

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

## **RIGORÓZNÍ PRÁCE**

### ***Genista tinctoria L. in vitro* – ovlivnění produkce sekundárních látek**

**Mgr. Gabriela Fiedlerová**

**Datum zadání:**

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

**Vedoucí rigorózní práce: Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.**

**Oponent rigorózní práce: PharmDr. Jan Martin, Ph.D.**

**Termín odevzdání:**

**Počet stran: 73**

Úvodem své rigorózní práce bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Lence Tůmové, Csc. za odborné rady a pomoc, kterou mi poskytla při zpracování mé práce. Zároveň děkuji PharmDr. Janu Martinovi, Ph.D. za technickou výpomoc s kapalinovým chromatografem.

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>8</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. <i>Genista tinctoria</i> L. – Kručinka barvířská.....</b>	<b>9</b>
3.1.1. Botanický popis rostliny.....	9
3.1.2. Výskyt.....	11
3.1.3. Charakteristika, sběr a úprava drogy.....	11
3.1.4. Obsahové látky.....	11
3.1.5. Použití.....	11
<b>3.2. Flavonoidy.....</b>	<b>12</b>
3.2.1. Flavonoidy a jejich význam v rostlinách.....	12
3.2.2. Chemická struktura.....	12
3.2.3. Biosyntéza.....	14
3.2.4. Využití flavonoidů.....	16
<b>3.3. Isoflavonoidy.....</b>	<b>16</b>
3.3.1. Isoflavonoidy a jejich význam v rostlinách.....	16
3.3.2. Chemická struktura.....	17
3.3.3. Biosyntéza.....	18
3.3.4. Využití isoflavonoidů.....	18
<b>3.4. Chinolizidinové alkaloidy.....</b>	<b>19</b>
3.4.1. Chinolizidinové alkaloidy a jejich výskyt v rostlinách.....	19
3.4.2. Chemická struktura.....	20
3.4.3. Biosyntéza.....	20
3.4.4. Využití chinolizidinových alkaloidů.....	21
<b>3.5. Explantátové kultury rostlin.....</b>	<b>22</b>
3.5.1. Explantátové kultury rostlin.....	22
3.5.2. Rozdělení explantátových kultur.....	22
3.5.3. Definice základních pojmů.....	22
3.5.4. Základní vlastnosti explantátových kultur.....	23
3.5.5. Kultivace explantátových kultur <i>in vitro</i> .....	24
3.5.5.1. Fáze kultivace.....	24
3.5.5.1.1. Suspenzní kultury.....	24

3.5.5.2.	Podmínky kultivace.....	25
3.5.5.2.1.	Živná média.....	26
3.5.5.2.1.	Fyzikální podmínky kultivace.....	27
3.5.5.3.	Sterilizace.....	28
3.5.5.3.1.	Sterilizace rostlinného materiálu.....	28
3.5.5.3.2.	Sterilizace živného média.....	28
3.5.5.3.3.	Sterilizace vzduchu.....	28
3.5.5.3.4.	Sterilizace nástrojů, kultivačních baněk, popř. bioreaktorů.....	29
3.5.6.	Využití explantátových kultur.....	29
3.5.6.1.	Produkce sekundárních metabolitů.....	29
3.5.6.2.	Rozmnožování a šlechtění rostlin.....	30
<b>3.6.</b>	<b>Elicitace.....</b>	<b>31</b>
3.6.1.	Princip elicitace.....	31
3.6.2.	Elicitory.....	31
3.6.2.1.	Rozdělení elicitorů.....	31
3.6.2.2.	Mechanismus účinku elicitorů.....	31
3.6.3.	Faktory ovlivňující elicitaci.....	33
<b>3.7.</b>	<b>Ultrazvuk.....</b>	<b>34</b>
3.7.1.	Ultrazvuk a jeho účinky.....	34
3.7.2.	Ultrazvuková lázeň.....	35
3.7.3.	Elicitace ultrazvukem.....	35
<b>3.8.</b>	<b>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....</b>	<b>36</b>
3.8.1.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	36
3.8.2.	Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie.....	37
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.</b>	<b>Přístroje.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.</b>	<b>Chemikálie.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.</b>	<b>Suspenzní kultura <i>Genista tinctoria</i> L.....</b>	<b>39</b>
4.3.1.	Živné médium.....	39
4.3.2.	Kultivační nádoby a nástroje.....	40
4.3.3.	Pasážování a kultivace.....	40
4.3.4.	Abiotická elicitace ultrazvukem.....	41
<b>4.4.</b>	<b>Stanovení obsahu isoflavonoidů.....</b>	<b>42</b>
4.4.1.	Princip stanovení.....	42

4.4.2. Validace HPLC metod.....	42
4.4.2.1. Test způsobilosti chromatografického systému.....	42
4.4.2.2. Validační parametry.....	43
4.4.3. Postup stanovení.....	43
<b>4.5. Kalibrační křivky hodnocených isoflavonoidů.....</b>	<b>45</b>
4.5.1. Sestrojení kalibrační křivky.....	45
4.5.2. Kalibrační křivky sledovaných isoflavonoidů.....	46
<b>4.6. Výpočet obsahu isoflavonoidů.....</b>	<b>50</b>
<b>4.7. Statistické vyhodnocení.....</b>	<b>51</b>
4.7.1. Aritmetický průměr.....	51
4.7.2. Směrodatná odchylka.....	52
4.7.3. T-test.....	52
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1. Tabulky.....</b>	<b>54</b>
<b>5.2. Grafy.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3. Průběh HPLC analýzy.....</b>	<b>62</b>
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>63</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>67</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>68</b>
<b>9. SOUHRN.....</b>	<b>72</b>

# 1. ÚVOD

Je to již několik století, co člověk objevil léčivou schopnost některých rostlin. Nejprve používal léčivé rostliny čerstvé, sušené či jinak konzervované, později začal z rostlin využívat i izolované léčivé látky.

K izolaci účinných látek slouží léčivé rostliny získávané sběrem ve volné přírodě nebo pěstované v polních monokulturách. Toto má ale své nevýhody: např. produkce účinných látek v těchto rostlinách je závislá na klimatických (teplota, sluneční svit, srážky) a půdních podmínkách, sběr je možný pouze sezónně, některých druhů rostlin ve volné přírodě ubývá, hrozí zde výskyt škůdců a chorob a u polních monokultur následný výskyt reziduí pesticidů a jiných polutantů životního prostředí ve sklizni. (1, 2, 3)

Tyto nevýhody jsou odstraněny při chemické syntéze léčivých látek. Zde však narážíme na nevýhody ekonomické: příliš náročný či zdlouhavý technologický postup syntézy, vysoká cena takto získaných účinných látek. (2, 3)

Hledají se proto další možnosti, jak získávat přírodní léčivé látky v dostatečném množství a za přijatelných ekonomických podmínek. Jako vhodné řešení se jeví využití biotechnologických metod založených na elicitaci kultur rostlinných explantátů *in vitro*. Tyto metody mají, oproti tradičním způsobům získávání účinných látek z rostlin, hned několik výhod: syntéza metabolitů probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatických a půdních podmínkách, jsou vyloučeny negativní biologické vlivy (mikroorganismy, hmyz) a zbytky pesticidů či polutantů životního prostředí, elitací je možné zvýšit produkci sekundárních metabolitů kulturou a tím i snížit výrobní cenu produkovaných látek. (1, 3, 4, 5.) Explantátové kultury mohou produkovat i sloučeniny, které se v rostlině nevyskytují. (4, 3)

Předpokladem úspěšné elicitace je použití vhodného elicitoru a stanovení optimální délky jeho působení u dané explantátové kultury. (1) A právě tímto, ve vztahu k produkci flavonoidů a isoflavonoidů explantátovými kulturami, se zabývá výzkum na katedře farmakognosie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je studium vlivu abiotického elicitoru – ultrazvuku působícího v různých časových intervalech na produkci sekundárních metabolitů – isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L.



### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. *Genista tinctoria* – kručinka barvířská

##### Čeled' *Fabaceae* – bobovité

#### 3.1.1. Botanický popis rostliny

Kručinka barvířská je polokřovitá bylina dosahující výšky až 500 cm. Kmínek má vystoupavý nebo vzpřímený, četné větve vzpřímené, podélně žebernaté, chlupaté nebo olysalé. Listy k větévkám přisedlé, dorůstají délky 10 – 40 mm, šířky 5 – 10 mm, jsou podlouhle kopinaté až eliptické, na líci lysé, na rubu a na okrajích řídce přitiskle chlupaté, s drobnými čárkovitými palisty. Bohaté hrozny až 6 cm dlouhé, květní stopky délky 2 – 3 mm, přitiskle chlupaté se dvěma šídlovitými listenci. Kveté od května do srpna žlutými 8 – 17 mm dlouhými květy. Kalich 4 – 7 mm dlouhý, lysý, řídce kratičce chlupatý, rozeklaný ve dva málo odlišné pysky, horní i dolní s velkými zuby. Pavéza vejčitého tvaru, zašpičatělá, vzpřímená, lysá. Křídla podlouhlá, odstávající od člunku, kratší než člunek. Člunek rovný, podlouhlý, lysý. Semeník také podlouhlý, lysý. Plodem jsou lusky v obrysu úzce podlouhlé, ve švu mírně zvlňené, na vrcholu zašpičatělé, lysé, obsahující 3 – 10 semen. Semena olivově hnědavá, okrouhlá a slabě zploštělá. (6, 7)

Obr. č. 1: *Genista tinctoria*



Obr. č. 2: *Genista tinctoria*



### 3.1.2. Výskyt

Kručinka barvířská patří mezi druhy mírně teplomilné a světlomilné. Vyskytuje se především ve světlých doubravách, v lemech cest a lesů, na chudých loukách a pastvinách, ale i na skalnatých místech. Vyhovují jí půdy alkalické až kyselé, chudé na dusík, různého zrnitostního složení. (7)

### 3.1.3. Charakteristika, sběr a úprava drogy

Jako droga se používá usušená nať – *Herba genistae tinctoriae*. Droga chutná nahořkle svíravě a je bez pachu.

Kvetoucí nať se sbírá od května do srpna. Suší se ve stínu nebo při umělé teplotě nejvýše do 35 °C. (6)

### 3.1.4. Obsahové látky

Nať obsahuje flavonoidy, isoflavonoidy, chinolizidinové alkaloidy, třísloviny, kumariny, silice a slizy, dále pak hořčiny, saponiny a barviva (luteolin). (6, 10)

Semena obsahují alkaloidy (anagyrin, cytisin a kaulofylin a další). (6)

### 3.1.5. Použití

Pro obsah flavonoidů a silice má účinky diuretické, používá se proto vnitřně ve formě nálevu jako diuretikum a dezinficiens. Doporučuje se při otocích a nedostatečnosti srdeční, protože ovlivňuje cévní soustavu a výměnu látkovou. (6)

K. Csedo et al. ve svém výzkumu došli k závěru, že extrakt z *Genista tinctoria* má pozitivní efekt na *Staphylococcus aureus* a *Salmonella typhi*. (8)

Jiná skupina vědců prokázala antidiabetickou aktivitu, resp. schopnost snížit glykémii, u zástupců rodu *Genista*. (9)

Kvůli obsahu žlutých barviv (luteolinu a genisteinu) se dříve používalo větví, listů a květů kručinky barvířské k barvení lněných a vlněných látek. (7)

## 3.2. Flavonoidy

### 3.2.1. Flavonoidy a jejich význam v rostlinách

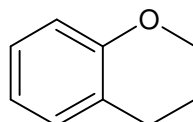
Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin. Většinou se v rostlinách vyskytují ve formě O-glykosidů nebo C-glykosidů, jejich molekula je tedy složena z necukerné části (aglykon) a cukerné složky (genin) (nejčastěji glukóza nebo rhamnóza). Méně často se pak flavonoidy nachází v rostlinách jako volné aglykony.

Uložení flavonoidů v rostlinném organismu je druhově závislé. Obecně platí, že ve vodě rozpustné glykosidy jsou nejčastěji rozpuštěné v buněčné šťávě vakuol. Mohou být ukládány pouze do buněk epidermis listů nebo současně do epidermis i mezofylu listů, přičemž oba typy tkání mohou obsahovat odlišné typy flavonoidů. Aglykony, jejichž hydroxylové skupiny jsou částečně nebo úplně methylované, jsou lipofilnější, a tím pádem lépe rozpustné ve voskové vrstvě na povrchu listů, se nejčastěji nachází v kutikule listů. V květech jsou flavonoidy uloženy v buňkách epidermis. Lze je také najít v oplodí plodů, v semenech a pylových zrnech. Methoxylované deriváty jsou lipofilní a vyskytují se v silicích. (10, 11)

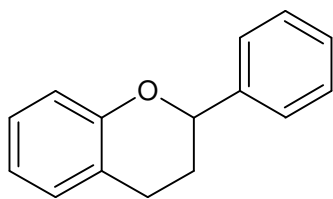
Barevné i bezbarvé flavonoidy plní pouze funkci kopigmentů (přispívají k zbarvení). Jakožto barviva způsobují zbarvení rostlin a působí tak jako atraktanty pro hmyz. (12) Flavonoidy se v rostlinách účastní oxidačně–redukčních pochodů. (10)

### 3.2.2. Chemická struktura

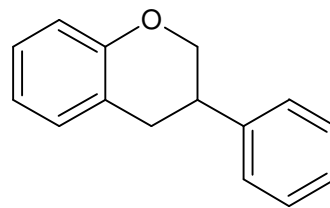
Flavonoidy jsou deriváty kyslíkaté heterocyklické sloučeniny fenylochromanu. Základem struktury je chroman. Podle polohy navázaného arylu na chromanu se rozlišují: flavany (aryl v poloze 2), isoflavany (aryl v poloze 3) a neoflavany (aryl v poloze 4). (10, 12)



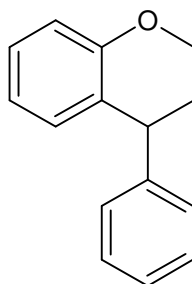
chroman



flavan

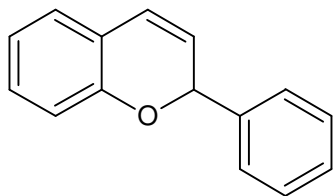


isoflavan

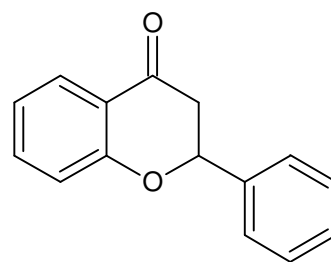


neoflavan

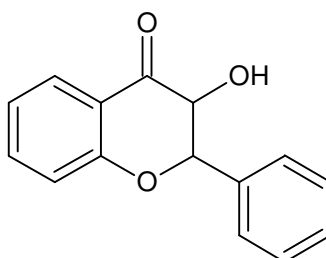
Oxidací pyranového kruhu flavanu vznikají deriváty flavanu: (10)



