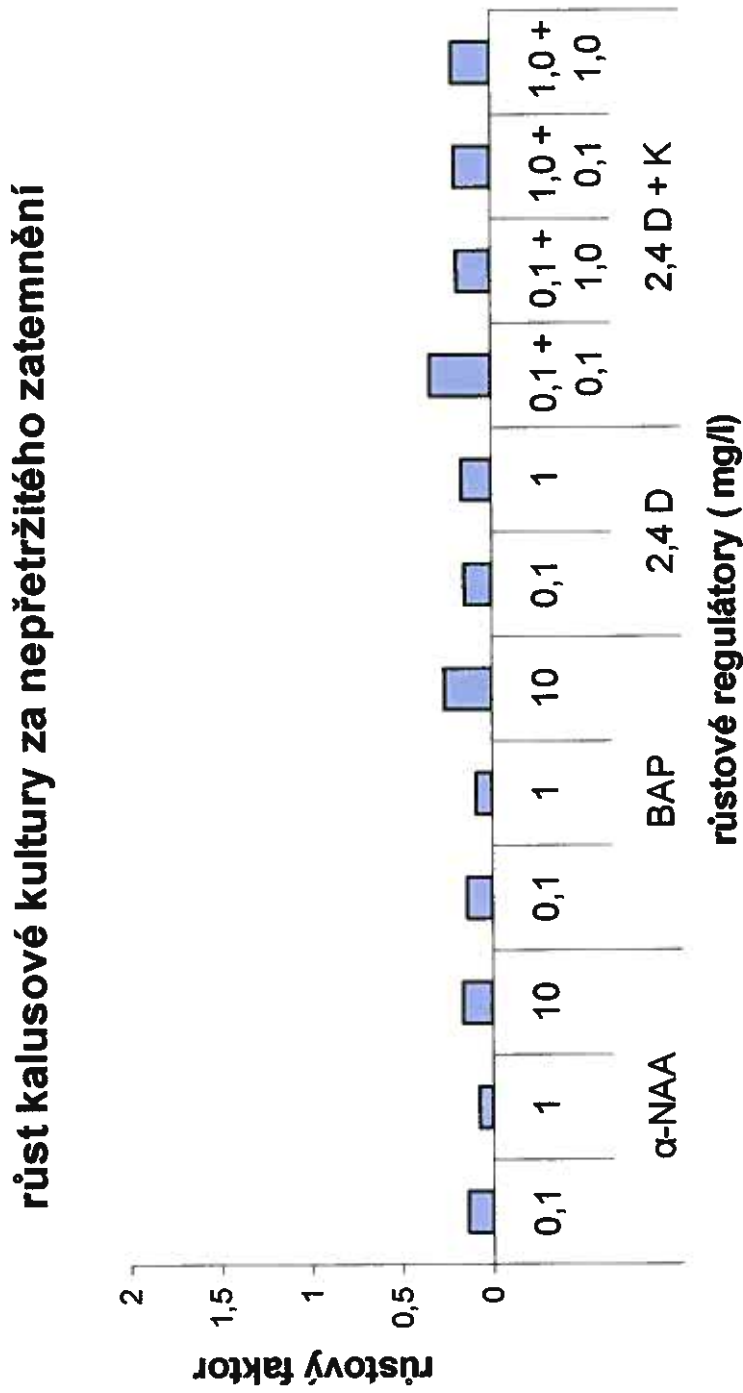
Graf č. 3

Růst kalusové kultury *Genista tinctoria* na MS médiu s přidavkem různých regulátorů o různých koncentracích za neustálého osvětlení.



