

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**STUDIUM SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ
V ROSTLINNÝCH EXPLANTÁTOVÝCH KULTURÁCH II**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Pověřen vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Hradec Králové, květen 2018

Nikola Urbanová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za její cenné rady, věcné připomínky, ochotu a pomoc při zpracování této diplomové práce.

PROHLÁŠENÍ

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

Nikola Urbanová

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Jalovec virginský (<i>Juniperus virginiana</i> L., <i>Cupressaceae</i>)	10
3.1.1 Popis jalovce virginského a jeho využití	10
3.1.2 Kultivary jalovce virginského	12
3.2 Sekundární metabolity rostlin	12
3.2.1 Obecná charakteristika a cesty biosyntézy sekundárních metabolitů	12
3.2.2 Funkce a využití sekundárních metabolitů	13
3.3 Obsahové látky v jalovci virginském	14
3.3.1 Podofylotoxin	14
3.3.1.1 Zdroje podofylotoxinu	15
3.3.1.2 Struktura podofylotoxinu a jeho vlastnosti	15
3.3.1.3 Biosyntéza podofylotoxinu	16
3.3.1.4 Deriváty odvozené od podofylotoxinu	17
3.3.1.5 Mechanismus účinku a využití podofylotoxinu a jeho derivátů v medicíně	18
3.4 Explantátové kultury rostlin	20
3.4.1 Úvod a historie	20
3.4.2 Základní principy	21
3.4.2.1 Totipotence	21
3.4.3 Typy explantátových kultur	22
3.4.3.1 Kalusové kultury	23
3.4.3.2 Suspenzní kultury	24
3.4.4 Pasážování	27
3.4.5 Zařízení laboratoře explantátových kultur	27

3.4.5.1	Sterilizační metody	27
3.4.6	Kultivační média	28
3.4.6.1	Složení kultivačního média	29
3.4.6.2	Růstové regulátory	33
3.4.6.3	Příprava kultivačního média	35
3.4.7	Výhody a využití explantátových kultur	35
3.5	Zvýšení produkce sekundárních metabolitů	37
3.5.1	Elicitace	37
3.5.1.1	Elicitory	38
3.5.1.2	Mechanismus účinku	44
3.5.1.3	Parametry elicitorů	45
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
4.1	Pomůcky a přístrojové vybavení	47
4.2	Kultivace explantátových kultur <i>Juniperus virginiana</i> L.	47
4.2.1	Rostlinný materiál	47
4.2.2	Kultivační nádoby a nástroje	48
4.2.3	Složení kultivačního média	48
4.2.4	Příprava kultivačního média	49
4.2.5	Pasážování a kultivace kalusových a suspenzních kultur	49
4.3	Elicitace	51
4.3.1	Příprava elicitoru	51
4.3.2	Elicitace explantátových kultur <i>Juniperus virginiana</i> L.	51
4.4	Stanovení obsahu podofylotoxinu	52
4.4.1	Příprava vzorku k analýze	52
4.4.2	HPLC analýza vzorků	52
4.5	Statistické zpracování dat	55

5.	VÝSLEDKY	57
5.1	Tabulky	57
5.2	Grafy	60
6.	DISKUZE	62
7.	ZÁVĚR	67
8.	POUŽITÁ LITERATURA	68
9.	POUŽITÉ OBRÁZKY	75
10.	ABSTRAKT	76
11.	ABSTRACT.....	77

1. ÚVOD

Lidský život je od nepaměti závislý na rostlinách. Vyšší rostliny jsou nejen důležitým zdrojem potravin, dřeva, vlákniny a olejů, ale také poskytují nejbohatší výběr přírodních látek, z nichž mnohé jsou využívány v medicíně, kosmetice a potravinářství. Odhaduje se, že asi třetina vyráběných léčivých přípravků obsahuje biogenní látky rostlinného původu nebo z nich získané deriváty. Tak je tomu i v léčbě nádorových onemocnění, kde se nejrůznější látky přírodního původu uplatňovaly již od starověku. [1, 2]

Podofylotoxin je aryltetralinový lignan, který byl původně izolován z podofylinu, pryskyřice získávané z oddenků rodu *Podophyllum*. Dnes je známo, že je široce distribuován ve spektru rostlin, a to zejména v čeledích *Cupressaceae*, *Berberidaceae*, *Apiaceae*, *Burseraceae* nebo *Verbenaceae*. Jedním z alternativních zdrojů podofylotoxinu je i námi studovaný jalovec virginský (*Juniperus virginiana* L.). Podofylotoxin je známý především pro svoji protinádorovou aktivitu a dnes slouží zejména jako prekurzor pro chemickou syntézu klinicky významných léčiv, kterými jsou etoposid, teniposid a etopophos. [3, 4]

Bohužel většinu sekundárních metabolitů, tedy i podofylotoxin, nelze získat ekonomicky přijatelnou organickou syntézou a získání látek z přírodních surovin se zajišťuje stále obtížněji. Důvodem je zejména zmenšování rostlinných zdrojů, narušování životního prostředí, ohrožení rostlin klimatickými vlivy, hmyzem nebo bakteriálními nákazami a současně i stoupající nároky farmaceutického průmyslu. Proto se hledají alternativy, jak požadované látky získat. Jednou z možností je využití rostlinných explantátových kultur. [1, 5]

Produkce sekundárních metabolitů cestou kultivace *in vitro* má několik nesporných výhod. Požadované látky mohou být produkovány za řízených podmínek, které neovlivňují klimatické změny, jsou prosté nákaz, mohou být pěstovány kontinuálně po celý rok, získaný materiál dosahuje vysoké uniformity a kultury buněk mohou produkovat i sloučeniny, které se v rostlině nevyskytují. [5]

Velkou nevýhodou a až na výjimky charakteristickým problémem explantátových kultur, je nízká produkce sekundárních metabolitů. V současnosti je vypracováno mnoho metod, jak zvýšit produkci explantátových kultur, jednou z nich je metoda elicitace, která byla použita i v této diplomové práci. K elicitaci se používají látky se signálním účinkem,

tzv. elicitory, které působí jako stresové faktory – spouští obrannou odpověď exponovaných buněk. Dávají podnět k expresi genů, syntéze enzymů a tímto způsobem navozují zvýšení syntézy fytoalexinů i jiných sekundárních metabolitů a látek podílejících se na ochraně rostliny nebo explantátu. Základním předpokladem úspěšné elicítace je nalezení vhodného elicitoru, jeho optimální koncentraci a dobu jeho působení na rostlinnou kulturu *in vitro*. [1, 6]

Chitosan je často používán jako elicitor ke stimulaci produkce farmaceuticky prospěšných sloučenin jak v rostlinách, tak v systémech *in vitro*. Pozitivní účinek chitosanu na produkci podofylotoxinu již byl u několika explantátových kultur studován, ale informace o tom, že chitosan zvyšuje produkci podofylotoxinu u druhu *Juniperus virginiana* L., zatím nebyly publikovány. [7, 8, 9]

Cílem této práce bylo zjistit vliv potencionálního elicitoru chitosanu na produkci podofylotoxinu v kalusové a suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* varieta Glauca a v kalusové kultuře *Juniperus virginiana* varieta Hetzii.

2. CÍL PRÁCE

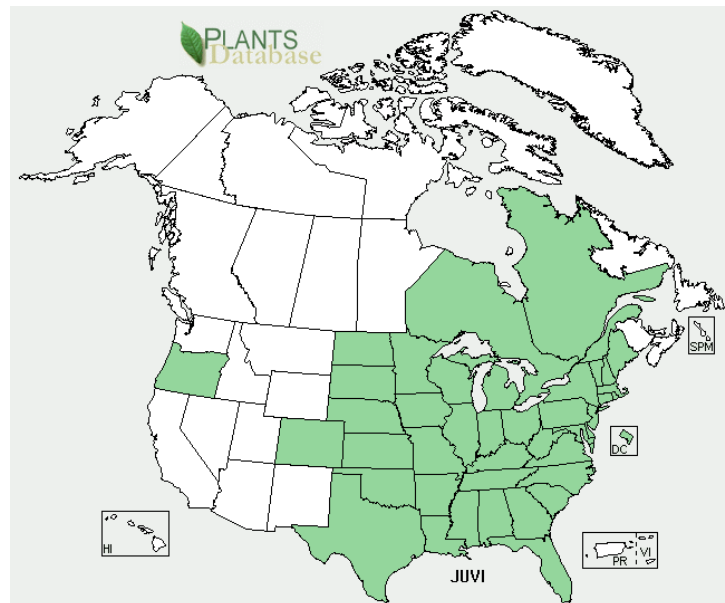
1. Seznámení se s metodikou kultivace rostlinné explantátové kultury *Juniperus virginiana*.
2. Sledování vlivu elicitoru chitosanu na produkci podofylotoxinu kalusovou kulturou *Juniperus virginiana* (varieta Glauca a Hetzii) a suspenzní kulturou *Juniperus virginiana* (varieta Glauca).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Jalovec virginský (*Juniperus virginiana* L., *Cupressaceae*)

3.1.1 Popis jalovce virginského a jeho využití

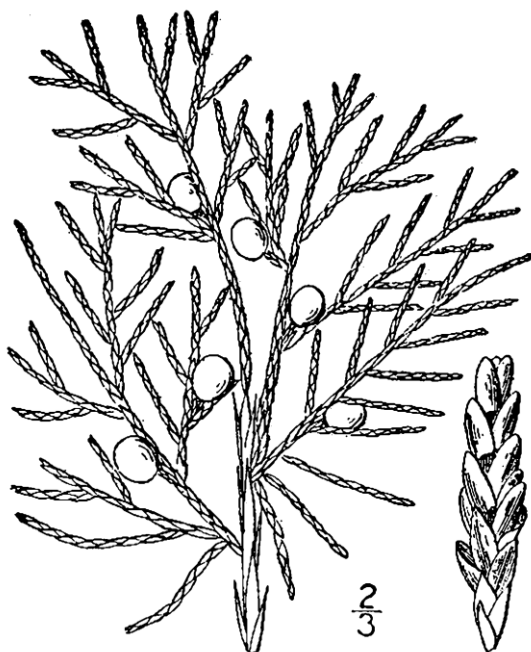
Jalovec virginský (*Juniperus virginiana*) je dvoudomá jehličnatá dřevina řadící se do čeledi cypřišovitě (*Cupressaceae*). Původně se jalovec virginský vyskytoval na rozsáhlém území ve východních oblastech Severní Ameriky, mezi Hudsonovým zálivem, Floridou, Novým Mexikem a pásmem Skalnatých hor. Dnes je jako okrasná dřevina pěstován téměř po celém světě. Tento jalovec miluje hlubší půdy zásobené vláhou, ale obstojně snáší i sucho. [10, 11, 12]



Obr. č. 1. Výskyt *Juniperus virginiana* L. [13]

Juniperus virginiana je vždyzelený strom vyznačující se kuželovitou vzpřímeně stavěnou korunou. I když dorůstá až do výšky 30 metrů, kultivary jsou často jen keřovitěho vzrůstu. Větvičky má velmi tenké, nápadně čtyřhranné, nesoucí šupinovitě a jehlicovitě listy. V prvním stádiu, u mladých rostlin, se tvoří listy jehlicovitě, v dalším stádiu listy šupinovitě. Převažující šupinovitě listy jsou 2 mm dlouhé, zakončené zřetelnou špičkou. Na koncích jsou odstálé od větvičky a mají rýhovitou žlázku. Jehlicovitě juvenilní listy jsou špičaté, mají délku 5–10 mm a na svrchní straně se nachází dva bílé proužky. Listy po rozemnutí nevykazují nepříjemný zápach. Samčí šištice, dlouhé přibližně 5 mm, jsou

složeny z několika přeslenů šupinovitých tyčinek. Spodní část šištice tvoří tyčinky obsahující 3–4 prašná pouzdra, horní část šištice představují tyčinky, které obsahují pouze 1–2 prašná pouzdra. Vzpřímené samičí šištice jsou dlouhé 2 mm a jsou složeny z několika přeslenů semenných šupin, z nichž pouze tři horní šupiny nesou po jednom vajíčku. Každé z vajíček má protáhlou mikropyli, která vyčnívá z konce květu. Za pohlavní zralosti se z mikropyle vylučuje kapka tekutiny, na kterou se zachytávají pylová zrna. Po opylení mikropyle zasychá, plodolisty zdužnatí a semena se ocitají uvnitř bobulovité šištice. Zdužnatělá šištice, podobající se bobuli, je nepravým plodem a nazývá se galbulus. Galbuly vejcovitého tvaru dozrávají již 1. – 2. rokem a mají typicky temně modrou barvu s šedavým ožíněním. [10, 14, 15]



