

PŘÍLOHY

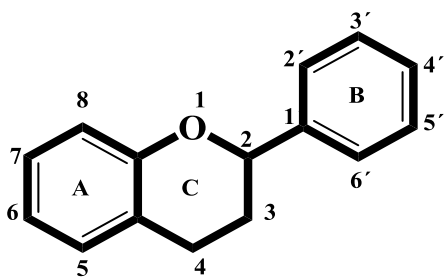
Příloha 1. *Trifolium pratense* L.



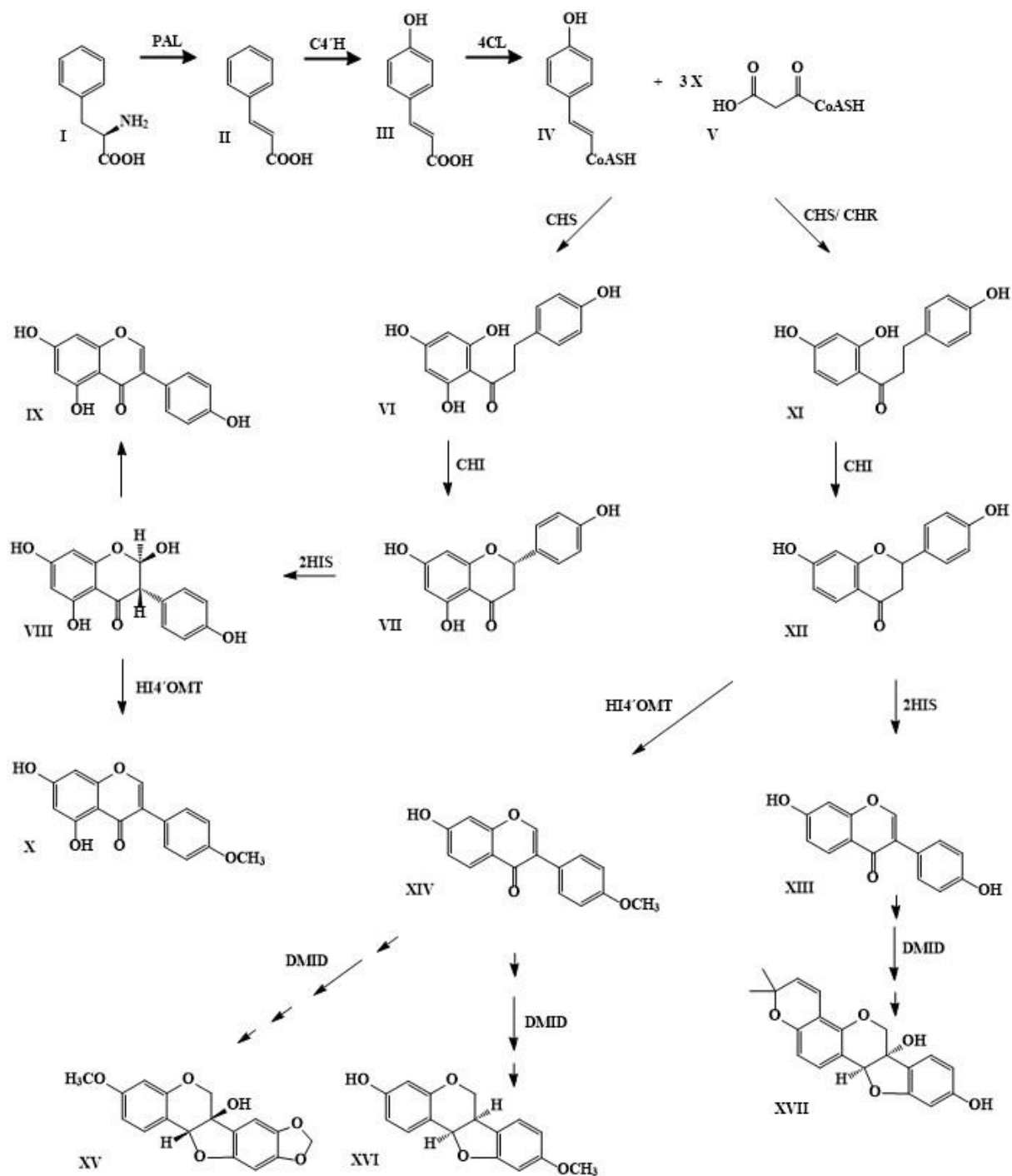
Příloha 2. *Genista tinctoria* L



Příloha 3. Základní struktura flavonoidů⁸⁶



Příloha 4. Syntéza isoflavonů⁸⁸



Příloha 5. Kalusová kultura *T. pratense* v Gamborg B5 tekutém mediu.



Příloha 6. Suspenzní kultura *T. pratense* na papírovém můstku v Gamborg B5 mediu.



Příloha 7. Kalusová kultura *G. tinctoria* v SH tekutém mediu.



