

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie



KULTURY LÉČIVÝCH ROSTLIN *IN VITRO*-XX

Diplomová práce

Kateřina Chreňová

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

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

Oponent: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Datum odevzdání: 10. 5. 2016

Počet stran: 74

V Hradci Králové dne:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne:

Podpis:

Ráda bych poděkovala za odborné vedení při práci Doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. Dále PharmDr. Janu Martinovi za technickou výpomoc a celé katedře farmakognosie za vstřícný přístup při vypracovávání práce. Děkuji Ing. Jindřichu Rejtharovi za cenné rady a také mé rodině za nezbytnou podporu při studiu.

Obsah

1. OBSAH

2.	ABSTRAKT.....	5
3.	ABSTRACT.....	6
4.	ÚVOD.....	7
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	8
6.	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
6.1	Kručinka barviřská (<i>Genista tinctoria</i> L.).....	9
6.1.1	Taxonomie a botanický popis.....	9
6.1.2	Použití.....	10
6.1.3	Obsahové látky.....	11
6.2	Explantátové kultury rostlin.....	17
6.3	Stresové faktory mající vliv na tvorbu a obsah sekundárních metabolitů.....	18
6.3.1	Abiotické faktory.....	18
6.3.2	Biotické faktory.....	21
6.4	<i>Genista tinctoria</i> L.- <i>in vitro</i> elicítace.....	23
6.5	Selen.....	25
6.5.1	Obecná charakteristika selenu.....	25
6.5.2	Vliv selenu na lidský organismus.....	25
6.5.3	Biologická dostupnost, toxicita a rozdílné vlastnosti jednotlivých forem.....	26
6.5.4	Selen jako elicitor.....	28
6.5.5	Jiné využití selenu.....	31
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
7.1	Pomůcky a přístrojové vybavení.....	32
7.2	Chemikálie.....	33
7.3	Kultivace kultur <i>Genista tinctoria</i> L.- <i>in vitro</i>	35
7.3.1	Rostlinný materiál.....	35
7.3.2	Živné médium.....	35
7.3.3	Příprava kalusových a suspenzních kultur.....	36
7.4	Elicítace.....	37

7.4.1	Příprava elicitoru.....	37
7.4.2	Elicitace <i>in vitro</i> kultur u <i>Genista tinctoria</i> L.....	37
7.5	Stanovení obsahu	38
7.5.1	Příprava vzorků k analýze.....	38
7.5.2	HPLC analýza vzorků	39
7.5.3	Ukázka chromatogramu	40
7.5.4	Kalibrační křivky	40
7.6	Statistické zpracování dat.....	44
8.	VÝSLEDKY	46
8.1	Tabulky	47
8.2	Grafy	53
9.	DISKUSE.....	56
10.	ZÁVĚR.....	61
11.	POUŽITÉ ZKRATKY	62
12.	SEZNAM TABULEK.....	64
13.	SEZNAM OBRÁZKŮ	65
14.	SEZNAM GRAFŮ.....	66
15.	POUŽITÁ LITERATURA.....	67

2. ABSTRAKT

Studie byla zaměřena na zvýšení produkce sekundárních metabolitů v *in vitro* kultuře *Genista tinctoria* L. prostřednictvím elicitoru. Byly použity různé koncentrace elicitoru – oxidu seleničitého k ovlivnění hladiny isoflavonoidů vyskytujících se v těchto kulturách.

Pokus byl prováděn na kalusových a suspenzních kulturách v MS živném médiu suplementovaného růstovým regulátorem – 10 g l^{-1} NAA (α -naftyloctové kyseliny). Elicitor byl přidán ve formě roztoku v koncentraci $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$; $9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a $9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Kultury byly vystaveny působení elicitoru po dobu 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Obsah isoflavonoidů v sušině i médiu byl zhodnocen prostřednictvím HPLC analýzy.

Nejvýznamnější produkce v kalusové kultuře byla zaznamenána u genistinu ($6,20 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$, $8,30 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a $9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ po 168 h. Druhý nejvýznamnější nárůst obsahu genistinu $5,20 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ byl zaznamenán při použité koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ po 6 h. Obsah genisteinu, daidzeinu a formononetinu v kalusové kultuře nebyl významně zvýšen a ve většině vzorcích došlo k nulovému nárůstu oproti kontrole. Obsah biochaninu A byl nulový oproti kontrolním vzorkům.

V suspenzní kultuře byl nejvýznamnější nárůst zjištěn u daidzeinu. Nejvyšší nárůst ($37,10 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) byl naměřen po ošetření elicitem při použité koncentraci $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a $9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ po 24 h. Další významný nárůst daidzeinu ($11,30 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) byl zaznamenán při použití koncentrace elicitoru $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a $9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ po 12 h. U obsahu genistinu byl zaznamenán významný nárůst především v časech 24 h při koncentraci $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ($15,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$), 168 h při koncentraci $9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ($9,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) a 48 h při koncentraci $9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ($10,7 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$). U genisteinu nebyla zjištěna žádná produkce po aplikaci elicitoru. Obsah formononetinu byl zvýšen minimálně a u biochaninu A byly opět zjištěny především nulové hodnoty.

Isoflavonoidy se do živného média nevylučovaly. Oxid seleničitý může být doporučen jako efektivní elicitor ke zvýšení obsahu isoflavonoidů – genistinu v kalusových a suspenzních kulturách a daidzeinu v suspenzních kulturách.

3. ABSTRACT

The study is aimed to enhance *in vitro* production of secondary metabolites in *Genista tinctoria* L. via elicitor treatment. The different levels of elicitor concentration – selenium dioxide were utilized to affect the quantity of isoflavonoids occurred in cultures.

Experiment was performed in callus and suspension cultures on MS nutrient media supplemented with 10 g l⁻¹ of NAA (α -naphthylacetic acid) as growth regulator. The elicitor was added in the form of solution in concentrations of 9,012.10⁻³ mol l⁻¹; 9,012.10⁻⁴ mol l⁻¹ and 9,012.10⁻⁵ mol l⁻¹. It was exposed for 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours. The content of isoflavonoids was determined by HPLC in dry weight (DW) and medium.

The most effective production of genistin (6,20 mg. g⁻¹ DW, 8,30 mg. g⁻¹ DW) in callus culture was measured. It was reached in concentrations of 9,012.10⁻⁴ mol l⁻¹ and 9,012.10⁻⁵ mol l⁻¹ after 168 h elicitor treatment. The second most satisfactory genistin level 5,20 mg g⁻¹ DW was detected after elicitor application in concentration of 9,012.10⁻⁴ mol l⁻¹ after 6 h. The content of genistein, daidzein and formononetin in callus culture was low and in the most cases equal zero compared to control samples. The content of biochanin A was equal zero compared to control samples.

The most efficient daidzein production (37,10 mg g⁻¹ DW) in suspension culture was detected after elicitor treatment in concentrations of 9,012.10⁻³ mol l⁻¹ and 9,012.10⁻⁵ mol l⁻¹ after 24 h. The second most abundant content 11,30 mg g⁻¹ DW of daidzein was reached after selenium dioxide treatment in concentrations of 9,012.10⁻³ mol l⁻¹ and 9,012.10⁻⁵ mol l⁻¹ after 12 h. High production of genistin was observed in concentration of elicitor 9,012.10⁻³ mol l⁻¹ (15,2 mg g⁻¹ DW) after 24 h, in concentration 9,012.10⁻⁴ mol l⁻¹ (9,5 mg g⁻¹ DW) after 168 h and in concentration 9,012.10⁻⁵ mol l⁻¹ (10,7 mg g⁻¹ DW) after 48 h. The content of genistein and biochanin A was equal zero after elicitor application. Production of formononetin was very low.

Isoflavonoids were not released into nutrient media. Selenium dioxide can be recommended to increase efficiently isoflavonoids production – genistin in callus and suspension cultures and daidzein in suspension cultures.

4. ÚVOD

Velké množství léků vychází z látek přírodního původu a i byliny samy o sobě hrají významnou roli v soudobé medicíně. Tyto látky mají různý potenciál – některé se využívají tradičně při různých onemocněních bez jakéhokoli důkazu (většina alternativních postupů), jiné mohou působit jako velice účinná prevence onemocnění a součást životního stylu, další jakou účinná terapie závažného onemocnění.

Proto je v našem zájmu získat co nejkvalitnější produkt z rostlinného materiálu v co největším množství, s minimálními náklady a i s co nejmenší ekologickou zátěží související s pěstováním (např. získání produktu nezatiženého pesticidy) a výrobou. Jednou z cest jsou právě biotechnologické metody, které ne všechny tyto podmínky splňují, ale mají svůj význam. Nemale výhodou konkrétně u kultury rostliny *Genista tinctoria* L. je, že její kultura produkuje pouze využívané isoflavonoidy, nikoli alkaloidy.⁽¹⁾

Nevýhodou *in vitro* kultur je zatím nižší produkce požadovaných sekundárních látek oproti matečné rostlině. Jednou z možností, jak zvýšit tuto produkci, je metoda elicitace. Principem této metody je děj odehrávající se běžně v přírodě. Rostlina vystavená stresu (infekce, klimatické podmínky, těžké kovy) zvyšuje produkci sekundárních metabolitů, které většinou slouží jako účinná ochrana.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo se seznámit s technikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále zjistit vliv abiotického elicitoru selenu na produkci isoflavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L. Na základě stanovení obsahu jednotlivých isoflavonoidů HPLC metodou zjistit, zda uvedený elicitor v různých koncentracích je schopen ovlivnit produkci těchto obsahových látek.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Kručinka barvířská (*Genista tinctoria* L.)

6.1.1 Taxonomie a botanický popis

Kručinka barvířská je taxonomicky řazena podle The International Plant Index Database do čeledi *Leguminosae* (syn. *Fabaceae*).⁽²⁾ Anglická synonyma pro rostlinu *G. tinctoria* jsou Dyer`s Greenweed, Common Woadwaxen, Broom.⁽³⁾

Jedná se o jedovatý polokeř vyskytující se v Evropě a Asii⁽⁴⁾, postrádající trny, dosahující výšky 20-60 cm. Má střídavé, lesklé, podlouhlé, kopinaté, přisedlé, zelené listy svírající se stonkem úhel 45°, které jsou čtyřikrát delší, než je jejich šířka. Květenství typu hrozen je složeno z jednotlivých žlutých květů, které jsou oboupohlavné. Rostlina se nachází na neobdělávaných travnatých plochách a vřesovištích, na živiny chudých, vápenitých nebo mírně kyselých půdách.⁽⁵⁾ Plody jsou desetisemenné lusky.⁽⁴⁾

Obrázek 1 Kručinka barvířská (*Genista tinctoria* L.)⁽⁶⁾



6.1.2 Použití

6.1.2.1 Terapeutické použití

V lidovém léčitelství se používají nezdřevnatělé části stonku, listy a kvetoucí nař. Preparáty z *G. tinctoria* vykazují diuretické, laxativní a cholagogní účinky. Tato rostlina je používána při edémech, nemocech močových cest a ledvin, dně, zácpě, střevních poruchách, krvácení, nemocech jater a žlučníku. Dále se také využívají účinky sedativní a vasodilatační při angioneuróze a migréně. Extrakt z čerstvé nadzemní části rostliny se používá v homeopatii. Preparáty z této rostliny jsou také využívány při onemocněních štítné žlázy (analogicky jako thyreoidin).⁽⁷⁾

6.1.2.2 Barvení

Nejvýznamnější barvířskou rostlinou byl nejspíše rýt barvířský (*Reseda luteola*). Kručinka barvířská byla však také často využívanou rostlinou k barvení textilií v různých kulturách. Spolu se srpicí barvířskou (*Serratula tinctoria*) měly ale především doplňkový charakter. Flavony luteolin a apigenin, isoflavon genistein a jejich glykosidy jsou známé barvicí komponenty rodu *Genista*.⁽⁸⁾ Žluté barvivo kručinky barvířské bylo například nalezeno v tak významných artefaktech z post-byzantské doby (16 – 19. století), jako jsou oděvy nalezené na hoře Athos v klášteře Xeropotamou.⁽⁹⁾

Obrázek 2 Textilie obarvená pomocí kručinky barvířské⁽¹⁰⁾

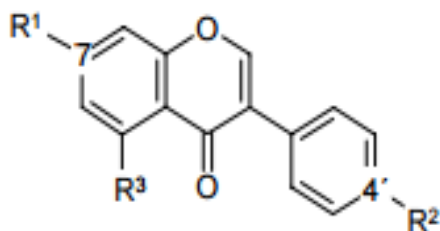


6.1.3 Obsahové látky

Hlavními obsahovými látkami kručinky barvířské jsou alkaloidy a flavonoidy. Alkaloidy produkované touto rostlinou jsou cytisin, spartein, methyleytisin a anagyrin.⁽¹¹⁾ Suspenzní ani kalusová kultura neprodukuje alkaloidy.⁽¹⁾ Dále byly ve studii zabývající se lipofilními sloučeninami z kručinky barvířské zmapovány další sloučeniny, a to: mastné kyseliny a jejich deriváty (triethyl orthoformát, ethylpalmitát), terpenoidy (menthol, bornylacetát, anethol, hexahydrofarnesylacetol), diterpenové alkoholy (phytol), fytosteroly (campesterol, stigmatosterol, γ -sitosterol), saturevané hydrokarbony (pentakosan, heptakosan, oktakosan, nonakosan, triakontan, tritriakontan, tetratriakontan, tetradekan), nesaturevané hydrokarbony (4-methylpenten-2), olefiny (dihydroactinidiolid, neophytadien), triterpenový saponinový derivát oleananu (β -amyryn) a monoterepnický lakton (loliolid), jenž vykazuje antitumorovou aktivitu. Ve studii byla použita GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spektrometry).⁽⁷⁾

Předmětem zájmu této práce jsou isoflavonoidy – genistin, genistein, biochanin A, daidzein, formononetin.

Obrázek 3 Struktura isoflavonoidů⁽¹²⁾



Genistin: R¹ = glukosa, R² = R³ = OH

Genistein: R¹ = R² = R³ = OH

Daidzein: R¹ = R² = OH, R³ = H

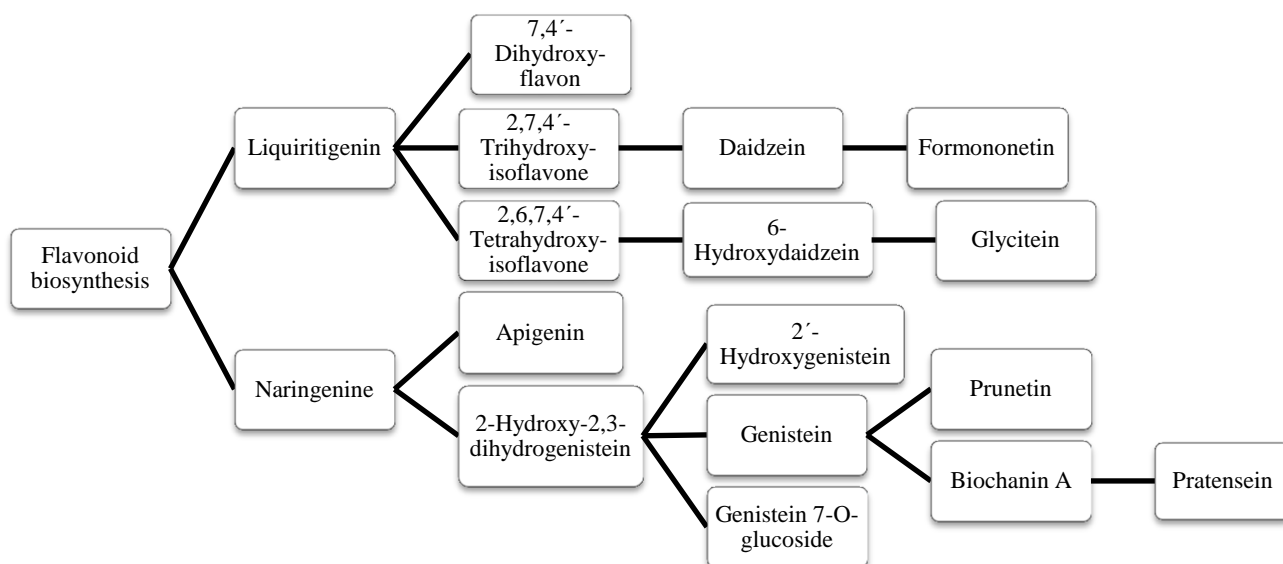
Formononetin: R¹ = OH, R² = OCH₃, R³ = H

Biochanin A: R¹ = R³ = OH, R² = OCH₃

6.1.3.1 Flavonoidy, isoflavonoidy – biosyntéza

Isoflavonoidy, biologicky aktivní sloučeniny známé jako fytoestrogeny, spadají do skupiny flavonoidů. Flavonoidní struktura je tvořena 2-fenylchromanovou strukturou, zatímco isoflavonoidy jsou tvořeny 3-fenylchromanovou strukturou bez substituce hydroxylové skupiny v poloze 2. Isoflavonoidy jsou odvozeny od flavonoidů biosyntetickou cestou přes liquiritigenin nebo naringenin. Cestou liquiritigeninu vznikají námi sledovaný formononetin a daidzein. Cestou naringeninu genistein a biochanin A. ⁽¹³⁾ Genistin je glykosid genisteinu. ⁽¹⁴⁾

Obrázek 4 Biosyntéza isoflavonoidů ⁽¹³⁾



6.1.3.2 Účinky isoflavonoidů

Tyto sekundární metabolity ovlivňují různé biologické funkce skrze několik cest. Jsou strukturně podobné estrogenům a vykazují estrogení i antiestrogení účinky v rozličných tkáních. Výsledky epidemiologických studií zkoumajících roli isoflavonoidů v lidském zdraví jsou prozatím nejednoznačné. Některé studie podporují názor, že konzumace isoflavonoidů má protektivní efekt na imunomodulační mechanismy, kognitivní funkce, snižuje riziko některých druhů rakovin, onemocnění kardiovaskulárního systému a kůže, osteoporózy, obezity a také přináší úlevu od menopauzálních symptomů. Jiné studie zase naopak neprokázaly žádný efekt. ⁽¹⁵⁾

Toto potvrzuje i systematické review z roku 2015 shrnující účinky různých intervencí v prevenci rakoviny prostaty. 60 mg genisteinu po dobu 12 týdnů versus placebo, 240 µg selenu + 570 mg silymarinu po dobu 6 měsíců versus placebo, sójový protein (kombinující genistein, daidzein a glycitein) ve srovnání s kalcium kaseinátem podávaným 24 měsíců. Slabá kvalita, variabilita v metodologii, nekonzistentní výsledky komplikují popis této záležitosti. ⁽¹⁶⁾

U genisteinu a daidzeinu nebyla zjištěna žádná souvislost s ovlivněním pubertálního vývoje u dívek. Tyto dvě látky byly zachycovány v průběhu pokusu jako biomarkery z moči. ⁽¹⁷⁾

Ve studii zkoumající antivirotické účinky deseti různých flavonoidů proti kočičímu kalciviru (FCV) a myšímu noroviru (MNV), byl sledován i účinek daidzeinu. U dávky 200 µM daidzeinu bylo pozorováno významné snížení titru FCV o $63,47 \pm 9,82$ %. Dávka 50 µM daidzeinu snížila titr MNV o $46,32 \pm 8,70$ %. Po předchozím ošetření daidzeinem se prokázala anti-norovirová aktivita proti NMV a FCV. ⁽¹⁸⁾

U genisteinu se v několika posledních letech pracuje s jeho potenciálními chemoprotektivními účinky proti rakovině. Ačkoli estrogény zvyšují riziko prsního karcinomu a genistein podporuje estrogen-pozitivní karcinom prsu, dlouhodobá konzumace sóji (zdroj genisteinu a dalších flavonoidů) se zdá být protektivní vůči karcinomu prsu. Ale jsou potřeba další studie, abychom porozuměli, proč konzumace sóji během dětství redukuje riziko karcinomu prsu. Zajímavostí je, že genistein vyčerpává telomerázovou aktivitu v buněčných liniích prsního karcinomu a má synergický efekt s inhibičními účinky tamoxifenu na estrogen-pozitivní buňky prsního karcinomu. Vedle toho se ukázalo, že genistein aplikovaný samostatně na estrogen-negativní buňky může významně obnovit expresi estrogenového alfa receptoru, stejně tak jako asociace s inhibitory histonové desacetylázy a trichostatinem. Jiné studie naznačují, že genistein modifikuje histonovou acetylaci v prsním karcinomu. Proto se zdá být genistein potenciální epigenetickou léčbou prsního karcinomu. ⁽¹⁹⁾

Ve studii, posuzující vliv extraktu z *G. tinctoria* (GT) nebo methylparabenu (MP) na histopatologické změny a na dva biomarkery oxidativního stresu u krys subchronicky exponovaných bisfenolem A (BPA), byly zjištěny příznivé účinky extraktu z *G. tinctoria*. V pokusu byly použity u jednotlivých skupin krys koncentrace: BPA 50 mg kg⁻¹, BPA + GT 35 mg kg⁻¹ nebo BPA + MP 250 mg kg⁻¹ po dobu 90 dní.