Obr. č. 2. Větévka *Juniperus virginiana* L. s galbuly [16]

Jalovec virginský zaplatil určitou daň za objevení Ameriky. Kdysi rozlehlé porosty této dřeviny, rozprostírající se ve východních oblastech Severní Ameriky, se povážlivě ztenčily, poté co se přišlo na to, že jeho vonné, lososově červené dřevo, sice křehké, ale trvanlivé, je velmi cenné. Nejvíce se ho spotřebovalo na výrobu tužek, část byla určena k destilaci tzv. „cedrového oleje“ a využíval se i v kosmetice. Dřevem se obkládaly stěny a vyráběl se z něho nábytek. Dnes ale jalovec virginský bezprostředně ohrožený není, protože se s oblibou pěstuje v parcích a zahradách, a to jak původní druh, tak různé kultivary. [12]

3.1.2 Kultivary jalovce virginského

Jsou známy četné kultivary vyznačující se různým zbarvením listů (žlutavé, bělavé, modrozelené) nebo odlišným vzrůstem. Charakteristickým znakem některých kultivarů tohoto jalovce je zimní (předjarní) červenání koncových větévек. Bylo vyšlechtěno velké množství variet, kdy nejstarší z nich pocházejí již z poloviny 19. století. Dnes se v našich parcích a zahradách, spíše než původní druh, pěstují právě různé kultivary, např. oblíbený keřovitě, rozkladitě rostoucí kultivar Tripartita. Kalusové a suspenzní kultury, se kterými jsme pracovali v experimentální práci, byly odvozeny od variety Glauca a Hetzii. [10, 11, 12]

- *Juniperus virginiana* Glauca, známý také pod anglickým názvem Silver Eastern Redcedar, je přibližně 7, 5 metru vysoká a 2, 5 metru široká dřevina. Má převážně šupinovité listy a sivě namodralý vzhled.
- *Juniperus virginiana* Hetzii je přibližně 3 metry vysoký a 2 metry široký strom. Má keřovitý vzrůst s rozložitými větvemi. Převažují šupinovité listy, které mají modrozelenou barvu. [10, 17, 18]

3.2 Sekundární metabolity rostlin

3.2.1 Obecná charakteristika a cesty biosyntézy sekundárních metabolitů

Obsahové látky rostlin jsou velmi různorodé chemické sloučeniny, tzv. fytochemikálie vznikající při látkové přeměně v rostlinách. Obecně se rozdělují na primární a sekundární metabolity. Primární metabolity se nacházejí ve všech rostlinách a zajišťují jejich základní životní funkce, zejména výživu a reprodukci. Jsou pro život buňky zásadní a nezbytné a v hlavních rysech společné buňkám všech organismů. Sekundární metabolity vznikají z metabolitů primárních, a i když nejsou pro život rostliny nepostradatelné, pomáhají rostlině přežít. Hrají významnou roli zejména při komunikaci buňky (organismu) s okolím, a umožňují tak realizovat rostlině plnohodnotný život daný genomem druhu. Většinou jde tedy o látky specifické pro jeden rod i druh organismů, látky aktivní pouze v určité fázi životního cyklu nebo za určitých podmínek vnějšího prostředí, nebo probíhající jen v jednotlivých tkáních či skupinách buněk. Na základě

biosyntetického původu můžeme sekundární metabolity rozdělit na tři základní skupiny: terpeny, alkaloidy a fenolové látky.

Biosyntéza terpenoidů vychází z pětiuhlíkatého prekurzoru isopentyl difosfátu (IPP) a dimethylallyldifosfátu a oba tyto prekurzory vznikají kondenzací tří jednotek acetylkoenzymu A. Alkaloidy obsahující alespoň jeden nebo více atomů dusíku ve své struktuře jsou biosyntetizovány především z aminokyselin. Šikimátová dráha a polyketidová dráha jsou základními biosyntetickými dráhami vzniku fenolových látek u rostlin, hub a bakterií. Mezi základní fenolické látky patří flavonoidy, fenolické kyseliny, stilbeny, ligniny a lignany. Za důležité meziprodukty této dráhy jsou považovány šikimát, vznikající kondenzací fosfoenolpyruvátu a D-erythrosa-4-fosfátu, a chorismát, jenž může být dále metabolizován na aromatické aminokyseliny – tyrosin, tryptofan a fenylalanin. Právě fenylalanin je ve fenypropanoidové dráze, která úzce souvisí s dráhou šikimátovou, metabolizován na fenolové kyseliny a *p*-kumaroyl-CoA. [19, 20, 21, 22]

3.2.2 Funkce a využití sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity jsou často považovány za méně důležité, ale tento pohled je zavádějící, neboť u řady z nich byla prokázána jejich významná role pro produkující metabolismus. Mají několik rozličných funkcí – mohou sloužit jako přenašeče informací (hormony, transitory), efekty jiných organismů (barviva, vůně, atraktanty, antibiotika, insekticidy, toxiny), faktory pro využívání ekologických situací (chelatační činidla, antibiotika, inhibitory antibiotické aktivity) a také jako skladovací formy odpadních produktů primárního metabolismu. [21]

Velké množství sekundárních metabolitů využívají rostliny ke komunikaci a ke své ochraně a obraně. Několik metabolitů vzniklo právě jako ochrana proti virům, bakteriím, patogenním houbám a konkurenčním rostlinám, zejména však proti býložravcům (např. šnekům, slimákům, členovcům a obratlovcům). Navíc mohou sloužit sekundární metabolity také jako atraktanty lákající opylovače a ostatní živočichy, kteří roznášejí semena. K těmto účelům využívají rostliny rostlinná barviva a vůně (těkavé esenciální látky a oleje). V několika případech mohou mít látky účinky obojí, a to jak antimikrobiální a insekticidní, tak mohou sloužit jako atraktanty např. na květech rostliny. S tímto jevem se můžeme setkat zejména u rostlin obsahující některé antokyany

a monoterpeny. Dále mohou metabolity zastávat i fyziologické funkce a sloužit například jako ochrana proti UV záření. [23]

Sekundární metabolity rostlin jsou také využívány lidstvem už po několik tisíců let jako barviva (indigo), aromata a příchutě (vanilin, kapsaicin, hořčičný olej), vůně (růžový olej, levandulový olej a další esenciální oleje), stimulanty (kofein, nikotin, efedrin), halucinogeny (morfin, kokain, skopolamin), insekticidy (nikotin, pyretrin), jedy (strychnin, koniin), ale také našly své uplatnění v medicíně a farmacii (atropin, kodein, morfin). [23]

3.3 Obsahové látky v jalovci virginském

Jalovec virginský obsahuje široké spektrum látek, kde hlavní podíl představuje silice, která se získává převážně z jalovcového dřeva. Kůra a listy éterické oleje obsahují také, ale ve výrazně nižším množství. Zároveň mají jednotlivé části rostlin odlišné složení této silice. Vyšší procento éterických olejů nalezneme u starších stromů a v jádrovém dřevu. Silice jalovce se skládá z přibližně 200 složek a je tvořená převážně monoterpeny a seskviterpeny. Mezi nejvíce zastoupené složky patří safrol, limonen, β -pinen, α -pinen, myrcen, linalool a bornylacetát. Dále silice obsahuje cedren, cedrol, α -terpinen nebo terpinen-4-ol. Mezi další látky obsažené v jalovci virginském patří pryskyřice, cukry, organické kyseliny, kyselina askorbová, třísloviny, vitamíny a minerály. Mimo tyto látky, obsahuje jalovec také flavonoidy, které mají příznivý vliv na správnou cirkulaci krve a snížení krevního tlaku. Konkrétně jsou to flavonoidy – kaempferol, rutin a quercetin. Listy jalovce mimo silici obsahují také důležité lignany, a to zejména podophylotoxin, dále α -peltatin a β -peltatin. Kůra i dřevo byly také testovány na přítomnost podofylotoxinu, ale jeho přítomnost zde nebyla prokázána. [24, 25, 26, 27, 28]

3.3.1 Podofylotoxin

Podofylotoxin je přirozeně se nacházející produkt rostlin, jehož deriváty hrají významnou roli zejména v léčbě rakoviny, ale také revmatoidní artritidy, genitálních bradavic, psoriázy a roztroušené sklerózy. Poprvé byl extrahován ve formě pryskyřice z rostliny *Podophyllum peltatum* L. (*Berberidaceae*) a z *Linum sp.* (*Linaceae*) a byl používán lékaři v jižní Americe již v 19. století právě při léčbě genitálních bradavic. [29, 30, 31]

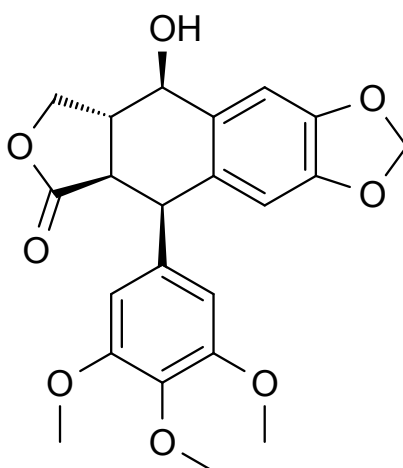
3.3.1.1 Zdroje podofylotoxinu

Podofylotoxin je tradičně izolován z podofylinu, pryskyřice získávané z oddenků rodu *Podophyllum*. Preferovaným druhem je *Podophyllum emodi* pocházející z Indie, před americkým druhem *Podophyllum peltatum*. Obsah podofylotoxinu získaného ze sušiny *P. emodi* byl 4,3 %, proti 0,25 % u druhu *P. peltatum*. [3]

Ačkoliv hlavním zdrojem podofylotoxinu je již zmiňovaný *Podophyllum peltatum* L., *Podophyllum hexandrum* a *Podophyllum emodi*, dodávka podofylotoxinu je z těchto zdrojů stále problematičtější, a proto je nutné hledat zdroje alternativní. Lignany aryltetralinu, jako je podofylotoxin a jeho deriváty, jsou široce distribuovány ve spektru rostlin, a to zejména v čeledích *Cupressaceae*, *Berberidaceae*, *Apiaceae*, *Burseraceae* nebo *Verbenaceae*. Jedním z alternativních zdrojů může být právě jalovec virginský a další druhy jalovce, ačkoliv obsah podofylotoxinu je u těchto druhů nižší. [4, 29, 30, 31]

3.3.1.2 Struktura podofylotoxinu a jeho vlastnosti

Molekula podofylotoxinu je charakterizována čtyřmi chirálními centry a systémem pěti kruhů, značených písmeny A, B, C, D a E. Molekula se skládá z dioxalového kruhu (A), dvou tetralinových kruhů (B a C) a gama-laktonového kruhu (D), kde tyto čtyři kruhy tvoří téměř planární útvar. Aromatický kruh (E) je navázán v poloze 1, má alfa-konfiguraci a vazba má určitý stupeň volné otáčivosti. [32]