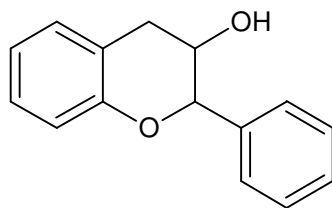
flaven



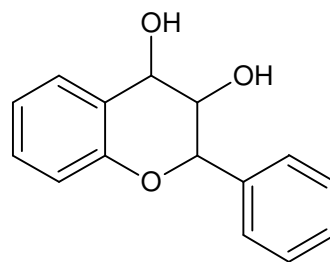
flavanon



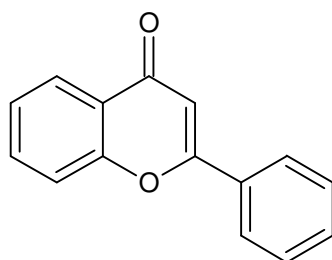
flavanonol



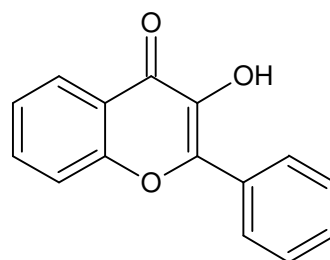
flavanol



flavandiol



flavon



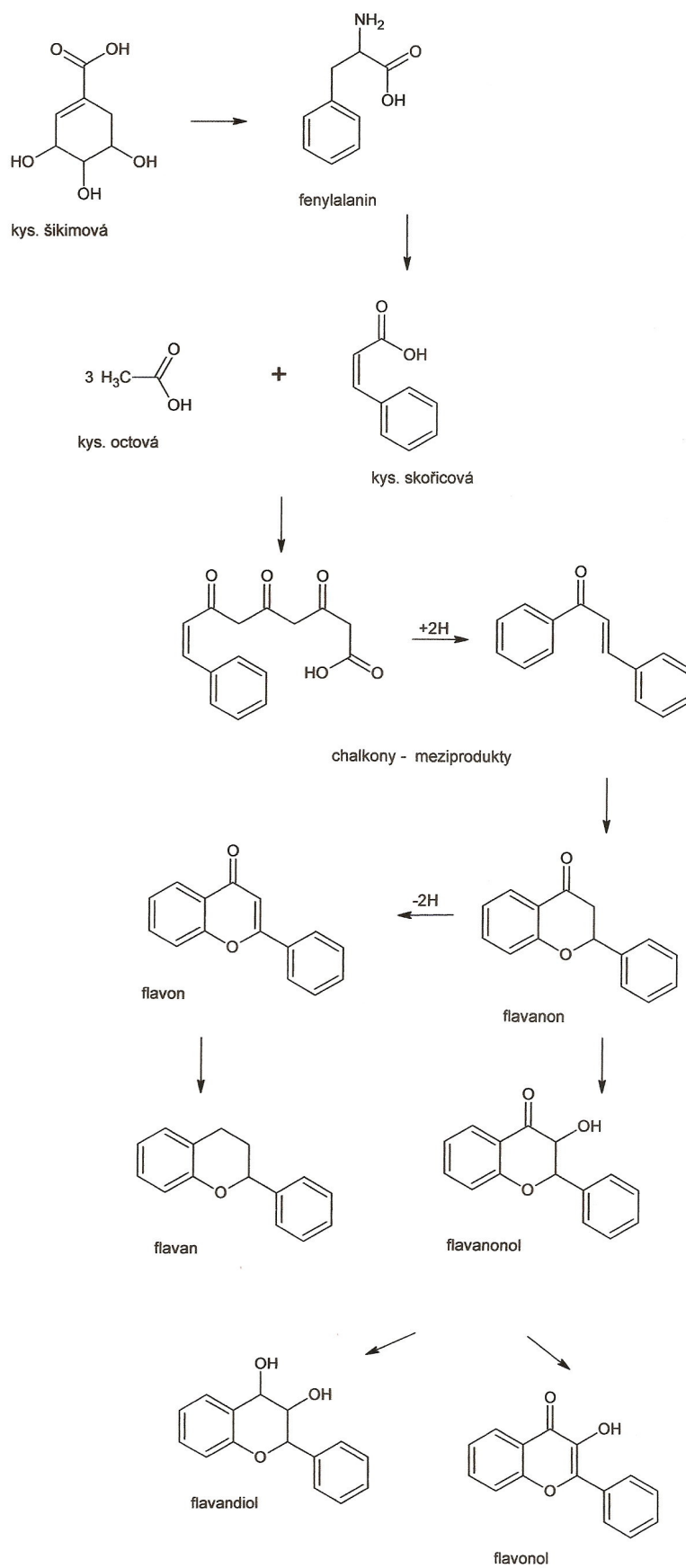
flavonol

Základní skelet může být dále substituován, nejčastěji hydroxyskupinami a methoxyskupinami. (10)

### 3.2.3. Biosyntéza

Aglykony flavonoidů vznikají oběma hlavními cestami vedoucími k syntéze aromatických látek v biologických systémech. Jeden šestiuhlíkatý fragment se odvozuje z acetátového metabolismu a zbývající devítiuhlíková část z kyseliny šikimové. Spojením kys. skořicové se třemi molekulami acetátu vzniká jako meziprodukt patnáctiuhlíkový chalkon. Z toho poté vzniká flavanon a z něj flavon, následně flavan a další deriváty flavanu. (10)

**Obr. č. 3: Biosyntéza flavonoidů (10):**



### 3.2.4. Využití flavonoidů

Flavonoidy normalizují permeabilitu kapilár a odstraňují jejich lomivost, čímž působí antihemorhagicky a antiedematosně.

Inhibicí hyaluronidasy brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi a působí tak podpůrně při léčbě infekčních nemocí.

S ionty vápníku tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle.

Některé mají též účinky diuretické a vasodilatační, působí jako antihypertenziva, cholaretika, cholagoga a spasmolytika. (10)

U flavonoidů bylo prokázáno, že snižují riziko vzniku karcinomu a působí preventivně proti nádorovému bujení. Jejich účinek spočívá v inhibici neovaskularizace a proliferace nádorových buněk ovlivněním enzymové aktivity a metabolismu DNA. (15)

Svým antioxidačním efektem mohou zlepšovat stavy, pro něž je typická vysoká produkce volných radikálů (např. zánětlivé stavy, diabetické komplikace, rakovinu, aterosklerózu, ischemickou chorobu srdeční). Potencují antioxidační účinek vitamínu C, vitamínu E, selenu. (10, 16)

U některých (např. u kvercetinu) byla prokázána antivirová aktivita, která byla ještě vyšší při současném podání acicloviru (synergický efekt acicloviru a určitých flavonoidů). (16)

Flavonoidy vykazují významnou steroidní hormonální aktivitu. (15)

## 3.3. Isoflavonoidy

### 3.3.1. Isoflavonoidy a jejich význam v rostlinách

Isoflavonoidy jsou biologicky aktivní sekundární metabolity rostlin. Vyskytují se především v rostlinách čeledi *Fabaceae* (např. *Trifolium pratense*, *Gycine max*), dále pak *Rutaceae*. (17)

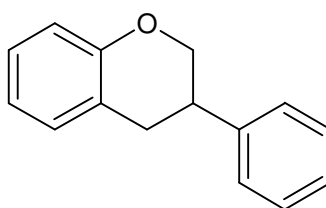
V rostlinách se nachází ve formě volné, jako aglykony, nebo vázané na cukry, jako glykosidy. (18)



Isoflavonoidy v rostlinách zastávají funkci ochrannou a obrannou. Mají účinky antibakteriální, antivirové, antiparazitární a fungistatické, posilují imunitu rostliny a působí jako antioxidanty. (15)

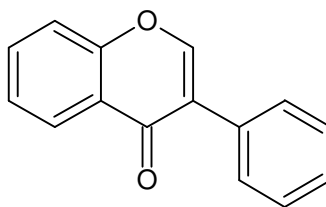
### 3.3.2. Chemická struktura

Isoflavonoidy jsou deriváty kyslíkaté heterocyklické sloučeniny fenylochromanu. Základ chemické struktury tvoří chroman s navázaným fenylem v poloze C-3 (isoflavan). (10)



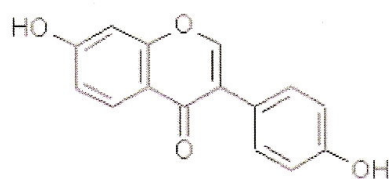
3-fenylchroman (isoflavan)

Významnou skupinou isoflavonoidů jsou isoflavony. Základní strukturu tvoří isoflavan. (12)

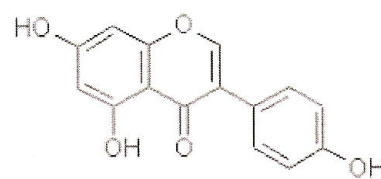


isoflavan

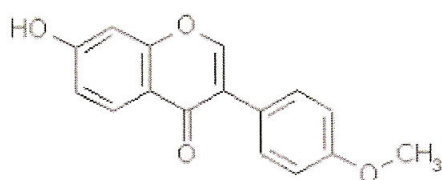
Isoflavan může být dále substituován, nejčastěji hydroxyskupinami a methoxyskupinami. Příkladem jsou v přírodě se vyskytující aglykony daidzein, genistein, formononetin a biochanin A a glykosid genistin. (12)



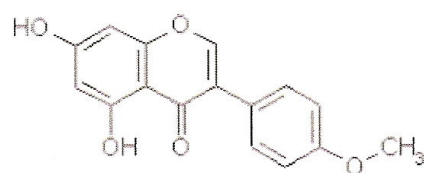
daidzein



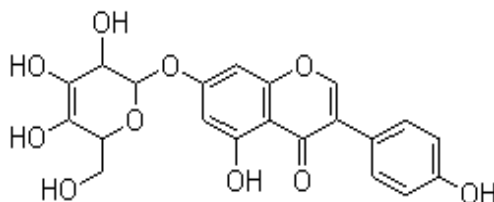
genistein



formononetin



biochanin A



genistin

Isoflavonoidy obsahují ve své molekule, podobně jako estrogény, fenolové jádro a jsou tudíž schopny se vázat na estrogenní receptor a interferovat tak s funkcí endogenních estrogenů v organismu živočichů. (13, 14) Spolu s estrogény se látky s estrogenní aktivitou chovají v živočišném organismu jako agonisté, při vysokých dávkách se mohou chovat i jako antagonisté. V případě estrogenního deficitu působí látky s estrogenní aktivitou jako slabí agonisté. (15)

### 3.3.3. Biosyntéza

Aglykony isoflavonoidů vznikají v rostlinách stejnou cestou jako aglykony flavonoidů – kondenzací polyacetátu a aromatických kyselin, které jsou syntetizovány biosyntetickou cestou kyseliny šikimové. Ze vzniklých flavanonových meziproductů jsou syntetizovány migrací arylu katalyzovanou enzymem 2-hydroxyisoflavanonsyntázou. (19)

### 3.3.4. Využití isoflavonoidů

V humánní medicíně se jeví jako perspektivní využití isoflavonoidy pro léčení komplikací spojených s klimakteriem, především postmenopauzální osteoporózy. Pomáhají od ženami subjektivně nepříjemně vnímaných návalů, pocení, nespavosti, únavy, ztráty libida. Dále isoflavony zlepšují prokrvení a nárůst tloušťky kůže, zvýšením tvorby kyseliny hyaluronové zlepšují hydrataci

pokožky, zvyšují tvorbu kolagenních i elastických vláken, mají pozitivní vliv i na růst vlasů. Mohou být tudíž vhodnou alternativou hormonální substituční terapie, která nemusí být pro všechny pacientky vhodná, resp. nutná. (14, 15)

Isoflavonoidy lze také využít ke zlepšení pozornosti, krátkodobé paměti, učení. Mají pozitivní vliv na aktivaci senzomotorických funkcí (hmat, sluch, čich, motorická aktivita). Při dlouhodobém užívání isoflavonoidů se předpokládá prevence vzniku Alzheimerovy choroby, nebo alespoň oddálení manifestace příznaků (změny nálady, anxieta, únavnost, ztráta libida). (15)

Ve stádiu výzkumu je inhibiční působení některých isoflavonoidů (genistein, biochanin A) na nádorové buňky. Pozitivní vliv na rakovinu prostaty již byl prokázán. Princip protinádorového působení isoflavonoidů spočívá v inhibici neovaskularizace v rostoucím nádoru, a tím zastavují přísun živin pro nádorové buňky. (16, 20, 21)

Isoflavony mají ochranný efekt proti UV–záření (20).

### **3.4. Chinolizidinové alkaloidy**

#### **3.4.1. Chinolizidinové alkaloidy a jejich výskyt v rostlinách**

Chinolizidinové alkaloidy se vyskytují v rostlinách čeledi *Fabaceae* (např. *Sarothamnus scoparius*, *Laburnum anagyroides*, *Genista tinctoria*). (10, 22)

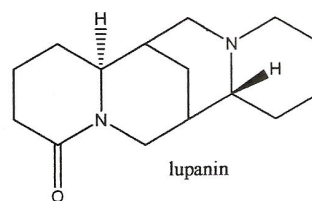
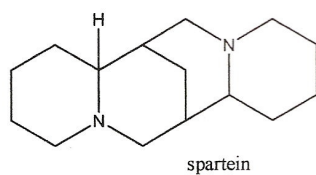
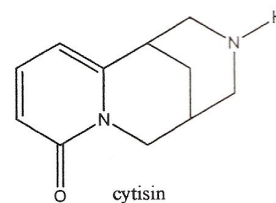
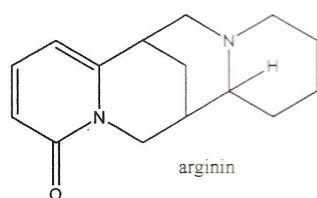
V literatuře se uvádí u drogy *Herba Genistae tinctoriae* obsah těchto chinolizidinových alkaloidů: cytisin, spartein, methylcytisin a anagyrin. (10)

Obsahem chinolizidinových alkaloidů v rostlinách rodu *Genista* a v kalusové kultuře *Genista tinctoria* se zabýval Luczkiewicz et. al.. Metodou TLC, za použití devíti standardů chinolizidinových alkaloidů (lupanin, methylcytisin, cytisin, hydroxylupanin, sophocarpin, lusitanin, retamin, spartein a L- $\alpha$ -isopartein), byly v intaktní rostlině *Genista tinctoria* prokázány cytisin, retamin, spartein a L- $\alpha$ -isopartein a v kalusové kultuře *Genista tinctoria* stanovili pouze retamin a spartein. Syntéza chinolizidinových alkaloidů při *in vitro* podmínkách byla prokazatelně potlačena. (22, 23)

Vzhledem k toxickému účinku chinolizidinových alkaloidů je potlačení jejich syntézy v kultuře *in vitro* výhodné.

### 3.4.2. Chemická struktura

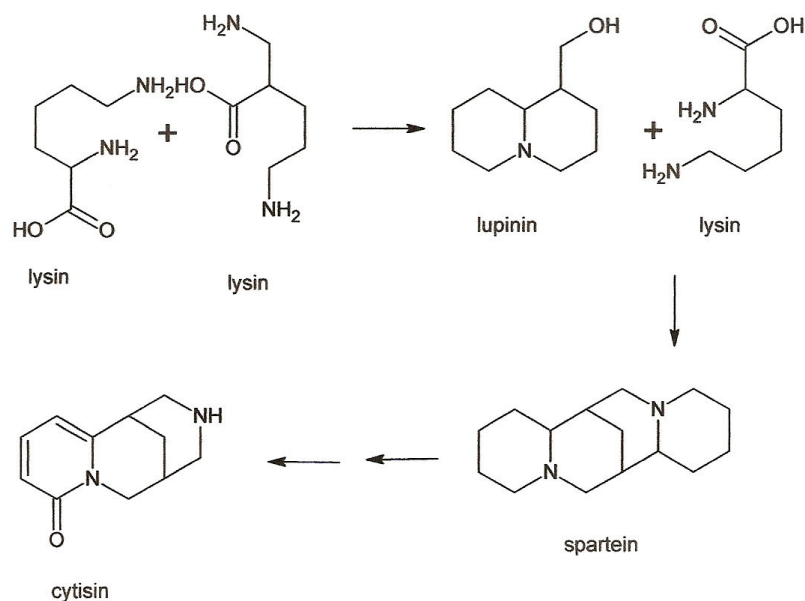
Chemická struktura některých chinolizidinových alkaloidů: (10)



### 3.4.3. Biosyntéza

Chinolizidinové alkaloidy jsou v rostlinách syntetizovány z aminokyseliny lysinu, resp. jeho metabolického ekvivalentu, kadaverinu. Lupinin vzniká ze dvou molekul lysinu, spartein ze tří molekul lysinu. Cytisin vzniká jako štěpný produkt sparteinu. (10)

**Obr. č. 4: Biosyntéza chinolizidinových alkaloidů: (10)**



### 3.4.4. Využití chinolizidinových alkaloidů

Terapeutický význam mají spartein a cytisin.