Byly odebrány vzorky plasmy, tkáně jater, ledvin, štítné žlázy, dělohy, vaječníků a prsní žlázy. Lipidová peroxidace a produkce hydroxylových radikálů byla hodnocena pomocí histologické analýzy malondialdehydu a 2,3-dihydroxybenzoové kyseliny. Závažnost histopatologických změn jater a ledvin byla nižší po podání extraktu GT než po podání pouze BPA nebo BPA+MP. MP a GT vykazovaly antioxidační vlastnosti redukující lipidovou peroxidaci a BPA indukovanou generaci hydroxylových radikálů. ⁽²⁰⁾

Protektivní účinek daidzeinu a genisteinu byl prokázán pouze u nádorů s pozitivním estrogenovým receptorem. Vysoký příjem ostatních isoflavonoidů, například formononetinu a biochaninu A, stejně tak jako celý komplex isoflavonoidů, nebyl asociován s poklesem rizika. Riziko prsního karcinomu významně klesá s vysokým příjmem rostlinného lignanu matairesinolu, ale ne s příjmem secoisolariciresinolu nebo uceleného komplexu lignanů. Nicméně oba předpokládané savčí lignany enterodiol a enterolacton byly nepřímo spojeny se zvýšeným rizikem rakoviny prsu. Efekt savčích lignanů je receptorově nezávislý. Žádný efekt nebyl pozorován u celkového příjmu fytoestrogenů. Výsledky této studie podporují tvrzení, že role genisteinu a daidzeinu u snížení rizika vzniku premenopauzálního karcinomu prsu je významná, navzdory nízkým hodnotám, stejně tak jako u matairesinolu a savčích lignanů. ⁽²¹⁾

Ve studii z roku 2001 bylo hodnoceno, jestli genistein stimuluje růst buněk estrogen dependentního lidského karcinomu prsu (MCF-7) *in vivo*. V pokusu byly použity myši s odstraněným brzlíkem, kterým byly aplikovány buňky MCF-7 a byly krmeny genistinem nebo genisteinem. Tumory se přeměřovaly každý týden po dobu 11 týdnů. Po usmrcení myši a zpracování výsledků byl závěr této práce, že glykosid genistin, stejně jako aglykon genistein, mohou stimulovat růst buněk estrogen dependentního karcinomu prsu *in vivo*. Odstranění genistinu nebo genisteinu z diety vyvolalo regresi tumoru. ⁽²²⁾

Podle další studie je genistein inhibitor tyrosinkinázy a způsobuje odloučení rotaviru z povrchu buňky. Tyto rotaviry jsou hlavní příčinou gastroenteritidy dětí a genistein by mohl být vzorem pro vznik nových léků – anti-rotavirotik s nízkou nebo dokonce žádnou toxicitou. Z širokého spektra inhibitorů pozastavil pouze genistein infekčnost rotaviru. Inhibice byla kmenově a dávkově omezena. Efekt drogy se zdá být závislý na aktivitě látky jako inhibitoru protein kinázy, poněvadž neaktivní analog genisteinu, daidzein, neměl žádný efekt na infekčnost viru. ⁽²³⁾

Dále byly zkoumány účinky biochaninu A, konkrétně jeho protektivní efekt na dopaminergní neurony u krys, kterým byl aplikován unilaterální lipopolysacharid (LPS). Výsledky ukázaly, že biochanin A významně zlepšuje u zvířecího modelu Parkinsonovy choroby symptomy v chování, má preventivní účinky na ztrátu dopaminergních neuronů a inhibuje aktivaci škodlivých mikroglíí u krys po aplikaci LPS. Navíc inhibuje aktivaci nicotinamid adenin dinucleotid fosfát oxidázy (NADPH oxidázy), produkci malondialdehydu (MDA), zvyšuje aktivaci superoxid dismutázy (SOD) a glutathionperoxidázy (GPx) v mozcích krys. Tyto výsledky naznačují, že biochanin A může být přírodní kandidát s protektivními účinky na dopaminergní neurony v léčbě Parkinsonovy choroby. ⁽²⁴⁾

V další studii byla stanovována akutní toxicita u formononetin-3'-sulfonátu, ve vodě rozpustném derivátu formononetinu. Tento derivát má prokázané neuroprotektivní a kardioprotektivní účinky jak *in vitro*, tak *in vivo*. Cílem studie bylo zjistit akutní toxicitu po intravenózním podání krysám a psům. U psů byla podána maximální dávka 2000 mg kg⁻¹, u krys 1000 mg kg⁻¹. Po ošetření byli monitorováni po 14 dní. U krys nebyla prokázána žádná toxicita ani mortalita. U psů bylo zaznamenáno přechodné zvracení do 15-20 minut po aplikaci. Vedle toho byl nalezen bílý krystal nezmetabolizovaného formononetin-3'-sulfátu v moči u krys i psů. Ale žádné biochemické nebo histopatologické změny nebyly objeveny. ⁽²⁵⁾

Červený propolis (nový brazilský druh tohoto včelího produktu) má velice neobvyklé složení obsahující isoflavonoidy, jako jsou formononetin a biochanin A. Ve studii byla zkoumána potenciální aktivita hydroalkoholického extraktu červeného propolisu a jeho biomarkeru – formononetinu, jako antinociceptivního a protizánětlivého léčiva na experimentálních myších modelech. Extrakt a formononetin vykazovaly významnou protizánětlivou aktivitu. Extrakt ale vykazuje také antinociceptivní účinek při zánětu a neurogenní bolest bez motorických vedlejších účinků, možná i díky účinkům jiných látek obsažených v extraktu. To vše podporuje populární používání červeného propolisu jako alternativní léčby zánětlivých, bolestivých a infekčních onemocnění a poukazuje na slibné terapeutické strategie v léčbě neuropatické bolesti. ⁽²⁶⁾

Ve studii zkoumající indukci apoptózy vyvolané formononetinem u buněk lidského osteokarcinomu buněčné linie U2OS (regulované Bcl-2 a BAX expresí) byly buňky ošetřeny různými koncentracemi formononetinu *in vivo* a *in vitro*. Po zpracování

výsledků se došlo k závěru, že formononetin má inhibiční efekt na proliferaci U2OS buněk jak *in vitro*, tak *in vivo*. Tento antitumorový efekt koreluje s koncentrací formononetinu. ⁽²⁷⁾

Z výsledků studie čínských vědců plyne, že formononetin indukuje endotheliální buněčnou migraci, formaci stresových vláken a zřejmě i podněcuje angiogenezi skrze estrogenový alfa receptor posílený ROCK (Rho-associated protein kinase) prostřednictvím utvoření aktivovaného komplexu: estrogenový alfa receptor/ ROCK-II. ⁽²⁸⁾

Také bylo zjištěno, že formononetin zesiluje cytotoxicitu doxorubicinu u gliomových buněk. Kombinační léčba s formononetinem zvrátila doxorubicin-indukovaný epiteliálně-mesenchymatický přechod v buňkách tumoru. Navíc bylo zjištěno, že léčba formononetinem významně snížila expresi histonové deacetylázy 5. ⁽²⁹⁾

Ve studii zabývající se inhibicí angiogeneze a zánětu pomocí extraktu z jetele lučního (*Trifolium pratense*) bylo zaznamenáno, že anti-angiogenické účinky nemethylovaných isoflanovů daidzeinu a genisteinu byly vyšší, než methylovaných sloučenin formononetinu a biochaninu A. Výsledky naznačují, že extrakt z této byliny není pouze vhodný doplněk při menopauzálních problémech, ale může být také významným chemoprotektivním prostředkem proti chronickým nemocem, které mají například vysokou incidenci u starších žen. ⁽³⁰⁾

6.2 Explantátové kultury rostlin

Kromě běžného způsobu získávání sekundárních metabolitů z rostlin se využívají i *in vitro* metody. U těchto metod je však zapotřebí striktně sterilní prostředí. Pracuje se s izolovanými částmi rostlin z různých úseků rostliny, u kterých se využívá jejich schopnosti se dále dělit a v případě potřeby jsou dokonce schopny v rozvoj plnohodnotné rostliny.⁽³¹⁾ Vypěstování plnohodnotné rostliny je podmíněno totipotencí (to znamená, že každá diferencovaná buňka rostliny obsahuje kompletní genetickou informaci), tato vlastnost tudíž i zaručuje vegetativní množení explantátu.⁽³²⁾

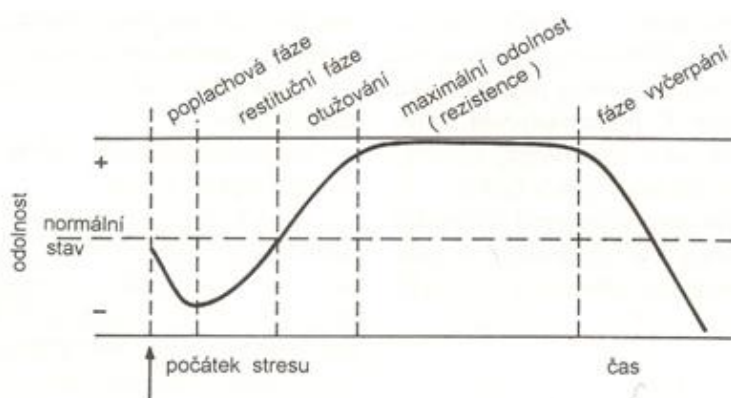
Explantáty potřebují pro přežití jednak sterilní podmínky, ale i vhodnou výživu. Ta zahrnuje minerální látky, organické látky jako jsou cukry a vitamíny a také růstové regulátory. Tyto látky jsou součástí takzvaného kultivačního média. Dále jsou explantáty ovlivněny faktory, jako je světlo (intenzita, spektrum, fotoperioda), teplota a popřípadě i plyná složka kultivačního média. Vedle těchto faktorů závisí vývoj explantátu na jeho samotných vlastnostech, obzvláště genomu.

Po vložení explantátu do média a nastavení kultivačních podmínek dochází k řadě reakcí. Nejprve explantát reaguje na prodělané poranění při izolaci, poté reaguje na ztrátu celistvosti rostliny a na konec reaguje na kultivační podmínky. Ke vzniku kalusu dochází po izolaci explantátu. Kalusem nazýváme pletivo neorganizovaného růstu, bez polarit a běžného uspořádání pro rostlinu, ale diferenciac buněk nadále probíhá. Při dodržení kultivačních podmínek a přenášení kalusu bez odumřelých buněk může explantát přežívat až desítky let.⁽³¹⁾

6.3 Stresové faktory mající vliv na tvorbu a obsah sekundárních metabolitů

Stresové faktory jsou fyzikálně – chemické (abiotické) nebo biotické. Po proniknutí ovlivňují vnitřní prostředí rostliny. To, v jaké míře rostlinu ovlivní, závisí na rostlinném druhu, a to díky různě vyvinutým ochranným strukturám (tloušťka kutikuly, impregnace buněčných stěn, rezervoáry vody, snadno rozložitelné organické látky). Rostlina ale také může na stresové faktory reagovat fyziologickými procesy, kterými se snaží minimalizovat negativní dopad stresových faktorů, již působících ve vnitřním prostředí. Dle adaptačních schopností rostliny daných intenzitou, délkou působení stresového faktoru a genetickými predispozicemi rostliny, se rostlina vyrovnává se stresem různými způsoby. ⁽³³⁾

Obrázek 5 Idealizovaný průběh stresové reakce ⁽³³⁾



6.3.1 Abiotické faktory

Zvýšená teplota nad 40 °C vyvolává u většiny rostlin změny fyzikálně – chemických vlastností buněčných membrán (přechod do lamelárně kapalného = superfluidního stavu → ztráta funkce) a proteinů (změna konformace → ztráta funkce). Výjimkami samozřejmě jsou některé rostliny polopouští a pouští. Rozdíly v odolnosti rostlin vůči vyšším teplotám spočívají především v chemickém složení buněčných membrán. Reakce rostlin na zvýšenou teplotu se také projevuje tvorbou stresových proteinů (heat shock proteins). ⁽³³⁾

Nízká teplota (ne mráz) mnohdy předurčuje schopnost rostliny v budoucnu přežít expozici teplotám pod bodem mrazu. Důsledkem aklimatizace na chlad jsou změny v genové expresi asociovány s fyziologickými a biochemickými procesy. Poškození

nastává většinou díky dehydrataci způsobené formací extracelulárního ledu, ostatní poškození je způsobeno ROS (reaktivní formy kyslíku).⁽³⁴⁾ Funkčnost enzymů není chladem ovlivňována, ale dochází ke změnám fyzikálně – chemických vlastností membrán (tvoří se gel). Opět dochází k hromadění osmoticky aktivních látek a produkci stresových hormonů (cold-induced proteins). Zvyšuje se koncentrace kyseliny abscisové.

Při teplotách pod bodem mrazu je pro rostlinu důležité, aby zabránila vzniku ledu uvnitř buňky pomocí osmoticky aktivních látek, a při výrazně nízkých teplotách se musí ochránit prostřednictvím maximální dehydratace. Tyto procesy jsou ale sezónní záležitostí.

Nedostatečné množství vody je zásadním zemědělským problémem celosvětově ovlivňujícím růst a produktivitu rostlin. Na rozdíl od minerálních látek je koloběh vody v ekosystémech velice rychlý, její příjem nepravidelný a někdy velice nevyzpytatelný. Nejmarkantnější vliv má na růst. Již při malých ztrátách dochází ke zpomalení růstu. Je zasažena funkčnost enzymů. Ke snížení aktivity dochází například u nitrátoreduktázy, ke zvýšení aktivity dochází u α -amylázy a ribonukleázy. Tvorba cytokininů se také snižuje a buněčné dělení se postupně zpomaluje. Zvyšuje se koncentrace kyseliny abscisové, obzvláště v listech, kde je její funkcí zavírání průduchů. Pro osmotické přizpůsobení je důležitá zvýšená syntéza aminokyseliny prolinu.

Nedostatečné množství kyslíku v půdě je problém obzvláště jílovitých půd nebo bývá důsledkem zamokření. Při tomto stresovém stavu získává rostlina energii fermentačními procesy, které nejsou z energetického hlediska dobrou strategií, a také dochází k tvorbě nebezpečných konečných produktů, jako je ethanol a kyselina mléčná.

Půdy s vysokým obsahem solí jsou problémem oblastí v okolí moře, s nadměrným výparem (pouště a polopouště) nebo dlouhodobé závlahy a okolo komunikací ošetřených posypovou solí. Rostlina rostoucí v tomto prostředí se chrání osmoregulací (dochází ke zvýšení osmotického tlaku v buňkách kořenů) a tvorbou stresových proteinů.

Kyselé půdy jsou častým stresovým faktorem, který je způsoben nerozváženým způsobem hospodaření (monokultury, nadměrné užívání dusíkatých hnojiv, spotřeba veškeré biomasy). V takové půdě není tak významným problémem samotná kyselost, ale nepřímý důsledek kyselosti půdy, a to je rozpustnost toxických sloučenin (vysoce

toxické jsou ionty Al^{3+}) a v nadbytku také volné ionty Fe^{2+} a Mn^{2+} a vyplavení kationtů v důsledku vytěsnění kationtů Ca^{2+} , Mg^{2+} a K^+ ze sorpčních vazeb na koloidech. Dále je snižena dostupnost fosforu a nitrátového dusíku. ⁽³³⁾

Světlo je pro rostliny esenciální faktor mající vliv na normální růst. V excesivní dávce však může způsobit výrazné buněčné poškození, obzvláště díky ROS. Rostliny se se proti ROS brání zvýšením peroxidázové aktivity, akumulací anthokyanů, redukcí komponent anténního systému k rozptýlení energie absorbovaného světla. ⁽³⁵⁾ V rešerši zabývající se abiotickými i biotickými faktory došli k závěru, že světlo, cirkadiální rytmus a nabídka cukrů mají vliv na syntézu ligninu. ⁽³⁴⁾

V posledních letech došlo k vzestupu UV-B záření (280-320 nm). Rostliny využívají k ochraně před UV zářením mechanické bariéry jako je tlustší kutikula a trichomy. Také syntetizují protektivní sekundární metabolity. ⁽³⁶⁾ UV-B záření zvyšuje produkci sloučenin, jako jsou flavonoidy, taniny a lignin, u kterých se zdá, že hrály významnou roli v přechodu rostlin z vodního prostředí na pevninu, když začaly být více exponovány UV-B záření. ⁽³⁷⁾ UV-B záření významně zvýšilo produkci isoorientinu, orientinu, isovitexinu a vitexinu v kalusových kulturách mnoha druhů rodu *Passiflora*. ⁽³⁸⁾ Tvorbu sekundárních metabolitů může ovlivnit i UV-A a UV-C záření. Dlouhé vlnové délky UV-A záření zvýšily množství atranorinu. ⁽³⁹⁾ Po expozici UV-C záření došlo ke zvýšení fytoalexinů u tří amerických druhů rodu *Vitis* a tří kultivarů *Vitis vinifera*. ⁽⁴⁰⁾ Vliv UV záření (254 a 366 nm) byl zkoumán i na produkci sekundárních metabolitů u kultur *G. tinctoria*. Produkce jednotlivých isoflavonoidů v kalusové kultuře se měnila v závislosti na vlnové délce UV záření. Genistin, genistein, daidzein, biochanin A se tvořil ve větší míře po UV ozáření v kalusové kultuře ve srovnání s neošetřenými kalusy. Maximální obsah genistinu byl zaznamenán při vlnové délce 254 nm po dobu 300 s (vzorkování po 48 h). Tvorba formononetinu byla zaznamenána pouze u kalusových kultur ošetřených UV zářením. ⁽⁴¹⁾

Mechanická zranění, například po napadení hmyzem nebo mikroben, vyvolávají specifické stresové reakce. ⁽⁴²⁾

Některé kovy, jako je Zn, Cd či Pb, se vyznačují značnou toxicitou, rostliny většinou nemají obranné mechanismy a z půdy je neselektivně transportují s ostatními minerály. Způsobují především zpomalení růstu primárního kořene. Ke hromadění kovů dochází obzvláště v kořenech. Odolnost rostlin proti účinkům toxických kovů se liší.