Graf č. 4

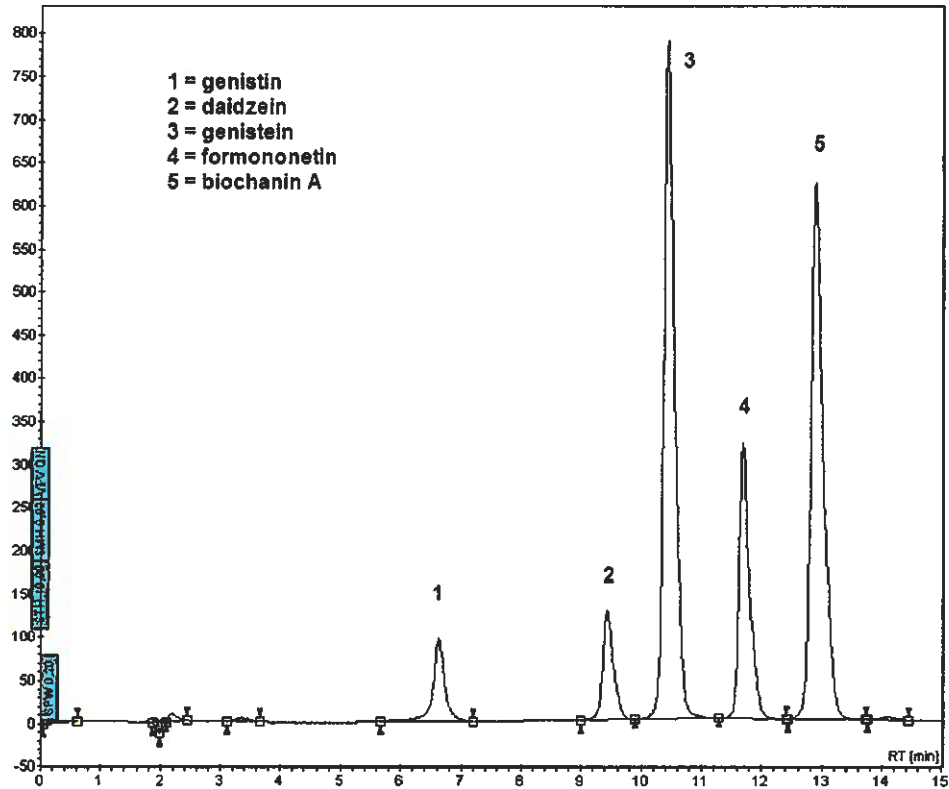
Růst kalusové kultury *Genista tinctoria* na MS médiu s přidavkem různých regulátorů o různých koncentracích za nepřetržitého zatemnění.



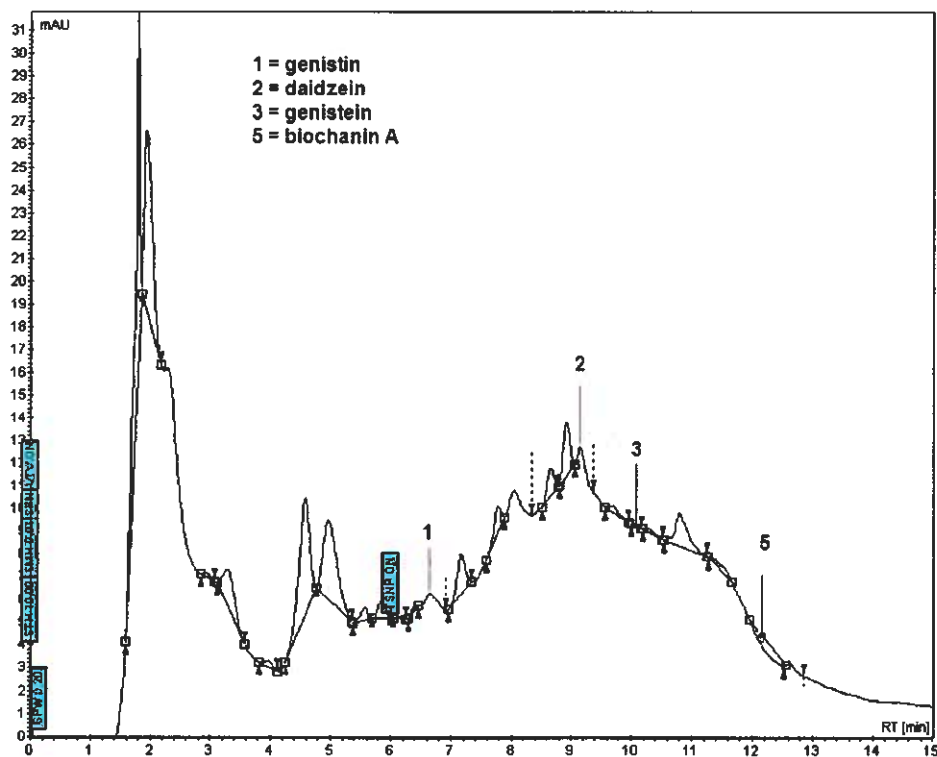
Stanovení obsahu isoflavonoidů v kalusové kultuře *Genista tinctoria*

K stanovení obsahu isoflavonoidů daidzeinu, genistinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A byla zvolena metoda HPLC s DAD s fluorescenčním detektorem.