Příloha 8. Suspenzní kultura *G. tinctoria* na papírovém můstku v SH mediu.



Příloha 9. Gamborg B5 medium – složení a příprava

Makroelementy Gamborg B5	Zásobní roztok 1 l
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,500 g
KNO ₃	25,00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,500 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.340 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,500 g

Mikroelementy Gamborg B5	Zásobní roztok 100 ml
MnSO ₄ .H ₂ O	1,0000 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2000 g
H ₃ BO ₃	0,3000 g
KI	0,7500 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0250 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025 g

Železnatý komplex	Zásobní roztok 500 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,392 g
FeNaEDTA	1,867 g

Vitamíny MS	Zásobní roztok 50 ml
Thiamin B ₁	0,005 g
Kyselina nikotinová B ₃	0,025 g
Pyridoxin B ₆	0,025 g
Růstové regulátory	Lihové zásobní roztoky
2,4-D	0,025 g/ 25 ml
BAP	0,05 g/ 50 ml

Gamborg B5 medium	1 l
Makroelementy Gamborg B5	100 ml
Mikroelementy Gamborg B5	1 ml
Železnatý komplex MS	2 ml

Vitaminsy MS	0,5 ml
2,4-D	2,0 ml
BAP	2,0 ml
Sacharosa	30,00 g
Myo-inositol	0,100 g
Thiamin	0,010 g

Pevné látky byly rozpuštěny v 1l odměrné baňce ve 100 ml destilované vody a postupně byly přidány odměřené zásobní roztoky kromě růstových regulátorů. Po promíchání byl objem doplněn destilovanou vodou po rysku baňky a přidán 2,4-D a BAP. Medium po rozlití do Erlenmeyerových baněk a uzavření hliníkovou folií bylo vysterilizováno v autoklávu při 121 °C a 101,5 kPa po dobu 15 minut.

Příloha 10. Schenk & Hildebrandt (SH) medium – složení a příprava

Makroelementy SH	Zásobní roztok 1 l
CaCl ₂	1,510 g
KNO ₃	25,000 g
MgSO ₄	1.9505 g
(NH ₄)H ₂ PO ₄	3,000 g

Mikroelementy SH	Zásobní roztok 250 ml
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,025 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,050 g
FeNaEDTA	4,950 g
H ₃ BO ₃	1,250 g
KI	0,250 g
MnSO ₄	2,500 g
Na ₂ MoO ₄	0,025 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,250 g

Vitaminsy SH	Zásobní roztok 100 ml
Thiamin B ₁	0,05 g

Kyselina nikotinová B ₃	0,05 g
Pyridoxin B ₆	0,005 g

Růstové regulátory	Lihové zásobní roztoky
2,4-D	0,025 g/ 25 ml
Kinetin	0,025 g/ 25 ml

SH medium	1 l
Makroelementy SH	100 ml
Mikroelementy SH	1 ml
Vitaminy SH	1 ml
2,4-D	0,5 ml
Kinetin	100 µl
Sacharosa	30,0 g
Myo-inositol	1,00 g

K rozpuštění pevných látek v 1l odměrné baňce bylo použito zhruba 100 ml destilované vody a postupně byly přidány odměřené zásobní roztoky. Po promíchání byl objem doplněn destilovanou vodou po rysku baňky. Medium po rozlití do Erlenmeyerových baněk a uzavření hliníkovou folií bylo vysterilizováno v autoklávu při 121 °C a 101,5 kPa po dobu 15 minut

Příloha 11: Elicitace a inhibice transportu

Zásobní roztoky elicitorů

VOSO ₄ 100 µM	0,00815 g/0,5 l
NH ₄ VO ₃ 100 µM	0,00585 g/0,5 l

Zásobní roztoky inhibitorů byly připraveny rozpuštěním v níže uvedených rozpouštědlech v koncentracích, které byly o tři řády vyšší než finální koncentrace uvedené v grafech. Ostatní koncentrace stejných inhibitorů byly naředěny z těchto zásobních roztoků.

NH₄Cl a orthovanadát sodný byly rozpuštěny ve vodě; verapamil, probenecid, glibenklamid a gramicidin byly rozpuštěny v DMSO; brefeldin A byl rozpuštěn v ethanolu.

Příloha 12. Izolace vakuol a ovlivnění transportu

Roztok A	250 ml
Mannitol 500 mM	22,7 g

Roztok B	10 ml
Mannitol 500 mM	0,455 g
HEPES 10 mM	0,024 g

Roztok enzymů	100 ml
Cellulasa Onozuka R-10	1,1667 g
Macerozym R-10	0,2708 g

Enzymy byly rozpuštěny v roztoku A a jednu hodinu promíchávány za ochrany před světlem na třepačce.

Roztok Ficoll	25 ml
MgATP 3 mM	0,03804 g
Mannitol 500 mM	2,275 g
HEPES 10 mM	0,06 g
PEG 0,0375%	0,0094 g
EDTA 12,5 mM	0,1163 g
Ficoll 400 5 %	1,25 g
Ficoll 400 10 %	2,5 g
Ficoll 400 15 %	3,75 g

Pro gradient byly připraveny různé roztoky o příslušné koncentraci Ficollu 400.