Mezi odolnější patří některé trávy. Vylučují totiž do rhizosféry organické kyseliny, využívají sorpce na pektinové látky buněčných stěn a vyznačují se i vyšší selektivitou transportních proteinů. K obranným mechanismům při expozici toxických kovů patří tvorba stresových proteinů, proteázy, ubikvitinu a fytochelatinů. Fytochelatiny jsou látky inaktivující toxicitu těžkých kovů, díky své schopnosti vázat je do chelátových komplexů. Jsou to polypeptidické látky příbuzné tripeptidu glutathionu. Tvorba těchto látek je indukovaná až přítomností těžkých kovů v cytozolu. Těžké kovy jsou pak dále po transportu do vakuoly inaktivovány koncentrovanými organickými kyselinami. ⁽³³⁾ Těžké kovy jsou definovány jako kovy s hustotou vyšší než 5 g cm^{-3} . Těžké kovy jako je Mo, Fe a Mn jsou považovány za mikronutrienty. Zn, Ni, Cu, V, Co, W a Cr jsou toxické prvky. U kovů Hg, Ag, Sb, Cd, Pb se prozatím nezdá, že by měly funkci jako mikronutrienty, a jsou pro rostliny různě toxické. Jako chelátory se často uplatňují fenolické metabolity, které vychytávají ROS během oxidačního stresu, způsobeného těžkými kovy. S těžkými kovy reagují fenolické a karboxylové skupiny. K těmto sloučeninám se řadí hydroxyskořicová kyselina a flavonoidy zahrnující anthokyany. ⁽⁴³⁾ Expozice suspenzní kultury *Panax ginseng* vysokou dávkou mědi vedla k akumulaci fenolických sloučenin a ligninu. ⁽⁴⁴⁾ Byl objeven nový fytoalexin danielon, který byl izolován z plodů papáji ošetřené solemi mědi. ⁽⁴⁵⁾ Celkový obsah rozpustných fenolických sloučenin se zvýšil u *Triticum aestivum* po expozici 40 mM Ni. ⁽⁴⁶⁾ Naopak u *Camelii sinensis* ošetření Ni vedlo k poklesu fenolických sloučenin. ⁽⁴⁷⁾

Mezi stresující faktory řadíme i některé plynné sloučeniny (SO_2 , CO_2 , ozon). Oxid siřičitý je nebezpečný ve větších koncentracích, kdy narušuje průběh sekundárních procesů fotosyntézy prostřednictvím blokace činnosti karboxylačního enzymu Rubisco. Ozon vzniká působením ultrafialového záření na oxidy dusíku (NO , NO_2) a některé plynné organické sloučeniny. Ozon jako stresový faktor podněcuje tvorbu stresových hormonů, ethylenu, polyamidů a flavonoidů. ⁽³³⁾ Koncentrace oxidu uhličitého má v budoucnu stále narůstat a nejspíše bude mít i dopad na metabolismus sekundárních metabolitů u rostlin. ⁽⁴⁸⁾ Je známo, že vysoké koncentrace CO_2 interferují s biosyntézou ligninu. ⁽³⁴⁾

6.3.2 Biotické faktory

K biotickým stresorům řadíme bakterie, plísňe a viry. Rostlina dostává signál o napadení prostřednictvím specifických metabolitů, které vylučuje parazit nebo je tento

specifický metabolit odloučen z poškozené buněčné stěny. V rostlině se aktivují vhodné geny pomocí druhých posílů. Obrannými mechanismy je opět tvorba stresových proteinů, syntéza a kumulace sekundárních metabolitů s antibiotickým účinkem (flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky, alkaloidy- tzv. fytoncidy či inhibitiny). Obvykle jsou tyto sloučeniny běžně přítomny, při infekci se však jejich koncentrace zvyšuje. Specifickými obrannými látkami jsou fytoalexiny, které se tvoří až v přítomnosti patogenu. Chemicky jsou to různorodé sloučeniny, podobné typy sloučenin se vyskytují u příbuzných druhů rostlin. V čeledi *Fabaceae* to jsou isoflavonoidy, u *Solanaceae* seskviterpeny, u *Poaceae* diterpeny, u *Apiaceae* furanokumariny a u *Vitaceae* stilbeny. Tyto látky jsou většinou lipofilního charakteru, to jim usnadňuje průnik plazmatickou membránou patogenu. Dále se rostlina může bránit pomocí nekrózy vlastních buněk napadených patogeny nebo tvorbou kalózy, jež vyplňuje buňky kolem infikovaného místa.⁽³³⁾ Odpověď na útok patogenu se může také využívat ke zvýšení produkce určitých látek. Například u suspenzní kultury tolíce vojtežky (*Medicago sativa*) došlo k akumulaci stresových fenolických metabolitů. Tato kultura byla ošetřena elicitorem *Colletotrichium lindemuthianum*, který byl přidán k vodnému roztoku kultur.⁽⁴⁹⁾

Alelopatii, další biotický stresový faktor, můžeme rozdělit na přímou a nepřímou. U přímého působení mohou některé rostliny prostřednictvím sekundárních metabolitů, které vypouští do půdy, ovlivňovat okolní rostliny. Účinek může být inhibiční až toxický. Například u některých trav a jetelovin bylo prokázáno toto ovlivňování ve vodních kulturách, kde tvořily rostliny fenolické sekundární metabolity. Nepřímé alelopatické působení bylo pozorováno například jako metabolity uvolněné mikrobiálním rozkladem z odumřelých částí rostlin. Známým příkladem může být juglon, díky kterému jsou velice toxické opadané listy ořešáku královského. Může se jednat také o různé flavonoidní sloučeniny a taniny. Běžné jsou však především fenolické látky běžně se vyskytující v půdě.

Sem je možné zahrnout i interakci s býložravci, díky které se u rostlin vyvinuly různé morfologické a morfogenetické adaptace v podobě trnů, vysokého obsahu sklerenchymatických pletiv nebo rychlé regenerace poškozených orgánů. Dále se vyvinuly i biochemické adaptace, které můžeme rozdělit na tvorbu látek kvalitativního charakteru (látky v malých koncentracích, ale pro živočichy vysoce toxické – alkaloidy,

glykosidy a glukosinoláty) nebo kvantitativního charakteru (látky toxické až ve větším množství).⁽³³⁾

6.4 *Genista tinctoria* L.-*in vitro* elicítace

U vysoce produktivní suspenzní kultury *G. tinctoria* byly použity elicitory methyljasmonát a chitosan. Dál byl použit dimethylsulfoxid (DMSO) jako permeabilizátor. Maximální koncentrace isoflavonových aglykonů (4-6krát větší než u kontrolních vzorků biomasy) byly získány ze vzorků, kde byl jako elicitor použit chitosan. Všechny isoflavonoidy byly uloženy uvnitř buněk. Elicitory neměly žádný efekt na akumulaci a metabolismus základních glykosidů isoflavonoidů. Změna způsobu ukládání isoflavonoidů byla zaznamenána až po suplementaci média DMSO. Oba elicitory (chitosan v koncentraci 150 mg l⁻¹ a methyljasmonát v koncentraci 100 μmol l⁻¹) byly přidány v 0. nebo 26. den růstového cyklu. Přímý permeabilizující faktor DMSO byl přidán v množství 20 ml l⁻¹ k aktivně rostoucí suspenzní kultuře *G. tinctoria*.⁽⁵⁰⁾

Ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů se dále používají i růstové regulátory. Například byl zkoumán vliv růstových regulátorů na produkci anthokyanů u jahod (*Fragaria ananassa*), mrkve (*Daucus carota*), batátu (*Ipomoea batatas*) a šťavele (*Oxalis reclinata*). Růstové regulátory, jako je 2,4-D, IAA a NAA, suplementovány v různých mírách, podporovaly růst stejně jako syntézu anthokyanů. Mezi cytokininy vykazoval největší produktivitu kinetin. Nejvýhodnější byla kombinace IAA a kinetinu v porovnání s ostatními kombinacemi.⁽⁵¹⁾

Vápník je všudypřítomná sloučenina účastnící se signálních cest v rostlině. Bylo objeveno, že obsah vápníku se zvyšuje při odpovědi rostliny na některý stresový faktor, jako je světlo, salinita, sucho nebo chlad. Ošetření buněčné kultury mrkve (*Daucus carota*) nízkými koncentracemi vápníku vyústila ke zvýšení růstu i produkce anthokyanů.⁽⁵¹⁾

Vliv růstových regulátorů na růst biomasy a akumulaci isoflavonů genisteinu a daidzeinu včetně jejich aglykonů, glykosidů a jejich esterů byl zkoumán také u kalusové kultury *G. tinctoria*. V experimentu bylo použito 10 auxinů a 7 cytokininů a jejich kombinace. Statistickou analýzou byl zachycen vztah mezi růstem kalusu a akumulací isoflavonů, v případě cytokininů byl tento vztah pozitivní a negativní u auxinů. Ve skupině cytokininů byl největší obsah isoflavonů (6,436.26 mg/100 g sušiny) a

nejrychlejší nárůst biomasy byl zaznamenán u kinetinu v koncentraci $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ společně s 2,4-D v koncentraci 5 mg l^{-1} . Ve skupině auxinů kombinace $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ TIBA (2, 3, 5- triiodobenzoic acid) a $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ KIN (kinetin) vykazovala největší nárůst biomasy a obsah isoflavonů ($10,474.23 \text{ mg /100 g sušiny}$), což je největší množství těchto metabolitů, kterých bylo dosaženo v kalusové kultuře u vyšších rostlin. ⁽⁵²⁾

V rámci stresových faktorů u kultur *G. tinctoria* byl pozorován i vliv elektrického proudu a roztoku AgNO_3 . Největší obsah genistinu byl naměřen u suchých buněk suspenzní kultury po 30 min elicitace proudem 10 V a 6 h kultivace, daidzeinu po 60 min elicitaci proudem o síle 5 V a 24 h kultivaci. Největší obsah genistinu byl naměřen po 48 h u sušiny suspenzní kultury při použité koncentraci $5,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ AgNO_3 . Tato stejná koncentrace byla také nejvýhodnější pro nejvyšší tvorbu daidzeinu po 168 h. Součástí studie bylo hodnocení eluce isoflavonoidů do živného média, ty byly analýzou v médiu prokázány. ⁽⁵³⁾

Poměrně novinkou je využití ultrazvuku jako elicitoru zvyšující produkci sekundárních metabolitů. Ve studii byl použit nízkenergetický ultrazvuk. Expozice ultrazvuku signifikantně zvýšila obsah genistinu po 3 min ošetření (vzorkování po 72 h). Největší obsah daidzeinu byl naměřen po 5 min ošetření (vzorkování po 168 h). ⁽⁵⁴⁾

K elicitaci se mohou využít i jiné látky, které jsou pro rostlinu cizorodé. Byl například zkoumán vliv pyrazinkarboxylových kyselin na tvorbu flavolignanů, flavonoidů a isoflavonoidů u kalusových a suspenzních kultur *Sylibum marianum*, *Ononis arvensis* a *G. tinctoria*. Tyto látky byly původně připraveny jako antimykobakteriální a antifungální sloučeniny. Byl zjištěn pozitivní vliv na tvorbu sekundárních metabolitů. ^{(55) (56)}

6.5 Selen

6.5.1 Obecná charakteristika selenu

Slovo selen pochází z řeckého výrazu pro měsíc. Byl objeven Berzeliem v roce 1817. Tento polokov má protonové číslo 34, relativní atomovou hmotnost 78,96 a dosahuje oxidačních čísel -II, 0, +IV, +VI. Vyskytuje se v několika vzácných minerálech. V minulosti byl získáván z odpadního prachu při zpracovávání rud obsahující sulfidy mědi. Dnes se selen nejčastěji získává ze zbytkového materiálu při elektrolytickém zpracování rud mědi.⁽⁵⁷⁾

Selen existuje v několika alotropických formách, které se liší strukturou a barevností. Elementární selen je považován za stopový prvek tělu prospěšný, ale ve vysokých dávkách může být toxický.⁽⁵⁸⁾ Selen se vyskytuje v anorganických i organických sloučeninách. V anorganických sloučeninách jako selenan a seleničitan.⁽⁵⁹⁾ V organických sloučeninách se nejčastěji jedná o metylovanou formu nebo může v aminokyselinách zastupovat místo síry (selenocystin, selenocystein, selenomethionin a selenomethylselenomethionin).⁽⁵⁷⁾

6.5.2 Vliv selenu na lidský organismus

Selen je stopový prvek, který se vyskytuje v některých běžných potravinách a také je součástí různých doplňků stravy. Pro správnou funkci lidského těla je zcela nezbytný, je totiž součástí více jak dvou desítek selenoproteinů, jež mají velice významnou roli při reprodukci, metabolismu thyroïdních hormonů, DNA syntéze a ochraně těla před infekcí a oxidativním stresem.⁽⁵⁹⁾

Podle nařízení Evropské Unie by doporučená denní dávka selenu měla dosahovat do 55 μg (v rámci každodenního stravování).⁽⁶⁰⁾

Potravinový příjem závisí na obsahu selenu v půdě a mění se v závislosti na geografické lokalitě. Příklad příjem selenu je v Evropě daleko nižší ve srovnání s USA, Kanadou, Japonskem a Venezuelou. Ve zmíněných zemích dosahuje příjem dokonce až hodnot 300 μg den^{-1} .⁽⁶¹⁾ Nízké hodnoty selenu v evropské půdě zapříčiňují, že potraviny vypěstované a konzumované v členských státech Evropské Unie nemají potřebný obsah tohoto stopového prvku. Suplementace tímto prvkem je v tomto případě možným řešením nedostatečného příjmu selenu ve stravě.⁽⁶²⁾

Selen se po absorpci váže na červené krvinky, albumin a globuliny krevní plazmy. Mezi 28 % a 46 % selenu je uloženo v kosterním svalstvu. Selen je také antioxidantem chránícím buňky proti volným radikálům, které jsou přirozeným vedlejším produktem metabolismu a spoluúčast na redukčních procesech je podmíněna vznikem funkčních vazeb s aminokyselinami (selenocystein a selenomethionin).⁽⁶²⁾

Některé studie ukazují negativní korelace mezi hladinami selenu a rizikem kolorektálního karcinomu, rakoviny prostaty, močového měchýře, kůže, žaludku a jícnu.^{(63) (64)} Objevily se také určité náznaky, že suplementace selenem může zvýšit frekvenci některých druhů rakovin, ovlivněných popularizací doplňků se selenem.⁽⁶⁵⁾

Dále studie naznačují, že vysoké dávky selenu ve stravě snižují riziko rakoviny o 31 % a riziko úmrtí je o 45 % nižší. Riziko rakoviny prostaty je sníženo o 22 % a rakoviny močového měchýře také o 22 %. S nedostatkem selenu je spojován rozvoj rakoviny častěji u mužů než u žen, což může poukazovat na možné rozdíly v distribuci selenu u mužů a žen.⁽⁶³⁾

Studie zkoumající vliv selenu a vitamínu E neodhalily žádný vztah mezi suplementací selenu (200 µg selenu na den) s vitamínem E (400 UI vitamínu E na den) nebo bez vitamínu E a rizikem vzniku rakoviny prostaty.⁽⁶⁶⁾ Dlouhodobější sledování po dobu osmnácti měsíců po skončení studie neprokázalo žádné významné spojení mezi suplementací selenu a rizikem rakoviny prostaty.⁽⁶⁷⁾

6.5.3 Biologická dostupnost, toxicita a rozdílné vlastnosti jednotlivých forem

Z hlediska biodostupnosti se zdá, že nejvíce vyhovují organické sloučeniny.⁽⁶²⁾^{(68) (75)} Organické sloučeniny jsou vstřebávány v průměru z 85–95 % ve srovnání s anorganickými formami, kterých se vstřebává okolo 40–50 %.⁽⁶²⁾ Biologická dostupnost není podmíněna pouze tím, jestli je látka podána ve formě organické či anorganické sloučeniny, nebo podaným množstvím, ale obzvláště u organických sloučenin záleží na formě zdroje selenu, na stravitelnosti a dostupnosti selenoaminokyselin.⁽⁶⁸⁾

Toxicita anorganických forem jako jsou seleničitany a selenany ve vodných vzorcích je čtyřicetkrát vyšší než u organických sloučenin a toxicita Se^{IV} je větší než

Se^{VI}.⁽⁶⁹⁾ Z předběžných dat vyplývá, že anorganická forma selenu může zvyšovat cytotoxicitu vanadylu dosud neznámým mechanismem.⁽⁷⁰⁾

Nejlepší biodostupnost selenu zaručují přírodní zdroje selenu, jako jsou para ořechy (*Bertholletia excelsa*, Brazil Nuts) a zapukajské ořechy (*Lecythis ollaria*).⁽⁷¹⁾⁽⁷²⁾ Po několikadenním užívání zapukajských ořechů byla ovšem pozorována masivní alopecie způsobená toxickými účinky vysokých dávek selenu.⁽⁷³⁾ Nedostatek selenu se naopak projevuje onemocněním zvané „Kashin–Beck Disease“. Je to endemická, chronická, degenerativní osteoarthropatie charakterizovaná vážnými skeletálními deformacemi a nanismem, která se obvykle vyskytuje v období dospívání. Nejvyšší incidence této nemoci je v Číně. Dřívější studie naznačují, že prevalence tohoto onemocnění vyplývá z genetické interakce mezi genetickou vnímavostí a vlivy prostředí (nedostatek selenu a/nebo jodu, T-2 toxin – trichotecenový mykotoxin).⁽⁷⁴⁾

Díky výsledkům některých studií poukazujících na vznik rakovinného bujení v souvislosti s nadbytečným příjmem selenu a také díky jeho potenciálně škodlivému působení na DNA se snažili někteří vědci těchto efektů využít. Zkoumali tudíž antimikrobiální efekt této sloučeniny a popřípadě možnost zcitlivění některých mikrobiálních kmenů, například MRSA (methicilin-rezistentní zlatý stafylokok). Samotné využitelné antimikrobiální účinky se neprokázaly, ale byl zaznamenán efekt při zcitlivění vůči jiným antibiotikům, nejspíše díky interakci s proteázami proteazomu.⁽⁷⁵⁾

Teheránští vědci zkoumali antimikrobiální efekt probiotických kultur obohacených nanočásticemi selenu proti *Candida albicans*. Byl použit *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus johnsonii* – oba redukuje oxid seleničitý na buněčné elementární selenové nanočástice. Laktobacily ošetřené oxidem seleničitým i jejich bezbuněčná média inhibovali růst *Candida albicans* a podle vědců by měly být dále zkoumány pro možné použití u anti-*Candida* probiotických směsí v budoucnu.⁽⁷⁶⁾

Také byly nasyntetizovány monodisperzní nanočástice selenu za použití chitosanu a karboxymethylchitosanu, které fungují jako stabilizátor a tzv. „capping agent“. Touto jednoduchou metodou se dají získat funkční nanokompozity selenu s vysokou stabilitou, biokompatibilitou a biodegradabilitou, které mohou být výhodně využity v potravinových doplňcích a farmaceutickém průmyslu. V porovnání se

seleničitanem sodným byla schopnost vychytávání volných radikálů těchto sloučenin mnohem větší. ⁽⁷⁷⁾