Spartein snižuje dráždivost srdce a rozšiřuje koronární cévy, používá se proto perorálně nebo intravenózně při tachykardii a srdečních arytmiích. Dále má dráždivé účinky na svalstvo střevní stěny a uteru, používá se jako uterotonikum. (10)

Cytisin působí jako agonista na neuronálních nikotinových acetylcholinových receptorech. Má emetický účinek, dále pak účinky analgetické, atihypertenzní a působí monotropně. (10, 23)

Lupanin má baktericidní účinky na *Pseudomonas syringe P.V. tomato*, *Pseudomonas Syringe P.U. „phaselolica“*, *Pseudomonas libida*, *Erurnia carotvora*.

U anagyriu se zkoumá působení na respiratory syncitial virus. (23)

## 3.5. Explantátové kultury rostlin

### 3.5.1. Explantátové kultury rostlin

Explantátové kultury rostlin (kultury rostlinných explantátů *in vitro*) znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za definovaných podmínek. (1, 24)

### 3.5.2. Rozdělení explantátových kultur

Explantátové kultury rostlin se dělí podle morfologické, resp. anatomické charakteristiky do několika skupin:

- **Kultura orgánová** – orgánové systémy, orgány nebo jejich základy či části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a v celku zachovává jejich stavbu a funkci.
- **Kultura tkáňová** – do různého stupně soudržné, morfologicky desorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně, pomnožované na polotuhých nebo pevných nosičích, nasycených živným médiem, nebo v tekuté živné půdě.
- **Kultura suspenzní** – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendované v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.
- **Kultura buněčná** – volné jednotlivé buňky pomnožované v tekuté či polotekuté živné půdě nebo na nosiči nasyceném živnou půdou.
- **Kultura protoplastů** – kultura buněk zbavených buněčných stěn; buněčný obsah je obalen jen pružnou plasmolemou.
- **Kalusová kultura** – kultura kalusu *in vitro*. (4)

### 3.5.3. Definice základních pojmů

- **Rostlinný explantát** – fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů, odebraný buď z intaktní rostliny nebo z již existující kultury s cílem pěstovat ho v podmínkách *in vitro*.

- **Kultura rostlinných explantátů** – rostlinné explantáty pěstované po určitou dobu *in vitro*.
- **Kultivace *in vitro*** – pěstování rostlinného materiálu v podmínkách definovaných po stránce chemické i fyzikální a zabraňující nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organismy a buňkami.
- **Primární explantát** – rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny.
- **Primární kultura** – kultura primárních explantátů.
- **Subkultura, pasáž** – kultura rostoucí v subkultivačním intervalu, označeném určitým subkultivačním číslem.
- **Subkultivace, pasážování** – přenos celé kultury nebo její části (inokula) do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat nebo zesílit růst kultury po další subkultivační interval.
- **Subkultivační interval** – období mezi dvěma po sobě následujícími subkultivacemi kultury.
- **Subkultivační číslo** – pořadové číslo, udávající, kolikrát byl kultura subkultivována (pasážována) od svého založení (odvození) z primárního explantátu nebo již existující kultury.
- **Kalus** – v přeneseném slova smyslu pletivo proliferující na povrchu nenádorových primárních explantátů a schopné subkultivace.
- **Rozpadavost kultur** – schopnost tkáňových a suspenzních kultur se spontánně rozpadat na buněčné shluky a volné buňky schopné dalšího růstu a pomnožování. (4)

### 3.5.4. Základní vlastnosti explantátových kultur

- Tkáňovou, suspenzní či buněčnou kulturu lze, až na několik výjimek, odvodit z buňky nebo komplexu buněk pletiva kteréhokoliv rostlinného orgánu.
- Buněčné, tkáňové i orgánové kultury jsou schopny trvale růst na i velmi jednoduchých plně syntetických půdách.
- Explantátovou kulturu lze pěstovat *in vitro* za vhodných kultivačních podmínek neomezeně dlouho.
- Tkáňová i suspenzní kultura se v průběhu růstu v podmínkách *in vitro* dediferencuje, ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter, není ale homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciaci.

- Z genetického hlediska se rozlišují kultury stabilní a nestabilní.
- Buňky tkáňových ani buněčných kultur nejsou schopny tvořit jednovrstvou kulturu, neuchycují se na tuhé ani polotuhé povrchy.
- Vhodnou kombinací růstových regulátorů a dalších složek kultivačního média lze v explantátových kulturách indukovat histogenesi nebo organogenesi. Z jediné somatické buňky lze odvodit životaschopnou rostlinu. (1, 3, 4)

### **3.5.5. Kultivace explantátových kultur *in vitro***

#### **3.5.5.1. Fáze kultivace**

Kultivaci rostlinných explantátů lze rozdělit do čtyř fází: (4)

- 1. fáze** – výběr vhodné matečné rostliny a získání primárního explantátu. Z asepticky pěstované nebo povrchově sterilizované rostliny se oddělí část vybraného orgánu a umístí se na vhodné sterilní agarové médium ke kultivaci *in vitro*. Po několika týdnech se objeví primární kalus, schopný rozmnožování na novém médiu.
- 2. fáze** – sekundární kalusová kultura. Získaný kalus je po odstranění zbytku výchozího orgánu při pasážování na vhodném médiu schopen neomezeně proliferovat.
- 3. fáze** – suspenzní kultura. Suspenzní kultura se získá enzymatickým nebo mechanickým rozvolněním kalusové kultury. Suspenzní kultura je dále udržována pomocí pravidelných pasáží.
- 4. fáze** – suspenzní kultury jsou udržovány v malých baňkách na rollerech nebo třepačkách. (1, 4, 5)

##### **3.5.5.1.1. Suspenzní kultury**

Suspenzní kultury rostlin jsou relativně homogenní populací buněk a malých buněčných shluků, které jsou kultivovány v pohyblivém tekutém živném médiu. (1)

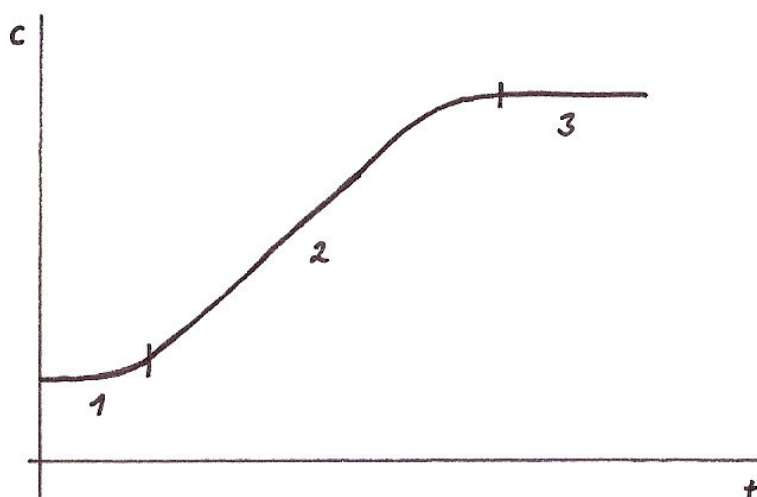
Pohyblivé tekuté živné médium umožňuje buněčné suspenzi snadný přístup živin a dobrou výměnu plynů a to způsobuje poměrně rychlý růst suspenzní kultury. (1, 3)



Jelikož kultivace probíhá v uzavřeném systému, mění se, vlivem odčerpávání živin z živného média, složení média, dále pak hustota suspenze a tudíž i podmínky kultivace.

Růst suspenzní kultury v uzavřeném systému charakterizuje **růstová křivka**. Průběh křivky je charakteristický pomalým růstem kultury těsně po naočkování (**lag fáze**), velmi intenzivním nárůstem v **exponenciální fázi** a poklesem popřípadě úplným zastavením růstu ve **stacionární fázi** (limitováno nedostatkem živin, které byly vyčerpány během exponenciální fáze). (1)

Obr. č. 5: Růstová křivka suspenzní kultury (1)



1 – lag fáze, 2 – exponenciální fáze, 3 – stacionární fáze

c – koncentrace – počet buněk v 1 ml, t – čas – počet dnů kultivace

Suspenzní kulturu lze udržet dlouho, pokud je vždy ve vhodnou dobu (na konci exponenciální fáze růstu) provedeno pasážování. (1, 3) Obvykle stačí přenést 5 – 10 % inokula do čerstvého média po 2 – 4 týdnech. (3)

### 3.5.5.2. Podmínky kultivace

Vhodné podmínky kultivace jsou nezbytně důležité pro růst explantátové kultury, lze jimi ale také ovlivnit produkci sekundárních metabolitů v dané kultuře.

### 3.5.5.2.1. Živná média

Složení živného média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v explantátových kulturách. (1)

Existuje mnoho živných médií pro kultivaci rostlinných explantátů, v základu ale všechny obsahují obvykle tyto složky: makroelementy, mikroelementy, zdroje organického uhlíku (sacharidy), zdroje organického dusíku (aminokyseliny), vitaminy, růstové regulátory, nedefinované směsi přírodních látek, destilovanou vodu. (1, 4)

- **Makroelementy** – jsou nutné pro kultivaci, jejich optimální koncentrace v živném médiu je závislá na rostlinném druhu. Patří sem: dusík, fosfor, draslík, vápník, magnesium, síra a chlór. Ionty se přidávají do živného média ve formě jejich solí. (1, 4)
- **Mikroelementy** – esenciální: železo, mangan, bor, molybden, měď a zinek; neesenciální: kobalt, sodík, jód, chlór. (1)
- **Zdroje organického uhlíku** – nejčastěji se používají sacharidy: sacharóza, popř. glukóza či fruktóza. Kultury rostlinných explantátů *in vitro* jsou schopné využívat uhlík jako základní stavební jednotku pro nově vznikající tkáň nejen ze sacharidů, ale také z alkoholů a organických kyselin. (1, 4)
- **Zdroje organického dusíku** – aminokyseliny: kasein hydrolyzát, L–glutamin, L–asparagin, glycin, adenin. Přestože jsou explantátové kultury schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, může přítomnost některých aminokyselin v živném médiu stimulovat růst explantátů. Při vyšší koncentraci však mohou samostatně dodané aminokyseliny růst naopak inhibovat.
- **Vitaminy** – především dva vitaminy skupiny B: thiamin (nezbytný pro růst explantátových kultur), pyridoxin. Také jsou důležité tzv. bios faktory: biotin, myo–inositol. Dále se přidávají: vitamin C, kyselina nikotinová, kyselina pantotenová, riboflavin. (1, 4)
- **Růstové regulátory** – lze rozdělit na tři skupiny převážně stimulačně působících regulátorů: auxiny, gibereliny a cytokininy, a na převážně inhibičně působící regulátory: abscisiny. (25) Vždy je nutná nejen jejich koncentrace, ale i jejich vzájemný poměr. (1) K auxinům patří: kyselina  $\beta$ –indolyloctová (IAA), kyselina  $\beta$ –indolylmáselná (IBA), kyselina

fenyloctová (PAA), kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D). (1, 25) Mezi cytokininy se řadí: benzylaminopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (IPA), furfurylaminopurin (kinetin), zeatin. (1) K abscisinům náleží především kyselina abscisová (ABA). (25)

- **Nedefinované směsi přírodních látek** – např. kokosové mléko, kvasničný extrakt, protein hydrolyzát, aktivní uhlí. V současné době se dává přednost definovaným kombinacím látek. (1, 4)
- **Destilovaná voda** – měla by být prostá pyrogenů, plynů, organických nečistot – vysoká kvalita. (1)

### 3.5.5.2.2. Fyzikální podmínky kultivace

Pro růst explantátové kultury i pro produkci sekundárních metabolitů kulturou jsou důležité fyzikální podmínky kultivace: teplota, světlo, vlhkost vzduchu a pH kultivačního média. (4)

- **Teplota kultivace** – je většinou zvolena empiricky v těsném rozmezí kolem 25 °C. Příliš nízká teplota inhibuje růst, zpomaluje až zastavuje metabolismus, příliš vysoká teplota způsobuje poškození buněk. (4)
- **Světlo** – je důležitá kvalita i kvantita. (1) V závislosti na délce osvětlení dochází v explantátových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů. Je proto nutné, zvolit pro kultivaci vhodnou periodu světlo/tma. (4)
- **Vlhkost vzduchu** – v kultivační místnosti by měla vlhkost vzduchu být v rozmezí 20 – 98 %, podle požadavků dané kultury.
- **pH živného média** – při zhotovení média je doporučováno dodržet koncentraci vodíkových iontů na pH 5,5 – 6,0 dále pH 6,0 – 7,0. Na příslušnou hodnotu pH lze živné médium upravit přidáním hydroxidu draselného nebo kyseliny chlorovodíkové. (1)

### **3.5.5.3. Sterilizace**

Jednou ze základních podmínek úspěšné kultivace explantátových kultur rostlin je zajištění sterility rostlinného materiálu, živného média a kultivačního prostředí. (1)

#### **3.5.5.3.1. Sterilizace rostlinného materiálu**

Kvůli riziku poškození rostlinného materiálu nelze použít vysokých teplot, používají se tudíž různé dezinfekční roztoky, které nepoškozují rostlinná pletiva, ale ničí bakterie a plísně.

Obvyklý postup získání sterilního materiálu k založení explantátové kultury zahrnuje: opláchnutí explantátu v roztoku detergentu (např. Jar), omytí vodou po dobu 10 – 30 minut, ponoření do dezinfekčního roztoku, slití dezinfekčního roztoku a opláchnutí explantátu nejméně třikrát ve sterilní destilované vodě. (1)

#### **3.5.5.3.2. Sterilizace živného média**

Lze využít několika způsobů sterilizace: párou (autoklávování), filtrací, ozářením, ultrazvukem a chemicky. (4)

Živná média, voda a další stabilní látky mohou být sterilizovány ve skleněných nádobách uzavřených uzávěrem (alobal, vata, plastová víčka). Živná média se obvykle autoklávují při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa. Délka sterilizace je závislá na objemu roztoku. Tlak by neměl přesahovat 140 kPa, aby nedocházelo k rozkladu sacharidů a dalších termolabilních složek média.

Termolabilní složky živného média (proteiny, aminokyseliny, některé vitaminy, některé cukry, gibbereliny) je nutné sterilizovat filtrací přes membránové filtry o velikosti pórů menší než 0,2 μm. (1)

#### **3.5.5.3.3. Sterilizace vzduchu**

Ke sterilizaci vzduchu v kultivační místnosti a laboratoři se používají filtry z vláknitých nebo pórovitých materiálů. (4)

#### **3.5.5.3.4. Sterilizace nástrojů, kultivačních baněk, popř. bioreaktorů**

Nástroje a baňky se sterilizují v autoklávu, bioreaktory *in situ* párou procházející pláštěm. (4)

#### **3.5.6. Využití explantátových kultur**

Explantátové kultury rostlin se využívají pro produkci sekundárních metabolitů rostlin, rozmnožování a šlechtění rostlin. (1, 5)

##### **3.5.6.1. Produkce sekundárních metabolitů**

Sekundární metabolity rostlin nacházejí uplatnění především ve farmaceutickém průmyslu, dále v potravinářském a kosmetické průmyslu či v zemědělství.