Zkušební roztok 1 – MgATP G-	25 ml
MgATP 3 mM	0,03804 g
Mannitol 500 mM	2,275 g
HEPES 10 mM	0,06 g
PEG 0,0375%	0,0094 g
EDTA 12,5 mM	0,1163 g
Ficoll 400 5%	1,25 g

Kontrolní roztok 1 – Kontrola G-	25 ml
Mannitol 500 mM	2,275 g
HEPES 10 mM	0,06 g
PEG 0,0375%	0,0094 g
EDTA 12,5 mM	0,1163 g
Ficoll 400 5%	1,25 g

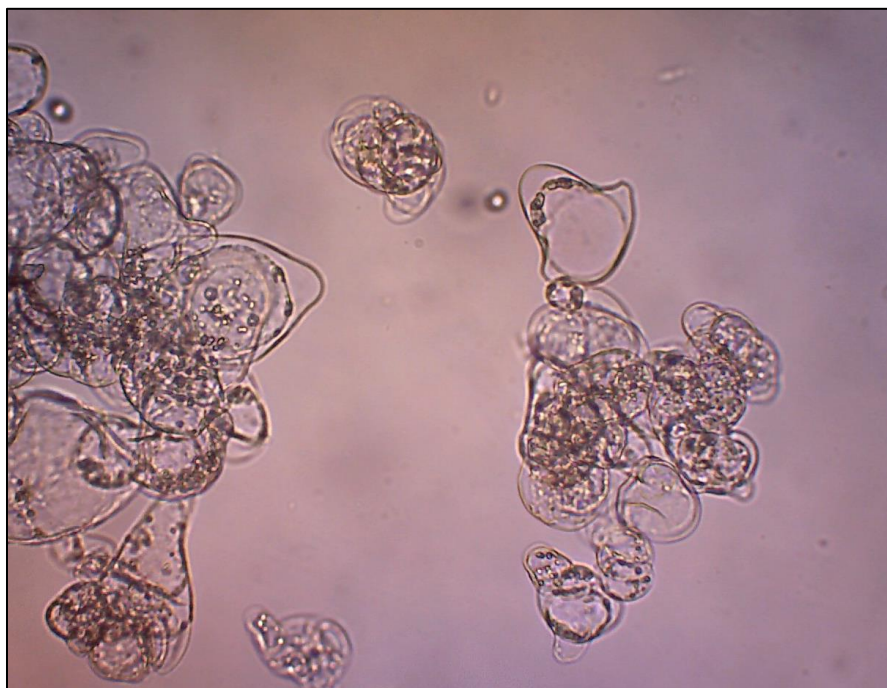
Zkušební roztok 2 – MgATP G+	25 ml
MgATP 3 mM	0,03804 g
Genistin 0,1 mM	0,00108 g
Mannitol 500 mM	2,275 g
HEPES 10 mM	0,06 g
PEG 0,0375%	0,0094 g
EDTA 12,5 mM	0,1163 g
Ficoll 400 5%	1,25 g

Kontrolní roztok 2 – Kontrola G+	25 ml
Genistin 0,1 mM	0,00108 g
Mannitol 500 mM	2,275 g
HEPES 10 mM	0,06 g
PEG 0,0375%	0,0094 g
EDTA 12,5 mM	0,1163 g
Ficoll 400 5%	1,25 g

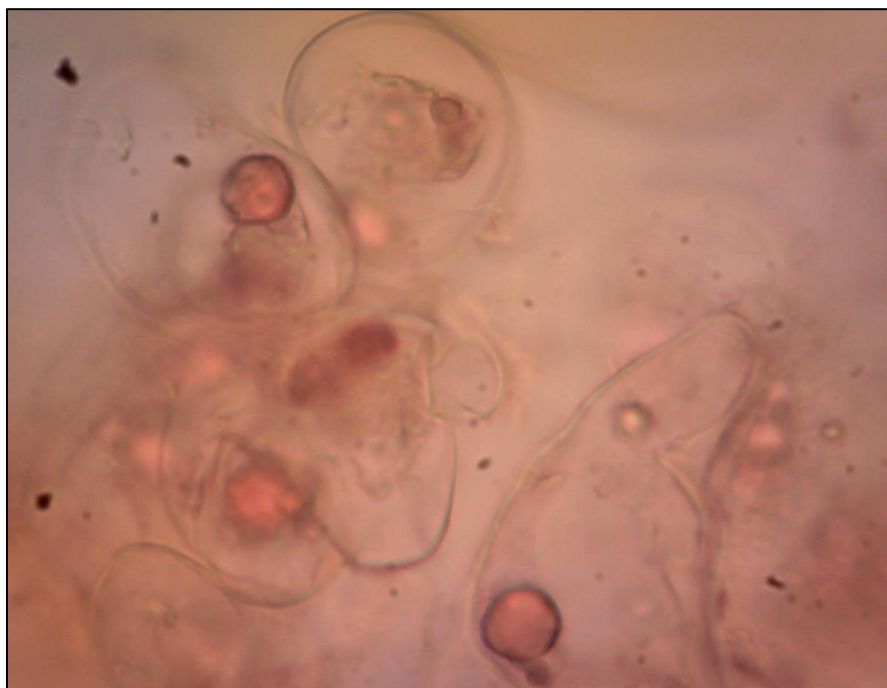
MgATP byl dále nahrazen Bafilomycinem A1 (zkušební roztok 3, 4) a DCCD (zkušební roztok 5, 6), které byly rozpuštěny v 5 ml DMSO a přidány k roztokům