6.5.4 Selen jako elicitor

Ve studii, zkoumající brokolici jako potenciální zdroj antikancerogenních látek s potenciální antiproliferativní aktivitou, používali ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů selen ve formě seleničitanu. Tato kombinace se selenem má několik výhod. Jednak selen může doplnit potenciální deficit tohoto minerálu, dále se navyšuje antioxidační aktivita směsi, zvyšuje se obsah fenolických sloučenin a antiproliferativní aktivita. Největší vliv na zvýšení produkce sekundárních metabolitů měl selen u sazenic brokolice, nikoli u klíčků. K ošetření byla použita destilovaná voda a roztok selenanu sodného o koncentraci 50 μM a byl aplikován patnáctý den klíčení sazenic. ⁽⁷⁸⁾

Obecně u brukvovité zeleniny nebyl pozorován žádný negativní efekt selenu na obsah antikancerogenních glukosinolatů, a proto může být doporučováno obohacování klíčků selenem, který i podporuje chemoprotektivní aktivitu těchto účinných látek. ⁽⁷⁹⁾

V jiné studii při biofortifikaci selenem a jinými elicitory nebyl pozorován žádný statisticky významný efekt na obsah a syntézu fenolických sloučenin. Zde se zkoumal ale pouze vliv na klíčky brokolice. K ošetření byl použit roztok selenanu sodného v koncentraci 10, 40, 90 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Ke statistickému zpracování dat byla použita metoda faktoriálního designu 3^2 ve dvou blocích, jako faktory byly použity – typ elicitoru a koncentrace elicitoru (10, 40, 90 $\mu\text{mol l}^{-1}$). ⁽⁸⁰⁾

Vliv selenu byl také zachycen ve studii, kdy po aplikaci selenu na klíčky tří kultivarů brokolice byl pozitivně ovlivněn glutathionový metabolismus a tvorba sekundárních metabolitů. ⁽⁸¹⁾

V další studii byla zkoumána kovy a selenem indukovaná akumulace a exkrece u kořenů sazeniček pískavice řecké seno (*Trigonella foenum-graecum*). Cílem pokusu bylo zjistit, zda se isoflavonoid medicarpin účastní detoxifikace kovů. Sledován byl vliv tří kovů (mědi, kadmia a hliníku) a selenu na syntézu a exkreci medicarpinu z kořenů sazenic pískavice řecké seno. Finální koncentrace roztoků těchto elicitorů byla 10 μM . Obsah medicarpinu byl sledován RP-HPLC (Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography) a genová exprese byla sledována pomocí RT-PCR (Reverse

Transcription – Polymerase Chain Reaction). Veškerá ošetření významně indukovala zvýšení exprese biosyntetického genu pro medicarpin a současně se zvýšil obsah medicarpinu v kořenech a mediích kultur. Paralelně se zvýšila exsudace citrátu, jenž je také považován za obecný detoxikační prostředek kovů, jako odpověď na použití elicitorů. Výše uvedené výsledky spolu s mírnými efekty elicitorů na růst kořenů a integritu plazmatické membrány naznačují, že medicarpin, stejně jako exsudace citrátu, se může účastnit detoxifikace kovů a selenu. ⁽⁸²⁾

Také byl studován vliv různé úrovně intenzity UV-B záření na distribuci selenu a fenolických látek v rostlině pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum*), která byla vypěstována ze semen ošetřených různými roztoky selenu. Semena byla máčena ve vodě, v roztoku selenanu (5, 10 nebo 20 mg Se^{VI} l⁻¹) a roztoku seleničitanu (10 nebo 20 mg Se^{IV} l⁻¹). Rostliny vypěstované z těchto semen byly vystaveny různým úrovním UV-B záření. Obsah selenu v listech byl mnohem vyšší u rostlin vypěstovaných ze semen máčených v roztoku selenanu (až k 185 ng g⁻¹) ve srovnání se seleničitanem (až k 103 ng g⁻¹). U rostlin, získaných ze semen máčených ve vodě nezávisle na UV-B záření, byla nalezena nejvyšší koncentrace selenu v listech, kde se obsah selenu pohyboval mezi hodnotami 45 a 66 ng g⁻¹. V pohankových listech bylo naměřeno množství fagopyrinu 44,5-63,6 mg/ 100 g sušiny, ve stoncích 14,3-26,4 mg/ 100g sušiny. Zde nebyl nalezen žádný efekt máčení semen v roztocích nebo vystavení UV-B záření. ⁽⁸³⁾

Podle výsledků čínské studie se zdá, že selen ve formě listového postřiku zlepšuje fotosyntézu a ochraňuje fotosystém II u hrušně (*Pyrus bretschneideri*), hroznového vína (*Vitis vinifera*) a broskve (*Prunus persica*). ⁽⁸⁴⁾ Taktéž sprejování rostlin pohanky roztokem selenu nejspíše způsobuje obohacení pohankového zrna cennými sloučeninami selenu v nutričně významných koncentracích. ^{(85) (86)}

V jiné studii byl zkoumán efekt kadmia (ve formě CdCl₂), selenu (ve formě Na₂SeO₃) a jejich směsí na tvorbu fenolických sloučenin a antioxidační aktivitu u řeřichy seté (*Lepidium sativum*). Kultury ošetřené koncentrací Cd^{II} až 5 mg l⁻¹ vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s kontrolními vzorky. Toto zvýšení bylo spojeno s nárůstem glykosidicky vázaných fenolických sloučenin. Při ošetření roztokem Se^{IV} byl nárůst antioxidační aktivity menší a byl spojován se zvýšením volných fenolických sloučenin. Při simultánní expozici Cd^{II} a Se^{IV} (0,5-2 mg l⁻¹ každý) byly hodnoty antioxidační aktivity relativně konstantní a nižší, než byly nalezeny

v přítomnosti samotného Se^{IV} nebo Cd^{II} , což poskytuje další důkaz protektivního účinku Se^{IV} proti stresu vyvolaného Cd^{II} u tohoto rostlinného druhu. ⁽⁸⁷⁾

V zemědělství jihovýchodní Asie je velkým problémem kontaminace rýže arsenem. Proto se studuje vliv selenu na zmírnění oxidativního stresu vyvolaného arsenem skrze modulaci antioxidantních enzymů a thiolů v rýži. Srovnávala se samostatná suplementace jedním prvkem (As nebo Se) a jejich simultánní suplementace (As + Se). Dle získaných výsledků se dá soudit, že přítomnost selenu (25 A mu M) snižuje akumulaci arzenu trojnásobně v kořenech a dvojnásobně ve výhoncích ve srovnání s rostlinami exponovaných samotným arsenem (25 A mu M). Oxidativní stres v kořenech a výhoncích indukovaný přítomností arzenu byl výrazně snížen suplementací Se. U rostlin exponovaných oběma prvky byla ve srovnání s expozicí pouze arsenem pozorována zvýšená aktivita některých enzymů- glutathion-peroxidázy, katalázy a askorbát peroxidázy a dalších látek typu neproteinových thiolů, glutathionu a fytochelatinů. Analýza genové exprese citlivých genů na metaloidy (metaloid responsive gen-LOX, SOD and MATE) ukázala upregulaci během stresu vyvolaného arsenem, ale naopak signifikantní downregulaci během expozice arsenem a selenem zároveň. Nalezené hodnoty naznačují, že suplementace Se by mohla být efektivní strategií k redukcí akumulace a toxicity arzenu u rýže. ⁽⁸⁸⁾

Selen byl jako elicitor také zkoumán při ošetřování tkáně a orgánů česneku kuchyňského (*Allium sativum*) *in vitro*. Pozornost byla soustředěna na fytochemickou a biochemickou aktivitu. Bylo zjištěno, že *in vitro* ošetření tkáně česneku koncentracemi 2 a 4 mg l^{-1} Se prokazatelně zvýšilo obsah aminokyselin, proteinů a alliinu. Obsah prolinu se zvyšoval v závislosti na dávce, ačkoli při dávce 4 mg l^{-1} bylo zvýšení obsahu prolinu velmi výrazné. Aktivita antioxidantních enzymů byla také zvýšená v kultuře s médiem obsahující koncentraci 4 mg l^{-1} Se. Selenem obohacený česnek vykazoval zvýšený obsah alliinu, což naznačuje, že šetření selenem nezvyšuje pouze nutriční hodnotu, ale také medicínální hodnotu česneku. ⁽⁸⁹⁾

Zkoumán byl i vliv selenu a salicylové kyseliny (SA) na zmírnění účinků salinity na exponované rostliny sóji. Sazenice byly ošetřeny třemi koncentracemi selenu (0, 25 and 50 mg l^{-1}) a dvěma koncentracemi kyseliny salicylové (0 a 0,5 mM) a/nebo dvěma koncentracemi NaCl (0 and 100 mM). Se a/nebo SA významně zvýšily hladinu chlorofylu a obsah karotenoidů, stejné účinky měly i na chlorofyl a/b, ale nepříznivý efekt na koncentraci chlorofylu b. Utilizace Se a/nebo SA vedla k vylepšení obsahu

prolinu a hořčiku v porovnání s kontrolami. Suplementace Se a/nebo SA, obzvláště jejich směs, vedla k signifikantnímu poklesu Na/K poměru, dále byl pozorován indukční účinek na enzymatické (peroxidáza, kataláza a superoxidismutáza) i neenzymatické (askorbát) antioxidační systémy. ⁽⁹⁰⁾

6.5.5 Jiné využití selenu

Selen je významný i v jiných vědeckých odvětvích, například byla provedena DFT (Density Functional Theory) studie kyanoethenselenolu. Na základě domněnek, že selen mohl být zapojen do vzniku a evoluce života na naší planetě, se stal kyanoethenselenol molekulou astrobiologického zájmu. ⁽⁹¹⁾ V současné době se selen hojně využívá při výrobě fotočlánků. ⁽⁵⁷⁾ Vedle biofortifikace selenem, byl také zkoumán vliv endofytické bakterie vyskytující se na selenem suplementované pšenici. Tato bakterie může být prospěšná nejen pro růst rostlin, ale i pro biofortifikaci, jelikož rostliny mají v její přítomnosti větší toleranci tohoto prvku a dále také pro biokontrolu houbového patogenu *Gaeumannomyces graminis*. Inhibice růstu tohoto patogenu byla potvrzena v této studii *in vitro*. ⁽⁹²⁾

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Pomůcky a přístrojové vybavení

Autokláv PS 20 A, Chirana, ČR

Box s laminárním prouděním Fatran L-F, Výrobné družstvo Pokrok, SR

Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko

Horkovzdušný sterilizátor SVS 9/1, Chirana, ČR

Laboratorní analytické váhy PRLT A 13, Sartorius, Německo

Laboratorní třepačka Heidolph- Promax 2020, Heidolph Instruments, Německo

Mikrofiltry (0,20 μm), Corning NY 14831, Německo

Pipetovací balónek, Filip, Německo

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

Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR

Vodní lázeň KL, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Kapalinový chromatograf:

Autosampler Jasco AS-2055, Japonsko

Čerpadlo Jasco PU-2089, Japonsko

Diodový detektor Jasco MD-2015, Japonsko

Kolona LiChroCART RP-18 250x4 (5 μm), Merck Darmstadt, Německo (s ochranou předkolonkou a předkolonovým filtrem)

Termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko

7.2 Chemikálie

Ajatin plus- 10% roztok, Profarma-Produkt s.r.o., ČR
Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný monohydrát p.a., Lachema, ČR
Dusičnan amonný p.a., Penta, ČR
Dusičnan draselný p.a., Lachema, ČR
Edetan sodno -železnatý p.a., Sigma – Aldrich, USA
Ethanol 96%, Lachema, ČR
Glycin p.a., Penta, ČR
Hydrolyzát kaseinu, Imuna, SR
Chlorid kobaltnatý hexahydrát, Fluka, Švýcarsko
Chlorid vápenatý p.a., Penta, ČR
Jodid draselný p.a., Penta, ČR
Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR
Kyselina fosforečná, Penta, ČR
Kyselina nikotinová, Sigma – Aldrich, USA
Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta, ČR
Methanol HPLC grade
Methanol, Penta, ČR
Myo-inositol, Sigma – Aldrich, USA
Oxid seleničitý, Sigma – Aldrich, USA
Pyridoxin, Sigma – Aldrich, USA
Růstový stimulant α – NAO, Sigma – Aldrich, USA
Sacharosa p.a., Lachema, ČR
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR
Síran manganatý tetrahydrát p.a., Lachema, ČR
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema, ČR
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR

Síran železnatý heptahydrát p.a., Lachema, ČR

- Standardy
- Biochanin-A p.a., Sigma, USA
 - Daidzein p.a., Fluka, Švýcarsko
 - Formononetin p.a., Fluka, Švýcarsko
 - Genistein p.a., Sigma, USA
 - Genistin p.a., Fluka, Švýcarsko

Superčistá voda, Katedra analytické chemie FaFUK v HK, Česká republika

Thiamin, Sigma – Aldrich, USA

7.3 Kultivace kultur *Genista tinctoria* L.- *in vitro*

7.3.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál byl získán z pasáží 23. až 31. kalusových a suspenzních kultur.

7.3.2 Živné médium

Kultivace suspenzních i kalusových kultur *Genista tinctoria* probíhala v živném médiu dle Murashigeho a Skooga. ⁽⁹³⁾ Složení živného média je uvedeno v mg l⁻¹.

makroelementy:	CaCl ₂	332,50
	KNO ₃	1900,00
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00
	NH ₄ NO ₃	1650,00
	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,00
mikroelementy:	MnSO ₄ .H ₂ O	16,90
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,50
	H ₃ BO ₃	6,20
	KI	0,83
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
železnatý komplex:	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,84
	Na ₂ EDTA	37,34
vitamíny:	kyselina nikotinová	0,50
	pyridoxin	0,50
	thiamin	0,10
glycin		2,00
sacharosa		30000,00
myo-inositol		100,00
hydrolyzát kaseinu		1000,00

Dále byl použit 1 ml roztoku růstového regulátoru α -NAA (kyselina α -naftyl octová). Tento roztok byl o koncentraci 1,00 g α -NAA na 100 ml ethanolu.

Každá složka média byla navážena na analytických vahách nebo odpipetována ze zásobního roztoku a kvantitativně převedena do odměrné baňky. Navážené složky byly poté v odměrné baňce doplněny destilovanou vodou do objemu 1 l. Po kompletním rozpuštění a řádném promíchání bylo médium rozděleno do Erlenmayerových baněk po 30 ml. Hrdla baněk byly následně překryty hliníkovou fólií a všechny baňky byly vysterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa po dobu 20 minut.

7.3.3 Příprava kalusových a suspenzních kultur

Použité Erlenmayerovy baňky byly vždy předem řádně umyté horkou vodou a saponátem, vypláchnuté destilovanou vodou a vysušené ve sterilizátoru při 200 °C. Po zavedení papírových můstků a nalití živného média bylo s hrdly překrytými hliníkovou fólií vše opět sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa po dobu 20 minut. K přenášení inokula (části kalusu z předešlé kultivace) se využívalo pinzet opláchnutých ethanolem a vysušených ve sterilizátoru 2 hodiny při teplotě 200 °C a dalšího sterilního laboratorního nádobí.

Kalusové kultury byly získány pasážováním za aseptických podmínek v laminárním boxu. Ten byl vždy předem vytřen 10% roztokem Ajatinu a vyzářen germicidní zářivkou. Inokulum se přeneslo na můstek z filtračního papíru, který byl uvnitř Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml, obsahující už 30 ml živného média. Kultivace probíhala po dobu 30 dnů v uzavřené místnosti při teplotě 25°C při světelném režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

Suspenzní kultury byly získány přenesením kalusu a jeho následným mechanickým rozdrcením v Erlenmayerové baňce obsahující živné médium. Hrdla baněk byla opět překryta hliníkovou fólií. Kultivace probíhala po dobu 21 dnů na rotační třepačce (121 otáček za minutu) v uzavřené místnosti při teplotě 25°C při světelném režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

7.4 Elicitace

7.4.1 Příprava elicitoru

Jako elicitor byl použit oxid seleničitý (SeO_2), ten byl ve formě roztoku o třech různých koncentracích přidán ke kalusovým i suspenzním kulturám *G. tinctoria*. Roztok o koncentraci C_1 byl připraven navážením 100 mg čisté látky a naředěním superčistou vodou na 100 ml roztoku. Roztok o koncentraci C_2 byl získán naředěním 10 ml roztoku C_1 v odměrné baňce na 100 ml superčistou vodou a roztok o koncentraci C_3 byl získán naředěním 10 ml roztoku C_2 v odměrné baňce na 100 ml superčistou vodou. To vše za aseptických podmínek. Veškeré použité laboratorní nádoby bylo předem vysterylizováno. Výsledné koncentrace roztoků byly následující:

$$C_1 = 9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} = 100 \text{ mg/ 100 ml}$$

$$C_2 = 9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} = 10 \text{ mg/ 100 ml}$$

$$C_3 = 9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} = 1 \text{ mg/ 100 ml}$$

7.4.2 Elicitace *in vitro* kultur u *Genista tinctoria* L.

Ke každému pokusu bylo použito 36 baňek s kalusovými nebo suspenzními kulturami. Hliníkové fólie na hrdlech baňek byly ošetřeny před aplikací elicitoru a superčisté vody Ajatinem a práce probíhala v aseptických podmínkách v laminárním boxu, který byl nejméně hodinu před započatou prací vysvícen germicidní UV-lampou. K 30 baňkám se přidal 1 ml elicitoru příslušné koncentrace. Ke zbylým 6 baňkám se přidal 1 ml superčisté vody. Tyto baňky sloužily jako kontrolní vzorky. Hrdla baňek se zakryla hliníkovou fólií a označila počtem hodin, za který byl proveden odběr vzorků. Vždy 5 baňek s elicitem bylo označeno pro odběr po 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h a 168 h. 2 baňky bez elicitoru sloužící jako kontrola byly označeny pro odběr po 12 h, další 2 baňky byly označeny pro odběr po 48 h a poslední 2 baňky bez elicitoru byly označeny pro odběr po 168 h.

Poté byly baňky s kalusovými kulturami přemístěny zpět do kultivační místnosti a suspenzní kultury na třepačku.

Po 6, 12, 24, 48, 72, 168 hodinách se kalusy vyjmuly ze všech 5 baňek pomocí pinzety na jeden filtrační papír a nechaly se usušit za laboratorní teploty. Živné médium

z těchto pěti baněk se slilo do jedné lahvičky a dalo se zamrazit. Podobně byly odebírány i vzorky ze suspenzních kultur s tím rozdílem, že byly filtrovány přes filtrační papír, pevný podíl zachycený na filtračním papíře se opět usušil za laboratorní teploty a médium slilo do jedné lahvičky a dalo zamrazit. Takto získané vzorky poté sloužily k další části pokusu. Z kontrolních 2 baněk se odebíral kalus i médium stejným způsobem po 12, 48 a 168 hodinách.