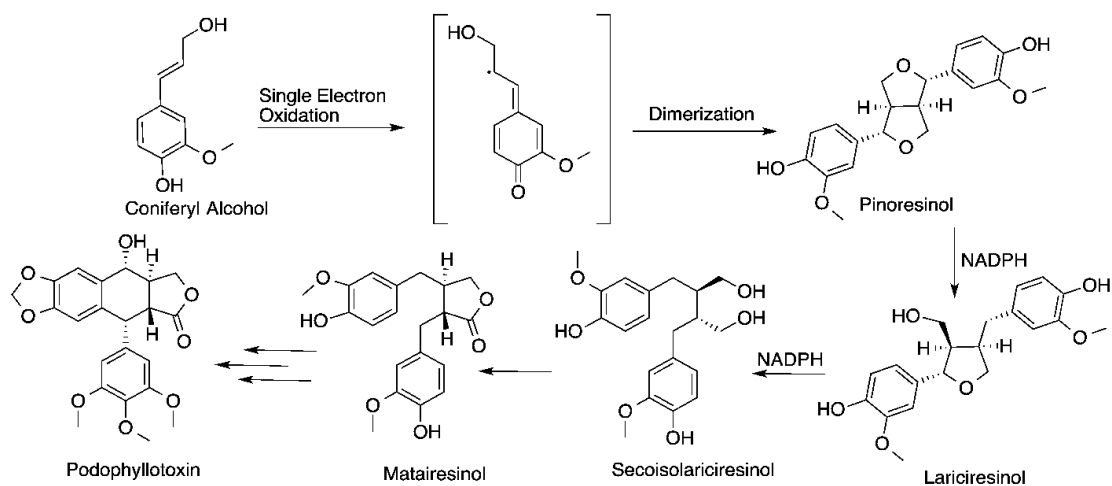
Obr. č. 3. Struktura podofylotoxinu [33]

Dříve se předpokládalo, že všechny kruhy jsou pro aktivitu podofylotoxinu esenciální, ale toto tvrzení bylo vyvráceno a novější studie poukázaly na to, že pro aktivitu jsou důležité pouze kruhy A a E. Dále bylo prokázáno, že aromatizací kruhu C dojde ke ztrátě aktivity podofylotoxinu, zatímco modifikace na uhlíku C-4 v kruhu C jsou většinou přínosné a objemné substituenty aktivitu dokonce zvyšují. [32]

Podophylotoxin je po chemické stránce aryltetralinový lakton řadící se mezi lignany. Lignany jsou definovány jako dimery vzniklé oxidativní dimerizací dvou fenylpropanových jednotek spojených centrálními uhlíky jejich propanových bočních řetězců v polohách C-8 a C-8'. Lignany mohou být izolovány z různých částí rostlin: kořenů, oddenků, dřeva, listů, plodů, semen nebo dokonce endofytických organismů. Byly nalezeny také v moči lidí a savců, ale většina z nich je shodná se složkami rostlinných primárních metabolitů. [4, 34]

3.3.1.3 Biosyntéza podofylotoxinu

Jak již bylo dříve uvedeno, lignany jsou definovány jako dimery dvou fenylpropanových jednotek. Tyto sloučeniny vznikají fenylpropanoidovou cestou přes dráhu kyseliny šikimové. Několik studií se již zabývalo cestou biosyntézy podofylotoxinu a jako začátek této cesty byla navržena molekula koniferylalkoholu. Dimerizací dvou molekul koniferylalkoholu za přítomnosti jednoelektronového oxidantu vznikne (+) – pinoresinol. (+) – pinoresinol je dále v přítomnosti kofaktoru NADPH redukován na (+) – lariciresinol a následně (–) – secoisolariciresinol. Selektivní dehydrogenací (–) – secoisolariciresinolu dojde k převodu na (–) – matairesinol, který je považován za prekurzor podofylotoxinu. Kroky vedoucí k prvnímu lignanu podofylotoxinového typu, deoxypodofylotoxinu jsou zatím neznámé. Tyto kroky zahrnují tvorbu můstku vedoucího ke tvorbě dioxalového kruhu A, hydroxylaci a metylaci na kruhu E a také uzavření kruhu C. [32, 34]



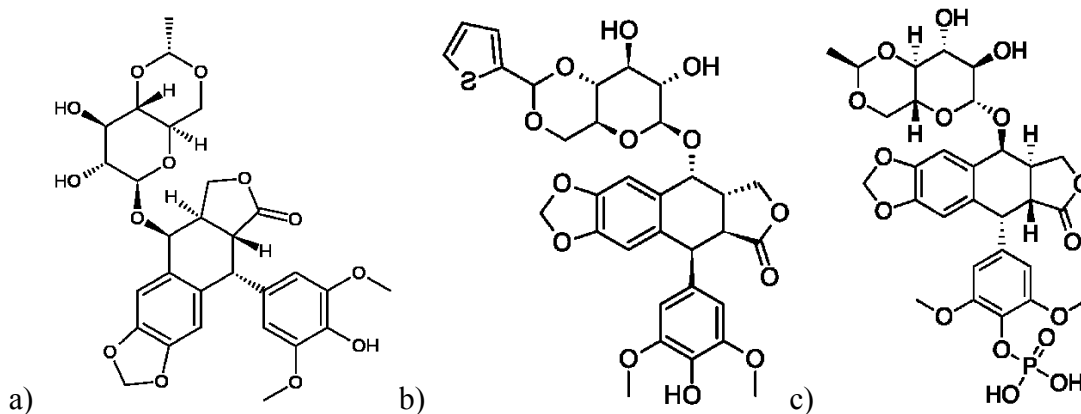
Obr. č. 4. Biosyntéza podofylotoxinu [18]

3.3.1.4 Deriváty odvozené od podofylotoxinu

Přes klinicky prokázanou účinnost, velkou nevýhodou samotného podofylotoxinu je jeho vysoká, zejména gastrointestinální, toxicita, která snižuje celkový terapeutický index léčiva. Tato toxicita je nejpravděpodobněji spojena s jeho hydrofobitou a nepředvídatelným systémovým chováním. Ve snaze snížit tyto nežádoucí účinky, bylo ve výzkumu vyvinuto úsilí provádět četné modifikace základního kruhu. Výsledkem bylo zavedení hydrofilnějších glykosidových derivátů, a to etoposidu a teniposidu. Jedná se o 4-glukopyranosyl deriváty epipodofylotoxinu, diastereoizomeru podofylotoxinu. Zvýšením rozpustnosti molekuly ve vodě se snížila četnost nežádoucích účinků, došlo však i ke snížení samotného antineoplastického účinku. [34]

Etoposid je využíván zejména v kombinační terapii refrakterního testikulárního lymfomu, myeloidní leukémie a rakoviny žaludku, vaječnicků, mozku, prsu, slinivky a plic. Teniposid má menší využití, než etoposid a využívá se zejména v léčbě lymfomů [34]

Úspěšná syntéza etoposidu a teniposidu odstartovala ještě větší zájem o podofylotoxin a optimalizaci jeho struktury, která by vedla k přípravě nových derivátů s vynikajícím farmaceutickým profilem a širším terapeutickým použitím. Jedním z nich je fosfát etoposidu – etopophos, určený k překonání omezení spojených se špatnou rozpustností etoposidu. Díky dalšímu zvýšení hydrofility molekuly, může být podávána ve vyšších dávkách intravenózně. V krvi je rychle přeměněn fosfatázou na etoposid. [34]



Obr. č. 5. Struktury: a) etoposid [35] b) teniposid [36] c) etopophos [37]

3.3.1.5 Mechanismus účinku a využití podofylotoxinu a jeho derivátů v medicíně

Význam podofylotoxinu a zájem o něj stoupá především díky jeho antineoplastické aktivitě. Z hlediska mechanismu účinku je podofylotoxin řazen mezi antimitotika, tzv. mitotické jedy, díky jeho vlastnosti znemožnit sestavování tubulinu do mikrotubulů, děje vedoucího k zastavení mitózy. Mitóza představuje přísně regulovaný proces buněčného dělení, jehož narušení vede k aktivaci kontrolních bodů mitotického vřeténka, k zástavě mitózy a případně až k indukci tzv. mitotické buněčné smrti. Vzhledem k tomu, že nádorové buňky jsou obzvláště citlivé vůči látkám, které narušují buněčné dělení, stala se antimitotika velice záhy jedním z hlavních přístupů protinádorové terapie. [38]

Na průběhu mitózy se podílejí především mikrotubuly. Mikrotubuly jsou základní složkou cytoskeletu a jedná se o vysoce dynamické struktury, jejichž základním stavebním kamenem je bílkovina tubulin. Tubulin je uspořádaný do základních dimerových jednotek, které se skládají z alfa a beta tubulinu. Dimery tubulinů spolu tvoří dlouhé řetězce zvané protofilamenta, která se spojují v samotný mikrotubulus. [32]

Mikrotubuly hrají klíčovou úlohu nejen při správné migraci chromozomů při mitóze, ale spolupodílejí se též na udržení tvaru buňky, na buněčné motilitě (a tedy i na invazivitě a metastazování) a na přenosu signálů mezi povrchovými receptory a jádrem. Mezi polymerací dimerů na jednom konci a disociací dimerů na konci druhém je ustanovena dynamická rovnováha. Podofylotoxin se reverzibilně váže na tubulin, a tím tuto dynamickou rovnováhu ruší. Výsledkem této vazby je inhibice polymerace mikrotubulů, zástava buněčného cyklu v kontrolním bodu G2 – M a spuštění apoptózy. Zásadním způsobem jsou však alternovány i všechny buněčné funkce, jejichž průběh je vázán na

plně funkční mikrotubuly. Dochází více či méně také k inhibici buněčné motility, invazivity, metastazování a angiogeneze. [32, 38]

Stejný mechanismus účinku inhibice polymerace tubulinu je prokázán i u dalších antimitotik, jako je kolchicin, tzv. vinca alkaloidy, eribulin mesylát, maytansin nebo dolastatin. Obecně dynamika mikrotubulů zůstává jedním z nejúspěšnějších chemoterapeutických cílů. [32, 38]

Semisyntetické analogy, etoposid, teniposid a etopophos, neinterferují s mikrotubuly díky přítomnosti objemného glykosidu, ale disponují silnou inhibiční aktivitou proti enzymu DNA topoizomeráze II. Topoizomerázy, nebo lépe DNA – topoizomerázy, jsou nukleární enzymy řadící se do skupiny izomeráz vyskytující se ve všech buňkách eukaryotických organismů, které tvoří přechodné zlomy v DNA umožňující buňce měnit její topologii. Jedná se o vysoce konzervativní enzymy nezbytné pro přežití všech eukaryotických organismů a hrají zásadní roli při replikaci DNA, kondenzaci a segregaci chromozomů. Existují dvě hlavní formy těchto enzymů, a to DNA topoizomerázy I a II. [32, 34, 39, 40]

Dvoušroubovice DNA prodělává torzi kolem vlastní osy, což může vést k překroucení a vytvoření zlomu v jednom či obou řetězcích DNA, zvláště v S – fázi, kdy vzniká tzv. replikační vidlice. Topoisomeráza I se váže pouze na jeden řetězec dvoušroubovice, který rozpojí, uvolní nadměrnou torzi a přerušovaný řetězec opět spojí, čímž umožní plynulost replikačního procesu. Topoisomeráza II se váže na oba řetězce DNA, tím dojde k jejich přerušování a následně k opětovnému spojení a umožní tak separaci chromozomů při mitóze. Při inhibici topoizomeráz nedojde k opětovnému spojení řetězců, a zlomy v DNA tak mají pro osud buňky smrtící účinek. [38]

Antivirové aktivity podofylotoxinu se dnes využívá zejména v léčbě condyloma acuminatum a dalších typů bradavic. Onemocnění condyloma acuminatum je charakterizováno bradavičnatými výrůstky v oblasti zevních pohlavních orgánů nebo řitního otvoru. Původcem je lidský papilomavirus (HPV) typu 6 a 11, méně často i onkogenní typ 16 a 18. Tento antivirový účinek je spojen s různými mechanismy včetně porušení buněčného cytoskeletu a inhibicí integrázy, která interferuje s replikací viru. [32]