Bafilomycin A1 0,03 mM	0,00093 g
DCCD 0,5 mM	0,00258 g

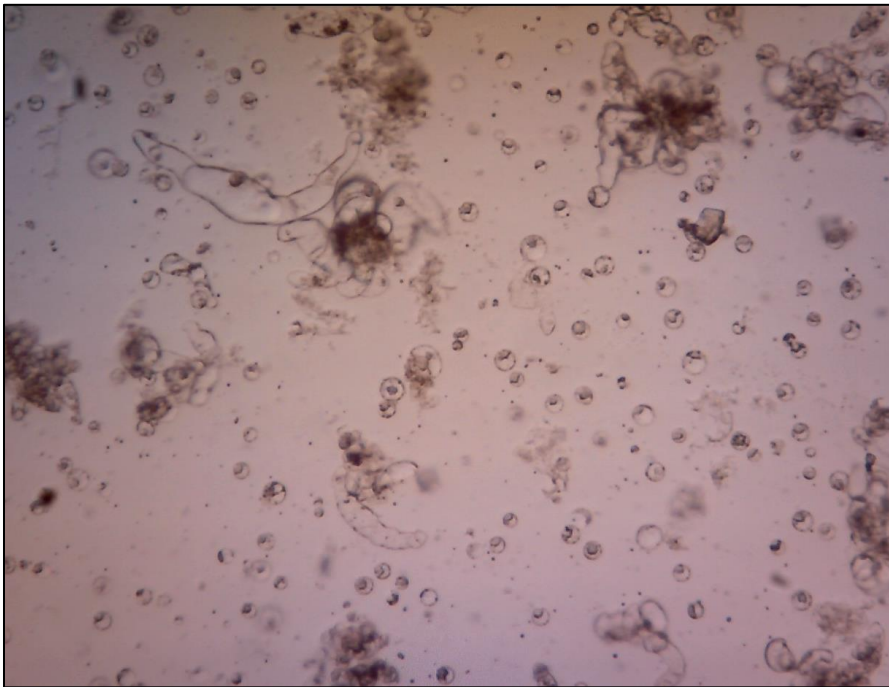
Příloha 13. Suspenzní kultura *T. pratense* ihned po přidání roztoku enzymů, kde jsou patrné shluky buněk. (100× zvětšeno)



Příloha 14. Buňky s vakuolami zbarvené neutrální červení po 3 hodinách v roztoku mannitolu. (400× zvětšeno)



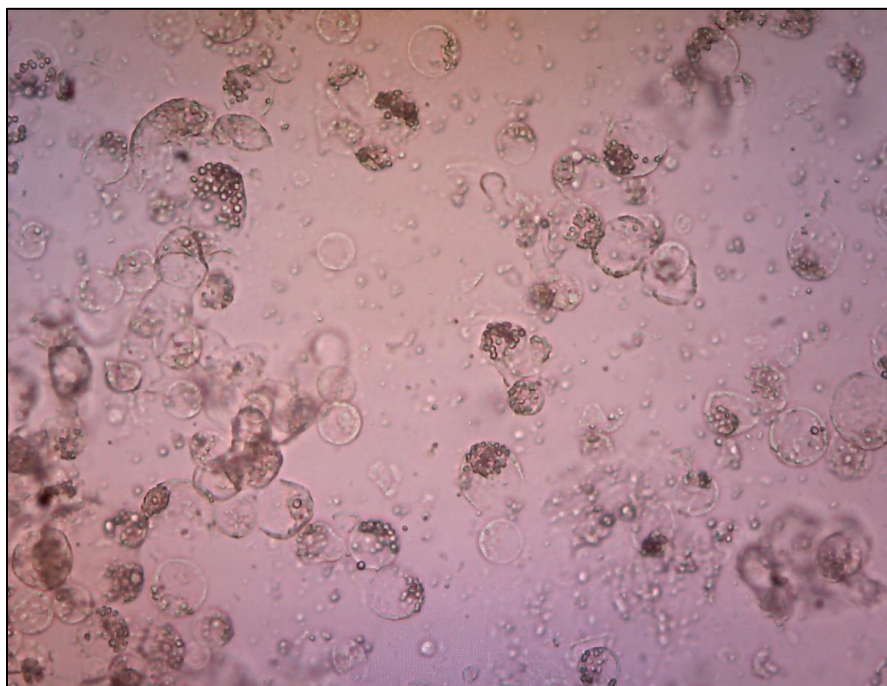
Příloha 15. Buněčná suspenze v roztoku enzymů po 3 hodinách kultivace, kdy mezi shluky jsou již dobře patrné uvolněné protoplasty. (40× zvětšeno)