7.5 Stanovení obsahu

7.5.1 Příprava vzorků k analýze

K extrakci z vysušeného kalusu a suspenze byla využita dvoustupňová digesce. Vysušený vzorek se nejprve rozdrtil v třecí misce s tloučkem kvůli zvětšení povrchu materiálu a zlepšení extrakce. Rozetřený kalus příslušné kultury a koncentrace elicitoru se zvážil na analytických vahách a kvantitativně převedl do Erlenmayerovy baňky s varnými kamínky. Do každé baňky se přidalo 10 ml MeOH R 80%. Řádně označené baňky se vařily na vodní lázni pod zpětným chladičem 10 minut. Kapalný obsah Erlenmayerovy baňky se po vychladnutí zfiltraval přes kousek vaty do 25 ml odměrné baňky. Použitý kousek vaty se i se zbytkem kalusu v Erlenmayerově baňce opět extrahoval s dalšími 10 ml MeOH R 80% za stejných podmínek 10 min. Extrakt se opět slil přes kousek vaty do odměrné baňky a dolil se MeOH R 80% po rysku 25 ml. Z odměrných baněk se odebral 1,7 ml extraktu pomocí injekční stříkačky a přeplnil se přes mikrofilm (0,20 μm) do vialek sloužící k HPLC analýze. Tyto vialky se před analýzou uchovávaly v lednici.

Extrakce z media následovala po jeho rozmražení. Kalibrovanou pipetou se změřil objem média a převedl do odpařovací misky. Médium se odpařilo do sucha na vodní lázni a poté se do misky přidalo 10 ml MeOH R 80%. Směs se nechala macerovat za občasného promíchání 10 minut. Poté bylo injekční stříkačkou odebráno 1,7 ml extraktu pomocí injekční stříkačky a přeplnil se přes mikrofiltr do vialek sloužící k HPLC analýze. Tyto vialky se před analýzou uchovávaly také v lednici.

7.5.2 HPLC analýza vzorků

K analýze vzorků byla použita metoda HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), což je analytická separační metoda sloužící jak ke kvantitativnímu, tak kvalitativnímu stanovení. ⁽⁹⁴⁾ Konkrétně byla použita sestava Jasco vybavená čerpadlem PU-2089, detektorem MD-2015, autosamplerem AS-2055, předkolumnovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250 x 4 (5 μm) s ochranou předkolumnkou.

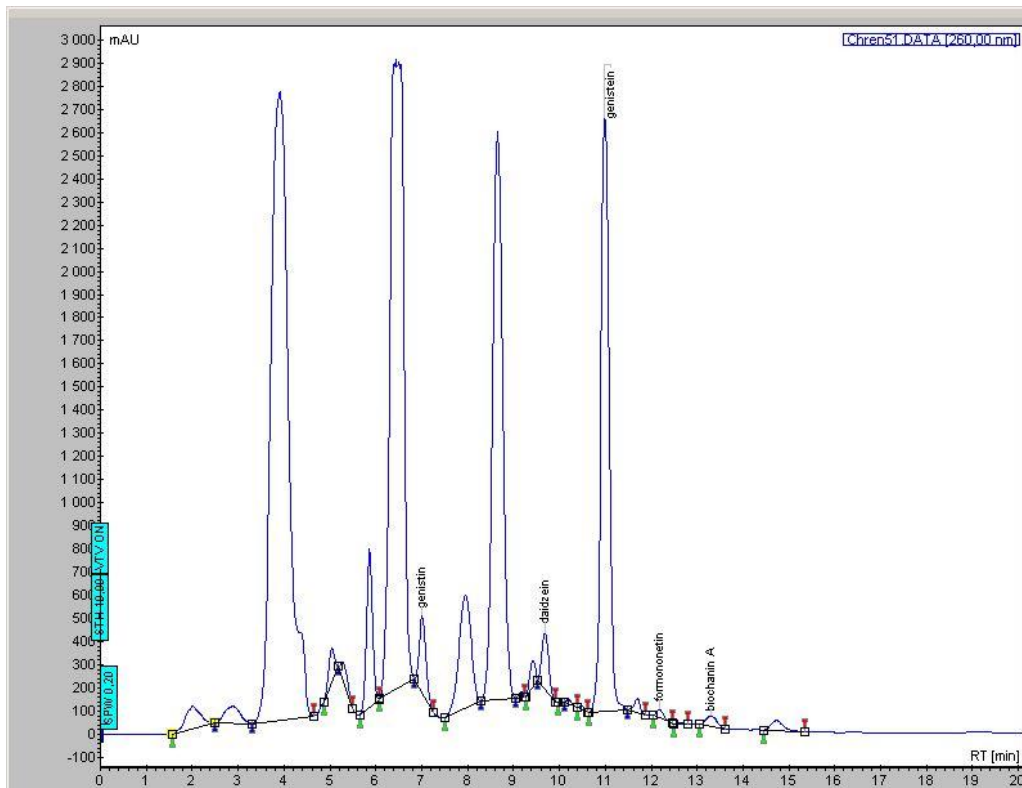
Nejprve proběhla eluce mobilní fáze gradientově, z 30% methanolu v čase $t = 0$ do 80% methanolu v čase $t = 9$ min. Následovala isokratická eluce 80% methanolem do času $t = 15$ min. Průtok byl $1,1 \text{ ml min}^{-1}$. 0,15% kyselina fosforečná sloužila v mobilní fázi vždy jako pufr.

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 190 – 450 nm. Z píků při vlnové délce 260 nm byl vypočten obsah sledovaných látek.

Jako standardy byly použity tyto isoflavonoidy: genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A.

7.5.3 Ukázka chromatogramu

Obrázek 6 Ukázka chromatogramu HPLC analýzy kalusové kultury



7.5.4 Kalibrační křivky

Tvorba kalibrační křivky se řídila dle rovnice $y = bx + a$

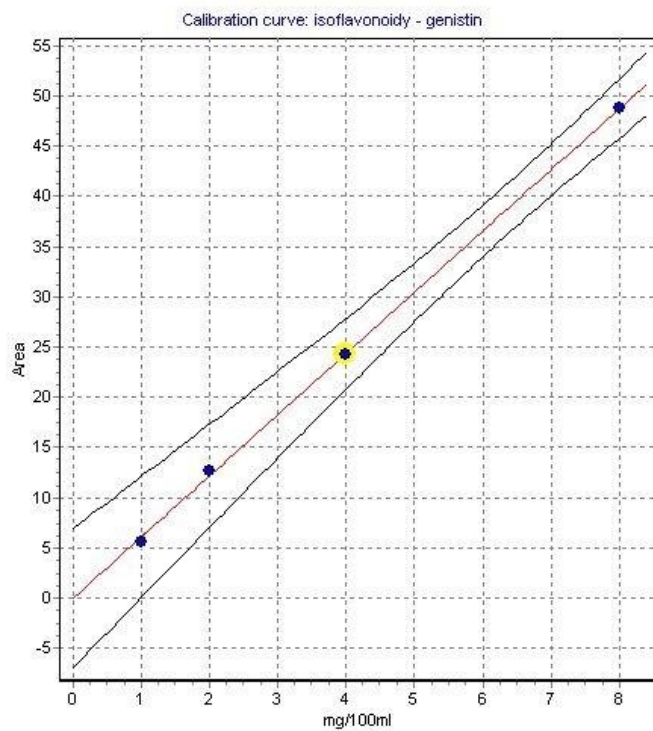
y = plocha

x = koncentrace v mg/ 100 ml

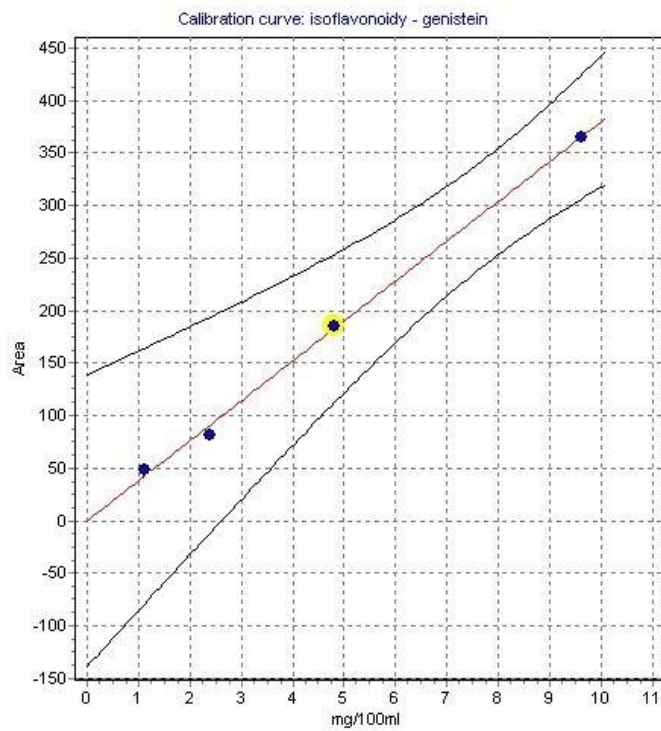
$a = 0$

b = rozličné hodnoty dle konkrétního sekundárního metabolitu

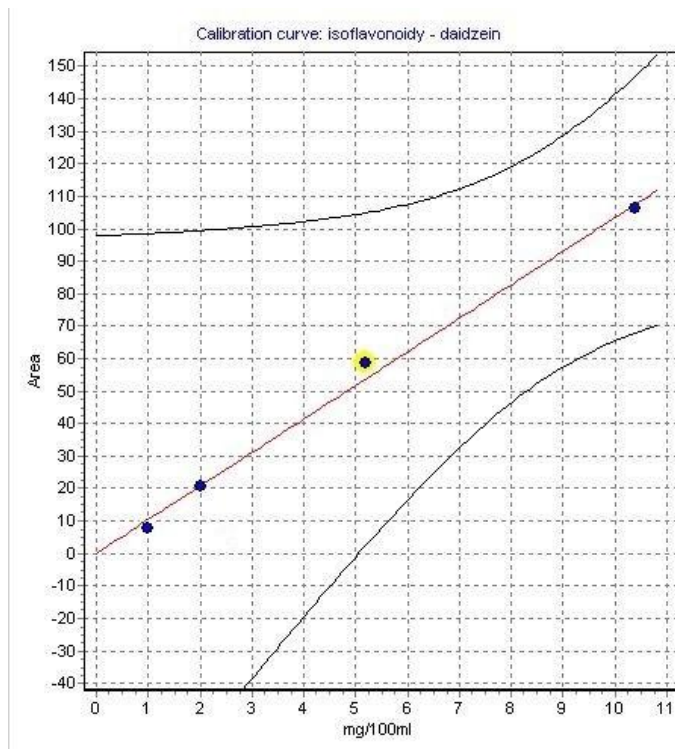
Obrázek 7 Kalibrační křivka – genistin



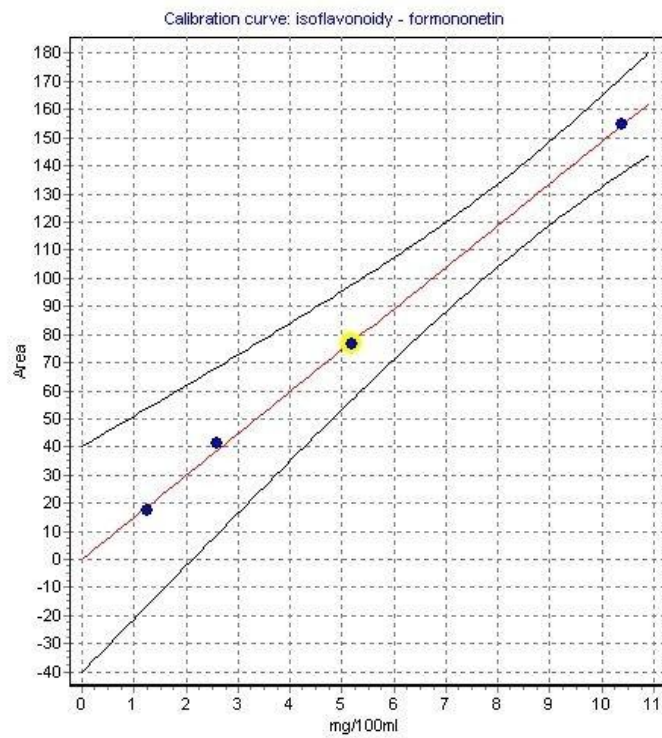
Obrázek 8 Kalibrační křivka – genistein



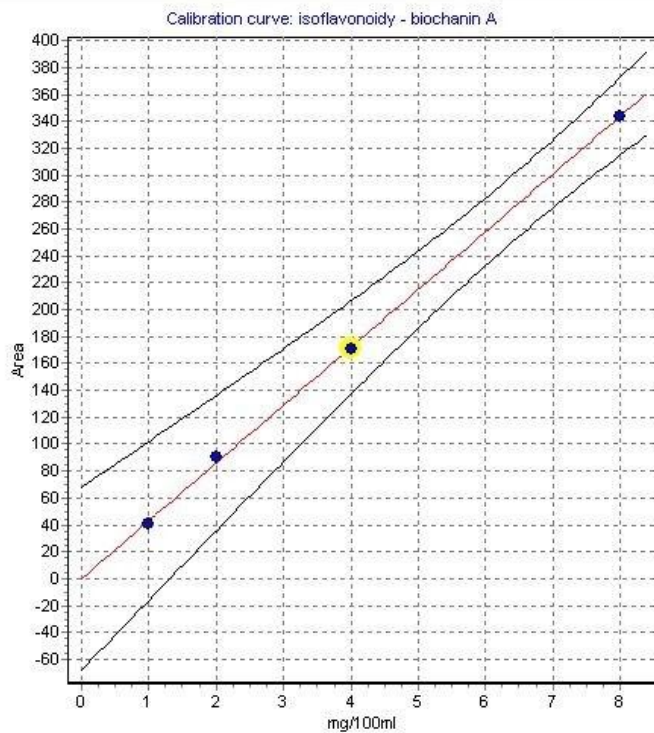
Obrázek 9 Kalibrační křivka – daidzein



Obrázek 10 Kalibrační křivka – formononetin



Obrázek 11 Kalibrační křivka – biochanin A



7.6 Statistické zpracování dat

Významnou charakteristikou pro statistické zpracování dat je směrodatná odchylka. Sděluje tedy, v jaké míře se liší hodnoty od průměrné (střední) hodnoty v daném souboru.

Směrodatnou odchylku definuje tento vztah:

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

S – směrodatná odchylka

χ – hodnota sledované veličiny

$\bar{\chi}$ – průměrná hodnota sledované veličiny

n – počet členů souboru

Pro určení statistické významnosti dvou průměrů, tudíž určení vlivu elicitoru na tvorbu sekundárních metabolitů, se používá T-test.

Testovací kritérium definuje tento vztah:

$$T = \frac{|m_1 - m_2|}{\sqrt{n_1 \cdot s_1^2 + n_2 \cdot s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

T – testovací kritérium

m_1 – aritmetický průměr kontrolního souboru

m_2 – aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 – směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 – směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 – počet členů kontrolního souboru

n_2 – počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu náleží t- rozdělení se stupněm volnosti.

Následující vztah vyjadřuje počet stupňů volnosti:

$$\mathbf{v} = \mathbf{n}_1 + \mathbf{n}_2 - 2$$

Příslušná kritická hodnota $\mathbf{t}(\mathbf{v})_p$ pro získaný stupeň volnosti \mathbf{v} a náležitou hladinu významnosti \mathbf{p} se porovná s vypočtenou hodnotou testovacího kritéria získané z T-testu. Byla provedena tři paralelní stanovení pro přesnou detekci obsahu sekundárních metabolitů. Počet členů kontrolního a pokusného souboru je $\mathbf{n}_1 = \mathbf{n}_2 = 3$, tudíž platí $\mathbf{v} = 4$. Při daném počtu stupňů volnosti $\mathbf{v} = 4$ a hladině významnosti $\mathbf{p} = 0,05$ je kritická hodnota testovacího kritéria $\mathbf{t}(\mathbf{v})_p = 2,78$. Statisticky významné jsou ty výsledky, u kterých je hodnota testovacího kritéria vyšší než kritická hodnota.

Jako kontrolní hodnoty k výpočtu testovacího kritéria pro odběry po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 h byly využity hodnoty odběru v čase 12, 48 a 168 h.

Hodnoty byly zpracovány pomocí statistického programu SigmaStat 4.0.





8. VÝSLEDKY

Metodou HPLC byly zanalyzovány získané vzorky a byla stanovena přítomnost i kvantitativní obsah následujících pěti isoflavonoidů: genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A. Ve vzorcích ze sušiny kalusových kultur byla zaznamenána přítomnost především genistinu. U suspenzních kultur především genistinu a daidzeinu. Procentuální zastoupení jednotlivých isoflavonoidů je zachyceno v následujících tabulkách a grafech. Médium podrobené analýze neobsahovalo žádné isoflavonoidy, tudíž kultury sekundární metabolity v tomto případě nevylučovaly do média.

8.1 Tabulky

Tabulka 1 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g⁻¹DW) v kalusové kultuře *Genista tinctoria* při koncentraci elicitoru C₁

Koncentrace elicitoru [mg l ⁻¹]	Počet hodin	Genistin		Genistein		Daidzein		Formononetin		Biochanin A	
		S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test
C ₁	6	2,60 ± 0,16	7,35	0,10 ± 0,02	0	0	8,66	0	8,66	0	8,66
	12	1,70 ± 0,16	1,84	0	8,66	0	8,66	0	8,66	0	8,66
	12 K	1,40 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x	0,10 ± 0,02	x	0,10 ± 0,02	x	0,10 ± 0,02	x
	24	1,40 ± 0,16	0	0	8,66	0	8,66	0	8,66	0	8,66
	48	2,00 ± 0,16	3,06	0,10 ± 0,02	0	0	8,66	0	2,60	0	8,66
	48 K	1,50 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x	0,10 ± 0,02	x	0,30 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x
	72	0,70 ± 0,16	4,90	0,20 ± 0,02	6,12	0,10 ± 0,02	0	0,10 ± 0,02	1,72	0	8,66
	168	1,10 ± 0,16	31,23	0	8,66	0,10 ± 0,02	8,66	0,10 ± 0,02	0	0	0
	168 K	6,20 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x	0	x	0,10 ± 0,02	x	0	0

	statisticky významné hodnoty
	zvýšené statisticky významné hodnoty
	snížené statisticky významné hodnoty
	nulové statisticky významné hodnoty
S±s	obsah [mg g ⁻¹] ± směrodatná odchylka
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 2 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g⁻¹DW) v kalusové kultuře *Genista tinctoria* při koncentraci elicitoru C₂

Koncentrace elicitoru [mg l ⁻¹]	Počet hodin	Genistin		Genistein		Daidzein		Formononetin		Biochanin A	
		S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test
C ₂	6	5,20 ± 0,16	22,05	0,30 ± 0,02	2,60	0,20 ± 0,16	1,73	0,10 ± 0,02	8,66	0	0
	12	2,70 ± 0,16	6,74	0,30 ± 0,02	2,60	0	0	0	0	0	0
	12 K	1,60 ± 0,16	x	0	x	0	x	0	x	0	0
	24	4,10 ± 0,16	15,31	0	0	0,10 ± 0,08	1,73	0	0	0	0
	48	1,60 ± 0,16	0,61	0	8,66	0,10 ± 0,08	1,73	0	0	0	0
	48 K	1,50 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x	0	0	0	x	0	0
	72	1,10 ± 0,16	2,45	0,10 ± 0,02	0	0	0	0	0	0	0
	168	6,20 ± 0,16	30,01	0	8,66	0	0	0	1,73	0	0
	168 K	1,30 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x	0	0	0,10 ± 0,08	x	0	0

	statisticky významné hodnoty
	zvýšené statisticky významné hodnoty
	snížené statisticky významné hodnoty
	nulové statisticky významné hodnoty
S±s	obsah [mg g ⁻¹] ± směrodatná odchylka
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 3 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g⁻¹DW) v kalusové kultuře *Genista tinctoria* při koncentraci elicitoru C₃