3.4 Explantátové kultury rostlin

3.4.1 Úvod a historie

Názvem explantát označujeme jakoukoliv živou, uměle oddělenou část rostliny, pěstovanou sterilně při umělých podmínkách mimo původní celek (individuum). Definice dle Bauera (1939) pak uvádí, že za explantát je považován každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů, který je vytržený z korelačních vztahů k celku (individu) a je pěstován v umělých podmínkách bez ohledu na to, roste-li nebo ne. Je tedy možné odvodit explantát od mnohobuněčné rostliny, ale také od jejích částí, meristematických pletiv, buněk, protoplastů a kalusů. Explantátové kultury našly uplatnění jak při šlechtění rostlin, ale také při produkci sekundárních metabolitů. Jejich hlavní výhodou je, že lze dlouhodobě a v poměrně malém prostoru kultivovat velké populace buněk, a z každé lze vypěstovat plnohodnotnou rostlinu. [41, 42]

Teoretický počátek kultur rostlinných explantátů *in vitro* sahá až do druhé poloviny 19. století a je často spojován se jménem německého rostlinného fyziologa Klebse, který studoval životní projevy jednotlivých buněk vláknitých řas izolovaných z vlákna plazmolytickou macerací. Klebs na konci 19. století roku 1887 vyslovil domněnku, že by se podobné pokusy snad mohly podařit i na materiálu z vyšších semenných rostlin. O pár let později roku 1893 doopravdy Rechanger uveřejnil výsledky pokusů s pěstováním fragmentů různých částí rostlin v umělých podmínkách a jako první použil živný roztok v kulturách *in vitro*. Ze svých pokusů učinil závěr, že fragment rostliny, k tomu, aby mohl dále růst v kultuře *in vitro*, musí mít elementy cévního svazku. Tento závěr vyvrátil na počátku 20. století uznávaný botanik G. Haberlandt, který dokazoval, že neexistuje spodní hranice velikosti fragmentu podmiňující růst v kultuře *in vitro* a že bude možné použít pro pokusy jedinou buňku. Dlouhodobě se mu kultury *in vitro* ale nepovedlo udržet, což bylo nejpravděpodobněji dáno vysokou diferenciací a specializací trvalých buněk, které použil Haberlandt ke svým pokusům a také skutečnost, že extrakty z rostlin nejsou vhodným prostředím pro kultury *in vitro* zvoleného rostlinného materiálu. První dlouhodobé kultury kořenových špiček klíčnic rostlin rajčete se podařily udržet Whiteovi (1934), který k živné půdě přidal kvasničný extrakt. White si na pokusy vybral kořenové špičky klíčnic rostlin rajčete a pasážováním udržel tyto kultury *in vitro* přes 7 let. Ve stejném roce se také Whiteovi, a nezávisle i francouzským badatelům Gatheretovi (1934) a Nobécourtovi (1937), podařilo úspěšně množit explantátové

kultury okrasných rostlin. Od této doby až po současnost byly a jsou prací tisíců badatelů na celém světě získávány nové a nové poznatky a je již jen málo rostlinných druhů, u kterých by nebyla explantace propracována. [41]

3.4.2 Základní principy

Explantátové kultury rostlin znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. Ve svém principu dojde k izolaci buněk, pletiv nebo orgánů ze sterilně napěstované, eventuálně povrchově sterilizované rostliny a následně k jejich kultivaci ve sterilních podmínkách řízeného prostředí (definovaná kultivační média, teplota, vlhkost, kvalita a kvantita světla). Ve sterilním prostředí je možno kultivovat jednotlivé buňky, protoplasty, části stonků, listů, kořenů, vegetační vrcholy, postranní pupeny anebo reprodukční části jako mikrospory, vajíčka, embrya, semena nebo spory. [41, 42]

3.4.2.1 Totipotence

Základem rostlinného organismu je zygota. Zygota vzniká splynutím vaječné buňky s buňkou spermatickou a obsahuje kompletní genetickou informaci. Ta se následně mitoticky dělí za vzniku dceřiných buněk, které se vyvíjejí, diferenciují a stávají se základním stavebním kamenem specializovaných pletiv. Vegetativní množení rostlin v explantátových kulturách je možné díky totipotenci, tedy schopnosti každé somatické buňky vytvořit jakýkoliv typ buňky organismu. Jinými slovy můžeme říct, že každá diferencovaná rostlinná buňka obsahuje veškerou genetickou informaci potřebnou pro vývin celého organismu. Fakt, že se daří rostlinu vegetativně množit, ukazuje, že diferencované rostlinné buňky nikterak nedegradují, ale naopak změnou kultivačních podmínek jsou schopny opětovné dediferenciace a následného mitotického dělení. Buňky diferencovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristematických, a tudíž v rostlinném organismu není totipotentní pouze zygota, ale také meristematická buňka a vlastně jakákoliv rostlinná buňka. Teoreticky můžeme pro odvození explantátové kultury použít jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem. [42, 43]

Každá somatická buňka je totipotentní a obsahuje kompletní genetickou výbavu celé rostliny a teoreticky by tedy měla explantátová kultura produkovat tytéž látky jako celá rostlina. Ale ta je diferencována a důsledkem toho je, že metabolismus sekundárních metabolitů probíhá pouze v určitém vývojovém cyklu nebo např. pouze ve specializovaném orgánu. Proto v jistých případech může docházet k nepříznivým situacím, kdy explantátová kultura neprodukuje metabolity žádné, nebo je produkuje pouze v nepatrném množství, nebo v důsledku mutací produkuje metabolit zcela odlišný. [5]

3.4.3 Typy explantátových kultur

Díky totipotenci rostlinné buňky je možné odvodit různé druhy explantátových kultur:

- **Orgánové kultury** – orgánové systémy, orgány nebo jejich části, které jsou pěstovány v podmínkách *in vitro* způsobem, který částečně zachovává jejich stavbu a funkci a umožňuje jejich diferenciaci.
- **Kultury tkáňové, resp. pletivové** – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy pletiva, pomnožované buď na polotuhých nebo pevných nosičích, nasycených živnou půdou nebo výjimečně v tekuté živné půdě.
- **Prašnikové kultury a kultury mikrospor** – izolované prašníky pěstované na pevném nebo v tekutém médiu.
- **Protoplastové kultury** – kultura buněk zbavených buněčných stěn (povrch protoplastů tvoří pouze cytoplazmatická membrána). Kultury jsou umístěny na pevné nebo tekuté médium. V kulturách protoplastů bylo dokázáno, že jsou schopny fúze, že jsou po regeneraci buněčné stěny schopné jaderného buněčného dělení, že mohou vytvářet kalusy a že v těchto kalusech je možné dosáhnout morfogeneze a regenerace celé rostliny.
- **Buněčné kultury** – volné jednotlivé a identifikovatelné buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté nebo polotekuté živné půdě nebo i na nosiči nasyceném živnou půdou.
- **Kalusové a suspenzní kultury** – tyto kultury byly použity v mé experimentální práci a podrobně se jim věnuji v následujících kapitolách. [42, 43]

3.4.3.1 Kalusové kultury

Kalusem se rozumí koherentní amorfnní hmota málo organizovaných tenkostěnných parenchymatických buněk, která vzniká neorganizovaným množením buněk rostlinných. V intaktní rostlině může být tvorba kalusu indukována poraněním, přítomností hmyzu, eventuálně mikroorganismů, nebo stresem. Jinak je tomu v podmínkách *in vitro*, kdy se kalus začne tvořit, pokud umístíme rozřezané kousky z poraněných sterilních částí rostlin (explantát) do média s obsahem regulátorů růstu ve vhodných poměrech a koncentracích. Buňky trvalých pletiv explantátu izolované z intaktní rostliny a přenesené do kontaktu s kultivačním médiem se po určité adaptační fázi začnou dělit. Aitchinson a kolektiv (1977) popisují tři stádia vývoje kalusového pletiva: (1) indukci růstu, (2) začátek buněčného dělení a (3) cytodiferenciaci. [5, 44, 45]

Během prvního stádia vývoje kalusového pletiva dochází ke změnám vnitřního metabolismu, a to zejména ke změnám syntézy DNA, RNA a proteinů. Výsledkem je tzv. proces dediferenciace, tedy proces, při němž se diferencované buňky navracejí do meristemického stavu, vytvářejí neorganizovaný kalus a následně se obnovuje jejich buněčné dělení. Druhé – proliferační stádium je charakterizováno mitotickým dělením. Bohužel ne všechny buňky explantátu reagují na nové prostředí kultury *in vitro* stejnou odezvou. Mitotické dělení je omezeno především na povrchové buněčné vrstvy, zatímco centrální zóny se nedělí. Mitotická aktivita je totiž podmíněna řadou faktorů, jako je reakce na poranění, anaerobní prostředí, zvýšená dostupnost živin nebo vliv světla na povrchové vrstvy explantátu. V posledním stádiu cytodiferenciace se v kalusovém pletivu postupně diferencují orgány (kořeny, prýty, somatická embrya), dochází ke tvorbě tracheálních elementů, sítkových elementů, suberinizovaných buněk, žláznatých buněk a trichomů a začínají probíhat reakce drah sekundárního metabolismu. [45]

Z hlediska schopnosti zpětné diferenciace v organizovanou strukturu musíme na kalus nahlížet jako na heterogenní systém. I když můžeme všechny buňky kultury *in vitro* obsahující funkční jádro považovat za totipotentní, ne všechny jsou morfogeneticky kompetentní. Totipotence se v průběhu ontogeneze potlačuje, a tak pouze některé buňky neorganizovaného kalusu reagují na morfogenní signál, který determinuje jejich růst a diferenciaci v organizovanou strukturu. Jak jsem již zmiňovala, kombinace růstových regulátorů a jejich koncentrační poměr v kultivačním médiu jsou rozhodující z hlediska růstu a diferenciaci buněk, pletiv a orgánů *in vitro*. Zejména u dvouděložných rostlin je

obecným pravidlem, že vysoká koncentrace auxinu a nízká koncentrace cytokininu v médiu podmiňují proliferaci neorganizovaného kalusu, zatímco opačný poměr působí na indukci regenerace pupenů a prýtů. [45]

Kalusové kultury se od sebe mohou lišit barvou, strukturou a také tvarem. Zbarvení mají často bílé, krémové, zelené, ale například i fialové, pokud dojde k akumulaci anthokyanů ve vakuolách. Liší se i strukturou. Rozeznáváme jak kultury, které jsou tvořeny poměrně tvrdými kompaktními a velkými shluky buněk, tak i kultury, kde buňky tvoří měkké rozpadavé, malé skupiny. Tvar mohou mít téměř sférický, nebo naopak výrazně protáhlý. [46]

U většiny dvouděložných bylin je možné odvodit kalus z různých explantátů, jako např. ze segmentu listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, vzrostných vrcholů, embryí atd... U jednoděložných bylin je možné použít pouze embrya, velmi mladé listy, nodální segmenty stonků, nebo květní základy. Nejvíce problematické je odvodit kalus u dřevin. [43]

3.4.3.2 Suspenzní kultury

Buněčné suspenzní kultury rostlin představují relativně homogenní populaci buněk, nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu. Pro její získání je většinou nezbytné odvodit kalusové pletivo, a to nejlépe rozpadavé, od kterého se suspenze odvozuje snadněji než od kompaktního. Kousky kalusu jsou následně kultivovány v tekutém médiu na třepače nebo rolleru a kalus se rozpadne na směs různě velkých shluků buněk a následně na jednotlivé buňky. Protože mají buňky přirozenou tendenci se spojovat, je prakticky nemožné získat suspenzi tvořenou jen oddělenými jednotlivými buňkami. Použitím relativně vysoké koncentrace auxinu a nízké koncentrace cytokininu v médiu ale můžeme disperzitu buněk zvýšit. Další možností je pravidelné filtrování rostoucí kultury přes sítko o známé velikosti pórů. [43]

Ke kultivaci suspenzních kultur se používají pohybující se tekutá živná média, která zabezpečují jednak rovnoměrný přístup živin k jednotlivým buňkám, tak i řádnou výměnu dýchacích plynů. Další výhodnou vlastností pohybujícího se média je napomáhání rozpadu buněčných shluků, které vznikají při dělení buněk. [43]