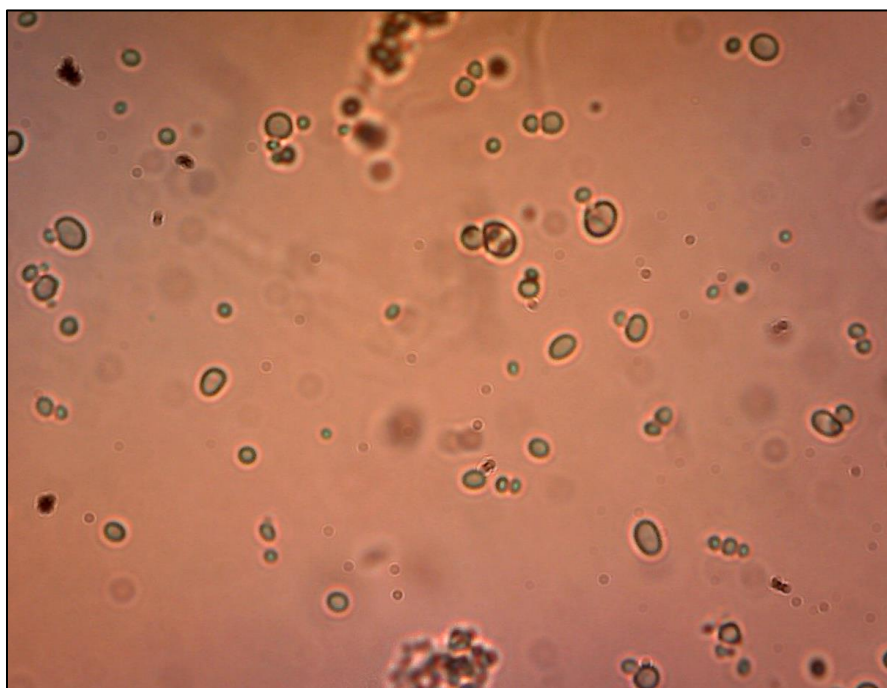
Příloha 16. Uvolněné protoplasty v roztoku enzymů po 4 hodinách kultivace, které mají bez buněčné stěny typický kruhový tvar. (100× zvětšeno)



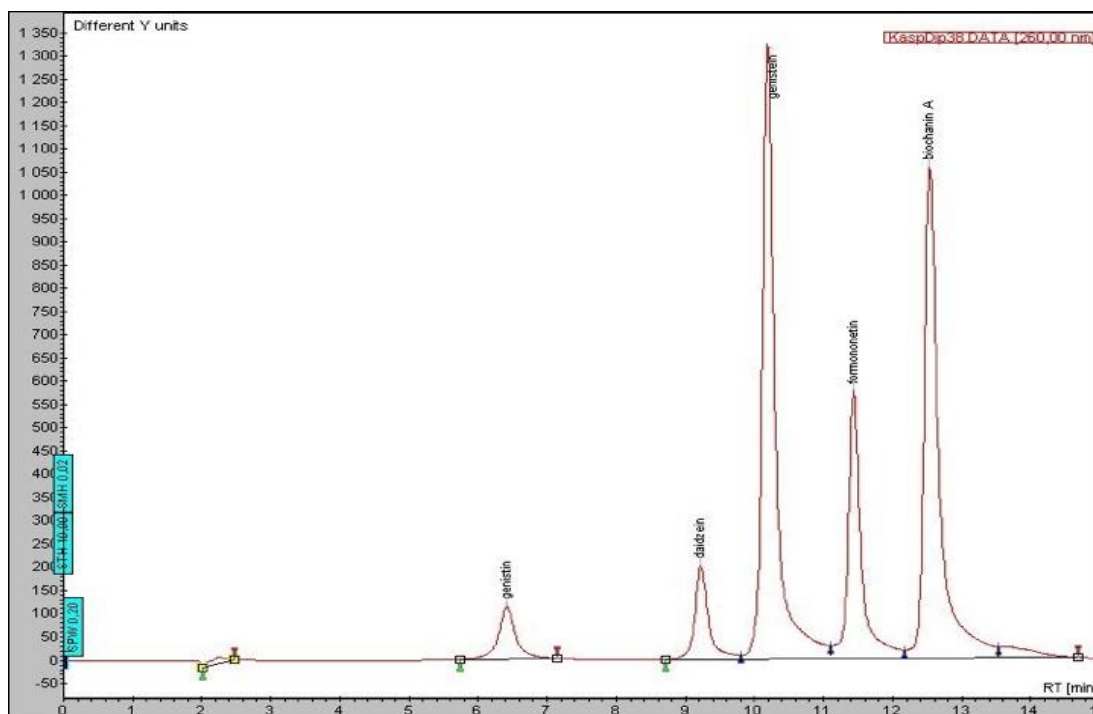
Příloha 17. Lyzované protoplasty s vakuolami po smísení roztoku B obsahující resuspendovanou peletu protoplastů s destilovanou vodou. (100× zvětšeno)