Koncentrace elicitoru [mg l ⁻¹]	Počet hodin	Genistin		Genistein		Daidzein		Formononetin		Biochanin A	
		S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test
C₃	6	0,60 ± 0,16	41,64	0,10 ± 0,08	0	0,10 ± 0,08	1,73	0,10 ± 0,08	0	0	0
	12	1,80 ± 0,16	34,29	0	1,73	0	0	0	1,73	0	0
	12 K	7,40 ± 0,16	x	0,10 ± 0,08	x	0	x	0,10 ± 0,08	x	0	0
	24	1,80 ± 0,16	34,29	0,10 ± 0,08	0	0	0	0	1,73	0	0
	48	1,10 ± 0,16	31,84	0,10 ± 0,08	0	0	1,73	0	1,73	0	0
	48 K	6,30 ± 0,16	x	0,10 ± 0,08	x	0,10 ± 0,08	x	0,10 ± 0,08	x	0	0
	72	5,80 ± 0,16	3,06	0,10 ± 0,08	0	0	1,73	0,10 ± 0,08	0	0	0
	168	8,30 ± 0,16	29,39	0,10 ± 0,08	29,39	0	0	0	1,73	0	0
	168 K	3,50 ± 0,16	x	0,20 ± 0,16	x	0	x	0,10 ± 0,08	x	0	0

	statisticky významné hodnoty
	zvýšené statisticky významné hodnoty
	snížené statisticky významné hodnoty
	nulové statisticky významné hodnoty
S±s	obsah [mg g ⁻¹] ± směrodatná odchylka
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 4 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g⁻¹DW) v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* při koncentraci elicitoru C₁

Koncentrace elicitoru [mg l ⁻¹]	Počet hodin	Genistin		Genistein		Daidzein		Formononetin		Biochanin A	
		S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test
C ₁	6	0,20 ± 0,16	25,11	0	8,66	3,50 ± 0,16	30,31	0	0	0	8,66
	12	0,50 ± 0,16	23,27	0	8,66	11,30 ± 0,16	97,86	0	0	0	8,66
	12 K	4,30 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x	0	x	0	x	0,10 ± 0,16	x
	24	15,20 ± 0,16	66,75	0	8,66	37,10 ± 0,16	321,30	1,10 ± 0,16	9,53	0,20 ± 0,02	0,86
	48	10,70 ± 0,16	46,54	0	8,66	4,70 ± 0,16	40,70	1,10 ± 0,16	9,53	0,10 ± 0,16	8,66
	48 K	3,10 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x	0	x	0	x	0	x
	72	1,50 ± 0,16	9,798	0	8,66	0	0	0	0	0	0
	168	8,90 ± 0,16	20,82	0	1,73	0,50 ± 0,16	4,33	0,10 ± 0,02	8,66	0,30 ± 0,16	2,60
	168 K	5,50 ± 0,16	x	0,20 ± 0,16	x	0	x	0	x	0	

	statisticky významné hodnoty
	zvýšené statisticky významné hodnoty
	snížené statisticky významné hodnoty
	nulové statisticky významné hodnoty
S±s	obsah [mg g ⁻¹] ± směrodatná odchylka
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 5 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g⁻¹DW) v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* při koncentraci elicitoru C₂

Koncentrace elicitoru [mg l ⁻¹]	Počet hodin	Genistin		Genistein		Daidzein		Formononetin		Biochanin A	
		S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test
C ₂	6	5,60 ± 0,16	22,05	0	0	0,10 ± 0,02	0	0	0	0	0
	12	1,70 ± 0,16	1,837	0	0	0,10 ± 0,02	0	0	0	0	0
	12 K	2,00 ± 0,16	x	0	x	0,10 ± 0,02	x	0	x	0	0
	24	1,20 ± 0,16	4,90	0	0	0,50 ± 0,16	3,44	0,10 ± 0,02	8,66	0	0
	48	0	18,19	0	8,66	0,10 ± 0,02	8,66	0	0	0	0
	48 K	2,10 ± 0,16	x	0,10 ± 0,16	x	0	x	0	x	0	0
	72	3,00 ± 0,16	5,51	0,10 ± 0,16	0	0,40 ± 0,16	3,46	0	0	0	0
	168	9,50 ± 0,16	56,95	0,10 ± 0,16	1,72	0,30 ± 0,16	0	0	0	0	0
	168 K	0,20 ± 0,16	x	0,30 ± 0,02	x	0,30 ± 0,16	x	0	x	0	0

	statisticky významné hodnoty
	zvýšené statisticky významné hodnoty
	snížené statisticky významné hodnoty
	nulové statisticky významné hodnoty
S±s	obsah [mg g ⁻¹] ± směrodatná odchylka
T-test	hodnota testovacího kritéria

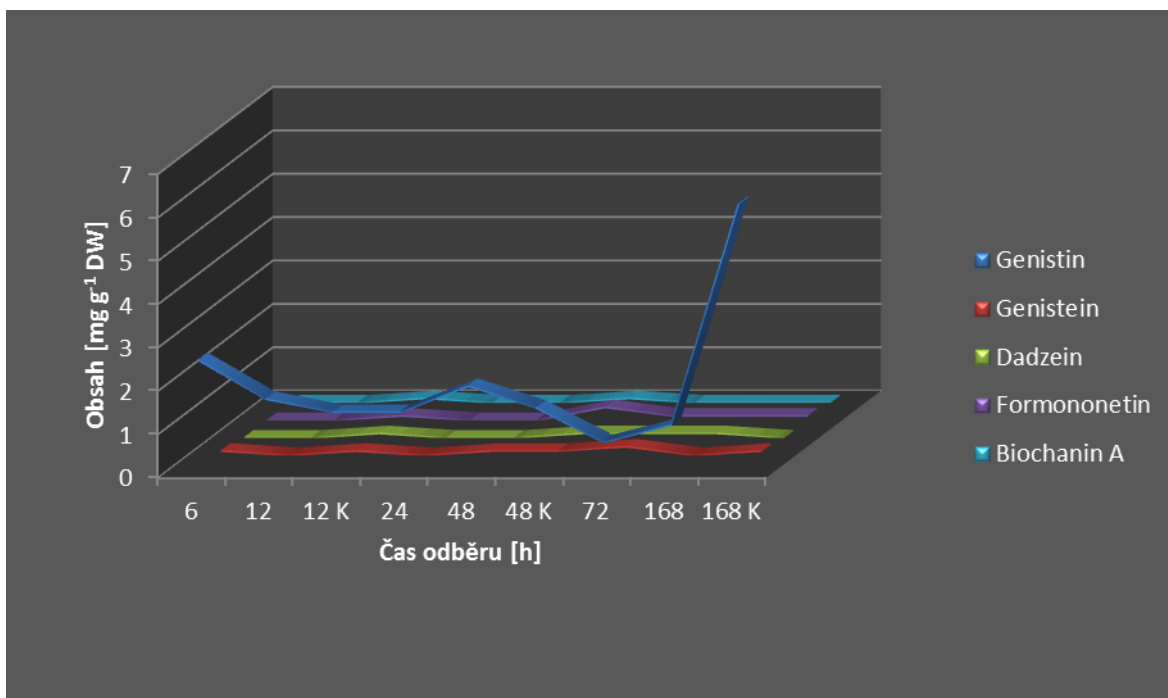
Tabulka 6 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g⁻¹DW) v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* při koncentraci elicitoru C₃

Koncentrace elicitoru [mg l ⁻¹]	Počet hodin	Genistin		Genistein		Daidzein		Formononetin		Biochanin A	
		S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test	S±s	T-test
C3	6	11,50 ± 0,16	19,60	0	8,66	0	0	0	0	0	0
	12	0,50 ± 0,16	47,76	0	8,66	11,30 ± 0,16	97,86	0	0	0	0
	12 K	8,30 ± 0,16	x	0,10 ± 0,16	x	0	x	0	x	0	x
	24	15,20 ± 0,16	42,25	0	8,66	37,10 ± 0,16	321,29	1,10 ± 0,16	9,53	0,20 ± 0,16	1,73
	48	10,70 ± 0,16	92,67	0	8,66	4,70 ± 0,16	0,61	1,10 ± 0,16	8,62	0,10 ± 0,02	2,59
	48 K	0		0,10 ± 0,16	x	4,80 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x	0,40 ± 0,16	x
	72	0,60 ± 0,16	5,20	0	8,66	6,60 ± 0,16	11,02	0	8,66	0	3,46
	168	0,90 ± 0,16	1,23	0	0	9,40 ± 0,16	16,53	0	8,66	0	0
	168 K	0,70 ± 0,16	x	0	x	6,70 ± 0,16	x	0,10 ± 0,02	x	0	x

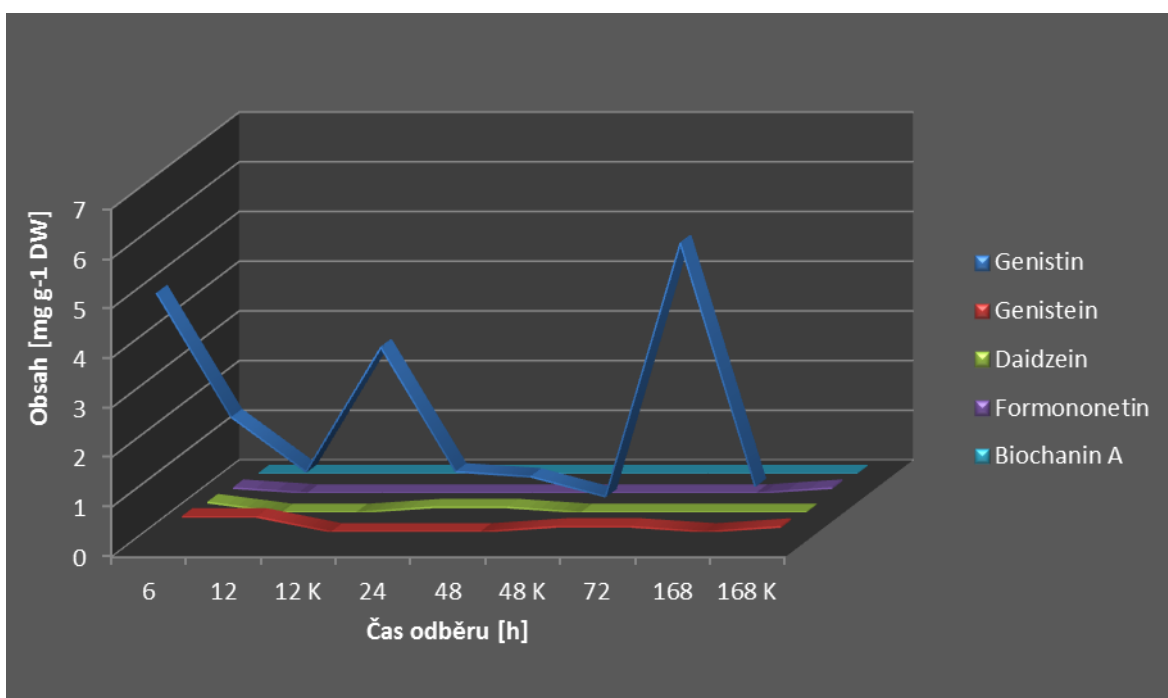
	statisticky významné hodnoty
	zvýšené statisticky významné hodnoty
	snížené statisticky významné hodnoty
	nulové statisticky významné hodnoty
S±s	obsah [mg g ⁻¹] ± směrodatná odchylka
T-test	hodnota testovacího kritéria

8.2 Grafy

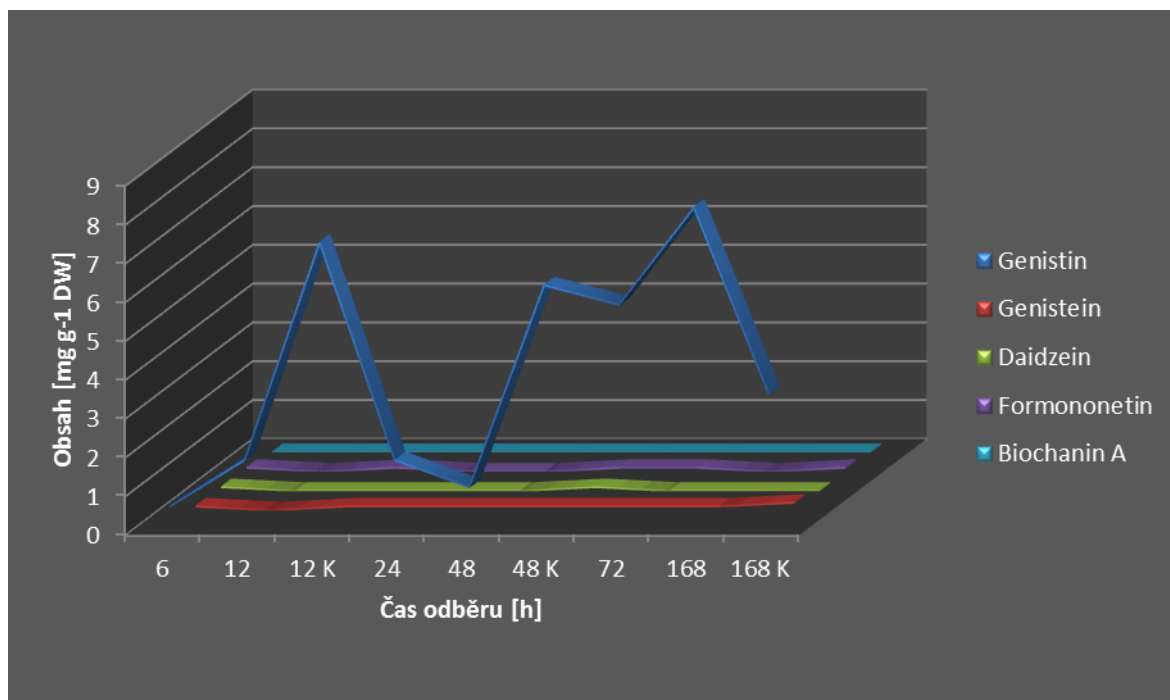
Graf 1 Tvorba isoflavonoidů v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C₁



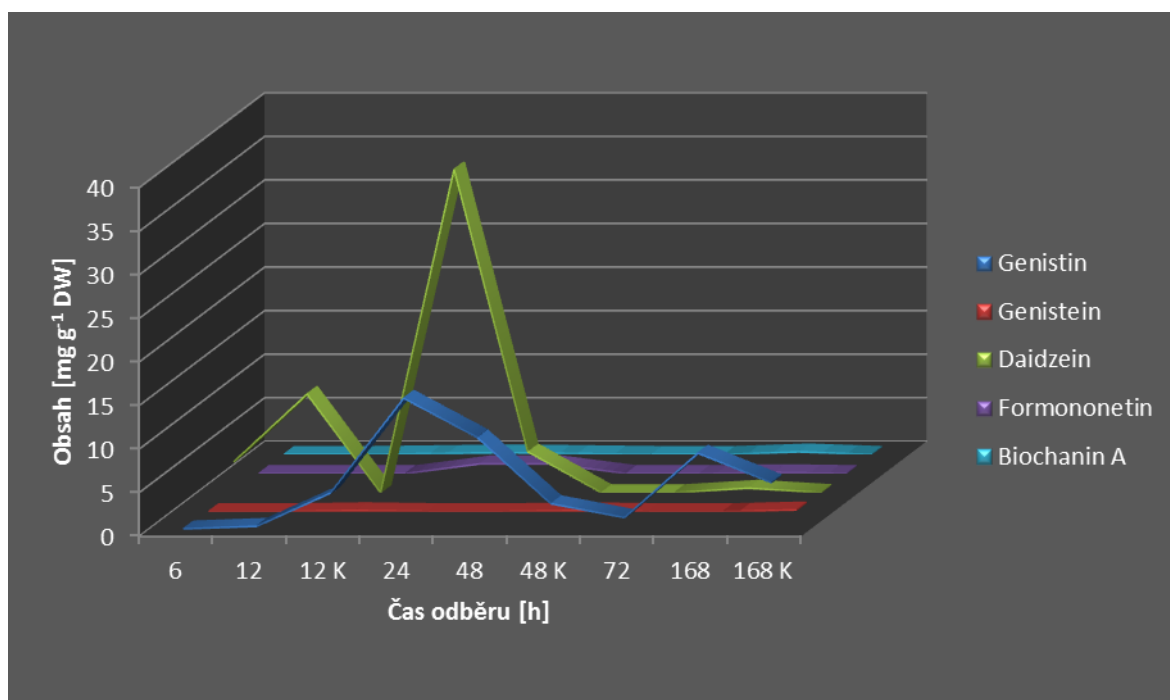
Graf 2 Tvorba isoflavonoidů v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C₂



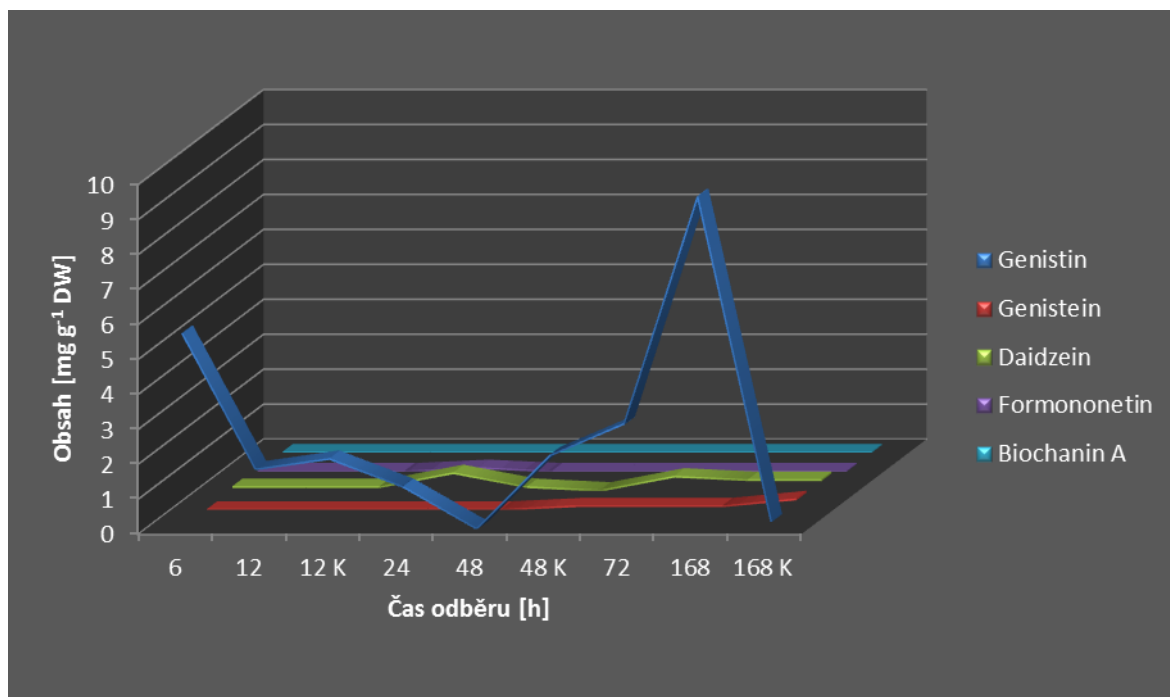
Graf 3 Tvorba isoflavonoidů v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C₃



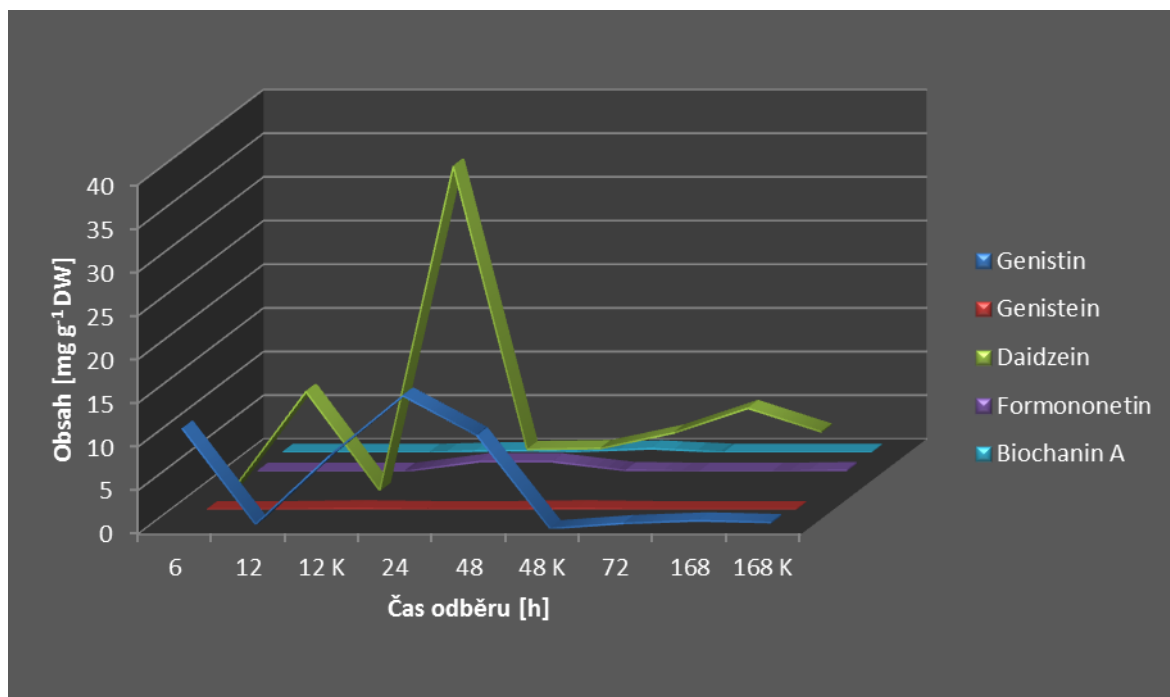
Graf 4 Tvorba isoflavonoidů v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C₁



Graf 5 Tvorba isoflavonoidů v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C₂



Graf 6 Tvorba isoflavonoidů v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C₃



9. DISKUSE

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv selenu ve formě SeO_2 na produkci jednotlivých isoflavonoidů v *in vitro* kulturách *G. tinctoria*.