Nejčastěji se suspenzní kultury kultivují v Erlenmeyerových baňkách (100–150 ml), které se naplní médiem z jedné pětiny, nebo jedné čtvrtiny a umístí na roller nebo třepačku. Roller je přístroj, který kultivační nádoby otáčí v šikmé rovině za poměrně malé rychlosti 1–10 otáček za minutu. Kultivační nádoby mohou být speciálně upraveny tak, aby napomáhali mechanické separaci buněk. Nejčastěji se jedná o různé výstupky. Třepačka baňkami pohybuje v horizontální rovině vyšší rychlostí, a to přibližně 30–150 otáček za minutu při amplitudě výkyvu 2–5 cm. Ke kontinuálním kultivacím se využívají různé typy bioreaktorů, v nichž se pohyb média uskutečňuje buď míchadlem, nebo probubláváním sterilního vzduchu. Ty nejmodernější dokonce automaticky zajišťují stálé složení živného roztoku, jeho pH, nebo hustotu buněčné suspenze. [43]

Ideální buněčná suspenze je morfologicky a biochemicky homogenní. Poměrně často u suspenzních kultur však dochází ke genetickým změnám, které vedou k heterogenitě kultury. Ve starší buněčné suspenzi je pak možné pozorovat malé meristemické buňky, které tvoří drobné nebo větší agregáty a protáhlé vakuolizované buňky, které ztratily schopnost se dělit. [43]

3.4.3.2.1 Růstová křivka suspenzních kultur

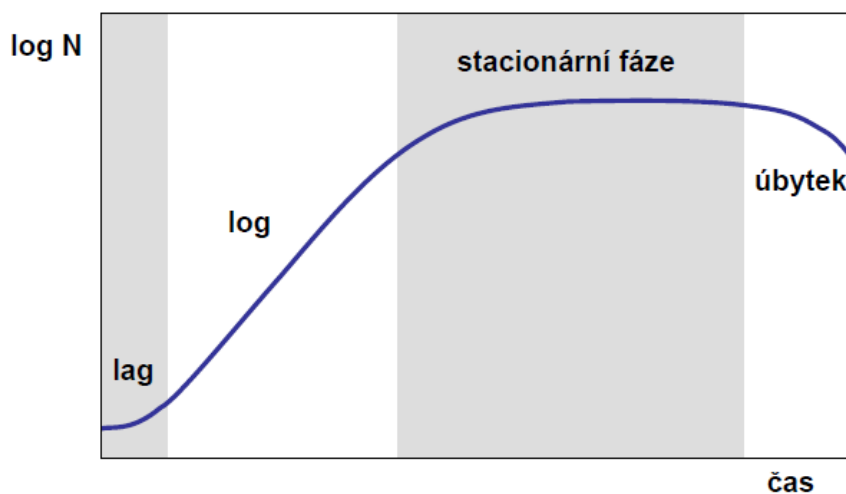
Růst buněčné suspenze lze charakterizovat pomocí tzv. růstové křivky. Graficky růstová křivka znázorňuje závislost některé z růstových charakteristik suspenze (PCV – packed cell volume, čerstvá hmotnost, počet buněk, sušina) na čase. Buněčná suspenzní kultura oproti kalusové kultuře roste o poznání rychleji, ale zároveň tyto rychle rostoucí buňky odčerpávají živiny z kultivačního média. Z této skutečnosti můžeme vyvodit, že se buňky v kultuře nejprve množí přibližně exponenciálně, až do okamžiku, kdy se v důsledku kontaktní inhibice začne růst buněk zpomalovat. [43] [47]

Konkrétně rozeznáváme tyto fáze růstu buněčné suspenze:

1. **Lag – fáze** – jedná se o počáteční fázi, ve které počet buněk těsně po naočkování nejprve mírně klesá a pak poměrně rychle vzrůstá. Buňky se adaptují na kultivační prostředí a připravují se k buněčnému dělení.
2. **Log – fáze** – tato fáze, též někdy nazývaná exponenciální nebo logaritmická, je charakteristická velmi intenzivním exponenciálním nárůstem buněk. Buňky se aktivně dělí a v ideálním případě se buňky pěstují právě v této fázi. Krátce před

dosažením stacionární fáze se kultura naředí a pasáže se nejlépe v takové hustotě, aby opět rostla exponenciálně.

3. **Stacionární fáze** – v tomto stádiu dochází k poklesu růstu. Růst buněk je limitován nedostatkem živin, které byly vyčerpány z média v průběhu exponenciálního růstu.
4. **Fáze úbytku buněk** – dochází k postupnému odumírání buněk, snížení pH a hromadění toxických produktů buněčného metabolismu. [43] [47]



Obr. č. 6. Růstová křivka suspenzních kultur [48]

Délka doby mezi založením buněčné kultury a stacionární fází závisí na několika faktorech, a to na počáteční hustotě suspenze, době trvání lag fáze a růstové rychlosti buněčné linie. Pokud je počáteční hustota suspenze malá, je množení buněk výrazně pomalejší, nebo dokonce mohou buňky zaniknout. Normálně se buňky totiž v kultuře vzájemně ovlivňují a produkují růstové faktory, je-li buněk ale málo, koncentrace růstových faktorů není dostačující a množení buněk se zpomalí nebo dokonce zastaví. Tento problém může řešit tzv. kondicionované médium, kdy růst buněčné suspenze o malé počáteční hustotě lze stimulovat jejím „kontaktem“ s kulturou o vysoké hustotě buněk. [43] [47]

3.4.4 Pasážování

Přenos explantátu z jednoho média na médium čerstvé se označuje jako pasážování. Tento interval je závislý na podmínkách kultivace, typu explantátu a rostlinném druhu a bývá obvykle 4 až 5 týdnů. Pasážování se provádí pravidelně a jeho cílem je přenést explantát do nového prostředí zbaveného rostlinných exkretů, které explantát naprodukoval a které by mohly negativně ovlivnit jeho další růst. [49]

3.4.5 Zařízení laboratoře explantátových kultur

V typické laboratoři nalezneme mimo prostoru určeného k mytí skla a skladovacího prostoru řadu dalších základních zařízení. Jednou ze zásadních podmínek úspěšné kultivace explantátových kultur je zajištění sterility po celý průběh kultivace, a proto by měla být laboratoř přizpůsobena k aseptické práci. V laboratoři nalezneme jak prostor vhodný pro aseptickou manipulaci se sterilní kulturou, tak prostor vhodný k přípravě a sterilizaci médií. K aseptické práci lze použít aseptický box s laminárním prouděním, nebo jednoduchý box opatřený germicidní zářivkou, který je dostatečný k očkování malého množství explantátů. Aseptický box by měl být opatřen HEPA filtrem, což je typ vzduchového filtru tvořený hustou sítí skleněných vláken, který je schopný ze vzduchu zachytit nečistoty o velikosti 300 nm s 99,97–99,99% účinností. Další důležitou částí laboratoře je místnost určená ke kultivaci, která musí mít regulovatelnou teplotu, vlhkost vzduchu, osvětlení a programovatelnou délku periody. Alternativou je speciální box s řízenými kultivačními podmínkami. [43]

3.4.5.1 Sterilizační metody

Jak je již uvedeno v předešlém odstavci, základní podmínkou úspěšné kultivace je zajištění sterility po celý její průběh. Prostředí aseptického boxu nebo kultivační místnosti je nejlepší sterilizovat pomocí ultrafialového záření nejčastěji germicidními zářivkami a doba, po kterou je nezbytné místnost sterilizovat, je dána její velikostí. Nutné je sterilizovat i nástroje a použité sklo. Kovové nástroje a sklo se nejčastěji sterilizují zabalené, např. do alobalu pomocí horkovzdušných sterilizátorů. Plastikové uzávěry, filtry, sklo, a především média se sterilizují zejména horkou parou za zvýšeného tlaku v autoklávu při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa nejčastěji po dobu 15–20 minut. [43]

Doba sterilizace u médií je závislá na objemu roztoku v jednotlivých nádobách, a proto je výhodnější rozlít médium do více nádob o menších objemech a sterilizovat tak médium kratší dobu. Některé složky médií jsou však velmi termolabilní a není je možné sterilizovat autoklávováním. Proto je nutné je sterilizovat pomocí speciálních membránových filtrů o velikosti pórů 0,22 mikrometru. Mezi tyto látky patří např. proteiny, některé cukry (fruktóza, glukóza), gibbereliny, některé vitamíny (kyselina listová, riboflavin), močovina, aminokyseliny (asparagin), anebo enzymy používané k izolaci protoplastů. K filtraci je možné použít jednorázové sterilní filtry. Přes tyto filtry se roztok protlačuje injekční stříkačkou nebo pomocí složitějšího filtračního zařízení napojeného na vývěvu. [42, 43]

Odvození sterilní primární kultury je spojeno s povrchovou dezinfekcí explantátu. Ke sterilizaci rostlinného materiálu se používají dezinfekční roztoky, protože není možné použít vysokých teplot. Nejprve se opláchne explantát v roztoku detergentu, který také zvyšuje účinek dezinfekčních činidel díky zvýšení smáčivosti povrchu explantátu, omyje se vodou a ponoří se do dezinfekčního roztoku. Je nutné použít takový roztok, který zničí plísňe a bakterie, ale na druhou stranu nepoškodí rostlinná pletiva. Nejpoužívanějšími dezinfekčními činidly jsou chlórové vápno, 10–15% roztok SAVO Super a roztok Chloraminu B. Dále se používá ethanol, dusičnan stříbrný, chlorid rtuťnatý nebo peroxid vodíku. Nakonec se explantát nejméně 3x opláchne ve sterilní destilované vodě. V případě, že ani opakovaná sterilizace nevede k odvození sterilní kultury, je možné aplikovat antibiotika buď na povrch explantátu, nebo se přidávají do kultivačních médií. Vzhledem k jejich toxicitě je nutné jejich použití snížit na minimum. [43]

3.4.6 Kultivační média

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin je složení kultivačního média. Jednoduché živné půdy pro rostlinné tkáně mají také svůj praktický a teoretický význam, ale mohou být použity pouze během prvních kultivačních fází a nezabezpečují trvalý růst a vývoj explantátu. K dosažení tohoto cíle musí být použito složitějšího média obsahujícího kromě minerálních solí a cukrů i rozličné organické látky. Optimální podmínky kultivace se pro každou kulturu mohou velmi výrazně lišit. Dnes jsou dokonce vyvíjena i speciální média podporující tvorbu žádaných sekundárních metabolitů. [5, 41, 43]

Existuje velké množství médií používaných pro různé druhy rostlin a pro různé účely kultivace a zpravidla jsou označovány jménem badatele, který půdu sestavil, použil a vyzkoušel první. Mezi nejčastěji používaná média patří média, která popsali badatelé White (1963), Murashige a Skoog (MS, 1962), Gamborg a kolektiv (B5, 1968), Gautheret (1942), Shenk a Hildebrant (SH, 1968), Nitsch a Nitsch (1969), anebo Lloyd a McCown (1981). MS médium, které sestavili badatelé Murashige a Skoog v roce 1962, patří k jedněm z nejvíce používaných. Bylo vyvinuto a poprvé aplikováno u explantátové kultury tabáku. Dnes má poměrně široké použití, podporuje organogenezi a regeneraci rostlin a používá se v orgánových, kalusových i suspenzních kulturách. Na rozdíl od dřívějších médií se vyznačuje vysokou koncentrací dusíku, draslíku a amonia. Gamborgovo B5 medium obsahuje na rozdíl od MS média menší množství dusíku, a zvláště amoniových solí. [41, 43, 50]