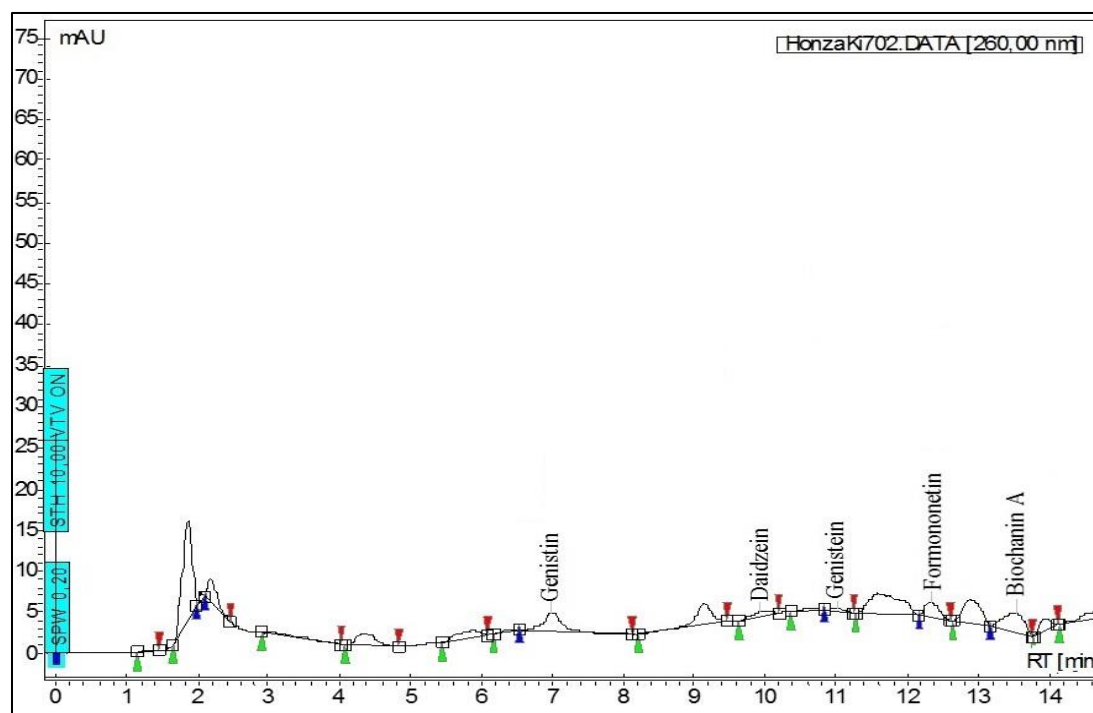
Příloha 18. Izolované vakuoly, získané po centrifugaci a odebrané z pelety. (400× zvětšeno)