Obr. č. 1 – Záznam HPLC analýzy standardů



Obr. č. 2 – Záznam HPLC analýzy kalusové kultury



6. Diskuze

Důležitým krokem k odvození explantátové kultury s vysokou produkcí sekundárních metabolitů je zajištění optimálních podmínek kultivace. Jedná se o složení živného média, vliv světelného režimu a přítomnost růstového regulátoru v odpovídající koncentraci, důležitou roli hraje i velikost explantátu. Nezbytným předpokladem je také aseptická práce.

V diplomové práci jsem se zabývala kultivací kalusové kultury *Genista tinctoria* *in vitro*.

Cílem mé práce bylo zjistit vliv různých růstových regulátorů v rozdílných koncentracích a to: α -NAA, BAP, 2,4 D a 2,4 D s přídavkem kinetinu na růst kultury a produkci isoflavonoidů v kalusové kultuře *Genista tinctoria* za různých světelných režimů (normální světelný režim, nepřetržité osvětlení, nepřetržité zatemnění).

Do živného média byly přidány růstové regulátory v těchto koncentracích: α -NAA 0,1 mg/l, 1,0 mg/l, 10,0 mg/l; BAP 0,1 mg/l, 1,0 mg/l, 10,0 mg/l; 2,4 D 0,1 mg/l, 1,0 mg/l a 2,4 D s přídavkem K 0,1 mg/l + 0,1 mg/l, 0,1 mg/l + 1,0 mg/l, 1,0 mg/l + 0,1 mg/l, 1,0 mg/l + 1,0 mg/l. Po čtyřech týdnech byl vyhodnocen růst a stanoven obsah isoflavonoidů (genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A) metodou HPLC.

Vliv různých růstových regulátorů na růst kalusové kultury

Při hodnocení růstu kalusové kultury po přidání růstového regulátoru BAP v různých koncentracích k MS médiu a za různých světelných režimů byl největší růst zjištěn u koncentrace 10,0 mg/l při nepřetržitém osvětlení ($R = 1,868$) viz tab. č. 36, graf č. 3. Zároveň byla zjištěná hodnota růstového faktoru kultury nejvyšší ze všech testovaných regulátorů.

Při hodnocení růstu kalusové kultury na MS médiu s přídavkem regulátoru α -NAA v různých koncentracích a za různých světelných režimů byl největší růst zaznamenán při koncentraci 1,0 mg/l za normálního světelného režimu ($R = 1,331$) viz tab. č. 2, graf č. 2.

Při použití růstového regulátoru 2,4 D v různých koncentracích a za různých světelných režimů bylo maximálního růstu dosaženo při koncentraci 0,1 mg/l za normálního osvětlení ($R = 1,564$) viz tab. č. 10, graf č. 2.

Při použití kombinace růstových regulátorů 2,4 D s kinetinem byl největší růst zaznamenán při koncentracích 0,1 mg/l + 1,0 mg/l za normálního světelného režimu ($R = 1,356$) viz tab. č. 17, graf č. 2.

Vliv různých růstových regulátorů na produkci kalusové kultury

Při hodnocení produkce kalusové kultury po přidání růstového regulátoru BAP v různých koncentracích k MS médiu a za různých světelných režimů byla největší produkce daidzeinu zaznamenána při koncentraci 0,1 mg/l při normálním světelném režimu (0,04 %) viz tab. č. 37. Vysoká produkce genistinu nastala také při koncentraci 0,1 mg/l za normálního světelného režimu (0,05 %) viz tab. č. 37. Ostatní isoflavonoidy byly obsaženy v téměř nedetekovatelných množstvích. Stanovené množství genistinu a daidzeinu v kultuře pěstované na MS médiu s přídavkem BAP o koncentraci 0,1 mg/l při normálním světelném režimu bylo nejvyšší ze všech testovaných regulátorů.