Sekundární metabolity lze získat z intaktních rostlin nebo chemickou syntézou. Tyto způsoby však nejsou vždy výhodné. Proto se jako vhodná alternativa jeví získávání sekundárních metabolitů z explantátových kultur, což má několik výhod: (1)

- syntéza sekundárních metabolitů probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatických a půdních podmínkách (1, 3, 4, 5)
- explantátová kultura může být odvozena v podstatě z kterékoli rostliny, resp. její části; kultivace probíhá kontinuálně po celý rok, tudíž i produkce sekundárních metabolitů je možná po celý rok (3, 4)
- vzhledem k tomu, že kultivace probíhá za aseptických podmínek, jsou vyloučeny negativní biologické vlivy ( napadení kultury mikroorganismy, škůdci, hmyzem)
- v explantátových kulturách lze selektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů (1, 3, 5)
- explantátové kultury mohou produkovat i sloučeniny, které se v intaktní rostlině nevyskytují – získávání nových látek v důsledku změn metabolismu explantátové kultury rostlin (3, 5)

- automatizací řízení růstu explantátové kultury a regulací metabolických procesů může klesat výrobní cena a stoupat produkce. (1)

Luczkiewicz M. et al. zkoumali produkci isoflavonoidů s estrogení aktivitou kalusovými kulturami šesti druhů rodu *Genista*. Kultury nechali růst v různých podmínkách – v různých živných médiích a za různé délky osvětlení. Největšího růstu a nejvyšší produkce isoflavonoidů dosáhly za konstantního světelného režimu na základním Schenk-Hildebrandt médiu s obsahem 2,4–dichlorophenoxyoctové kyseliny, kinetinu a sacharózy. Výsledky ukázaly, že kalusové kultury všech šesti druhů kručinek produkovaly více isoflavonoidů než intaktní rostliny. V produkované skupině isoflavonoidů převažoval genistin. (26)

### 3.5.6.2. Rozmnožování a šlechtění rostlin

Explantátové kultury rostlin mají široké využití v rozmnožování a šlechtění rostlin hned z několika důvodů: (1, 5)

- kultura se odvozuje z velmi malých částí (explantátů) a nevyžaduje příliš prostoru
- rozmnožování se provádí za sterilních podmínek, a tím se zabrání virovým a mikrobiálním nákazám
- rostliny je možno množit po celý rok, bez závislosti na ročním období
- rostliny *in vitro* mezi pasážemi nevyžadují prakticky žádnou péči (zálivku, pletí, chemické ošetření apod.)
- lze produkovat druhy nebo klony rostlin, které se tradičními metodami vegetativního množení množí pomalu nebo se vůbec nemnoží (5)
- překonání fyziologických bariér při hybridizaci taxonomicky vzdálených druhů pomocí kultivace izolovaných embryí
- regulace procesu oplození a jeho ovlivnění v podmínkách *in vitro*
- produkce haploidů při kultivaci prašníků a mikrospor
- spontánní výskyt a indukce genových a genomových mutací v buněčných a tkáňových kulturách a jejich selekce na úrovni regenerovaných rostlin
- řízená fúze protoplastů – vytvoření nových hybridů

- inkorporace cizího genetického materiálu do buněk – modifikace rostlinného genomu. (1)

## **3.6. Elicitace**

### **3.6.1. Princip elicítace**

Princip elicítace spočívá na signálem (elicitorem) indukované expresi genů, a to následně vede ke zvýšení syntézy sekundárních metabolitů v rostlinách i kulturách *in vitro*. (27)

### **3.6.2. Elicitory**

Elicitory jsou sloučeniny různého původu, které působí jako aktivátory enzymů v pletivech rostlin nebo stimulují syntézu těchto enzymů. Působí tudíž jako stresový faktor vyvolávající obrannou reakci buněk založenou na produkci sekundárních metabolitů. (1)

#### **3.6.2.1. Rozdělení elicitorů**

- **Biotické elicitory** - látky vytvořené živým organismem či za účasti živého organismu, např. kultury mikroorganismů. (1, 13)
- **Abiotické elicitory** - látky vytvořené jinak než živým organismem, tzn. nemají biologický původ (13), např. UV záření, nízká nebo naopak vysoká teplota, změny pH, soli těžkých kovů. (1)

#### **3.6.2.2. Mechanismus účinku elicitorů**

Stresové faktory (stresory) vyvolávají v rostlinách obranné reakce, které jsou závislé na aktivaci vhodných genů. Elicitory, jakožto stresový faktor, obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálů (tzv. druhých posílů – second messenger).

Rozeznáváme dva základní systémy druhých poslů: systém cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a systém fosfoinositidový. Oba tyto systémy jsou spouštěny vazbou biotického elicitoru na receptor v membráně buňky.

V systému cAMP je změna struktury receptoru pomocí guanozintrifosfát–vážícího proteinu (G-proteinu) přenesena na klíčový enzym – adenylátcyklázu, a ta přeměňuje adenosintrifosfát (ATP) na cAMP.

V systému fosfoinositidovém dochází po vazbě elicitoru na receptor ke štěpení membránového lipidu fosfatidylinositol–4,5–bisfosfátu (PIP<sub>2</sub>) fosfolipázou *c* na dvě signální molekuly: diacylglycerol (DAG) a inositol–1,4,5–trifosfát (IP<sub>3</sub>). Lipofilní molekula DAG zůstává v membráně a IP<sub>3</sub> přechází do cytoplasmy.

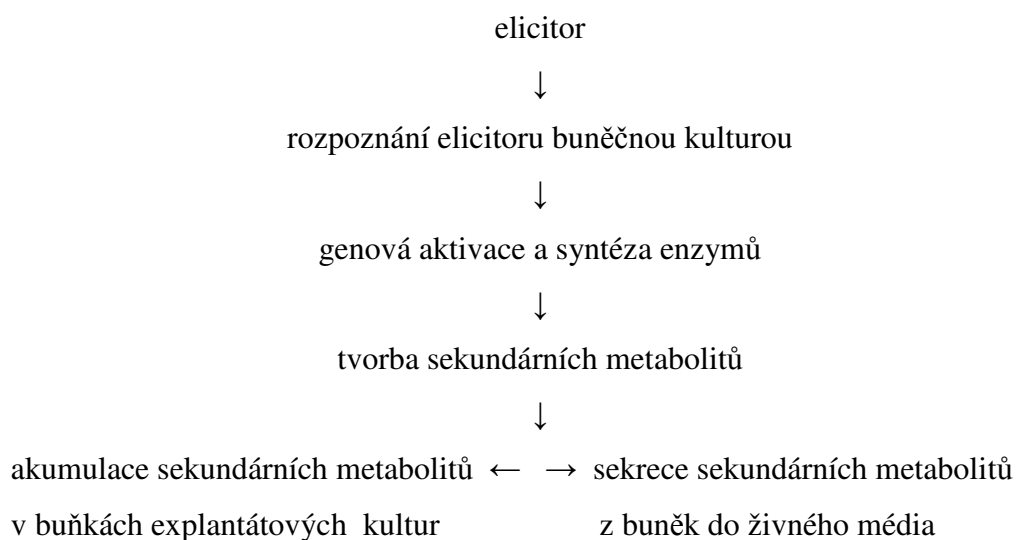
Všichni tři druží poslové působí nakonec změnu fosforylace proteinů. cAMP a DAG přímo, aktivací proteinkináz, na kterou navazuje exprese genů. IP<sub>3</sub> nepřímo, po vazbě na receptor v endoplazmatickém retikulu a uvolnění iontů vápníku. Ionty vápníku jsou dalším nosičem signálu. Váží se na specifickou bílkovinu kalmodulin, a tím vzniká aktivní komplex schopný aktivovat proteinkinázy a poté i expresi genů.

Velmi častým a rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku. Zvýšené množství peroxidu vodíku je možné zjistit po 5 až 10 minutách působení elicitoru. Kromě možného přímého účinku, mohou reaktivní kyslíkové deriváty ovlivňovat expresi genů i nepřímo, kdy nejprve peroxidací lipidů v membránách buněk vyvolají zvýšení produkce stresových fytohormonů (např. kyseliny jasmínové), a ty pak teprve ovlivňují transkripci genů.

Abiotické elicitory se neváží na specifický receptor v membránách buněk, působí jiným mechanismem: vyvolávají peroxidaci lipidů membrány, čímž dochází ke zvýšení propustnosti membrány pro vápenaté ionty, které vnikají dovnitř buňky a zprostředkují expresi genů. (27)



### Schéma interakce elicitoru s buňkami explantátové kultury (28)



#### 3.6.3. Faktory ovlivňující elicitaci

Hlavními faktory ovlivňujícími vliv elicitoru na explantátovou kulturu, a tím potažmo produkci sekundárních metabolitů kulturou, jsou:

- **specifita elicitoru** – stejný elicitor může stimulovat sekundární metabolismus různých explantátových kultur
- **koncentrace elicitoru** – ovlivňuje intenzitu odpovědi; optimální koncentrace elicitoru se zjišťuje empiricky
- **doba působení elicitoru** – ovlivňuje aktivitu metabolických enzymů kultury; optimální doba působení elicitoru se zjišťuje empiricky
- **načasování působení elicitoru** – jako nejvhodnější doba k aplikaci elicitoru se jeví exponenciální fáze růstu, kdy je většina enzymatických pochodů dostatečně aktivní, aby odpověděla na působení elicitoru
- **podmínky pěstování kultury** – složení živného média, osvětlení, teplota
- **stáří kultury**. (29)

## 3.7. Ultrazvuk

### 3.5.1. Ultrazvuk a jeho účinky

Ultrazvuk je akustické vlnění s frekvencí nad 20 kHz, tedy nad hranicí slyšitelnosti lidského ucha. (13, 30)

Ultrazvuk se šíří prostředím stejnou rychlostí ( $330 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) jako zvuk slyšitelných frekvencí (16 – 20 000 Hz), ale ultrazvukové vlny mají kratší vlnovou délku. Ultrazvuk se šíří prostředím přímočaře, při setkání s překážkou se odrazí, v kapalinách a pevných látkách dochází jen k malé absorpci ultrazvukových vln. (30)

#### Účinky ultrazvuku:

- **tepelné účinky** – při absorpci energie ultrazvukové vlny dochází k jejímu předávání molekulám prostředí, a tím k zvětšení kinetické energie molekul prostředí, což se projeví zvýšenou teplotou; tepelné účinky ultrazvuku jsou tedy přímo úměrné jeho frekvenci;
- **mechanické účinky** – průchod ultrazvukové vlny prostředím způsobuje rychlé lokální tlakové změny, které mají výrazné mechanické účinky na molekulové i buněčné úrovni a mohou vést až k poškození tkání;
- **fyzikálně-chemické účinky** – účinky disperzní, koagulační, schopnost štěpení vysokomolekulárních látek, vznik volných radikálů, urychlení polymerizace;
- **biologické účinky** – jsou závislé na velikosti energie pohlcené biologickým systémem, resp. na intenzitě ultrazvuku; nízká intenzita ultrazvuku má spíše biopozitivní účinek (např. zvýšení látkové výměny, zrychlení fyzikálně-chemických reakcí), ultrazvuk o intenzitě  $1,5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$  má slabě toxické účinky (zvýšení permeability buněčných membrán) a intenzita ultrazvuku nad  $3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$  způsobuje ireverzibilní morfologické změny v biologickém systému (např. porušení buněčných membrán, rozbití buněčného jádra, změny ve složení protoplazmy, rozpad červených krvinek). (30)

### 3.7.2. Ultrazvuková lázeň

Princip ultrazvukové lázně spočívá v šíření ultrazvukových vln kapalinou.

Jako **zdroj ultrazvuku v kapalinách** se používá několik typů generátorů:

- **generátory ejektorové** – založené na mechanickém principu: Do kapaliny proudící velkou rychlostí je umístěna kovová destička s břity na obou stranách. Kapalina obtéká destičku nadkritickou rychlostí a vzniklé turbulence destičku rozkmitávají. Frekvence ultrazvuku je tedy dána rezonanční frekvencí destičky. Takto lze získat ultrazvuk o frekvenci až 50 kHz.
- **generátory magnetostrikční** – založené na magnetostrikčním jevu: Změna rozměrů ferromagnetických látek (např. nikl, slitina niklu s kobaltem a železem) vyvolaná magnetizací. Lze získat ultrazvuk o frekvenci až 100 kHz.
- **generátory piezoelektrické** – založené na piezoelektrickém jevu: Deformace vhodné látky (např. destička z křemenného krystalu, titaničitanu barnatého) v závislosti na elektrickém poli. Na piezoelektrickou destičku se přivádí napětí z vysokofrekvenčních oscilátorů o frekvenci odpovídající vlastním kmitům destičky a destička se rozkmitá. Frekvence ultrazvuku je zde dána frekvencí přiváděného napětí a může dosáhnout až  $10^6$  kHz. (30)

### 3.7.1. Elicitace ultrazvukem

Využití ultrazvuku jakožto abiotického elicitoru se jeví jako výhodné pro růst a produkci sekundárních metabolitů.

Poukazuje na to studie Wang B. C. et al., ve které autoři došli k závěru, že ultrazvukové vlny mění produkci endogenních hormonů kalusu *Chrysanthemy*, což má vliv na růst této kalusové kultury. (31)

Použití ultrazvuku vhodné intenzity jakožto elicitoru, může vést k ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v rostlinách a explantátových kulturách rostlin, jak bylo prokázáno např. u *Panax Ginseng* a *Lithospermum erythrorhizon*. (32, 33, 34, 35)

Vystavení suspenzní kultury *Panax ginseng* ultrazvuku (hustota výkonu  $61,4 \text{ mW/cm}^3$ , fixní frekvence 38,5 kHz, doba působení ultrazvuku 2 min) vedlo k statisticky významnému zvýšení produkce saponinů sledovanou kulturou oproti kontrole. (32, 33)

V jiné studii bylo u suspenzní kultury *Panax ginseng* vystavené ultrazvuku (hustota výkonu  $82 \text{ mW/cm}^3$ , fixní frekvence 38,5 kHz, doba působení ultrazvuku 4 minuty) zaznamenáno zvýšení biosyntézy sekundárních metabolitů a navýšení celkového obsahu saponinů o 75 %. (32, 34)

Další studie sledovala vliv ultrazvuku (hustota výkonu menší nebo rovna  $113,9 \text{ kW/cm}^3$ ) na produkci sekundárních metabolitů v buňkách suspenzní kultury *Lithospermum erythrorhizon*. Bylo zjištěno, že expozice ultrazvuku vedla k vyšší aktivitě enzymů účastnících se biosyntézy sekundárních metabolitů, konkrétně shikoninu. Obsah produkovaného shikoninu se tak zvýšil o 60 – 70 %. Množství shikoninu vylučovaného z buněk kultury se zvýšilo z 20 % na 65 – 70 % hlavně v důsledku zvýšení propustnosti buněčné membrány. (32, 35)

Vystavení rostlinných kultur *in vitro* ultrazvuku vede k aktivaci obranných mechanismů rostlinných buněk, tj. rostlinné buňky reagují stejně, jako při napadení patogeny nebo vystavení jiným elicitorům. Dochází k přechodnému zvýšení toku  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk, výměnou  $\text{K}^+_{\text{ven}}/\text{H}^+_{\text{dovnitř}}$  v buněčné membráně a přechodné produkci reaktivních kyslíkových radikálů. (32, 33)

Jak vyplývá z účinků ultrazvuku, je jeho efekt na produkci sekundárních metabolitů explantátovou kulturou kromě podmínek elicitace ovlivněn i délkou působení ultrazvuku a jeho intenzitou. Využití ultrazvuku jako elicitoru má několik výhod: obranné mechanismy rostlinných buněk jsou aktivovány velmi rychle a reakci lze detekovat pouhé sekundy po expozici ultrazvukem. (32, 36)

## **3.8. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

### **3.8.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je separační metoda umožňující kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi.