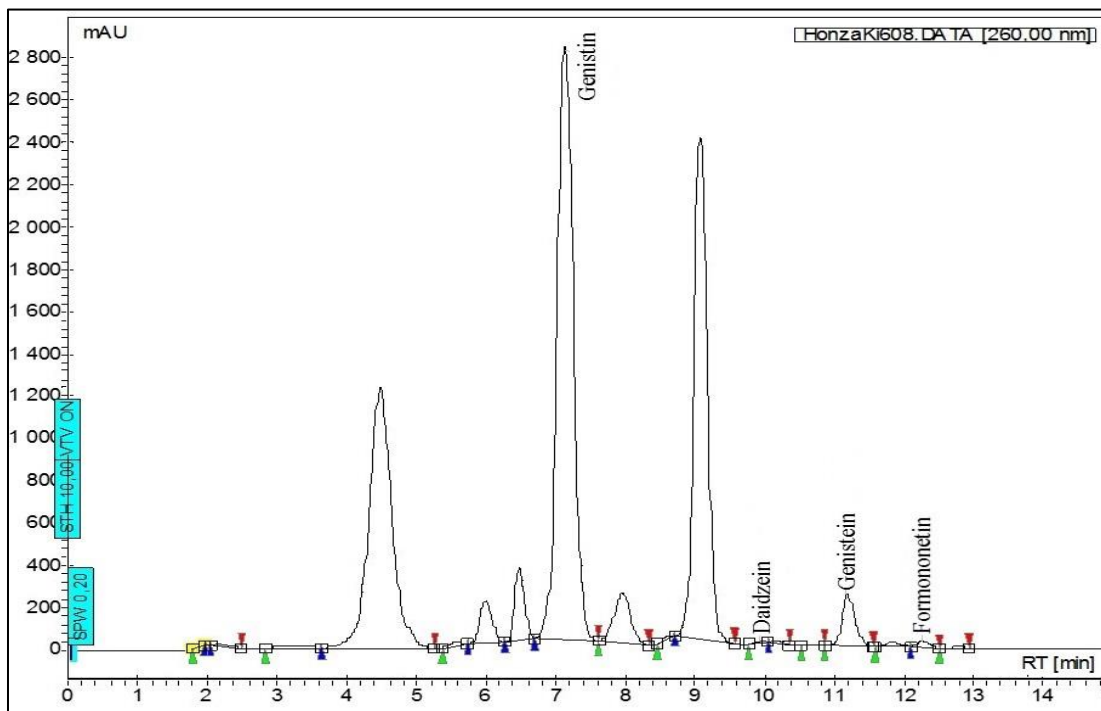
Příloha 19. Standardy isoflavonů



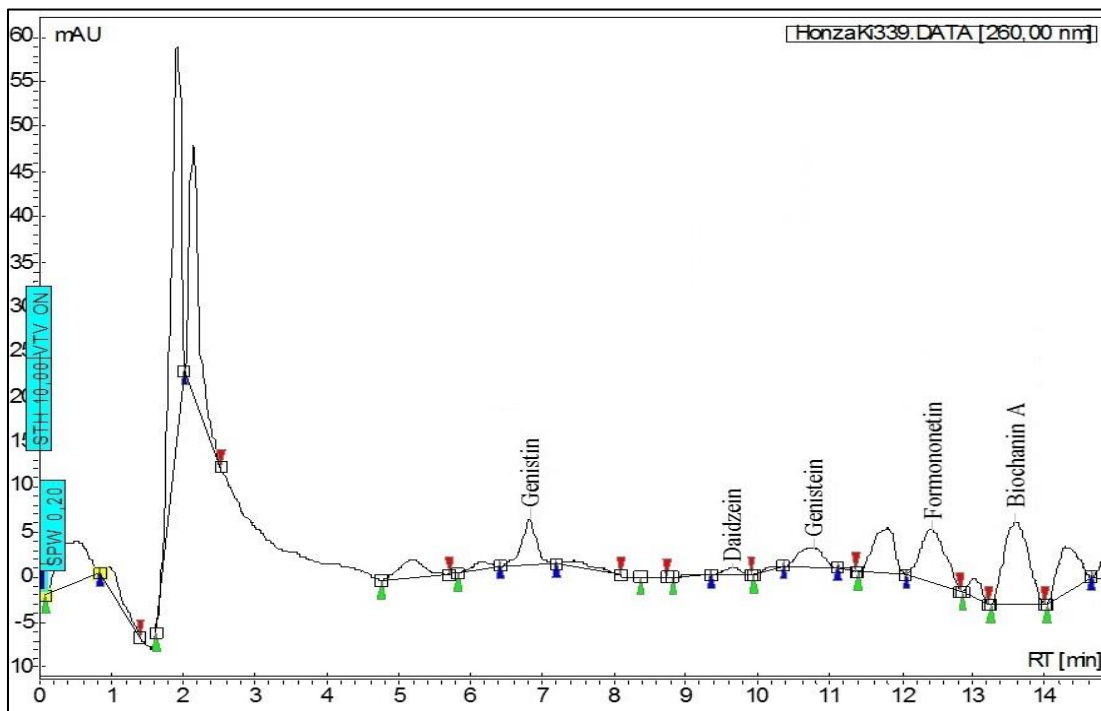
Příloha 20. Chromatogram isoflavonů v mediu *G. tinctoria* po kultivaci s NH_4Cl (10mM)