Produkce genistinu a daidzeinu byla dokonce vyšší než v intaktní rostlině viz tab. č. 37. Zde se potvrdilo předchozí zjištění Luczkiewiczze, který také uvádí zvýšenou produkci isoflavonoidů v kalusu v porovnání s intaktní rostlinou. (21)

Ostatní sledované isoflavonoidy (formononetin, biochanin A a genistein) byly při kultivaci kultury na MS médiu zaznamenány jen v nepatrných množstvích. Při přidání ostatních růstových regulátorů k MS médiu byla produkce isoflavonoidů téměř nulová s výjimkou média s přídavkem: 1,0 mg/l BAP a 10,0 mg/l BAP za normálního světelného režimu a 0,1 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l kinetinu za neustálého osvětlení, kdy byla zjištěna nepatrná produkce genistinu a daidzeinu viz tab. č. 37.

Při hodnocení produkce kalusové kultury na MS médiu s přídavkem regulátoru α -NAA v různých koncentracích a různých světelných režimů vysokou produkci daidzeinu vykazovala kultura pěstovaná za přidání α -NAA o koncentraci 1,0 mg/l za normálního světelného režimu (0,02 %) viz tab. č. 37. Vysoká produkce genistinu byla zaznamenána při koncentraci α -NAA 1,0 mg/l při nepřetržitém osvětlení (0,01 %) viz tab. č. 37. Ostatní isoflavonoidy byly při přidání tohoto růstového regulátoru na hranici detekovatelnosti.

Při použití růstového regulátoru 2,4 D v různých koncentracích a za různých světelných režimů byla pozorována vysoká produkce daidzeinu při koncentraci 0,1 mg/l za nepřetržitého osvětlení (0,02%) viz tab. č. 37. Ostatní isoflavonoidy se nepodařilo stanovit.

Při použití kombinace růstových regulátorů a to 2,4 D s kinetinem byla největší produkce daidzeinu zaznamenána při koncentraci 0,1 mg/l + 1,0 mg/l za nepřetržitého osvětlení (0,04 %) viz tab. č. 37. Vysoká produkce genistinu při 0,1 mg/l + 1,0 mg/l za nepřetržitého osvětlení (0,02 %) viz tab. č. 37 a vysoká i produkce genisteinu při 1,0 mg/l + 0,1 mg/l za nepřetržitého zatemnění (0,01 %) viz tab. č. 37.

Stanovení růstové a produkční charakteristiky

Na základě výsledků dosažených při kultivaci kalusové kultury *Genista tinctoria* porovnáním růstu a produkce kultury na MS médiu s obsahem různých růstových regulátorů bylo zvoleno pro stanovení růstové a produkční charakteristiky MS médium s přídavkem 0,1 mg/l BAP za normálního světelného režimu.

Z růstové a produkční charakteristiky vyplývá, že produkce isoflavonoidů v kultuře pěstované na médiu s přídavkem 0,1 mg/l BAP za normálního světelného režimu byla nižší než se očekávalo a za zmínku stojí snad nepatrné množství formononetinu v kalusu odebraném ve 45. dni růstu.

Celková produkce isoflavonoidů kalusovou kulturou se pohybovala ve stopových množstvích.

Vliv světelného režimu na růst a produkci kalusové kultury

Vedle růstových regulátorů patří světlo k důležitým faktorům ovlivňujícím intenzitu biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů v tkáňové kultuře. (3)

Pokus potvrdil významný vliv světelného režimu na růst a produkci kalusové kultury. Růst kultury za nepřetržitého zatemnění byl výrazně menší než za normálního světelného režimu nebo za nepřetržitého osvětlení viz grafy č. 2, 3, 4. Produkce kultury byla vyšší při nepřetržitém osvětlení za použití těchto růstových regulátorů: 2,4 D a 2,4 D s přídavkem kinetinu, za normálního světelného režimu při použití regulátorů: α -NAA a BAP. Za nepřetržitého zatemnění byla produkce isoflavonoidů v kalusové kultuře minimální viz tab. č. 37. Zde se potvrdilo předchozí zjištění Luczkiewicze, který dosáhl nejlepšího růstu a nejvyšší produkce isoflavonoidů v kalusové kultuře pod nepřetržitým osvětlením. (21)

Z pěti stanovovaných isoflavonoidů byly v kalusové kultuře prokázány čtyři a to: genistin, genistein, daidzein a formononetin. Dostupná literatura se o případném

výskytu formononetinu v *in vitro* kultuře ani v intaktní rostlině nezmiňuje. V intaktní rostlině se podařilo stanovit daidzein, genistein a biochanin A.