3.4.6.1 Složení kultivačního média

3.4.6.1.1 Makroelementy

Základní složku kultivačních médií tvoří makroelementy, které by měly být obsaženy v médiu v koncentraci přinejmenším 0,5 mM/l. Mezi makroelementy se řadí mimo uhlík (C), vodík (H) a kyslík (O) dalších 6 důležitých prvků – dusík (N), fosfor (P), draslík (K), vápník (Ca), hořčík (Mg) a síra (S). Všechny uvedené prvky jsou esenciální pro správný vývoj rostlinné buňky, ale jejich optimální koncentrace pro dosažení maximální růstové rychlosti je velmi závislá na rostlinném druhu. Dusík a síra hrají zásadní roli při syntéze proteinů a společně s fosforem také při syntéze nukleotidů. Nedostatek fosforu může vést k opožděnému růstu a tmavě zelené barvě listů. Hořčík podporuje integritu buněčné membrány, a také slouží jako enzymový kofaktor. Vápník podporuje syntézu buněčné stěny a draslík reguluje osmotický tlak buňky. [43, 46, 50]

Dusík je přidáván do média jak ve formě organické (aminokyseliny, organické kyseliny), tak ve formě anorganické (dusičnanové ionty, amonné ionty). Kultivační médium by mělo obsahovat přinejmenším 25–60 mM anorganického dusíku. Nitráty se přidávají do média obvykle v koncentraci 25–40 mM, amonium v koncentraci 2–20 mM, a to nejčastěji ve formě dusičnanu draselného a amonného. Optimální koncentrace ostatních prvků by se měla pohybovat v rozsahu 1–3 mM. [43]

3.4.6.1.2 Mikroelementy

Mezi mikroelementy nezbytné pro růst tkáňových kultur patří mangan (Mn), zinek (Zn), bór (B), železo (Fe), měď (Cu) a molybden (Mo). I když se do médií přidávají pouze v malých množstvích, jejich přítomnost je v médiu nezbytná. Mikronutrienty jsou zapotřebí ke správné funkci genetického aparátu, fotosyntézy a aktivitě růstových látek, proto jejich nedostatek může vést ke zpomalení růstu, chloróze listů nebo deformaci pletiv. Mangan je jedním z nejdůležitějších mikroelementů a je součástí většiny kultivačních médií. Obecně je do médií dodáván v podobné koncentraci jako železo a bór, tedy v koncentraci přibližně 25–150 μM . Jeho nejdůležitější role tkví pravděpodobně ve vymezení struktury metaloproteinů, které se účastní respirace a fotosyntézy. Je známo, že je zapotřebí také pro aktivitu několika enzymů. Zinek je součástí několika metaloenzymů. Rostliny s deficiencí zinku mají sníženou enzymovou aktivitu a následně sníženou syntézu proteinů, nukleových kyselin a chlorofylu, špatně vyvinuté chloroplasty, a také malé listy. Bór se podílí zejména na integritě a funkci plazmatické membrány. Jeho přítomnost je důležitá při syntéze fenolových kyselin, biosyntéze ligninu, a také je nezbytná pro udržení meristémové aktivity. Železo je do média přidáváno za přítomnosti kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), která má chelatační potenciál a vytváří s železem komplexní sloučeninu, a tak je dostupnost železa možná v širokém rozmezí pH. Samotné železo se nachází v médiu ve velmi malé koncentraci, protože se nemůže vyskytovat při nízkém pH. Do médií se také někdy dodává kobalt, jód, sodík a chlór, ale nemusí být pro explantátové kultury nezbytné. [43, 44, 46]

3.4.6.1.3 Zdroj uhlíku

Velmi významnou složkou kultivačního média je sacharóza, která slouží explantátovým kulturám hlavně jako zdroj uhlíku a energie. Většina rostlinných kultur není schopna efektivní fotosyntézy, ať už kvůli nedostatečnému vývinu buněk a tkání, nedostatku chlorofylu anebo nepatrné výměny plynů, a proto se sacharóza do médií dodává především z důvodu heterotrofní výživy explantátů, neboť jejich schopnost vyživovat se autotrofně je velmi omezena. Dále se sacharóza podílí na udržení osmotického potenciálu buňky. Během autoklávování se sacharóza přítomná v médiu částečně hydrolyzuje na glukózu a fruktózu, které jsou posléze rostlinným materiálem využívány k jejich růstu. Koncentrace sacharózy v kultivačním médiu je nejčastěji 2-3%. Tato koncentrace je sice výhodná pro rostlinný růst, ale na druhou stranu inhibuje syntézu chlorofylu. V některých

případech je možné sacharózu nahradit glukózou a fruktózou, nebo i jinými sacharidy jako jsou např. laktóza, galaktóza, rafinóza, maltóza nebo škrob. Sacharóza je však stále nejlepším zdrojem uhlíku, následována glukózou, maltózou a rafinózou. Nejméně vhodnými zdroji jsou manóza a laktóza. [43, 46]

3.4.6.1.4 Vitamíny

Vitamíny jsou organické látky potřebné jak k růstu a vývoji rostlin, tak jako katalyzátory řady metabolických procesů. Pro optimální růst explantátových kultur mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem. Mezi nejčastěji používané vitamíny v živných médiích patří thiamin (B1), kyselina nikotinová (B3), pyridoxin (B6), kyselina pantotenová (B5) a myoinositol. Dále se někdy používají vitamíny jako biotin (B7), kyselina listová, kyselina askorbová (C), riboflavin (B2), atd. Jejich přítomnost v médiích však většinou není nutná. Pro růst tkáňových kultur je nepostradatelný vitamin B1 – thiamin. Je součástí většiny médií a přidává se do média v koncentraci 0,1–10,0 mg/l ve formě thiamin pyrofosfátu. Thiamin je esenciální kofaktor v karbohydrátovém metabolismu a hraje důležitou roli při biosyntéze některých aminokyselin. Zajímavá je jeho interakce s cytokininy, kdy tato kombinace může podpořit růst některých druhů rostlin. Dalšími často přidávanými vitamíny jsou kyselina nikotinová a pyridoxin, nicméně jejich přítomnost v kultivačním médiu není nezbytná jako u thiaminu. Kyselina nikotinová se používá v koncentraci 0,1–5,0 mg/l, pyridoxin v koncentraci 0,1–10 mg/l. Ve většině kultivačních médií se vyskytuje také sacharid myoinositol, který může stimulovat růst explantátových kultur. Používá se v koncentraci 50–5000 mg/l. Tyto čtyři vitamíny – thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myoinositol jsou mimo jiné složkami MS média. [43, 44, 46]

3.4.6.1.5 Aminokyseliny

Aminokyseliny slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku anebo mohou být využívány k syntéze proteinů. Přestože jsou kultivované buňky schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, může přítomnost některých z nich podpořit jejich růst, a to zejména v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Dusík se dodává do živných médií nejčastěji ve směsi aminokyselin, jako je např. kasein hydrolyzát, který se přidává obvykle v koncentraci 0,05–0,1%. Dále se používají aminokyseliny: L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin. Koncentrace, která bude vést ke stimulaci růstu, závisí na

druhu aminokyseliny a je nutné si uvědomit, že vysoké koncentrace mohou naopak růst kultur inhibovat. [43]

3.4.6.1.6 *Nedefinované organické složky médií*

Růst explantátové kultury je možno podpořit i použitím nedefinovaných směsí, jako např. kasein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu z banánů nebo pomerančové či rajčatové šťávy. Vůbec první úspěšná kultivace byla provedena po přidavku kvasnicového extraktu. Dnes se nejčastěji používá kasein hydrolyzát v koncentraci 0,05–0,1% a kokosové mléko v koncentraci 5–20%. Použití těchto nedefinovaných směsí ale není optimální, právě z důvodu přesně neidentifikovatelného složení. Jak stimulační, tak inhibiční vliv na růst explantátů může mít i aktivní uhlí díky jeho absorpční schopnosti. Stimulační efekt je vysvětlován absorpcí toxických fenolických sloučenin produkovaných explantátem, inhibiční efekt naopak absorpcí růstových regulátorů obsažených v médiu. Používá se v koncentraci 0,5–0,1% a před použitím se propláchne kyselinou a zneutralizuje. Přidáním aktivního uhlí dojde zároveň ke ztmavnutí média. [43, 46]

3.4.6.1.7 *Látky používané pro zpevnění média*

Ke zpevnění média se nejčastěji používá agar, vysokomolekulární polysacharid s výbornou gelující schopností, který se vyrábí z červených mořských řas rodu *Floridiae* a *Gelidium*. Agar se do média nejčastěji přidává v koncentraci 0,8–1,0% a má oproti jiným látkám řadu výhod. Agarové gely jsou stabilní při teplotách používaných ke kultivaci, nereagují s ostatními složkami a nejsou rozkládány rostlinnými enzymy. Ke zpevnění média lze také použít agarózu, nebo syntetické rychle tuhnoucí a velmi čisté gely Phytigel a Gerlite. Další možnost zpevnění média je pomocí tzv. „můstků“ z filtračního papíru, polyuretanové pěny, čedičové vaty nebo perforovaného celofánu. [43]

3.4.6.2 Růstové regulátory

Velmi zásadní složkou kultivačního média jsou růstové regulátory, a to jak původní rostlinné hormony (fytohormony), tak i od nich odvozené syntetické analogy. Jednotlivé růstové regulátory jsou sice v médiích zastoupeny poměrně v malých množstvích, ale pro růst explantátu jsou zcela rozhodující. Řadíme je do pěti základních skupin, jmenovitě: auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová a ethylen. O charakteru růstu explantátové kultury však nerozhoduje pouze koncentrace jednotlivých hormonů, ale také jejich vzájemný poměr. Skoog a Miller jako první uvedli, že právě poměr auxinu a cytokininu určuje typ a rozsah organogeneze v rostlinných buňkách kultur. Tento poměr ale není obecný, závisí na druhu rostliny, kultivaru a explantátu, a proto existuje značná variabilita v typu a množství auxinu a cytokininu potřebných pro indukci morfogeneze. Nicméně gibbereliny, kyselina abscisová, ethylen a další růstové regulátory mají také v médiu důležitou roli a neměly by být opomíjeny. Tyto látky jsou ve tkáních rostliny syntetizovány dokonce více, ale mají spíše skrytou roli, protože zejména interagují s přidanými auxiny a cytokininy a společně pak ovlivňují vývoj a růst rostliny. Gibbereliny se přidávají do média především za účelem stimulace růstu buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, ke stimulaci růstu kalusu a ke stimulaci růstu zakrslých rostlin. Kyselina abscisová se dodává do média, v závislosti na rostlinném druhu, za účelem stimulace i inhibice růstu kalusu nebo ke stimulaci proliferace prýtlů a k inhibici pozdějších fází embryogeneze. [43, 51]

Vedle klasických fytohormonů byly objeveny ještě syntetické látky s regulační rolí ve tkáňových kulturách, jako např. polyaminy, jasmonáty, brassinosteroidy, oligosachariny, steroly, fosfoinositidy, kyselina salicylová nebo systeiny. Obvykle je požadováno, aby bylo v médiu použito dva nebo více regulátorů růstu z různých tříd, ať už současně nebo postupně. [51]

3.4.6.2.1 Auxiny

Auxiny mají výrazný vliv na růst buněk, acidifikaci buněčné stěny, iniciaci buněčného dělení a organizaci meristémů vedoucí buď k neorganizované tkáni (kalus) nebo k definovaným orgánům (kořeny). Dále podporují vaskulární diferenciaci. Nejčastěji přirozeně se vyskytujícím auxinem je kyselina indol-3-octová (IAA), ale v závislosti na druhu, stáří rostliny, období a podmínkách, ve kterých roste, byly identifikovány i další auxiny jako kyselina indol-3-máselná (IBA) nebo

kyselina 4-chlorindol-3-octová. Při hledání látek s růstově regulační aktivitou byla nalezena řada syntetických látek s účinky podobnými účinkům IAA. Tyto látky nazýváme syntetické auxiny a jejich společným znakem je aromatický kruhový systém, v jehož postranním řetězci je umístěna karboxylová skupina. Mezi syntetické auxiny používané v tkáňových kulturách rostlin patří především kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D), kyselina 1-naftylacetová (NAA) a nebo kyselina 4-chlorfenoxycetová (4-CPA). Různé druhy auxinů mají rozdílnou fyziologickou aktivitu, pohybují se různou rychlostí pletivy, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jsou jiným způsobem metabolizovány. Jak jsem již uváděla, auxiny výrazně přispívají k iniciaci rychlého buněčného dělení, ale záleží i na jejich použité koncentraci a době používání. Při dlouhodobém používání, anebo jejich vysoké koncentraci (zejména 2,4-D) může naopak dojít k potlačení morfogenetické aktivity explantátů. [43, 51, 52]