Jako rostlinný materiál byly použity kalusové a suspenzní kultury z pasáží 23. až 31. kultivovaných v živném médiu dle Murashigeho a Skooga s přidavkem růstového regulátoru α -NAA v koncentraci 1,00 g na 100 ml ethanolu.

Elicitor SeO_2 byl ke kulturám přidáván ve třech koncentracích:

$$C_1 = 9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} = 100 \text{ mg/ 100 ml}$$

$$C_2 = 9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} = 10 \text{ mg/ 100 ml}$$

$$C_3 = 9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} = 1 \text{ mg/ 100 ml}$$

K 5 baňkám byl vždy přidán 1 ml elicitoru a označily se k odběru po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 h. 2 baňky po 12, 48 a 168 h sloužily jako kontrola (místo elicitoru přidán 1 ml superčisté vody).

Vzorky k analýze se po zpracování materiálu získaly pomocí extrakce a následně byly vyhodnoceny pomocí HPLC metody.

Ke statistickému zpracování dat se použila metoda T-testu prostřednictvím statistického programu SigmaStat 4.0.

V kalusové kultuře byl zaznamenán statisticky významný nárůst obsahu genistinu po 6 a 48 h působení elicitoru o koncentraci C_1 , dále po 6, 12, 24 a 168 h při koncentraci elicitoru C_2 a po 168 h při koncentraci elicitoru C_3 (Tabulka 1, 2, 3; Graf 1, 2, 3). K nejvýraznějšímu zvýšení produkce genistinu došlo v čase 168 h ($6,2 \text{ mg g}^{-1}$ a $8,3 \text{ mg g}^{-1}$ DW) při koncentraci elicitoru C_2 a C_3 . V porovnání s kontrolními vzorky byla tudíž koncentrace větší o 13,2 % a 12,9 %. O něco nižší, ale přesto významný byl nárůst v čase 6 h ($5,2 \text{ mg g}^{-1}$ DW) o 9,7 % a po 24 h ($4,1 \text{ mg g}^{-1}$ DW) o 6,7 % při koncentraci elicitoru C_2 (Tabulka 2, 3; Graf 2, 3). Také byl vyhodnocen i statisticky významný pokles tvorby tohoto isoflavonoidního glykosidu oproti kontrolním vzorkům. Konkrétně to byly vzorky odebrané po 72 a 168 h při použití elicitoru v koncentraci C_1 a po 6, 12, 24, 48 a 72 h při koncentraci elicitoru C_3 (Tabulka 1, 3; Graf 1, 3).

Produkce genisteinu v kalusové kultuře nebyla významně zvýšena oproti kontrolní kultuře, byla naopak především nulová. Obsah genisteinu nebyl patrný u vzorků

odebraných po 12, 24 a 168 h při koncentraci elicitoru C_1 . Po 48 a 168 h při koncentraci elicitoru C_2 a po 168 h při koncentraci C_3 byl zachycen nevýrazný pokles produkce genisteinu (Tabulka 1,2,3; Graf 1,2,3). Navýšení obsahu genisteinu bylo zaznamenáno pouze v čase 72 h při koncentraci C_1 , který ale taktéž nebyl výrazný (Tabulka 1; Graf 1).

Obsah daidzeinu v kalusové kultuře byl statisticky významně zvýšen pouze v čase 168 h při použití elicitoru v koncentraci C_1 , produkce tohoto isoflavonoidu nebyla však značně zvýšena. V časech 6, 12, 24 a 48 h při koncentraci elicitoru C_1 byl zaznamenán opět statisticky významný pokles tohoto isoflavonoidu na nulové hodnoty (Tabulka 1; Graf 1).

Mírné, ovšem statisticky významné navýšení obsahu formononetinu v kalusové kultuře bylo zachyceno pouze po 6 h působení elicitoru v koncentraci C_2 . V časech 6, 12, 24 h při koncentraci elicitoru C_1 byl zaznamenán rovněž statisticky významný pokles obsahu na nulové hodnoty (Tabulka 1,2; Graf 1,2).

Obsah biochaninu A v kalusové kultuře při odběru po 6, 12, 24, 48 a 72 h při koncentraci elicitoru C_1 byl také statisticky významně snížen na nulové hodnoty (Tabulka 1; Graf 1).

U suspenzní kultury byl statisticky významný nárůst produkce genistinu vyhodnocen ve vzorcích odebraných po 24, 48 a 168 h při koncentraci elicitoru C_1 , dále v čase 6, 72 a 168 h při koncentraci elicitoru C_2 a v čase 6, 24, 48 a 72 při koncentraci elicitoru C_3 . Při koncentraci elicitoru C_1 bylo nejvýraznější navýšení obsahu v čase 24 h ($15,2 \text{ mg g}^{-1}$) o 29,4 %, při C_2 v čase 168 h ($9,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) o 25,1 % a při C_3 v čase 48 h ($10,7 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) o 28,8 % (Tabulka 4, 5, 6; Graf 4, 5, 6). Statisticky významný pokles tvorby genistinu oproti kontrolním vzorkům byl zaznamenán u vzorků odebraných po 6, 12 a 72 h při koncentraci elicitoru C_1 (Tabulka 4; Graf 4). Při aplikaci elicitoru v koncentraci C_2 došlo k statisticky významnému poklesu produkce u vzorku odebraného po 24 h a k poklesu produkce na nulové hodnoty u vzorku odebraného po 48 h (Tabulka 5; Graf 5). U koncentrace elicitoru C_3 byl zaznamenán statisticky významný pokles pouze u vzorků odebraných po 12 h (Tabulka 6; Graf 6).

Dle analýzy byla produkce isoflavonoidu genisteinu v suspenzní kultuře nulová oproti kontrolním vzorkům. Konkrétně to byly statisticky významné hodnoty získané u vzorků odebraných po 6, 12, 24, 48 a 72 h u koncentrace elicitoru C_1 , po 48 hodinách

u koncentrace elicitoru C₂ a po 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách u koncentrace elicitoru C₃ (Tabulka 4, 5, 6; Graf, 4, 5, 6).

U vzorků odebraných za 6, 12, 24, 48 a 168 h bylo zaznamenáno statisticky významné navýšení tvorby daidzeinu po aplikaci elicitoru v koncentraci C₁. Z toho velice významný nárůst byl v časech 12 h (11,3 mg g⁻¹ DW) o 30,5 % a 24 h (37,1 mg g⁻¹ DW) o 100% (Tabulka 4; Graf 4). Při koncentraci elicitoru C₂ proběhl statisticky významný nárůst obsahu tohoto isoflavonoidu v časech 24, 48 a 72 h, ale ne příliš zřetelný (Tabulka 5; Graf 5). Při koncentraci elicitoru C₃ bylo zaznamenáno statisticky významné navýšení produkce daidzeinu po 12, 24, 72 a 168 h. Velmi významný nárůst produkce o 30,5% (11,3mg g⁻¹ DW) se uskutečnil po 12 h a po 24 h elicitace (37,1 mg g⁻¹ DW) o 100 %. (Tabulka 6; Graf 6).

Minimální nárůst obsahu formononetinu v suspenzní kultuře byl pozorován po kultivaci 24, 48, 72 h s elicitorem v koncentraci C₁, po 24 h s elicitorem v koncentraci C₂ a po 24, 48 h s elicitorem v koncentraci C₃ (Tabulka 4, 5, 6; Graf 4, 5, 6). Po aplikaci koncentrace elicitoru C₃ nebyla u vzorků odebraných v čase 72 a 168 h zachycena žádná produkce formononetinu (Tabulka 6; Graf 6).

Tvorba biochaninu A v suspenzní kultuře byla opět převážně nulová v porovnání s kontrolní kulturou. Nulová produkce se týkala vzorků získaných po 6 a 12 h působení elicitoru v koncentraci C₁ a po 72 h s koncentrací elicitoru C₃. Mírné zvýšení produkce bylo zaznamenáno při použití elicitoru v koncentraci C₁ po 48 h (Tabulka 4, 6; Graf 4, 6).

Suspenzní kultura v porovnání s kalusovou kulturou reagovala na přítomnost elicitoru mnohem efektivněji. K navýšení produkce došlo u dvou isoflavonoidů (genistinu a daidzeinu) oproti kalusové kultuře, u které došlo k navýšení obsahu pouze u genistinu s jednoznačně nižšími hodnotami. (Tabulka 2, 3, 4, 5, 6; Graf 2, 3, 4, 5, 6)

Analyzována byla taktéž i média, u kterých nebylo uvolňování isoflavonoidů prokázáno. Kalusová ani suspenzní kultura tudíž po aplikaci tohoto elicitoru nevylučuje isoflavonoidy do média.

Selen byl jako elicitor také zkoumán ve studii KAPOOR *et al.* při ošetřování tkáně a orgánů česneku kuchyňského (*Allium sativum*) *in vitro*. Obsah aminokyselin, proteinů a alliinu byl prokazatelně zvýšen po ošetření *in vitro* tkáně česneku koncentracemi 2

a 4 mg l⁻¹ Se. Obsah prolinu se zvyšoval v závislosti na dávce, ačkoli při dávce 4 mg l⁻¹ bylo zvýšení obsahu prolinu velmi výrazné. ⁽⁸⁹⁾

Vliv selenu ve formě seleničitanu sodného o koncentraci 50 μM byl testován také u brokolice. Zvýšená produkce sekundárních metabolitů byla zaznamenána u sazenic brokolice nikoli u klíčků. ⁽⁷⁸⁾

Žádný statisticky významný efekt na obsah a syntézu fenolických sloučenin nebyl zaznamenán ve studii zabývající se biofortifikací selenem a jinými elicitory. Zkoumal se zde ale výhradně vliv na klíčky brokolice. Klíčky byly ošetřeny roztokem selenanu sodného v koncentracích 10, 40, 90 μmol l⁻¹. ⁽⁸⁰⁾

Ve studii TIAN *et al.* byl zkoumán efekt selenu na glutathionový metabolismus a tvorbu sekundárních metabolitů u klíčků tří různých kultivarů brokolice. Z výsledků studie vyplývá, že má selen pozitivní vliv na glutathionový metabolismus i tvorbu sekundárních metabolitů. ⁽⁸¹⁾

K elicítaci se mohou využít i jiné látky, které jsou pro rostlinu cizorodé. Ve studiích TŮMOVÁ *et al.* byl například zkoumán vliv pyrazinkarboxylových kyselin na tvorbu flavolignanů, flavonoidů a isoflavonoidů u kalusových a suspenzních kultur *Sylibum marianum*, *Ononis arvensis* a *G. tinctoria*. Byl zjištěn pozitivní vliv na tvorbu sekundárních metabolitů. ^{(55) (56)}

Nově se jako elicitor zvyšující produkci sekundárních metabolitů využívá ultrazvuk. ⁽⁵⁴⁾

V rámci stresových faktorů u kultur *G. tinctoria* byl ve studii KUBEŠ *et al.* pozorován i vliv elektrického proudu a roztoku AgNO₃ na pozitivní ovlivnění tvorby sekundárních metabolitů a jejich eluci do živného média. ⁽⁵³⁾

Studie LUCZKIEWICZ *et al.* vyhodnotila vliv elicitorů – methyl jasmonátu a chitosanu na tvorbu sekundárních metabolitů u vysoce produktivní suspenzní kultury *G. tinctoria* a na eluci isoflavonoidů do živného média. Maximální koncentrace isoflavonových aglykonů (4-6krát větší než u kontrolních vzorků biomasy) byly získány ze vzorků, kde byl jako elicitor použit chitosan. Chitosan v koncentraci 150 mg l⁻¹ a methyljasmonát v koncentraci 100 μmol l⁻¹ byly přidány v 0. nebo 26. den růstového cyklu k suspenzní kultuře *G. tinctoria*. U tohoto typu kultury byla zaznamenána nejvyšší produkce isoflavonoidů. Vylučování isoflavonoidů do média nebylo zachyceno navzdory tomu, že tento jev je často pozorováno u *in vitro* kultur exponovaných

stresovým faktorům. Dle autorů prozatím není záležitost eluce isoflavonoidů u *in vitro* kultur *G. tinctoria* plně objasněna a je předmětem dalšího zkoumání. Eluce může být ovlivněna pomocí permeabilizujícího faktoru – zde využít 2% DMSO, po jehož užití došlo k vyloučení isoflavonoidů do média. Ani jeden z elicitorů neovlivňoval uvolňování isoflavonoidů do média.⁽⁵⁰⁾

Ze získaných výsledků lze usoudit, že SeO₂ může sloužit jako vhodný elicitor ke zvyšování produkce určitých isoflavonoidů. Není ale schopen ovlivnit vylučování isoflavonoidů do živného média.

11. ZÁVĚR

V této práci byl sledován vliv SeO_2 na obsah isoflavonoidů v *in vitro* kultuře *G. tinctoria*.

– Byl zaznamenán pozitivní vliv na produkci isoflavonoidního glykosidu genistinu v kalusové a suspenzní kultuře a na produkci aglykonu daidzeinu v suspenzní kultuře.

– K nejvýznamnějšímu nárůstu došlo v suspenzní kultuře u daidzeinu při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a $9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ po 12 a 24 h, dále u genistinu při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ po 24 h, při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ po 168 h a při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-5}$ po 48 h.

– Kontrolní vzorky vykazovaly v některých případech nízký nárůst isoflavonoidů, ve vzorcích s elicitorem pak byla často produkce nulová – k tomuto jevu docházelo v kalusové kultuře u genisteinu při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a $9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. U daidzeinu, formononetinu a biochaninu A při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. V suspenzní kultuře u genisteinu při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, $9,012 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a $9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, u formononetinu při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ a biochaninu A při koncentraci elicitoru $9,012 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a $9,012 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

– Analýza nepotvrdila vylučování isoflavonoidů do média.

Ze získaných výsledků lze usoudit, že selen ve formě oxidu seleničitého může být využíván jako účinný elicitor obzvláště ke zvýšení obsahu daidzeinu a genistinu v suspenzní kultuře a dále i ke zvýšení obsahu genistinu v kalusové kultuře. Tyto poznatky lze dále využít při aplikaci v bioreaktoru nebo polní kultuře.