Luczkiewicz porovnával ve své studii také jiné flavonoidy obsažené v rostlině a kalusové kultuře než již dříve zmíněných 14 sloučenin a to: apigenin-7-O-diglykosid, luteolin-7-O-glykosid, luteolin, coumestrol, isoliquiritigenin. Zjistil, že apigenin-7-O-diglykosid, luteolin-7-O-glykosid a luteolin jsou obsaženy pouze v intaktní rostlině *Genista tinctoria*. Naopak liquiritigenin je obsažen pouze v kalusové kultuře a coumestrol, isoliquiritigenin se ani v rostlině ani v kalusové kultuře nevyskytují. (21) Formononetin neprokázal ani v kalusové kultuře ani v intaktní rostlině.

Důvodů pomalého růstu a nízké produkce mohlo být několik.

Jedním z nich mohlo být nevhodně zvolené médium, na kterém kultura očividně odumírá. Některé kalusy byly po čtyřtydenní kultivaci tmavě hnědé a tvrdé na rozdíl od ostatních světle béžových a měkkých kalusů. Zde se potvrdilo předchozí zjištění Luczkiewiczze, že rod *Genista* se jen obtížně kultivuje *in vitro*. Zjistil, že na MS médiu 45 % explantátů vytvořilo krémový až hnědý kalus s omezenou životaschopností, naopak výborných výsledků dosáhl při použití SH média. (21) Doporučila bych proto vyzkoušet kultivaci kalusové kultury právě na SH médiu.

Dalším problémem bylo stanovování pouze hlavních isoflavonoidů, s opomenutím jejich derivátů ve formě monoglykosidů, diglykosidů, esterů kyseliny malonové a octové. Jak už bylo zmíněno dříve, Luczkiewicz stanovil v kalusové kultuře 14 isoflavonoidů včetně jejich glykosidů, malonátů a acetátů. (21)

Určitou roli mohla sehrát i hmotnost naočkovaného inokula.

Jedním ze způsobů jak by se mohla zvýšit produkce isoflavonoidů je použití suspenzní kultury nebo pěstování kultury v bioreaktoru.

Luczkiewicz ve své práci zaměřené na výhonkové kultury a kultury z odvozené z kořenového vlášení *Genista tinctoria* používá speciálně upravený bublinový bioreaktor. Kultury produkovaly až 38x víc daidzinu než intaktní rostlina. (44) Kultury odvozené z kořenového vlášení *Genista tinctoria* kultivované v bioreaktoru

s bublinovým vzdušněním produkovaly také významné množství isoliquiritigeninu.
(45)

Dalším způsobem zvýšení růstu a produkce by mohla být elicitace. Působení stresu na tkáňovou kulturu může výrazně ovlivnit její růst i produkci.

Kalusové kultury odvozené z rostliny *Genista tinctoria* v Luczkiewiczových experimentech ukázaly, že produkují velké množství isoflavonoidů za optimálních podmínek. A tudíž je *Genista tinctoria* vhodným druhem pro další zkoumání a kultivaci. (21)

7. Závěr

Výsledky práce lze shrnout následovně:

- Byla zpracována metodika - odvození kultury *Genista tinctoria*, pasážování a kultivace kalusové kultury *Genista tinctoria*, byl vyhodnocen její růst a produkce v závislosti na podmínkách kultivace.
- Bylo zjištěno, že maximálního růstu ($R = 1,868$) dosáhla kalusová kultura při kultivaci za nepřetržitého osvětlení při použití růstového regulátoru BAP o koncentraci 10,0 mg/l.
- Byly detekovány tyto isoflavonoidy daidzein, genistin a genistein. Formononetin a biochanin A byly obsaženy v množstvích na hranici detekovatelnosti.
- Maximální produkce isoflavonoidu daidzeinu kalusovou kulturou bylo dosaženo při kultivaci za normálního světelného režimu při použití růstového regulátoru BAP o koncentraci 0,1 mg/l (0,04%). Maximální produkce isoflavonoidu genistinu kalusovou kulturou bylo opět dosaženo při kultivaci za normálního světelného režimu při použití růstového regulátoru BAP o koncentraci 0,1 mg/l (0,05%). Maximální produkce isoflavonoidu genisteinu kalusovou kulturou bylo dosaženo při kultivaci za nepřetržitého zatemnění při použití růstových regulátorů 2,4 D o koncentraci 0,1 mg/l a K o koncentraci 1,0 mg/l (0,01%).
- Na základě výsledků dosažených při kultivaci kalusové kultury *Genista tinctoria* porovnáním růstu a produkce kultury na jednotlivých médiích, bylo zvoleno médium pro stanovení růstové a produkční charakteristiky a to MS médium s přídavkem 0,1 mg/l BAP za normálního světelného režimu.
- Z růstové a produkční charakteristiky kalusové kultury *Genista tinctoria* kultivované na MS médiu s přídavkem 0,1 mg/l BAP za normálního osvětlení vyplývá, že maximálního růstu bylo dosaženo 40. dne kultivace ($R = 0,455$). Maximální produkce 45. dne (daidzein 0,01%; formononetin 0,03%).
- K zvýšení výtěžnosti doporučuji další výzkum v této oblasti, který může zahrnovat změnu kultivačního média, rozšíření spektra analyzovaných isoflavonoidů, práci v bioreaktoru či elicitaci.

8. Literatura

1. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty. Karolinum Praha, 2001, 75-83
2. Vodrážka Z.: Biotechnologie. Academia Praha, 1992,64-74
3. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty. Karolinum Praha, 1992, 84-94
4. Kováč J.: Explantátové kultury rostlin. Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, 1995, 1-18, 79-82
5. Kamenická A., Rypák M.: Explantáty v rozmnožování dřevin. VEDA, Slovenská akademie věd, Bratislava 1989, 38,44,72-79
6. Blažek J.: Nezbytné předpoklady pro práci s tkáňovými kulturami; Macek T.: Produkce sekundárních metabolitů kulturami rostlinných buněk *in vitro*, Biotechnologické využití tkáňových a buněčných kultur vyšších rostlin, Praha 1985, 63-67, 38-43
7. Procházka S., Macháčková I., Krekule J. et al.: Fyziologie rostlin. Academia Praha, 1998, 226, 240-284, 412-430
8. Kutina J.: Regulátory růstu a jejich využití zemědělství a v zahradnictví, SZN Praha, 1988, 9-144
9. Jahodář L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty, Karolinum Praha, 1995, 35-43
10. Aaron M. Rashotte, Hyun Sook Chae, Bridey B. Maxwell, Joseph J. Kieber: The interaction of cytokinin with other signals. *Physiologia Plantarum* 123 (2) 2005, 184
11. Baloun J., Jahodář L., Seifertová I., Štípek S.: Rostliny způsobující otravy a alergie, Avicenum Praha, 1989, 112
12. <http://faf.vfu.cz/html/index.2html>
13. Dostál J.: Nová květena ČSSR. 1. díl. Praha: Academia Praha 1989, 516
14. Janča J., Zentrich J.A.: Herbář léčivých rostlin 2.díl, Eminent Praha, 1995, 264-267
15. Sovová M.: Vybrané kapitoly z produkce léčivých rostlin, SPN Praha, 1990, 9-10
16. Hubík J., Dušek J., Spilková J.: Obecná farmakognozie II, SPN Praha 1989, 31-41, 174-176