3.4.6.2.2 Cytokininy

Cytokininy se přidávají do kultivačních médií zejména za účelem stimulace buněčného dělení a tvorby axilárních prýtlů. Mezi běžně používané cytokininy v kultivačních médiích patří především 6-benzylaminopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (IPA), kinetin a zeatin. Za nativní cytokiny jsou považovány zeatin a IPA, zatímco kinetin a BAP představují cytokininy syntetické. [43]

Buněčné dělení je tedy regulováno společnou aktivitou auxinů a cytokininů, z nichž oba ovlivňují různou fází buněčného cyklu. Auxiny ovlivňují replikaci DNA, zatímco cytokininy především mitózu. Proto je žádoucí, aby hladiny auxinů a cytokininů byly v kulturách pečlivě vyváženy a kontrolovány. Úpravou vzájemného poměru se pak může docílit i odlišné morfogenetické reakce v explantátové kultuře. Při vyšší koncentraci auxinů dojde k iniciaci tvorby kořenů, embryogenezi a iniciaci tvorby kalusu, naopak pokud je vyšší koncentrace cytokininů, je indukována tvorba adventivních, či axilárních prýtlů. [43, 51]

3.4.6.3 Příprava kultivačního média

Jak bylo uvedeno v předešlé kapitole, živné médium obsahuje makroelementy, mikroelementy, vitamíny, cukry a vhodnou kombinaci regulátorů indukujících buněčné dělení buněk. Velmi často tato média obsahují velké množství složek o nízkých koncentracích, a proto se při navažování musí postupovat pečlivě a velmi přesně. Abychom předešli případnému zanesení chyb při navažování, využívá se při přípravě kultivačních médií zásobních roztoků jeho jednotlivých složek, nebo připravených koncentrátů médií. Tyto koncentráty jsou dodávány v kapalném nebo pevném skupenství a v čas potřeby se rozpustí ve vodě na požadovanou koncentraci. Zásobní roztoky se většinou připravují 10x–100x koncentrované. V dalším kroku se do média přidají požadované růstové regulátory, vitamíny nebo sacharóza. Voda používaná k přípravě médií musí být vysoké kvality a čistoty. Používá se voda destilovaná nebo demineralizovaná, pro přípravu médií ve výzkumu dokonce redestilovaná. [43]

3.4.7 Výhody a využití explantátových kultur

Vyšší rostliny jsou nejen nepostradatelným zdrojem potravin, dřeva, vláknin a olejů, ale také jsou zdrojem velkého množství přírodních látek, které mají dnes nezastupitelnou roli v medicíně, kosmetice nebo v potravinářství. Bohužel velké množství těchto látek nejsme schopni získat ekonomicky výhodnou organickou syntézou a jejich výroba pomocí genového inženýrství v mikrobiálních systémech není zatím řešitelná, protože vznikají mnohostupňovými biosyntézami. A tak jejich jediným zdrojem zůstávají stále jenom rostliny. Přisun těchto přírodních surovin se však zajišťuje stále obtížněji. Důvodem je zejména drastické zmenšování rostlinných zdrojů, způsobené zabíráním půdy pro nezemědělské účely a narušováním životního prostředí. Ceny surovin proto vzrůstají a současně stoupají nároky, zejména farmaceutického průmyslu. Sběr divoce rostoucích léčivých rostlin i jejich polní pěstování je značně sezónní záležitostí, jeho výtěžnost závisí na mnoha činitelích a nelze je příliš zvyšovat. Často se jedná o rostliny, jejichž pěstování může být ohroženo klimatickými vlivy, hmyzem nebo bakteriálními nákazami. [5]

Pro biotechnologické využití biomasy získané pěstováním explantátových kultur přichází v úvahu především **produkce různých průmyslově využitelných sloučenin**, jako jsou enzymy, aminokyseliny, a především sekundární metabolity. Ve srovnání se získáváním těchto látek z intaktních rostlin má jejich produkce rostlinnými buňkami *in vitro* některé přednosti:

- Užitečné sloučeniny mohou být produkovány za řízených podmínek nezávisle na půdním fondu a klimatických změnách.
- Kultivované buňky jsou prosté mikroorganismů i hmyzu, které napadají rostliny.
- Mohou být pěstovány buňky rostlin libovolného původu, a to kontinuálně po celý rok.
- Ke zvýšení produkce žádaných látek lze využít metod selekce na buněčné úrovni.
- Získaný materiál dosahuje uniformity, jaké nelze v přírodních podmínkách nikdy dosáhnout.
- Kultury buněk mohou produkovat i sloučeniny, které se v rostlině nevyskytují. Tak byly např. nalezeny nové látky s antimikrobiální aktivitou nebo nový inhibitor proteas. Často jde o sloučeniny zatím neznámé struktury a s neznámou biologickou aktivitou. [5]

Za nejslibnější oblast biotechnologického využití kultur rostlinných buněk se považují jimi prováděné **biotransformace** různých sloučenin na užitečné látky. Na rozdíl od biosyntézy, při které dochází k výstavbě celé struktury *de novo*, týká se biotransformace pouze části molekuly, zatímco její větší část zůstává nezměněna. Pro biotransformace lze využít jako výchozí substráty látky, které se běžně v rodičovské rostlině vyskytují, i sekundární metabolity jiných rostlinných druhů, i sloučeniny syntetické. Jako příklad úspěšné biotransformace je uváděna hydroxylace β -methyldigoxinu v poloze 12 β za vzniku komerčně zajímavého β -methyldigitoxinu pomocí buněk *durmanu*. [5]

Vedle produkce a transformace různých látek lze možnost klonování populací rostlinných buněk využít i ve **šlechtění, množení a ozdravování rostlinných materiálů**. [5]

Dále explantátové kultury nacházejí stále větší **uplatnění v zemědělské praxi** a stávají se postupně neoddelitelnou součástí moderních zemědělských technologií.

Jejich využití v zemědělství je možné především v následujících oblastech:

- Ozdravování rostlin a produkce bezvirózního rostlinného materiálu.
- Masová produkce geneticky identického materiálu cestou mikropropagace.
- Rychlé namnožení nově vyšlechtěných odrůd.
- Uchovávání genobanky jednotlivých druhů, kultivarů atd.
- Produkce haploidních rostlin jako výchozího materiálu pro šlechtitelské programy. [43]

3.5 Zvýšení produkce sekundárních metabolitů

Explantátové kultury rostlin lze s výhodami využívat k produkci požadovaných sekundárních metabolitů, ale bohužel, až na výjimky, charakteristickým problémem kultivace rostlinných explantátů *in vitro* je jejich nízká produkce. Pro průmyslové využití explantátových kultur jako nového zdroje sekundárních metabolitů je třeba, aby jejich produkce byla ekonomičtější než tradiční postupy získávání těchto látek. Zatím není ucelený postup, jak optimalizovat procesy a docílit tak vyššího zisku sekundárních metabolitů, byly však vypracovány metody, které jsou použitelné u většiny explantátových kultur. [1, 53]

Ve své diplomové práci jsem zvyšovala produkci sekundárního metabolitu podofylotoxinu pomocí elicitoru, konkrétně chitosanu. Elicitory jsou látky se signálním účinkem, které působí jako stresové faktory – spouští obrannou odpověď exponovaných buněk. Metoda, která využívá elicitory za účelem zvýšení produkce sekundárních látek se nazývá elicítace. V následující kapitole se této problematice budu věnovat podrobněji. [6, 53]

3.5.1 Elicitace

Elicitace je jedna z nejefektivnějších technik používaných v současné době pro zlepšení biotechnologické produkce sekundárních metabolitů. Elicitací vyvolaný stres aktivuje obranné reakce rostliny či rostlinného explantátu, které vedou, mimo jiné, ke změně transkripce genů kódujících enzymy ovlivňující biosyntézu sekundárních metabolitů. [1]

3.5.1.1 Elicitory

Elicitory mohou být definovány jako látky, které stojí na počátku všech obranných reakcí jako spouštěcí faktory. Pokud jsou aplikovány do živého organismu v malém až stopovém množství, mohou indukovat nebo zlepšovat biosyntézu specifických látek, které mají důležitou roli při přizpůsobování se rostliny stresovým podmínkám. [1, 54]

Dle původu se elicitory dělí na dva typy: abiotické a biotické. K abiotickým elicitorům se řadí látky nebiologického původu, které se dále mohou dělit na fyzikální faktory a různé chemické látky. Biotické elicitory jsou naopak látky biologického původu, které zahrnují jak mikroorganismy, fytohormony, tak např. polysacharidy pocházející ze stěn rostlinných buněk jako chitin, chitosan, pektin, glukany, anebo celulózu. [54]

3.5.1.1.1 Abiotické elicitory

Jak již bylo zmíněno výše, abiotické elicitory se dále člení na fyzikální a chemické elicitory, které mají širokou škálu účinků na rostliny a jejich produkci sekundárních metabolitů. [54]

FYZIKÁLNÍ ELICITORY:

- **Světlo** je fyzikální faktor, který může ovlivnit produkci žádaných metabolitů. Může např. povzbuzovat produkci gingerolu nebo zingiberenu v kalusové kultuře *Zingiber officinale*. Dalším příkladem může být zvýšená produkce anthokyanů po ozařování suspenzní kultury *Perilla frutescens*. Ultrafialové (UV) záření také může v některých případech zvyšovat produkci sekundárních metabolitů. Například rostliny *Catharanthus roseus* vystavené UV-B světlu vykazují významné zvýšení produkce vinblastinu a vinkristinu, které se ukázaly jako účinné při léčbě leukémie a lymfomu. UV-C světlo společně s methyljasmonátem nebo kyselinou salicylovou jsou používány k podpoře produkce stilbenu v buněčných kulturách *Vitis vinifera*. [54]
- **Osmotický stres** je dalším důležitým abiotickým fyzikálním elicitem, který může vést ke změnám fyziologických a biochemických vlastností rostlin a zvýšit tak koncentraci sekundárních metabolitů. Jako příklady lze uvést prolin, polyethylenglykol (PEG) nebo sacharózu. Sacharóza je typickým osmotickým stresovým činidlem používaným pro indukci vodního stresu v rostlinách,

a také slouží jako životně důležitý zdroj uhlíku a energie. Osmotická nerovnováha může například silně ovlivňovat syntézu hypericinu a hyperforinu v rostlinách *Hypericum perforatum*. [54]

- **Salinita** snižuje růst a vývoj rostlin a mění řadu fyziologických a metabolických procesů. Na základě dosavadních poznatků vystavení slanosti indukují nebo stimuluje produkci sekundárních metabolitů, jako jsou např. fenoly, terpeny nebo alkaloidy. Příkladem může být zvýšená syntéza vinblastinu a vinkristinu v embryogenní tkáňové kultuře *Catharanthus roseus* za použití chloridu sodného (NaCl) jako elicitoru. [54]
- **Sucho** je jedním z nejdůležitějších abiotických elictorů. Sucho může velmi snížit růst rostlin, ale naopak zvýšit obsah sekundárního metabolitu. Stres vyvolaný v důsledku mírného deficitu vody například zvýšil produkci kyseliny rosmarínové, ursolové a oleanolové v rostlině *Prunella vulgaris*. [54]
- **Teplné změny** mohou výrazně snížit růst rostlin a vyvolat stárnutí, ale jak zvýšené teploty, tak teploty nízké mohou zvýšit produkci sekundárního metabolitu. Jako příklad lze uvést buněčné kultury *Melastoma malabathricum*, které při nižších teplotách (20 ± 2 °C) rostly lépe a vykazovaly vyšší produkci anthokyanu, než kultury, které byly inkubovány při teplotách (26 ± 2 °C) a (29 ± 2 °C). [54]