Je to rychlá a citlivá metoda, která umožňuje analyzovat prakticky vše od anorganických iontů až po polymerní sloučeniny, termolabilní a netěkavé sloučeniny. Nezanedbatelnou výhodou je, že pro analýzu stačí minimální množství vzorku a další výhodou je možnost automatizace u moderních HPLC chromatografů. (37, 38)

Princip HPLC spočívá v dělení látek mezi stacionární fází, naplněnou v koloně, a mobilní fází, procházející kolonou za vysokého tlaku. (37)

### **3.8.2. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie**

HPLC je nyní již široce využívanou separační metodou. Používá se k analýze steroidů, cukrů, vitaminů, pesticidů, barviv, léčiv a jejich metabolitů. (37, 38)

Jak prokázala studie Tero-Vascana A. et al., lze HPLC s gradientovou elucí s úspěchem využít ke stanovení obsahu flavonoidů a isoflavonoidů v *Genista tinctoria*. (39)

Stejně tak autoři Wu Q. L., Wang M. F. a Simon J. E ve své studii došli k závěru, že HPLC lze využít k detekci fytoestrogenů v rostlinách, rostlinných produktech a biologickém materiálu. (40)

V další studii Luczkiewicz et al. zjistil, že ke stanovení a separaci komplexu isoflavonoidů a flavonů (volných aglykonů, monoglykosidů, diglykosidů a esterů) *in vitro* v kultuře *Genista tinctoria*, lze použít HPLC s DAD UV a MS detektory. (23, 41)

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Přístroje

- autokláv PS 20 A, Chirana, Česká republika
- box s laminárním prouděním Fatran, Výrobné družstvo Pokrok, Slovenská republika
- horkovzdušný sterilizátor SVS 9/1, Chirana, Česká republika
- laboratorní analytické váhy A 200 S, Sartorius, Německo
- laboratorní třepačka UNIMAX 2010, HEIDOLPH INSTRUMENTS, Německo
- mikrofiltry CORNING NY 14831 (velikost pórů 0,20  $\mu\text{m}$ ), Německo
- ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100H, Bandelin, Německo
- vodní lázeň typ 1042, Gesellschaft für Labortechnik, Německo

#### **Kapalinový chromatograf:**

- autosampler Jasco AS-2055 Plus, Japonsko
- diodový detektor Jasco MD-2015 a fluorescenční detektor MD-2020, Japonsko
- kolona LiChroCART 250x4 mm, sorbent LiChrospher 5  $\mu\text{m}$
- předkolona LiChroCART 4x4 mm, sorbent LiChrospher 5  $\mu\text{m}$
- čerpadlo Jasco PU-2089 Plus, Japonsko
- termostat kolony Jetstream 2 Plus, Japonsko
- vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc, Česká republika
- těsnění na vialky, LABICOM s.r.o. Olomouc, Česká republika

### 4.2. Chemikálie

- Ajatin, Profarma-Produkt s.r.o., Česká republika
- destilovaná voda, Katedra analytické chemie, Faf UK HK, Česká republika
- Kyselina o-fosforečná, Lachema, Česká republika

- Methanol HPLC grade, Merk, Německo
- Methylalkohol p.a., Penta, Česká republika
- 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 Faf UK HK, Česká republika

### 4.3. Suspenzní kultura *Genista tinctoria* L.

K experimentům v této práci byla použita suspenzní kultura *Genista tinctoria* L., odvozená mechanickým rozvolněním z rozpadavé kalusové kultury *Genista tinctoria* L., která byla získána ze sterilní kořenové části klíčící rostliny kručinky barvířské.

K pokusům byla použita 29. – 34. pasáž, kultury staré 136 týdnů.

#### 4.3.1. Živné médium

Pro kultivaci suspenzní kultury *Genista tinctoria* L. bylo použito živné Schenk–Hildebrandtovo médium následujícího složení: (42)

CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,10	mg.l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,20	mg.l <sup>-1</sup>
FeNaEDTA	19,80	mg.l <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,00	mg.l <sup>-1</sup>
KI	1,00	mg.l <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10,00	mg.l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,10	mg.l <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,00	mg.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	151,00	mg.l <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	2500,00	mg.l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	195,05	mg.l <sup>-1</sup>

(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	300,00	mg.l <sup>-1</sup>
kys. nikotinová	5,00	mg.l <sup>-1</sup>
pyridoxin hydrochlorid	0,50	mg.l <sup>-1</sup>
thiamin hydrochlorid	5,00	mg.l <sup>-1</sup>
Myo-inositol	1000,00	mg.l <sup>-1</sup>
sacharóza	30 000,00	mg.l <sup>-1</sup>

Jednotlivé složky živného média byly naváženy na analytických vahách a v odměrné baňce na 1 000 ml rozpuštěny v destilované vodě a doplněny destilovanou vodou po značku.

K živnému médiu byly přidány dva růstové regulátory: kys. 2,4–dichlorfenoxyoctová (0,5 mg/l) a kinetin (0,1 mg/l).

### 4.3.2. Kultivační nádoby a nástroje

Pro kultivaci kalusové a suspenzní kultury byly použity 100 ml Erlenmayerovy baňky z varného skla SIAL, odolného vůči výkyvům teplot i vůči působení chemikálií.

Do Erlenmayerových baněk pro kultivaci kalusové kultury byly vloženy můstky z filtračního papíru a nalito 30 ml připraveného živného média. Do Erlenmayerových baněk pro kultivaci suspenzní kultury bylo nalito 30 ml připraveného živného média. Následně byla hrdla baněk překryta hliníkovou fólií a sterilizována v autoklávu 20 min při 121 °C a 100 kPa.

Pinzety používané při pasážování byly po umytí opláchnuty 96 % ethanolem, zabaleny do hliníkové fólie a sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru 2 hod při 200 °C.

### 4.3.3. Pasážování a kultivace

Kultivační baňky a hliníkové fólie, použité k překrytí hrdla baněk, byly před manipulací sterilizovány Ajatinem.

Pasážování a odvození kultur bylo prováděno v boxu s laminárním prouděním vydezinfikovaném roztokem Ajatinu (1 : 10) a vyzářeném germicidní zářivkou po dobu minimálně 1 hod. Při práci byly zachovány aseptické podmínky.



Pasážování se provádělo 4. týden kultivace přenesením inokula na můstek z filtračního papíru umístěný v Erlenmayerově baňce s živným médiem s cílem zachování růstu kalusové kultury. Baňky s kalusovou kulturou byly opět překryty hliníkovou fólií a dány do kultivační místnosti. Kultivace probíhala za normálního světelného režimu (16 hod světlo/8 hod tma) při teplotě 25 °C. Zároveň byla každý 3. týden z mechanicky rozdrobněného kalusu přeneseného do Erlenmayerovy baňky s živným médiem vytvořena suspenzní kultura. Baňky se suspenzní kulturou byly také překryty hliníkovou fólií a umístěny na laboratorní třepačku (150 ot./min) v kultivační místnosti. Kultivace probíhala za stejných podmínek jako u kalusové kultury.

#### **4.3.4. Abiotická elicitace ultrazvukem**

K elicitaci suspenzní kultury *Genista tinctoria* L. byl jako elicitor použit ultrazvuk. Elicitace se prováděla v ultrazvukové lázni.

Jednotlivé experimentální vzorky suspenzní kultury *Genista tinctoria* L. byly vystaveny působení ultrazvuku (o hustotě výkonu 0,1 W/cm<sup>3</sup>, stálá frekvence 35 kHz) po dobu 1, 2, 3, 4 a 5 minut a následně některé ihned odebrány, jiné dále kultivovány na laboratorní třepačce (150 ot./min) v kultivační místnosti za normálního světelného režimu (16 hod světlo/8 hod tma) při teplotě 25 °C po dobu 1 týdne.

Experimentální vzorky suspenzní kultury byly odebírány ihned a dále pak po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách po expozici ultrazvukem. Odebrané vzorky byly přefiltrovány přes filtrační papír a zachycené buněčné shluky se sušily při pokojové teplotě.

Kontrolní vzorky, tj. vzorky nevystavené působení elicitoru ultrazvuku, byly odebírány ihned a dále po 12 hodinách a 48 hodinách. Odebrané kontrolní vzorky byly také přefiltrovány přes filtrační papír a zachycené buněčné shluky se sušily při pokojové teplotě (za stejných podmínek jako experimentální vzorky).

V rámci každého časového intervalu včetně kontrol, bylo k odběru použito vždy po 5 baňkách.

## **4.4. Stanovení obsahu isoflavonoidů**

### **4.4.1. Princip stanovení**

Stanovení obsahu isoflavonoidů (genistinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

### **4.4.2. Validace HPLC metod**

Validace analytické metody je proces, který experimentálně ověřuje vhodnost, přesnost a spolehlivost metody a kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. (32, 44)

#### **4.4.2.1. Test způsobilosti chromatografického systému**

Nedílnou součástí HPLC metody je test způsobilosti chromatografického systému, který slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. (32, 43)

Pro hodnocení účinnosti kolony byly použity tyto parametry: (32, 43)

- faktor symetrie píku
- účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater
- rozlišení

V testu způsobilosti chromatografického systému byly sledovány i další faktory ovlivňující chromatografické chování: (32, 43)

- složení mobilní fáze
- pH mobilní fáze
- průtoková rychlost
- délka kolony
- teplota
- tlak

- charakteristika stacionární fáze (porozita, velikost, typ částic, specifický povrch)

#### 4.4.2.2. Validační parametry

- **přesnost** – míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem ve stejné laboratoři. Přesnost se vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka a stanoví se minimálně z šesti nezávislých analýz. (32, 44)
- **správnost** – odchylka výsledku metody od správné hodnoty. (32, 44) Zjišťuje se analýzou nejméně šesti vzorků o stejné koncentraci stanovované látky a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost  $v$ : (32)

$$v = (100 \cdot \text{nalezená hodnota}) / \text{správná hodnota}.$$

- **detekční limit**
- **kvantitativní limit** – je určen pomocí analýzy vzorků se známou koncentrací analytu a určením minimální hladiny, při které je analyt kvantifikován s přijatelnou přesností a správností (32)
- **linearita** – schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Kalibrační křivka se sestojí z minimálně pěti různých koncentrací standardní látky (každá koncentrace v tripletu) a provede se lineární regresní analýza. (32, 44)

#### 4.4.3. Postup stanovení

Usušené experimentální a kontrolní vzorky byly každý zvlášť upráškovány v třecí misce a zváženy.

Dále pak byly použity k přípravě výluhu pro stanovení obsahu isoflavonoidů:

Více než 0,100 g upráškováného vzorku bylo extrahováno 10 ml 80 % methanolu na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 20 minut. Po ochlazení se výluh zfiltraval přes chomáček vaty do odměrné baňky na 25 ml. Celý postup se s použitou vatou se vzorkem zopakoval ještě jednou. Získané výluhy se spojily byly doplněny 80 % methanolem na 25 ml.

Asi 2 ml výluhu byly přefiltrovány přes mikrofiltr (velikost pórů 0,20  $\mu\text{m}$ ) do označených vialek a dále analyzovány na kapalinovém chromatografu Jasco AS-2055 Plus.

### **Parametry HPLC analýzy:**

Kapalinový chromatograf: autosampler Jasco AS-2055 Plus

čerpadlo Jasco PU-2089 Plus

detektory MD-2015 a MD-2020

kolona LiChroCART 250x4 mm se sorbentem

LiChrospher 5  $\mu\text{m}$

předkolona LiChroCART 4x4 mm se sorbetem

LiChrospher 5  $\mu\text{m}$

Objem nástřiku: 20  $\mu\text{l}$

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

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

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

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

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

Průtok: 1,1 ml/min

Detekce: diodový detektor Jasco MD-2015,  $\lambda = 200 - 650 \text{ nm}$ , vyhodnoceno při

260 – 266 nm

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

## 4.5. Kalibrační křivky

### 4.5.1. Sestrojení kalibrační křivky

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

genistin: 2,0 mg/100 ml

4,0 mg/100 ml

8,0 mg/100 ml

daidzein: 2,0 mg/100 ml

5,2 mg/100 ml

9,6 mg/100 ml

genistein: 2,4 mg/100 ml

4,8 mg/100 ml

9,6 mg/100 ml

formononetin: 2,6 mg/100 ml

5,2 mg/100 ml

10,4 mg/100 ml

biochanin A: 2,0 mg/100 ml

4,0 mg/100 ml

8,0 mg/100 ml

Kalibrační křivky byly sestaveny podle rovnice:

$$y = bx + a$$

y – plocha

x – koncentrace v mg/ml

a = 0

b – pro jednotlivé isoflavonoidy různá hodnota

## 4.5.2. Kalibrační křivky sledovaných isoflavonoidů

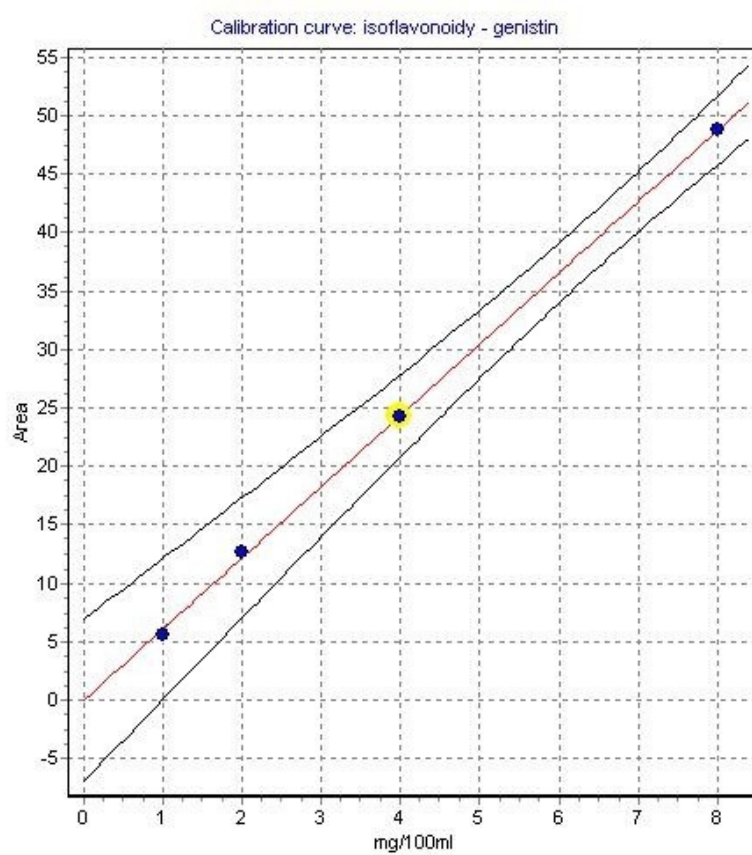
Z následujících hodnot pak byly sestrojeny kalibrační křivky:

Obr. č. 6: Kalibrační křivka genistinu

regresivní koeficient: 0,9998

$a = 0$

$b = 6,08940$

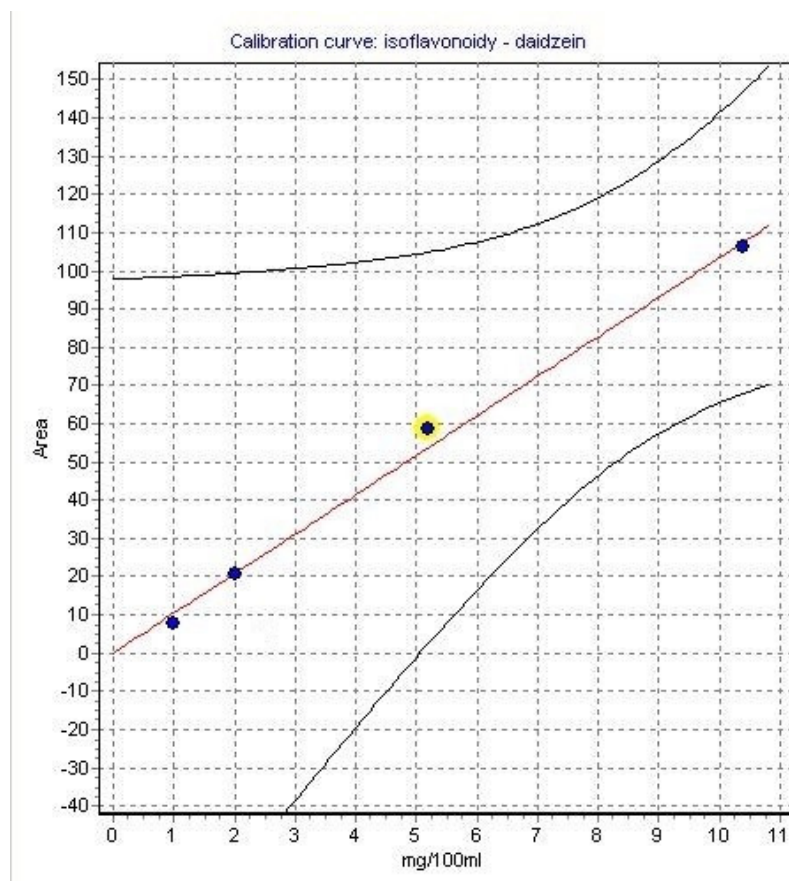


**Obr. č. 7: Kalibrační křivka daidzeinu**

regresivní koeficient: 0,9938

$a = 0$

$b = 10,34026$

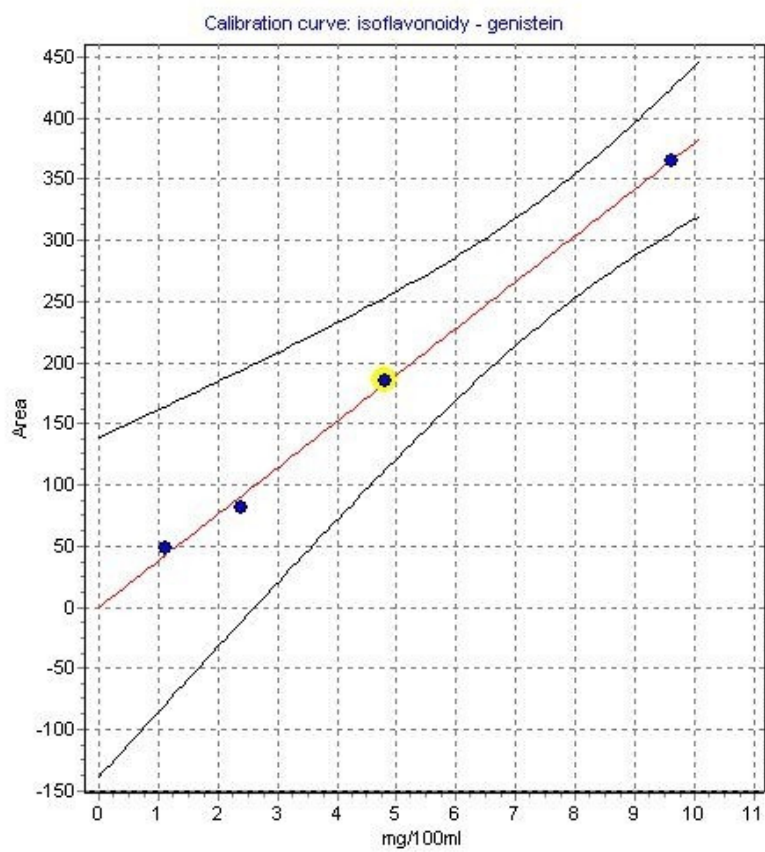


**Obr. č. 8: Kalibrační křivka genisteinu**

regresivní koeficient: 0,9997

$a = 0$

$b = 42,98035$



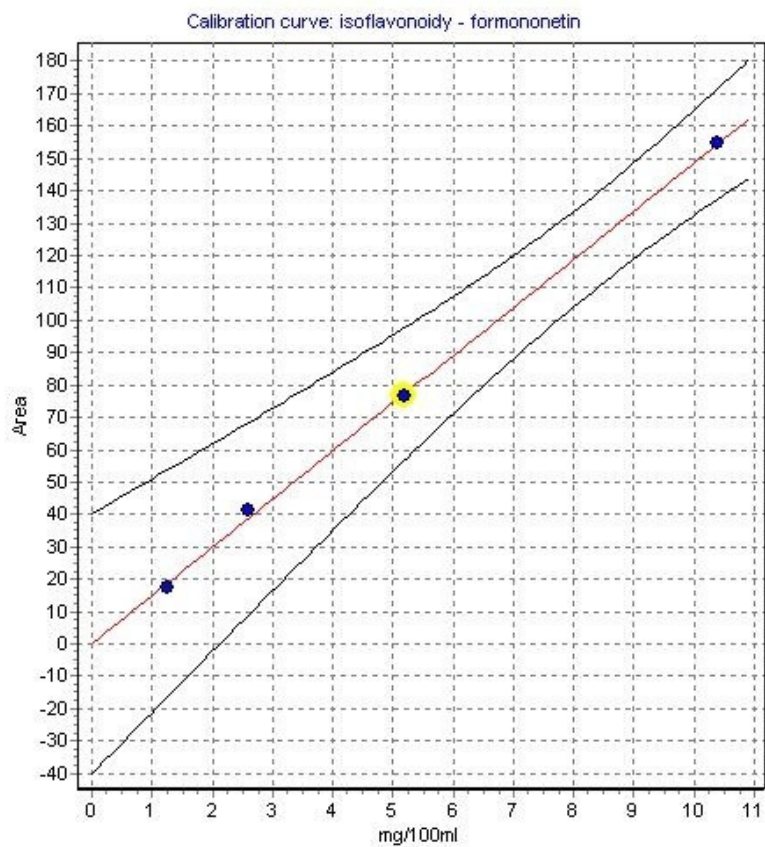


**Obr. č. 9: Kalibrační křivka formononetinu**

regresivní koeficient: 0,9994

a = 0

b = 14,86045

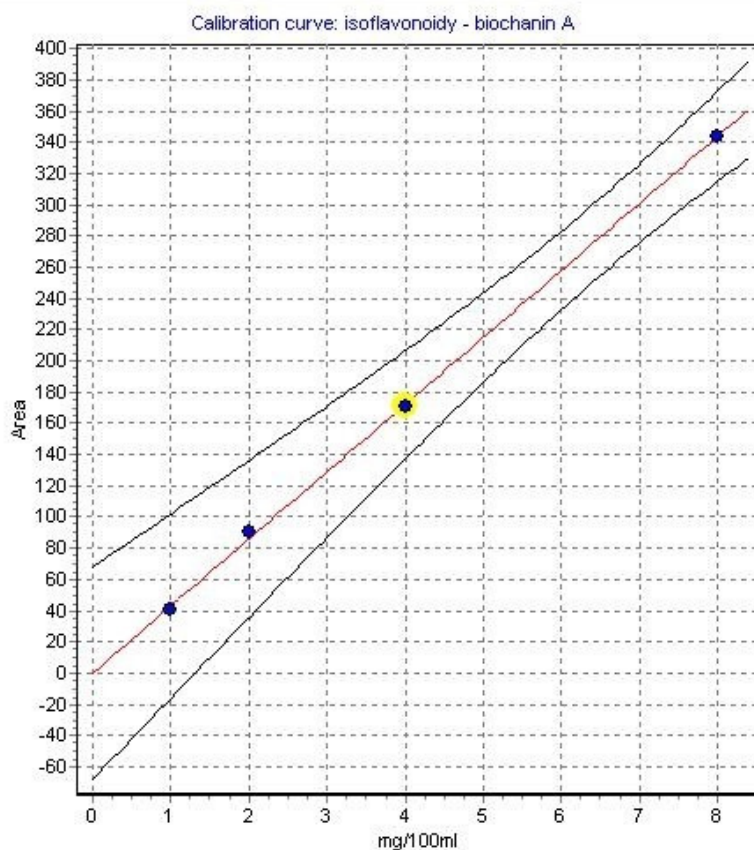


### Obr. č. 10: Kalibrační křivka biochaninu A

regresivní koeficient: 0,9997

a = 0

b = 42,98035



## 4.6. Výpočet obsahu isoflavonoidů

Výpočet obsahu jednotlivých isoflavonoidů provádí software propojený s HPLC. Ten změřil obsah plochy pod křivkou (resp. obsah plochy píku) a vyhodnotil ho podle kalibrační křivky (resp. podle předem naměřených obsahů ploch u standardů).

Vzorec pro výpočet obsahu isoflavonoidu ve vzorku:

$$C = (AUC / AUC_{st}) \cdot C_{st}$$

C – koncentrace zkoumaného vzorku v mg/100ml

C<sub>st</sub> – koncentrace standardu

AUC – plocha píku u zkoumaného vzorku

AUC<sub>st</sub> – plocha píku u standardu

Při výpočtech byla započítána navážka a ředění, získaný výsledek je uveden v procentech.

## 4.7. Statistické vyhodnocení

Získané výsledky obsahu isoflavonoidů ve sledované kultuře *Genista tinctoria* L. byly statisticky vyhodnoceny za použití T-testu, pro zvolenou hladinu významnosti  $p = 0,05$ . (46)

### 4.7.1. Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je popisná typická hodnota statistického souboru, který má tzv. normální (Gaussovo) rozdělení. (13)

Vypočítá se podle vzorce: (46)

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

$\bar{x}$  – aritmetický průměr

$n$  – rozsah souboru

$x_i$  – naměřené hodnoty

### 4.7.2. Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je statistická charakteristika pro měření rozptýlenosti jednotlivých hodnot statistického znaku kolem průměru. (13)

Vypočítá se podle vzorce: (46)

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

$s$  – směrodatná odchylka

$n$  – rozsah souboru

$x_i$  – naměřené hodnoty

$\bar{x}$  – aritmetický průměr

### 4.6.3. T-test

T-test je test významnosti rozdílu dvou průměrů a vypočítá se podle vzorce: (46)

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

$t$  – testovací kritérium

$\bar{x}_1$  – aritmetický průměr kontrolního souboru

$\bar{x}_2$  – aritmetický průměr pokusného souboru

$n_1$  – počet členů kontrolního souboru

$n_2$  – počet členů pokusného souboru

$s_1$  – směrodatná odchylka kontrolního souboru

$s_2$  – směrodatná odchylka pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší  $t$  rozdělení se stupněm volnosti ( $v$ ), vypočítáno dle vzorce:  $v = n_1 + n_2 - 2$

Vypočtená hodnota testovacího kritéria ( $t$ ) se porovná s příslušnou kritickou hodnotou  $t(v)_p$  pro vypočtený stupeň volnosti ( $v$ ) a zvolenou hladinu významnosti ( $p$ ). Je-li hodnota  $t$  větší než hodnota  $t(v)_p$ , je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti ( $p$ ).

Pro tři paralelní stanovení obsahu platí, že počet členů souboru kontrolního a pokusného souboru je shodný  $n_1 = n_2 = 3$  a počet stupňů volnosti  $v = 4$ . Kritická hodnota  $t(v)_p$  pro  $p(0,05) = 2,78$ . (46)

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Tabulky

Tabulka č. 1: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L. elicitované ultrazvukem po dobu 1 minuty

doba kultivace suspenzní kultury po expozici ultrazvuku (hod)	obsah isoflavonoidů (%)					směrodatná odchylka					T-test				
	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin
ihned	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0,01	0	<b>0,08</b>	0	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004
12	0	0	0	<b>0,08</b>	0	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004
24	0	0	0	<b>0,05</b>	0	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004
48	0	0	0	0,04	0	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004
72	0	0	0	0,03	0	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004
168	0	0	0	0,02	0	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004	0	0,004

**Tabulka č. 2: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L. elicítované ultrazvukem po dobu 2 minut**

doba kultivace suspenzní kultury po expozici ultrazvuku (hod)	obsah isoflavonoidů (%)					směrodatná odchylka					T-test				
	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin
ihned	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0,05	0,08	0	0	0,004	0,004	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0
12	0	0	0,02	0	0	0,004	0,004	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0
24	0	0	0,03	0	0	0,004	0,004	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0
48	0	0,05	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0
72	0	0,03	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0
168	0	0,08	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0

**Tabulka č. 3: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L. elicítované ultrazvukem po dobu 3 minut**

doba kultivace suspenzní kultury po expozici ultrazvuku (hod)	obsah isoflavonoidů (%)					směrodatná odchylka					T-test				
	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin
ihned	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	<b>0,08</b>	0	0	0	0,004	0	0	0	0	2,500	0	0
12	0	0	0	<b>0,03</b>	0	0	0	0,004	0	0	0	0	5,000	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,536	0	0
48	<b>0,01</b>	0	0	0,02	0	0	0	0,004	0	0	0	0	17,500	3,536	0
72	<b>0,08</b>	0	0	0,02	0	0	0	0,004	0	0	0	0	17,500	28,284	0
168	<b>0,01</b>	0	0	0	0	0	0	0,004	0	0	0	0	31,820	3,536	0



**Tabulka č. 4: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L. elicítované ultrazvukem po dobu 4 minut**

doba kultivace suspenzní kultury po expozici ultrazvuku (hod)	obsah isoflavonoidů (%)					směrodatná odchylka					T-test				
	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A
ihned	0	0,06	0	0	0	0	0,004	0	0	0	2,500	0	0	0	0
6	<b>0,02</b>	0,03	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0	10,000	7,071	0	0	0
12	<b>0,08</b>	0	0	0	0	0,004	0	0	0	0	3,536	28,284	0	0	0
24	<b>0,03</b>	0,01	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0	0	10,607	0	0	0
48	<b>0,01</b>	0	0	0	0	0,004	0	0	0	0	31,820	3,536	0	0	0
72	<b>0,02</b>	0,01	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0	20,000	7,071	0	0	0
168	<b>0,01</b>	0,02	0	0	0	0,004	0,004	0	0	0	17,500	3,536	0	0	0

**Tabulka č. 5: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L. elicítované ultrazvukem po dobu 5 minut**

doba kultivace suspenzní kultury po expozici ultrazvuku (hod)	obsah isoflavonoidů (%)					směrodatná odchylka					T-test				
	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A
ihned	<b>0,01</b>	0	0	0	0	0,004	0	0	0	0	0	3,536	24,749	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24,749	0	0
12	0	<b>0,03</b>	0	0	0	0	0,004	0	0	0	0,004	0	5,000	0	0
24	0	<b>0,03</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,000	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31,820	0	0
72	0	0,01	0	0	0	0	0,004	0	0	0	0,004	0	20,000	0	0
168	0	<b>0,14</b>	0	0	0	0	0,004	0	0	0	0,004	0	12,500	0	0

Zvýrazněné hodnoty obsahu isoflavonoidů ukazují na statisticky významné zvýšení obsahu některých isoflavonoidů v suspenzní kultuře působením ultrazvuku.