17. Luczkiewicz M., Migas P., Kokotkiewicz A., Walijewska M. et al: Two-Dimensional TLC with Adsorbent Gradient for Separation of Quinolizidine Alkaloids in the Herb and *in-vitro* Cultures of Several *Genista* Species, *Journal of Plant Chromatography* 17 (3-4) 2004, 89-94
18. Knöfel D., Schütte R.H.: Chinolizidinalkaloide: Konstitution und Konfiguration von Tinctorin aus *Genista tinctoria*, *Journal für Praktische Chemie* 312 (5), 2004, 887-895
19. Resen I., Veit M.: Simultaneous Determination of Phenolics and Alkaloids Using Ion Exchange Chromatography for Sample Preparation, *Phytochemical Analysis*, 6, 1995, 121-124
20. Spilková J.: Flavonoidy a jejich uplatnění v terapii, *Časopis českých lékárníků* 8, 2001, 18-20
21. Luczkiewicz M., Glód D.: Callus cultures of *Genista* plants – *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity, *Plant Science* 165, 2003, 1101-1108
22. Mikelová R., Klejdus B., Zehnálek J., Vacek J. et al: Chromatografické stanovení isoflavonů ve vegetativních a generativních částech rostlin sóje (*Glycine max*), *CHEMagazín* 14 (1), 2004, 13-15
23. Bello R., Barrachina M. D., Martínez-Cuesta M.A., Esplugues J.: Pharmacological Screening of the Methanol and Dichlormethanol Extracts of *Genista patens*, *Phytotherapy research*, (9), 1995, 495-499
24. Ososki L. A., Kennelly E. J.: Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research, *Phytotherapy research* 17, 2003, 845-869
25. Jedinak A., Farago J., Psenakova I., Maliar T.: Approaches to flavonoid production in plant tissue cultures, *Biologia* 59 (6), 2004, 697-710
26. Spilková J.: Dietetický význam flavonoidů, *Časopis českých lékárníků* (9), 2001, 12-14
27. Borges C., Martinho P., Martins A., Rauter A.P. et al: Structural characterisation of flavonoids and flavonoid-O-glycosides extracted from *Genista tenera* by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry, *Rapid communications in mass spectrometry*, 15, 2001, 1760-1767
28. Luczkiewicz M., Glód D., Bączek T., Buciński A.: LC-DAD UV and LC-MS for the Analysis of Isoflavones and Flavones from *In Vitro* and *In Vivo* Biomass of *Genista tinctoria* L., *Chromatographia* 60 (3-4), 2004, 179-185

29. www.faf.cuni.cz/daidalea/docs/Compond/2-3-2_Isoflavonoidy.pdf
30. Wu Q., Wang M., Simon J. E.: Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds, *Journal of Chromatography B*, (812) 2004, 325-355
31. Luczkiewicz M., Głód D.: Morphogenesis-dependent accumulation of phytoestrogens in *Genista tinctoria in vitro* cultures, *Plant Science* (168), 2005, 967-979
32. Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plants* 15, 1962, 473
33. Blažek J.: Nezbytné předpoklady pro práci s tkáňovými kulturami, *Biotechnologické využití tkáňových kultur a buněčných kultur vyšších rostlin*, Praha, ČSVTS, 1985, 63-67
34. Dušek J.: Studium pesticidů jako exogenních faktorů ovlivňujících jakost drog (kandidátská disertační práce), Univerzita Karlova, fakulta farmaceutická, Hradec Králové, 1993
35. Kolektiv autorů: Český lékopis 2002, Grada Publishing Praha, 2002
36. Eva de Rijke, Hem C. Joski, R. Anderson, Freek Areese et al: *Analytica chimica acta*, 468 (1), 2002, 3 – 11
37. Korbelář J., Endris Z.: *Naše rostliny v lékařství*, Avicenum Praha, 1985, 216-217
38. <http://rostliny.prirodou.cz/index.php?clanek=52&tridit=2&scan0=rostlina28scan1=1&scan2=1>
39. <http://rostliny.prirodou.cz/index.php?clanek=52&tridit=2&scan0=kvetenstvi1&scan1=3&scan2=0>
40. Rainova L., Nakov N., Bogdanova S., Minkov E. et al: Ulceroprotective activity of the flavonoids of *Genista rumelica* Vel, *Phytotherapy Research* 2 (3), 1988, 137-139
41. Federici E., Touché A., Choquart S., Avanti O. et al: High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures, *Phytochemistry* 64, 2003, 717-724
42. Garritano S., Pinto B., Giachi I., Posekli L. et al: Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an *in vitro* short-term test, *Phytomedicine*, 12 (1-2), 2005, 143-145

43. Radzikowski C., Wietrzyk J., Grynkiewicz G., Opolski A.: Genistein: a soy isoflavone revealing a pleiotropic mechanism of action – clinical implications in the treatment and prevention of cancer, *Prostepy Hig Med Dosw (Online)*, 58 (27), 2004, 128-139
44. Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A.: Co-cultures, of shoot and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens, *Plant Science*, 169 (5), 2005, 862-871
45. Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A.: *Genista tinctoria* hairy root cultures for selective production of isoliquiritigenin, *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, 60 (11-12), 2005, 867-875

Obr. č. 4: detail květenství *Genista tinctoria* (39)



9. Příloha

Obr.č. 3: Nať *Genista tinctoria* (38)