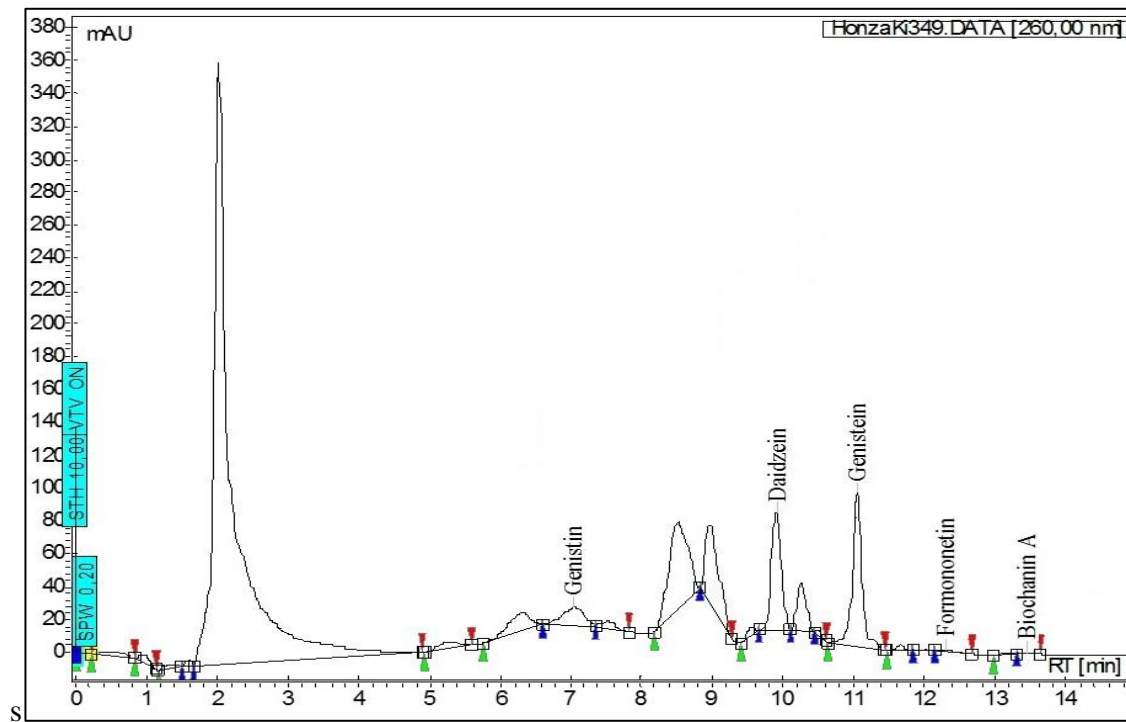
Příloha 21. Chromatogram isoflavonů v sušině *G. tinctoria* po kultivaci s verapamilem (1 mM)



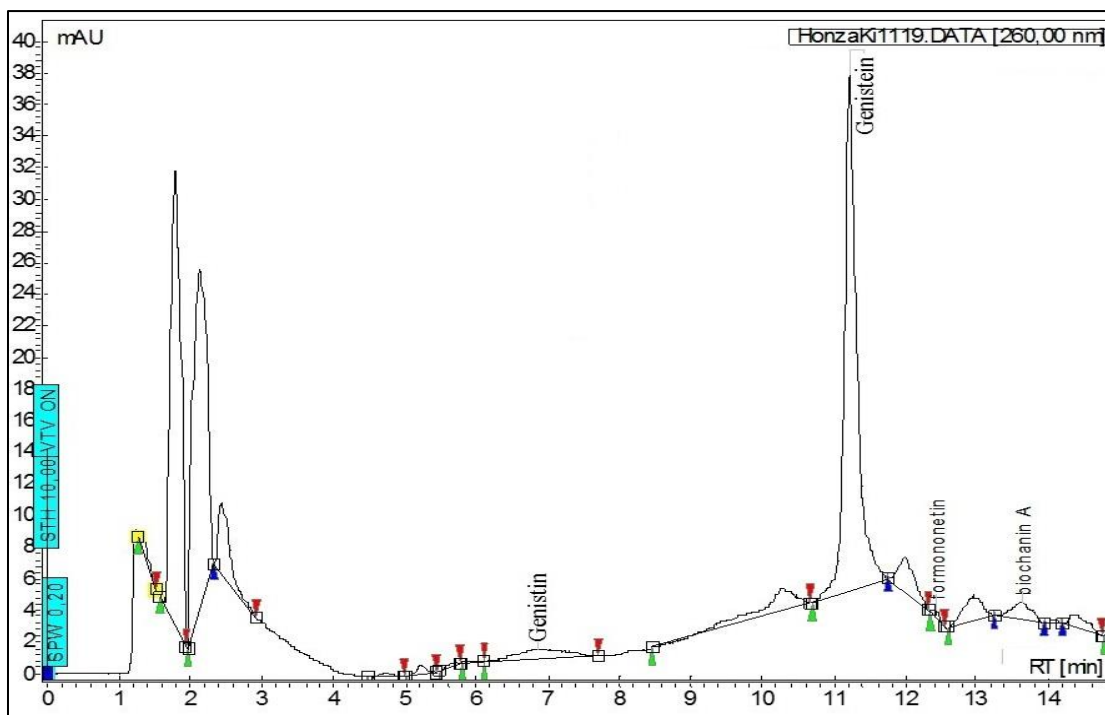
Příloha 22. Chromatogram isoflavonů v mediu *T. pratense* po 24hodinové elicitaci 1 μ M NH₄VO₃



Příloha 23. Chromatogram isoflavonů v sušině *T. pratense* po kultivaci s probencidem (1 mM)



Příloha 24. Chromatogram isoflavonů po aplikaci bafilomycinu A1 a genistinu v supernatantu *T. pratense*



Příloha 25. Chromatogram isoflavonů po aplikaci bafilomycinu A1 a genistinu v peletě *T. pratense*