**Tabulka č. 6: Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L. neelicitované ultrazvukem – kontroly**

doba kultivace suspenzní kultury po expozici ultrazvuku (hod)	obsah isoflavonoidů (%)				směrodatná odchylka				
	biochanin A	formononetin	genistein	daidzein	genistin	daidzein	genistein	formononetin	biochanin A
ihned	0	0,07	0	0	0	0,004	0	0	0
12	0	0,01	0	0	0	0,004	0	0	0
48	0	0,09	0	0	0	0,004	0	0	0

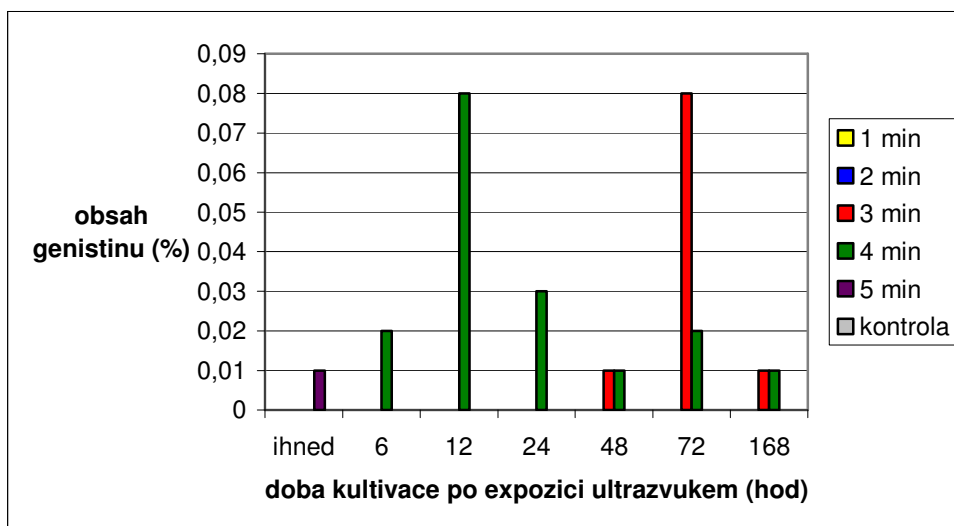
Bylo též sledováno uvolňování isoflavonoidů do živného média. Genistin, genistein, formononetin a biochanin A nebyly v živném médiu detekovány. Daidzein byl v živném médiu zjištěn v několika vzorcích (tab. č. 7), v ostatních vzorcích bylo pouze stopové množství daidzeinu.

**Tabulka č. 7: Obsah daidzeinu detekovaný v živném médiu**

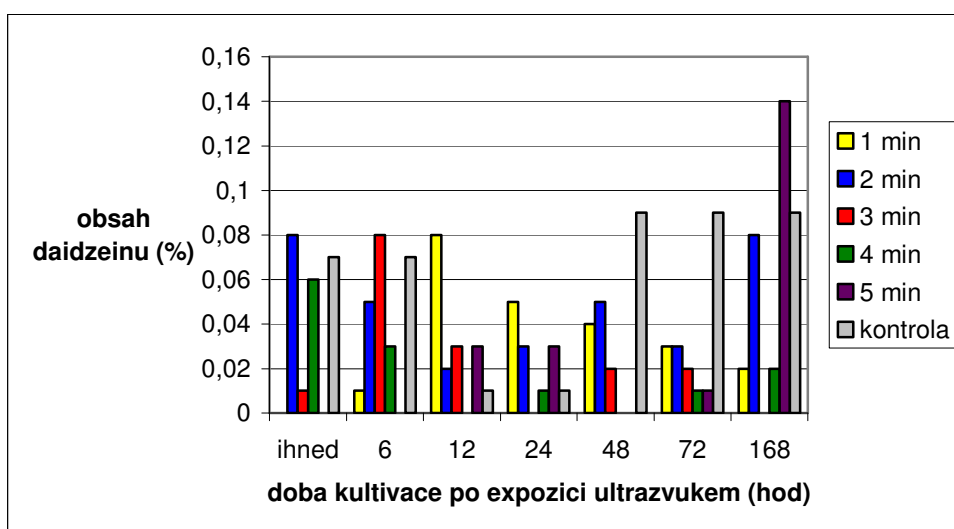
<b>doba působení ultrazvuku (min)</b>	<b>doba kultivace suspenní kultury po expoziční ultrazvukem (hod)</b>	<b>obsah daidzeinu (%)</b>
1	12	0,00256
	48	0,00368
2	ihned	0,00420
4	12	0,00132
	24	0,00192
	48	0,00128
	168	0,00120

## 5.2. Grafy

**Graf č. 1: Produkce isoflavonoidu genistinu v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L. elicitované ultrazvukem**

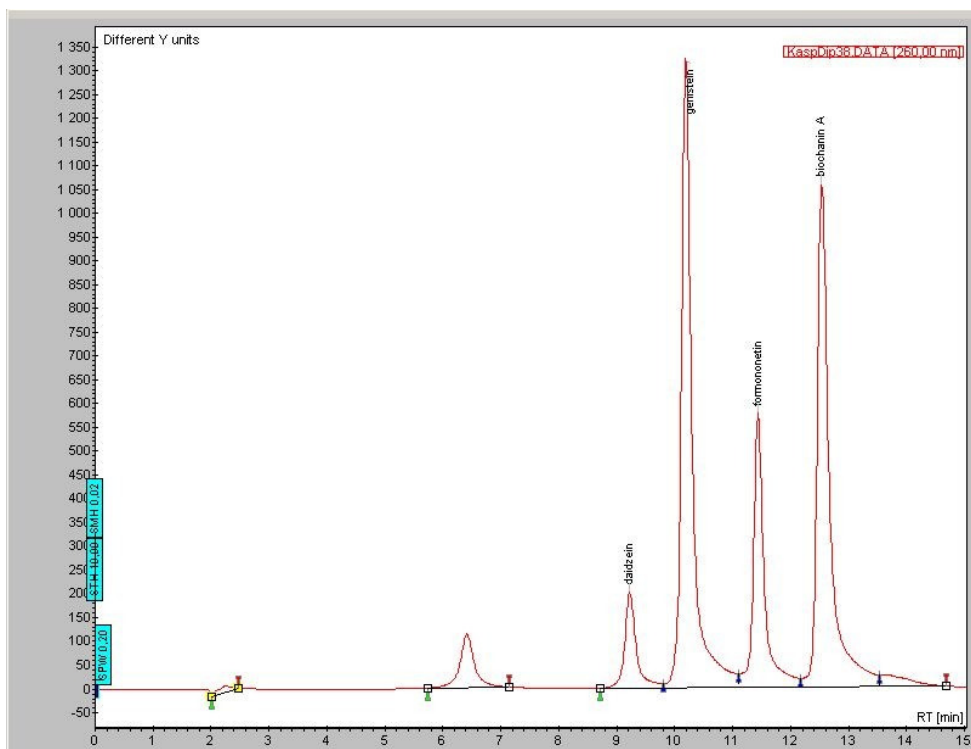


**Graf č. 2: Produkce isoflavonoidu daidzeinu v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L. elicitované ultrazvukem**

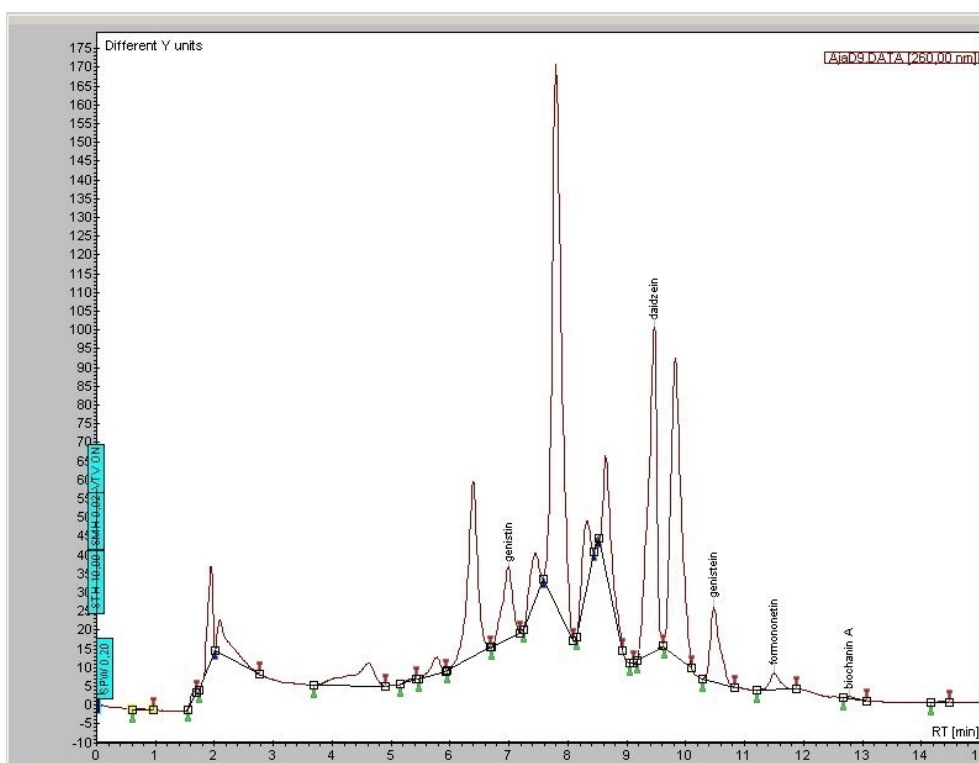


## 5.3. Průběh HPLC analýzy

Chromatogram č. 1: Průběh HPLC analýzy isoflavonoidů – standardy



Chromatogram č. 2: Průběh HPLC analýzy isoflavonoidů – vzorek (ukázka)



## 6. DISKUSE

Mnoho sekundárních metabolitů rostlin má terapeutický význam. S jejich rostoucím významem pro farmaceutický průmysl, stoupá i význam alternativních zdrojů produkujících tyto látky.

Jako vhodný zdroj sekundárních metabolitů se jeví využití explantátových kultur rostlin *in vitro*. U nich lze cíleně stimulovat produkci sekundárních metabolitů působením určitého stresu – např. snížením koncentrace živin v živném médiu, změnou množství růstových regulátorů v živném médiu nebo působením biotických či abiotických elicitorů. (1)

Cílem mnoha výzkumů v této oblasti je zejména metoda elicitace. Elicitem indukovaná exprese genů vede ke zvýšení syntézy sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro*. (27) Pro úspěšnou elicitaci je nutné zvolit vhodný elicitor a stanovit optimální délku jeho působení na danou explantátovou kulturu. (1)

V mé práci jsem k pokusům zvolila levný a dostupný abiotický elicitor – ultrazvuk. Sledovala jsem vliv ultrazvuku v různých časových intervalech na produkci sekundárních metabolitů isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L.

Pro kultivaci suspenzní kultury *Genista tinctoria* L. bylo použito Schenk–Hildebrandtovo médium s přídavkem růstových regulátorů (kys. 2,4–dichlorfenoxycetová v koncentraci 0,5 mg/l a kinetin v koncentraci 0,1 mg/l). Kultura byla kultivována při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma.

Vzorky suspenzní kultury byly vystaveny působení ultrazvuku (o hustotě výkonu 0,1 W/cm<sup>3</sup>, stálá frekvence 35 kHz) po dobu 1 minuty, 2 minut, 3 minut, 4 minut a 5 minut.

Elicitované vzorky kultury byly odebírány ihned po expozici ultrazvukem a dále pak po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách.

Kontrolní vzorky, tj. vzorky nevystavené působení elicitoru, byly odebírány ihned a dále pak po 12 a 48 hodinách. Kontrolní hodnota obsahu jednotlivých isoflavonoidů při okamžitém odběru kultury se vztahovala k odběrům elicitovaných vzorků ihned a po 6 hodinách po expozici ultrazvukem. Kontrolní hodnota obsahu jednotlivých isoflavonoidů po 12 hodinách

se vztahovala k odběrům elicitovaných vzorků po 12 a 24 hodinách po expozici ultrazvukem. Kontrolní hodnota obsahu jednotlivých isoflavonoidů po 48 hodinách se vztahovala k odběrům elicitovaných vzorků po 48, 72 a 168 hodinách po expozici ultrazvukem.

Ke stanovení obsahu jednotlivých isoflavonoidů (genistinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A) v elicitovaných vzorcích i v kontrolách byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Zjištěné hodnoty obsahu jednotlivých isoflavonoidů byly vypočteny softwarem propojeným s HPLC. Ten změřil obsah plochy pod křivkou (resp. plochy píku) a vyhodnotil ho podle předem naměřených obsahů ploch u standardů. Při výpočtech byla započítána navážka a ředění, aby výsledek vycházel v procentech.

Ze získaných výsledků je patrné, že kultura vystavená působení ultrazvuku po dobu 3 a 4 minut začala produkovat genistin, který v kontrolní kultuře nebyl přítomen, došlo tedy k navýšení produkce genistinu o 100 % oproti kontrole. (tab. č.3, 4 a 6, graf č. 1)

Nejvyšší produkce genistinu (0,08 %) byla zaznamenána při působení ultrazvuku po dobu 3 minut a odběru po 72 hodinách po expozici elicitoru a stejné hodnoty bylo dosaženo při působení ultrazvuku po dobu 4 minut a odběru po 12 hodinách po expozici elicitoru. (tab. č. 3 a 4, graf č. 1)

Nejvíce produkovala elicitovaná kultura genistin při vystavení ultrazvuku po dobu 4 minut, kdy byl obsah genistinu vyšší oproti kontrole při odběrech po 6, 12, 24, 48, 72 i 168 hodinách po expozici elicitoru. Pozitivní vliv na produkci genistinu mělo i působení ultrazvuku po dobu 3 minut, zde došlo k vzrůstu obsahu genistinu při odběrech po 48, 72 a 168 hodinách po expozici elicitoru. Vystavení kultury ultrazvuku po dobu 1, 2 a 5 minut (kromě 5 minut, odběr ihned) nemělo na produkci genistinu kulturou žádný vliv, elicitovaná kultura, stejně jako kontrola, jej neprodukovaly.

Elicitace ultrazvukem měla pozitivní vliv i na produkci daidzeinu suspenzní kulturou. (tab. č. 1 – 5, graf č. 2)

Nejvyššího obsahu daidzeinu (0,14 %) bylo dosaženo při působení ultrazvuku po dobu 5 minut a odběru po 168 hodinách po expozici elicitoru, což ale představuje zvýšení produkce daidzeinu jen o 56 % oproti kontrole.



Podstatnější navýšení produkce daidzeinu, o 400 % oproti kontrole, bylo dosaženo při působení ultrazvuku po dobu 1 minuty a odběru po 24 hodinách po expozici elicitoru, kdy obsah daidzeinu v elicítované kultuře činil 0,05 %. (tab.č. 1, 5 a 6, graf č. 2)

Působení ultrazvuku na kulturu po dobu 4 minut mělo negativní vliv na produkci daidzeinu kulturou. Obsah daidzeinu u těchto vzorků byl buď shodný s kontrolou (4 minuty, odběr po 24 a 72 hodinách) nebo došlo k snížení obsahu daidzeinu až o 100 % oproti kontrole (4 minuty, odběr po 12 a 48 hodinách). (tab. č. 4, graf č. 2)

Elicítace suspenzní kultury *Genista tinctoria* L. ultrazvukem neměla žádný efekt pro produkci dalších sledovaných isoflavonoidů (genisteinu, formononetinu a biochaninu A). Kontrola ani elicítované vzorky kultury tyto isoflavonoidy neprodukovaly. (tab. č. 1 - 6)

Z výsledků této práce vyplývá, že ultrazvuk se jeví jako vhodný elicitor pro produkci genistinu a zvýšení produkce daidzeinu suspenzní kulturou *Genista tinctoria* L. Elicítací kultury *in vitro* bylo dosaženo vyšší produkce isoflavonoidů než v neelicítované kultuře – kontrole.