V rámci této studie byla prohloubena znalost práce s explantátovými kulturami a vyhodnocen vliv selenu na tvorbu sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách *G. tinctoria*. Cíle práce byly tudíž naplněny

12. POUŽITÉ ZKRATKY

2,4-D	– 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
BAX	– BCL 2 associated X protein
BCL 2	– B-cell lymphoma 2
BPA	– Bisfenol A
DAD	– Diode Array Detector
DFT	– Density Functional Theory
DMSO	– Dimethylsulfoxid
DNA	– Deoxyribonukleová kyselina
DW	– Dry Weight – sušina
FCV	– <i>Feline calicivirus</i>
GC-MS	– Gas Chromatography-Mass Spektrometry
GPx	– Glutathionperoxidáza
GT	– Extrakt z <i>Genista tinctoria</i>
HPLC	– High Performance Liquid Chromatography
IAA	– Indol-3-octová kyselina
KIN	– Kinetin
LOX	– Lysyl oxidase
LPS	– Lipopolysacharid
MATE	– Multidrug and Toxin Extrusion
MCF-7	– Michigan Cancer Foundation-7 - buňky lidského karcinomu prsu
MDA	– Malondialdehyd
MNV	– <i>Murine norovirus</i>
MP	– Methylparaben
MRSA	– Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NAA	– α -naftyloctová kyselina
NADPH	– Nikotinamidadeninukleotidfosfát
ROCK	– Rho-associated protein kinase
ROS	– Reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku
RT-HPLC	– Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography
RT-PCR	– Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
SOD	– Superoxid dismutáza
T-2 toxin	– Trichotecenový mykotoxin

TIBA – 2, 3, 5- triiodobenzoic acid
U2OS – Buněčná linie lidského osteokarcinomu

13. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g ⁻¹ DW) v kalusové kultuře <i>Genista tinctoria</i> při koncentraci elicitoru C ₁	47
Tabulka 2 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g ⁻¹ DW) v kalusové kultuře <i>Genista tinctoria</i> při koncentraci elicitoru C ₂	48
Tabulka 3 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g ⁻¹ DW) v kalusové kultuře <i>Genista tinctoria</i> při koncentraci elicitoru C ₃	49
Tabulka 4 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g ⁻¹ DW) v suspenzní kultuře <i>Genista tinctoria</i> při koncentraci elicitoru C ₁	50
Tabulka 5 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g ⁻¹ DW) v suspenzní kultuře <i>Genista tinctoria</i> při koncentraci elicitoru C ₂	51
Tabulka 6 Obsah jednotlivých isoflavonoidů (v mg g ⁻¹ DW) v suspenzní kultuře <i>Genista tinctoria</i> při koncentraci elicitoru C ₃	52

14. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Kručinka barvířská (<i>Genista tinctoria L.</i>)	9
Obrázek 2 Textilie obarvená pomocí kručinky barvířské	10
Obrázek 3 Struktura isoflavonoidů	11
Obrázek 4 Biosyntéza isoflavonoidů	12
Obrázek 5 Idealizovaný průběh stresové reakce	18
Obrázek 6 Ukázka chromatogramu HPLC analýzy kalusové kultury	40
Obrázek 7 Kalibrační křivka — genistin	41
Obrázek 8 Kalibrační křivka — genistein	41
Obrázek 9 Kalibrační křivka — daidzein	42
Obrázek 10 Kalibrační křivka — formononetin	42
Obrázek 11 Kalibrační křivka — biochanin A	43

15. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Tvorba isoflavonoidů v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C1.....	54
Graf 2 Tvorba isoflavonoidů v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C2.....	54
Graf 3 Tvorba isoflavonoidů v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C3.....	55
Graf 4 Tvorba isoflavonoidů v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C1.....	55
Graf 5 Tvorba isoflavonoidů v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C2.....	56
Graf 6 Tvorba isoflavonoidů v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C3.....	56

16. POUŽITÁ LITERATURA

1. ŁUCZKIEWICZ, M., MIGAS, P., KOKOTKIEWICZ, A. *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 Planar Chromatography – Modern TLC*. 2004, 17(2), 89-94.
2. The International Plant Names Index [online]. [cit. 2015-11-14]. Dostupné z: http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do;jsessionid=ADD41056D82BEF0C385F8ECC51EF9E8E?id=496408-1&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Bjsessionid%3DADD41056D82BEF0C385F8ECC51EF9E8E%3Ffind_wholeName%3Dgenista%2Btinctoria%2B%26output_format%3Dnormal
3. Plants For a Future [online]. [cit. 2015-11-14]. Dostupné z: <http://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Genista+tinctoria>
4. JAHODÁŘ, L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Karolinum. 2009, 119. ISBN 978-80-246-1791-6.
5. STROH, P.: *Genista tinctoria* L.: Dyer's Greenweed. *Botanical Society of Britain & Ireland*. 2015, [online]. [cit. 2015-11-14]. Dostupné z: http://www.bsbi.org.uk/Genista_tinctoria_species_account.pdf
6. DEYL, M., SKOČDOPOLOVÁ-DEYLOVÁ, B. (ed.): *Naše květiny*. Ilustrace Květoslav Hísek. Praha: Academia. 2001, 108. ISBN 80-200-0940-X.
7. VLADIMIROVA, I. N., GEORGIYANTS, V. A.: Lipophilic substances from *Genista tinctoria*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013, 49(1), 91-92.
8. TROALEN, L. G., PHILLIPS, A. S., PEGGIE, D. A. *et al.*: Historical textile dyeing with *Genista tinctoria* L: a comprehensive study by UPLC-MS/MS analysis. *Analytical Methods*. 2014, 6(22), 8915-8923
9. KARAPANAGIOTIS, I., MANTZOURIS, D., KAMATEROU, P. *et al.*: Identification of materials in post-Byzantine textiles from Mount Athos. *Journal of Archaeological Science*. 2011, 38(12), 3217-3223
10. Dyeing with Dyers' Greenweed Extract [online]. [cit. 2015-11-14]. Dostupné z: http://www.wildcolours.co.uk/assets/images/autogen/a_natural-dye-extract-greenweed-0308_1.jpg
11. SPILKOVÁ, J., MARTIN, J., SIATKA, T. *et al.*: *Farmakognosie*. Praha: Karolinum. 2016, 120. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-3264-3
12. VÍTKOVÁ, M., MACKOVÁ, Z., FUKAL, L. *et al.*: Enzymová imunoanalýza pro stanovení isoflavonoidů. *Chemické listy*. 2004, 98(12), 1135-1139.

13. The National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2016-02-13].
Dostupné z:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/96862#show=linkedbiosystems/biosystems_biosystems_linked
14. ALLRED, C. D.: Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis*. 2001, 22(10), 1667-1673.
15. MIADOKOVÁ, E.: Isoflavonoids — an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology*. 2009, 2(4), 211-218.
16. HACKSHAW-MCGEAGH, L. E., PERRY, R. E., LEACH, V. A. *et al.*: A systematic review of dietary, nutritional, and physical activity interventions for the prevention of prostate cancer progression and mortality. *Cancer Causes*. 2015, 26(11), 1521-1550.
17. WOLFF, M. S., TEITELBAUM, S. L., MCGOVERN, K. *et al.*: Environmental phenols and pubertal development in girls. *Environment International*. 2015, 84, 174-180.
18. SEO, D. J., JEON, S. B., OH, H. *et al.*: Comparison of the antiviral activity of flavonoids against *murine norovirus* and *feline calicivirus*. *Food Control*. 2016, 60, 25-30.
19. BASSE, C., AROCK, M.: The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *International Journal of Cancer*. 2015, 137(12), 2785-2794.
20. POPA, D-S., BOLFA, P., VLASE, L. *et al.*: Influence of *Genista Tinctoria* L. or Methylparaben on Subchronic Toxicity of Bisphenol A in Rats. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2014, 27(2), 85-96.
21. LINSEISEN, J., PILLER, R., HERMANN, S. *et al.*: Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *International Journal of Cancer*. 2004, 110(2), 284–290.
22. ALLRED, C. D.: Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis*. 2001, 22(10), 1667-1673.
23. LÓPEZ, T., LÓPEZ, S., ARIAS, C. F.: The tyrosine kinase inhibitor genistein induces the detachment of rotavirus particles from the cell surface. *Virus Research*. 2015, 210, 141-148.
24. WANG, J., HE, C., WU, W-Y. *et al.*: Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage and oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2015, 138, 96-103.
25. LI, G., YANG, M., HAO, X. *et al.*: Acute toxicity of sodium formononetin-3'-sulphonate (Sul-F) in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2015, 73(2), 629-633.

26. CAVENDISH, R. L., SANTOS, J. S., NETO, R. B. *et al.*: Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015, 173, 127-133.
27. HU, W., XIAO, Z. M.: Formononetin Induces Apoptosis of Human Osteosarcoma Cell Line U2OS by Regulating the Expression of Bcl-2, Bax and MiR-375 *In Vitro* and *In Vivo*. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015, 37(3), 933-939.
28. LI, S., DANG, Y., ZHOU, X. *et al.*: Formononetin promotes angiogenesis through the estrogen receptor alpha-enhanced ROCK pathway. *Scientific Reports*. 2015, 5, 1-17.
29. LIU, Q., SUN, Y., ZHENG, J.-M., YAN, X.-L., CHEN, H.-M., CHEN, J.-K., HUANG, H.-Q.: Formononetin sensitizes glioma cells to doxorubicin through preventing EMT via inhibition of histone deacetylase 5. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015, 8(6), 6434-6441.
30. KRENN, L., PAPER, D. H.: Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine*. 2009, 16(12), 1083-1088.
31. PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J.: *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia. 1998, 328-341. ISBN 80-200-0586-2.
32. SIKYTA, B., DUŠEK, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum. 2001, 75-83. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0211-3.
33. PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J.: *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia. 1998, 412-431. ISBN 80-200-0586-2.
34. MOURA, J. C. M. S., BONINE, C. A. V., VIANA, J. O. F. *et al.*: Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010, 52(4), 360-376.
35. KIMURA, M., YAMAMOTO, Y. Y., SEKI, M. *et al.*: Identification of Arabidopsis Genes Regulated by High Light-Stress Using cDNA Microarray. *Photochemistry and Photobiology*. 2003, 77(2), 226-233.
36. YAMASAKI, S., NOGUCHI, N., MIMAKI, K.: Continuous UV-B Irradiation Induces Morphological Changes and the Accumulation of Polyphenolic Compounds on the Surface of Cucumber Cotyledons. *Journal of Radiation Research*. 2007, 48(6), 443-454.
37. ROZEMA, J., VAN DE STAAL, J., BJÖRN, L. O., CALDWELL, M.: UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology*. 1997, 12(1), 22-28.
38. ANTOGNONI, F., ZHENG, S., PAGNUCCO, C. *et al.*: Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*. 2007, 78(5), 345-352.
39. BEGORA, M. D., FAHSELT, D.: Usnic Acid and Atranorin Concentrations in Lichens in Relation to Bands of UV Irradiance. *The Bryologist*. 2001, 104(1), 134-140.

40. DOUILLET-BREUIL, A-C., JEANDET, P., ADRIAN, M. *et al.*: Changes in the Phytoalexin Content of Various *Vitis* Spp. in Response to Ultraviolet C Elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, 47(10), 4456-4461.
41. TŮMOVÁ, L., TŮMA, J.: The effect of UV light on isoflavonoid production in *Genista tinctoria* culture *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2011, 33(2), 635-640.
42. DELESSERT, C., WILSON, I., VAN DER STRAETEN, D. *et al.*: Spatial and temporal analysis of the local response to wounding. *Plant Molecular Biology*. 2004, 55(2), 165-181. ISSN 0167-4412.
43. WU, F., JIANG, W., WU, B.: Methodological Aspects About Determination of Plant Defensive Phenolics in Response to Stress. *Current Analytical Chemistry*. 2013, 9(3), 360-367.
44. ALI, M. B., SINGH, N., SHOHAEL, A. M. *et al.*: Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science*. 2006, 171(1), 147-154.
45. ECHEVERRI, F., TORRES, F., QUIÑONES, W. *et al.*: Danielone, a phytoalexin from papaya fruit. *Phytochemistry*. 1997, 44(2), 255-256.
46. PANDOLFINI, T., GABBRIELLI, R., COMPARINI, C.: Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant, Cell and Environment*. 1992, 15(6), 719-725.
47. BASAK, M., SHARMA, M., CHAKRABORTY, U.: Biochemical responses of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze to heavy metal stress. *Journal of Environmental Biology*. 2001, 22(1), 37-41.
48. DAVEY, M. P., BRYANT, D. N., CUMMINS, I. *et al.*: Effects of elevated CO₂ on the vasculature and phenolic secondary metabolism of *Plantago maritima*. *Phytochemistry*. 2004, 65(15), 2197-2204.
49. KESSMANN, H., EDWARDS, R., GENO, P. W. *et al.*: Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.): V. Constitutive and Elicitor-Induced Accumulation of Isoflavonoid Conjugates in Cell Suspension Cultures. *Plant Physiology*. 1990, 94(1), 227-232.
50. LUCZKIEWICZ, M., KOKOTKIEWICZ, A.: Elicitation and permeabilisation affect the accumulation and storage profile of phytoestrogens in high productive suspension cultures of *Genista tinctoria*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2012, 34(1), 1-16.
51. AKULA, R., RAVISHANKAR, G. A.: Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling*. 2014, 6(11), 1720-1731.
52. LUCZKIEWICZ, M., KOKOTKIEWICZ, A., GLOD, D.: Plant growth regulators affect biosynthesis and accumulation profile of isoflavone phytoestrogens in high-productive *in vitro* cultures of *Genista tinctoria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2014, 118(3), 419-429.

53. KUBEŠ, J., TŮMOVÁ, L., MARTIN, J. *et al.*: The production of isoflavonoids in *Genista tinctoria* L. cell suspension culture after abiotic stressors treatment. *Natural Product Research*. 2014, 28(24), 2253-2263.
54. TŮMOVÁ, L., TUMA, J., HENDRYCHOVA, H.: Effect of ultrasound on the isoflavonoid production in *Genista tinctoria* L. suspension cultures. *Pharmacognosy Magazine*. 2014, 10(38), 425-429.
55. TŮMOVÁ, L., KLIMESOVA, V., VILDOVA, A.: The Effect of Pyridinecarbothioamides on Isoflavonoid Production in *Genista tinctoria* Cultures *in Vitro*. *Natural Product Communications*. 2013, 8(5), 593-596.
56. TŮMOVÁ, L., TUMA, J., DOLEŽAL, M.: Pyrazinecarboxamides as Potential Elicitors of Flavonolignan and Flavonoid Production in *Silybum marianum* and *Ononis arvensis* Cultures *In Vitro*. *Molecules*. 2011, 16(12), 9142-9152.
57. Periodic Table of Elements: Los Alamos National Laboratory [online]. [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <http://periodic.lanl.gov/34.shtml>
58. FARKASOVSKA, I., ZEMBERYOVA, M.: Stanovenie a špeciácia selénu v biologickom materiáli a vo vzorkách životného prostredia technikami metódy AAS. *Chemické listy*. 1999, 93(10), 633-638.
59. Dietary Supplement Fact Sheet: Selenium. National Institutes of Health [online]. [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/>
60. Commission Directive 2008/100/EC: of 28 October 2008 amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for foodstuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. L 285/9. Brussel: Official Journal of the European Union. 2008.
61. JABLONSKA, E., GROMADZINSKA, J., KLOS, A. *et al.*: Selenium, zinc and copper in the Polish diet. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2013, 31(2), 259-265.
62. NIEDZIELSKI, P., RUDNICKA, M., WACHELKA, M. *et al.*: Selenium species in selenium fortified dietary supplements. *Food Chemistry*. 2016, 190, 454-459.
63. DENNERT, G., ZWAHLEN, M., BRINKMAN, M. *et al.*: Selenium for preventing cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011, 11(5), 1-131.
64. WATERS, D. J., CHIANG, E. C., COOLEY, D. M. *et al.*: Making sense of sex and supplements: differences in the anticarcinogenic effects of selenium in men and women. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004, 551(1-2), 91-107.
65. AMOAKO, P. O., UDEN, P. C., TYSON, J. F.: Speciation of selenium dietary supplements; formation of S-(methylseleno)cysteine and other selenium compounds. *Analytica Chimica Acta*. 2009, 652(1-2), 315-323.

66. LIPPMAN, S. M., KLEIN, E. A., GOODMAN, P. J. *et al.*: Effect of Selenium and Vitamin E on Risk of Prostate Cancer and Other Cancers. *The Journal of the American Medical Association*. 2009, 301(1), 39-51.
67. KLEIN, E. A., THOMPSON, I. M., TANGEN, C. M. *et al.*: Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer. *The Journal of the American Medical Association*. 2011, 306(14), 1549-56.
68. FAGAN, S., OWENS, R., WARD, P. *et al.*: Biochemical Comparison of Commercial Selenium Yeast Preparations. *Biological Trace Element Research*. 2015, 166(2), 245-259.
69. TUZEN, M., PEKINER, O. Z.: Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometric for selenium speciation in foods and beverages. *Food Chemistry*. 2015, 188, 619-624.
70. ZWOLAK, I.: Increased Cytotoxicity of Vanadium to CHO-K1 Cells in the Presence of Inorganic Selenium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2015, 95(5), 593-598.
71. CHANG, J. C., GUTENMANN, W. H., REID, C. M. *et al.*: Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. *Chemosphere*. 1995, 30(4), 801-802.
72. HAMMEL, C., KYRIAKOPOULOS, A., BEHNE, D. *et al.*: Protein-Bound Selenium in the Seeds of Coco de Mono (*Lecythis ollaria*). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 1996, 10(2), 96-102.
73. SENTHILKUMARAN, S., BALAMURUGAN, N., VOHRA, R. *et al.*: Paradise Nut Paradox: Alopecia Due to Selenosis from a Nutritional Therapy. *International Journal of Trichology*. 2012, 4(4), 283-284.
74. CHEN, Z., LI, H., YANG, L. *et al.*: Hair Selenium Levels of School Children in Kashin–Beck Disease Endemic Areas in Tibet, China. *Biological Trace Element Research*. 2015, 168(1), 25-32.
75. ESTEVAM, E., WITEK, K., FAULSTICH, L. *et al.*: Aspects of a Distinct Cytotoxicity of Selenium Salts and Organic Selenides in Living Cells with Possible Implications for Drug Design. *Molecules*. 2015, 20(8), 13894-13912.
76. KHERADMAND, E., RAFII, F., YAZDI, M. *et al.*: The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014, 22(1), 1-6.
77. CHEN, W., LI, Y., YANG, S. *et al.*: Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 132, 574-581.
78. BACHIEGA, P., SALGADO, J. M., CARVALHO, J. E. *et al.*: Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea Italica*) biofortified with selenium. *Food Chemistry*. 2016, 190, 771-776.

79. ÁVILA, F. W., YANG, Y., FAQUIN, V. *et al.*: Impact of selenium supply on Se-methylselenocysteine and glucosinolate accumulation in selenium-biofortified Brassica sprouts. *Food Chemistry*. 2014, 165, 578-586.
80. CARVACHO, H. B., PÉREZ, C., ZÚÑIGA, G. *et al.*: Effect of methyl jasmonate, sodium selenate and chitosan as exogenous elicitors on the phenolic compounds profile of broccoli sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014, 94(12), 2555-2561.
81. TIAN, M., XU, X., LIU, Y. *et al.*: Effect of Se treatment on glucosinolate metabolism and health-promoting compounds in the broccoli sprouts of three cultivars. *Food Chemistry*. 2016, 190, 374-380.
82. MATSOUKA, I., BERI, D., CHINO, I. *et al.*: Metals and selenium induce medicarpin accumulation and excretion from the roots of fenugreek seedlings: a potential detoxification mechanism. *Plant and Soil*. 2011, 343(1-2), 235-245.
83. OŽBOLT, L., KREFT, S., KREFT, I. *et al.*: Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. *Food Chemistry*. 2008, 110(3), 691-696.
84. FENG, T., CHEN, S. S., GAO, D. Q. *et al.*: Selenium improves photosynthesis and protects photosystem II in pear (*Pyrus bretschneideri*), grape (*Vitis vinifera*), and peach (*Prunus persica*). *Photosynthetica*. 2015, 53(4), 609-612.
85. STIBILJ, V., KREFT, I., SMRKOLJ, P. *et al.*: Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilisation. *European Food Research and Technology*. 2004, 219(2), 142-144.
86. SMRKOLJ, P., STIBILJ, V., KREFT, I. *et al.*: Selenium species in buckwheat cultivated with foliar addition of Se(VI) and various levels of UV-B radiation. *Food Chemistry*. 2006, 96(4), 675-681.
87. ELGUERA, J. C. T., BARRIENTOS, E., Y., WROBEL, K. *et al.*: Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013, 35(2), 431-441.
88. KUMAR, A., SINGH, R. P., SINGH, P. K. *et al.*: Selenium ameliorates arsenic induced oxidative stress through modulation of antioxidant enzymes and thiols in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicology*. 2014, 23(7), 1153-1163.
89. KAPOOR, R., NASIM, S. A., DHIR, B. *et al.*: Selenium treatment alters phytochemical and biochemical activity of in vitro-grown tissues and organs of *Allium sativum* L. *In Vitro Cellular*. 2012, 48(4), 411-416.
90. ARDEBILI, N. O., SAADATMAND, S., NIKNAM, V. *et al.*: The alleviating effects of selenium and salicylic acid in salinity exposed soybean. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2014, 36(12), 3199-3205.
91. SURAJBALI, P., RAMANAH, D., K., RHYMAN, L. *et al.*: Density Functional Theory Study of Cyanoetheneselenol: A Molecule of Astrobiological Interest. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 2015, 45(4), 455-468.

92. DURÁN, P., ACUÑA, J. J., JORQUERA, M. A. *et al.*: Endophytic bacteria from selenium-supplemented wheat plants could be useful for plant-growth promotion, biofortification and *Gaeumannomyces graminis* biocontrol in wheat production. *Biology and Fertility of Soils*. 2014, 50(6), 983-990.
93. MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962, 15(3), 473-497.
94. KLIMEŠ, J., SOCHOR, J., MOKRÝ, M. *et al.*: Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. Hradec Králové: Nukleus HK. 2011, 245. ISBN 978-80-87009-29-1