K obdobnému závěru došel ve svých studiích i Luczkiewicz. Odvodil kalusové kultury z šesti druhů rodu *Genista* s cílem co nejvyšší produkce isoflavonoidů s estrogenní aktivitou. U kultur optimalizoval podmínky pro růst a produkci isoflavonoidů obměnou živných médií a přítomností či absencí světla. Fytochemickým průzkumem zjistil, že kalusová kultura *Genista tinctoria* produkuje mnohem větší množství isoflavonoidů než intaktní rostlina. (26)

Lin et. al v suspenzní kultuře *Panax ginseng* vystavené ultrazvuku zaznamenal zvýšení biosyntézy sekundárních metabolitů a navýšení celkového obsahu saponinů o 75 %. (32, 34)

Další studie sledovala vliv ultrazvuku na produkci sekundárních metabolitů v buňkách suspenzní kultury *Lithospermum erythrorhizon*. Bylo zjištěno, že expozice ultrazvuku vedla k vyšší aktivitě enzymů účastnících se biosyntézy sekundárních metabolitů, konkrétně shikoninu. (32, 35)

Ultrazvuk se jevil jako vhodný elicitor i při pokusech Evy Skrbkové. Ta sledovala vliv elicitoru – ultrazvuku na produkci flavonoidů v tkáňové kultuře *Ononis arvensis* L.. Nejvyššího nárůstu produkce flavonoidů u kultury *Ononis*

*arvensis* bylo dosaženo při elicitaci ultrazvukem po dobu 1 minuty a odběru ihned, kdy byl obsah flavonoidů zvýšen o 677 % oproti kontrole. Jako výhodná se prokázala i elicitace ultrazvukem 1 minutu a odběr po 48 hodinách (obsah flavonoidů zvýšen o 300 %) a elicitace ultrazvukem 5 minut a odběr po 48 hodinách (obsah flavonoidů zvýšen o 278 %). (47)

Naopak při pokusech Jany Řimákové na suspenzní kultuře *Glycyrrhiza glabra* L., se ultrazvuk jakožto elicitor neosvědčil. V průběhu experimentu nebyl ve sledované kultuře *in vitro* ani v médiu detekován žádný ze sledovaných metabolitů – saponinů. (32)

Z uvedeného vyplývá, že využití ultrazvuku jakožto elicitoru nemusí mít vždy pozitivní efekt na produkci sekundárních metabolitů kulturou *in vitro*.

Předpokladem úspěšné elicitace je použití vhodného elicitoru a stanovení optimální délky jeho působení u dané explantátové kultury. (1)

Elicitace ultrazvukem u suspenzní kultury *Genista tinctoria* L. se však projevila jako výhodná pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů kulturou.

## 7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo studium vlivu abiotického elicitoru – ultrazvuku působícího v různých časových intervalech na produkci sekundárních metabolitů – isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L.

Podářilo se dosáhnout produkce isoflavonoidu genistinu v elicitované suspenzní kultuře, kontrola tento isoflavonoid neprodukovala. Došlo tedy k navýšení produkce genistinu o 100 % oproti kontrole. Dále bylo dosaženo výrazně vyšší produkce isoflavonoidu daidzeinu oproti kontrole. Na ostatní sledované isoflavonoidy (genistein, formononetin a biochanin A) neměla elicitace ultrazvukem pozitivní vliv, elicitovaná kultura, stejně jako kontrola, je neprodukovala.

Zvýšená produkce genistinu byla dosažena po působení ultrazvuku po dobu 4 minut a odběru po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách po jeho expozici v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L.. Genistin produkovala i kultura vystavená působení elicitoru po dobu 3 minut a odebíraná po 48, 72 a 168 hodinách po expozici ultrazvuku a elicitovaná po dobu 5 minut a odebraná ihned po expozici ultrazvuku. Nejvyšší obsah genistinu (0,08 %) byl zaznamenán při elicitaci ultrazvukem po dobu 3 minut a odběru po 72 hodinách po expozici ultrazvuku a stejné hodnoty bylo dosaženo při elicitaci po dobu 4 minut a odběru po 12 hodinách po expozici ultrazvuku.

Při působení ultrazvuku na kulturu podobu 1, 2, 3 a 5 minut došlo k zvýšení produkce daidzeinu elicitovanou kulturou oproti kontrole. Nejvyšší navýšení produkce daidzeinu o 400 % oproti kontrole bylo zaznamenáno při vystavení kultury elicitoru po dobu 1 minuty a odběru po 12 hodinách po expozici ultrazvuku.

Z výsledku experimentu vyplývá, že použití ultrazvuku jako elicitoru u suspenzní kultury *Genista tinctoria* L. je výhodné pro produkci genistinu a zvýšení obsahu daidzeinu.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Kováč, J.: Explantátové kultury, Olomouc, Vydavatelství Univerzity Palackého, 1995, s. 1 – 3, 6, 8 – 10, 13 – 15, 17 – 18, 50 – 53, 79 – 83
2. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: Farmakognosie I., Praha, SPN, 1989, s. 11, 13
3. Vodrážka, Z.: Biotechnologie, Praha, Academia, 1992, s. 63, 65, 68 – 69
4. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 1992, s. 9, 50 – 55, 84, 87 – 94
5. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 2001, s. 75, 79, 81
6. Korbelář, J., Endris, Z.: Naše rostliny v lékařství, Praha, Avicenum, 1981, s. 216
7. Slavík, B. a kol.: Květena České republiky 4, Praha, Academia, 1995, s. 352 – 354
8. Csedö, K., Fülöp, L., Gáspár, M.: Pharmacognostical Researches for the Therapeutic Use of *Genista tinctoria*, *Planta Medica* 42 (6), 1981, 143
9. Rauter, A. P., Martins, A., Lopes, R., Ferreira, J., Serralheiro, L. M., Araujo, M. E., Borgis, C., Justino, J., Silva, F. V., Goulart, M., Thomas-Oates, J., Rodrigues, J. A., Edwards, E., Noronha, J. P., Pinto, R., Mota-Filipe, H.: Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*, *Journal of ethnopharmacology* 122 (2), 2009, 384 – 393
10. Hubík, J., Dušek, J., Řezáčová, A., Štarhová, H.: Obecná farmakognosie II., Praha, SPN, 1986, s. 31 – 34, 174 – 175
11. Minařík, J.: Farmakognosie, Praha, Avicenum, 1979, s. 140 – 141
12. Macholán, L.: Sekundární metabolity, Brno, Masarykova universita, 2003, s. 76 – 77
13. Vokurka, M., Hugo, J., Doležal, T., Hach, P., Hechtová, M., Hlaváčová, R., Koštrnová, A., Lisá, L., Matějková, M., Presl, J., Strnad, L., Svoboda, J., Ulč, I.: Velký lékařský slovník, Praha, Maxdorf Jessenius, 2002, s. 2, 62, 269, 391, 770, 864
14. „Oldřich Lapčík: Symposium o metodách výzkumu fytoestrogenů, chemie, analýza a biologické vlastnosti.“ in: Bláhová, M., Drašar, P., Liboska, R., Valterová, I., Kratochvíl, B.: Bulletin Asociace českých chemických společností, 29 (1), 1998

15. Vrzáňová, M., Heresová, J.: *Fytoestrogeny*, Interní medicína pro praktické lékaře 1, 2004, 19 – 21
16. Antus, S., Gábor, M., Vetschera, K.: *Flavonoids and bioflavonoids*, Budapest, Akadémiai Kiadó, 1995, 56 – 68, 95
17. <http://www.itsz.czu.cz/cs/?r=2217&dep=61&part=7&pub=1108403498&wp=katedry publikace..info>, 4.4.2010
18. Šatník, V., Ondřejová, M., Míka, K., Čunderlík, R.: *Farmakognózia*, Martin, Osveta, 2006, s. 45
19. Deavours, B. E., Dixon, R. A.: *Metabolic Engineering of Isoflavonoid Biosynthesis in Alfalfa*, *Plant Physiology* 138 (8), 2005, 2245 - 2259
20. Rigano, D., Cardil, V., Formisano, C., Maldini, M. T., Piacente, S., Bevilacqua, J., Russo, A., Senatore, F.: *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide – induced DNA damage and human melanoma cell growth, *Chemico-Biological Interactions* 180 (2), 2009, 211 – 219
21. [http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/isoflavonoidy\\_cz.html](http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/isoflavonoidy_cz.html), 4.4.2010
22. Luczkiewicz, M., Midas, P., Kokotkiewicz, A., Walijewska, M., Cisowski, W.: 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* 17 (2-4), 2004, 89 – 94
23. Šárková, T.: *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2006, s. 18 – 19, 24 – 25
24. Landa, Z., Novák, F. J., Opatrný, Z., Landová, B., Petrů, E.: *Uplatnění explantátových kultur v genetice a šlechtění rostlin*, Praha, Academia, 1980, s. 7
25. Procházka, S. a kol.: *Botanika morfologie a fyziologie rostlin*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2006, Brno, s. 187 – 188, 190 – 193
26. Luczkiewicz, M., Glód, D.: *Callus cultures of Genista plants – in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity*, *Plant Science*, 165 (5), 2003, 1101 – 1108
27. Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol.: *Fyziologie rostlin*, Praha, Academia, 1998, s. 242, 424 – 425
28. Reichling, J., Beiderberch, R.: *Plant tissue cultures in research and praktice*, *Biologie* 5, 1989, 453 – 464

29. Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W.: Elicitation of plants, *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 20 (2), 2006, 72 – 83
30. Ďoubal, S., Horáčková, I.: *Biofyzika pro studenty farmacie*, Praha, Karolinum, 2000, s. 30, 47 – 48
31. Wang, B. C., Shav, J. P., Biao, L., He, L., Duan, C. R.: Soundwave stimulation triggers the content change of the endogenous hormone of the *Chrysanthemum* mature callus, *Colloids and Surfaces B-biointerfaces* 37 (3 – 4), 2004, 107 – 112
32. Řimáková, J.: *Disertační práce*, Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2005, s. 66 – 67, 106 – 107
33. Wu, J., Lin, L.: Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production, *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (1), 2002, 51 – 57
34. Lin, L., Wu, J., Ho, K. P., Qi, S.: Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures, *Ultrasound in Medicine & Biology* 27 (8), 2001, 1147 – 1152
35. Lin, L., Wu, J.: Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound, *Biotechnology and Bioengineering* 78 (1), 2002, 81 – 88
36. Sinisterra, J. V.: Application of ultrasound to biotechnology an overview, *Ultrasonics* 30 (3), 1992, 180 – 185
37. Karlíček, R., Polášek, M., Pospíšilová, M., Solich, P.: *Analytická chemie pro farmaceuty*, Praha, Karolinum, 2005, s. 267, 276 – 281
38. Klimeš, J. a kol.: *Kontrola léčiv I*, Praha, Karolinum, 2002, s. 29 – 33
39. Tero-Vescan, A., Imre, S., Vari, C. E., Osan, A., Dogaru, M. T., Csedo, C.: Determination of some isoflavonoids and flavonoids from *Genista tinctoria* by HPLC-UV, *Farmacia* 57 (1), 2009, 120 – 127
40. Wu, Q. L., Wang, M. F., Simon, J. E.: Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds, *Journal of chromatography B-analytical technologies in the biomedical and life sciences* 812 (1–2), 2004, 325 – 355
41. Luczkiewicz, M., Glod, D., Baczek, T., Bucinski, A.: LC–DAD UV and LC–MS for the analysis of isoflavones and flavones from *in vitro* and *in vivo* biomass of *Genista tinctoria* L., *Chromatographia* 60 (3-4), 2004, 179 – 185

42. Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C.: Medium and techniques for induction of growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Canadian Journal of Botany* 50, 1972, 199 – 204
43. Kolektiv autorů: Český lékopis 2002, Praha, Grada Publishing, 2002, s. 221
44. Šabartová, J.: Validace analytických metod v kontrole léčiv, *Věstník SÚKL* 1, 1996, Praha, SÚKL, s. 6 – 8
45. Klimeš, J. a kol.: *Kontrola léčiv II*, Praha, Karolinum, 2004, s. 79 – 82
46. Klemra, P., Klemrová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*, Praha, Karolinum, 1993, s. 30, 80
47. Skrbková, E.: *Rigorózní práce*, Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2005, s. 55 – 56

## 9. SOUHRN

### *Genista tinctoria* L. *in vitro* – ovlivnění produkce sekundárních látek

#### Souhrn

Cílem této práce bylo studium vlivu abiotického elicitoru – ultrazvuku působícího v různých časových intervalech na produkci sekundárních metabolitů – isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Genista tinctoria* L.

Kultura byla kultivována v živném Schenk–Hildebrandtovu médiu s přidavkem růstových regulátorů (kys. 2,4–dichlorfenoxycetová v koncentraci 0,5 mg/l a kinetin v koncentraci 0,1 mg/l) při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Jako elicitor byl použit ultrazvuk (o hustotě výkonu 0,1 W/cm<sup>3</sup> a stálé frekvenci 35 kHz) po dobu 1, 2, 3, 4 a 5 minut. Vzorky byly odebírány ihned a dále pak po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách po expozici ultrazvukem. Obsah isoflavonoidů (genistinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A) byl stanoven pomocí HPLC.

Z výsledků je zřejmé, že ultrazvuk jako elicitor zvyšoval produkci genistinu a daidzeinu u suspenzní kultury *Genista tinctoria* L.. Nejvyšší obsah genistinu (0,08 %) byl zaznamenán při elicitaci ultrazvukem po dobu 3 minut a odběru po 72 hodinách po expozici ultrazvuku a stejné hodnoty bylo dosaženo při elicitaci po dobu 4 minut a odběru po 12 hodinách po expozici ultrazvuku. Největší zvýšení produkce daidzeinu, o 400 % oproti kontrole, bylo zaznamenáno při elicitaci ultrazvukem po dobu 1 minuty a odběru po 12 hodinách po expozici ultrazvuku.

Elicitace suspenzní kultury *Genista tinctoria* L. ultrazvukem neměla žádný vliv na produkci dalších sledovaných isoflavonoidů (genisteinu, formononetinu a biochaninu A). Kontrola ani elicítované vzorky kultury tyto isoflavonoidy neprodukovaly.



## ***Genista tinctoria* L. in vitro – the affecting of secondary metabolites production**

### **Summary**

The aim of this work was the study of the effect of the abiotic elicitor ultrasound in different time intervals on the production of secondary metabolites – isoflavonoids in *Genista tinctoria* L. suspension cultures.

The culture was cultivated in the Schenk-Hildebrandt nutritive medium with adding of the growth regulators (2,4-dichlorfenoxiacetic acid 0,5 mg/l and kinetin 0,1 mg/l), temperature of 25 °C and luminous period 16-hours light/8-hours darkness. As the elicitor ultrasound (about power density 0,1 W/cm<sup>3</sup> and fixed frequency 35 kHz) for a period of 1, 2, 3, 4 and 5 minutes was used. The samples were taken immediately and further then after 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours after ultrasound exposition. The quantity of isoflavonoids (genistin, daidzein, genistein, formononetin and biochanin A) was determined by the HPLC method.

The results of this work show that ultrasound as elicitor is able to increase genistin and daidzein production in *Genista tinctoria* L. suspension culture. The highest quantity of genistin (0,08 %) was detected during the ultrasound elicitation for a period of 3 minutes and taking out after 72 hours after ultrasound exposition and the same content was achieved during the elicitation for a period of 4 minutes and taking out after 12 hours after ultrasound exposition. The largest rise of daidzein production, about 400 % in relation to the control sample, was detected during the ultrasound elicitation for a period of 1 minute and taking out after 12 hours after exposition.

The ultrasound elicitation of *Genista tinctoria* L. suspension culture didn't have any effect for the production of other isoflavonoids (genistein, formononetin and biochanin A). The control sample nor the elicited sample of the suspension culture didn't produce these isoflavonoids.