CHEMICKÉ ELICITORY:

- **Kovy** se staly jedním z hlavních abiotických stresových činidel kvůli jejich rostoucímu využití v rozvíjejících se oblastech, jako je průmysl, agrotechnika a jejich vysoké akumulaci a toxicitě. Kovy jako nikl (Ni), stříbro (Ag), železo (Fe) a kobalt (Co) vyvolávají zvýšenou produkci sekundárních metabolitů u řady rostlin. Dále bylo prokázáno, že vápenaté (Ca^{2+}), stříbrné (Ag^+) a kadmennaté ionty (Cd^{2+}) mohou zvýšit produkci tropanových alkaloidů, skopolaminu a hyoscyaminu v kulturách *Brugmansia candida*. Z dalších můžeme jmenovat: dusičnan stříbrný (AgNO_3), měďnaté ionty (Cu^{2+}), manganaté ionty (Mn^{2+}), lanthan (La), nebo zinek (Zn). [54, 55]
- **Pesticidy a herbicidy.**

3.5.1.1.2 Biotické elicitory

Termín elicitor byl původně používán pro molekuly, které jsou schopny zvýšit produkci fytoalexinů, ale nyní se běžně vztahuje na sloučeniny, které stimulují jakýkoliv druh obrany rostlin. Tato širší definice zahrnuje jak látky patogenního původu (exogenní elicitory), tak sloučeniny, které produkuje rostlina po působení patogenu, tzv. endogenní elicitory. Exogenní biotické elicitory zahrnují sloučeniny uvolňované mikroorganismy, popřípadě jinými patogeny, a dále sloučeniny, které jsou tvořeny působením rostlinných enzymů v buněčné stěně. Jsou to například mikrobiální enzymy, houbové a mikrobiální lyzáty, kvasinkové extrakty a polysacharidy buněčných stěn (chitin, glukany). Endogenní biotické elicitory zahrnují intracelulární proteiny, malé molekuly syntetizované rostlinnou buňkou v odezvě na stres, zahrnující fytohormony jako methyljasmonát nebo kyselinu salicylovou. Obecně se rozdělují biotické elicitory na čtyři skupiny, a to konkrétně: fytohormony, elicitory odvozené z mikroorganismů, fragmenty stěn rostlinných buněk a ostatní elicitory. [53]

FYTOHORMONY

Ve studiích byly studovány různé rostlinné hormony, ale dnes jsou nejvíce využívány zejména kyselina jasmonová, kyselina salicylová a jejich deriváty.

- **Kyselina salicylová** je malá molekula, která hraje zásadní roli při tzv. získané systémové rezistenci (SAR, angl. systemic acquired resistance), která zajišťuje širokou rezistenci vůči patogenům. Bylo prokázáno, že při hypersenzitivní reakci se v rostlině zvyšuje koncentrace kyseliny salicylové v místě infekce. Signál se pak šíří do jiných částí rostlin, aby vyvolal širokou škálu obranných reakcí, včetně produkce sekundárních metabolitů, což je důvod, proč se kyselina salicylová využívá jako elicitor. Nejedná se o globální elicitor, ale indukuje produkci pouze některých tříd sekundárních metabolitů. Jako příklad lze uvést využití kyseliny salicylové jako elicitoru v koncentraci 20 mg/l k vyvolání produkce paklitaxelu u buněčné suspenze *Taxus chinensis*, kterou provedli Wand a kol. Účinek kyseliny salicylové byl prokázán i u jiných rostlinných druhů. U buněčných kultur *Linum album* byla produkce podofylotoxinu 3x vyšší po elicitaci kyselinou salicylovou, než u kontrolních kultur po 3 dnech. [53, 54]

- **Jasmonáty**, zahrnující kyselinu jasmonovou (JA) a derivát methyljasmonát (MeJA), jsou rodinou cyklopentanonových sloučenin. JA patří mezi velmi důležité fytohormony a její koncentrace v rostlinách se zvyšuje jako reakce na patogeny, škůdce či lokální stres. Je významným signálním činitelem při biotickém stresu rostlin a hraje významnou roli při aktivaci sebeobraného systému rostliny. Z toho důvodu se kyselina jasmonová a její aktivnější derivát methyljasmonát začali používat jako velmi efektivní elicitory, které mohou indukovat produkci široké škály sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách. Exogenně aplikovaný MeJa (100–200 μ M) u různých druhů buněčných kultur vedl ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů, zahrnující například terpenoidy, flavonoidy, alkaloidy nebo fenylypropanoidy. Zvýšenou akumulaci podofylotoxinu a 6-methoxypodofylotoxinu zaznamenali Van Fürden a kolektiv v suspenzních kulturách *Linum album* po elicitaci MeJa. Dalším příkladem elicitace MeJa je zvýšení produkce paklitaxelu u buněčných kultur *Taxus spp.* [53, 54, 56]

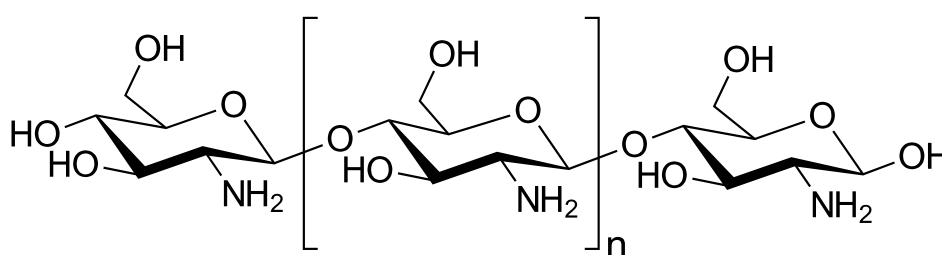
ELICITORY ODVOZENÉ Z MIKROORGANISMŮ

Mezi biotické elicitory patří i ty, které jsou odvozeny od samotného patogenu. Dnes jsou využívány zejména bakteriální, houbové a kvasnicové extrakty, a to často v komplexních biologických preparátech bez znalosti molekulární struktury jednotlivých složek. Příkladem bakteriálního extraktu může být extrakt bakterií *Staphylococcus aureus*, který zvýšil biosyntézu ginkgolidu a bilobalidu v suspenzní kultuře *Ginkgo biloba*. U několika druhů *Taxus sp.* po ošetření extraktem z hub, ať už samostatně nebo v kombinaci s jinými elicitory, došlo ke zvýšení produkce paklitaxelu a dalších taxanů. [53]

KOMPONENTY MIKROBIÁLNÍCH BUNĚČNÝCH STĚN

Elicitory odvozené z fragmentů mikrobiálních buněčných stěn jsou také důležitou skupinou látek zvyšující produkci sekundárních metabolitů. Patří sem látky jako pektin, algináty, chitin, chitosan a oligosachariny. Ve své práci jsem prováděla elicitaci pomocí chitosanu, a proto se mu budu věnovat v tomto odstavci podrobněji. [53]

- **Chitosan** (poly-D-glukosamin) patří mezi přírodní polymery typu polysacharidů. Chemicky se jedná o (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan. Molekula chitosanu má tři reaktivní centra, a to primární aminoskupinu a primární a sekundární hydroxyskupinu. Je odvozený od přírodního chitinu, druhého nejrozšířenějšího polysacharidu po celulóze. Získává se jeho alkalickou deacetylací, a to několikahodinovým varem s 50% hydroxidem sodným, nebo enzymaticky působením *N*-deacetylasy. V přírodě se vyskytuje pouze v malém množství u několika typů hub rodu *Aspergillus* a *Mucor*. [57]



Obr. č. 7. Struktura chitosanu [58]

Chitosan vykazuje celou řadu biologických aktivit. Vykazuje antibakteriální účinnost vůči mnoha grampozitivním i gramnegativním bakteriím a houbám při pH nižším než 6. Protinádorová účinnost chitosanu závisí na jeho molekulové hmotnosti, rozpustnosti a obsahu acetylových skupin. Vysokomolekulární je neúčinný, a proto je třeba připravit chitosan o nižší molekulové hmotnosti. Nízkomolekulární, částečně *N*-acetylovaný chitosan rozpustný ve vodě je také možné považovat za přírodní antioxidant. Chitosan má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní. Pro své výjimečné vlastnosti se tak používá v různých oborech zahrnujících především biomedicínu, kosmetiku, agrochemii, fyzikální chemii, konzervaci potravin, čištění vody nebo impregnaci textilií. V oblasti farmacie je jeho budoucnost především v roli biodegradabilního nosiče léčiv různých farmakologických skupin s možností jejich modifikace pro cílovou tkáň, odstranění některých nežádoucích vlastností léčiva a zvýšení biodostupnosti léčiva. Používá se také jako potravní doplněk pro snížení hladiny cholesterolu a redukci hmotnosti. [57]

Chitosan je také významným elicitorem, jehož aktivita byla studována již v několika experimentech. Mechanismus elicitačního účinku však dosud nebyl přesně objasněn. Nicméně odpovědi rostlinných buněk na chitosan vedou k uvedeným biochemickým změnám: poškození DNA, změnám chromatinu, zvýšení hladin H^+ a Ca^{2+} v cytosolu, aktivaci MAP-kináz (mitogenem aktivované proteinkinázy), oxidativnímu vzplanutí, apozici kalózy, zvýšení exprese genů pro pathogenesis related (PR) proteiny, akumulaci fytoalexinů, hypersenzitivní reakci a v některých případech k syntéze kyseliny jasmonové, kyseliny abscisové a akumulaci peroxidu. [59]

Účinnost polysacharidů, mezi něž patří i chitosan, jako aktivních elicitorů je závislá na struktuře molekuly. Obecně, polysacharidy s vysokým stupněm větvení jsou aktivnější než ty s nižším počtem postranních řetězců. V případě chitosanu je důležitý při indukci obranného metabolismu v *in vitro* kulturách jak stupeň acetylace, tak polymerace. Příkladem může být suspenzní kultura *Morinda citrifolia*. V tomto experimentu bylo zjištěno, že množství produkovaného antrachinonu rostlo v závislosti na stupni acetylace chitosanu. [60, 61]

Jak jsem zmiňovala výše, již bylo provedeno několik úspěšných pokusů, které dokazují pozitivní vliv chitosanu na produkci sekundárních metabolitů. Z úspěšně elicítovaných metabolitů můžeme jmenovat například:

- lignany (podofylotoxin, lariciresinol) - kultura *Linum album* [7]
- podofylotoxin – suspenzní kultura *Linum album* [8]
- fenylpropanoidové deriváty – kultura *Scrophularia striata* [62]
- paklitaxel – suspenzní kultura *Taxus chinensis* [63]
- antrachinony, fenoly, flavonoidy – kultura adventivních kořenů *Morinda citrifolia* [61]
- triterpenoidy – suspenzní kultura *Betula platyphylla* [9]
- mentol – kultura *Mentha piperita* [64]
- fenylpropanoidové deriváty – suspenzní kultura *Cocos nucifera* [65]
- artemisinin – kultura *Artemisia annua* [66]
- fenyletanoidové glykosidy – suspenzní kultura *Cistanche deserticola* [67]
- xantony – kalusová kultura *Hypericum perforatum* [68].

Nicméně jsou známy i neúspěšné pokusy o zvýšení produkce sekundárního metabolitu chitosanem. Příkladem může být snaha o zvýšení produkce silymarinu v kultuře *Sylibum marianum*. Zde ani jedna z použitých koncentrací chitosanu nevedla ke zvýšené akumulaci sekundárního metabolitu. Z výše uvedeného příkladu lze konstatovat, že funkce chitosanu jako elicitoru je druhově specifická. [9]

- **Oligosachariny** jsou oligosacharidy, které jsou tvořeny působením hydrolytických enzymů v buněčných stěnách rostlin nebo hub. Všechny tyto oligosacharidy působí jako elicitory. [53]

3.5.1.2 Mechanismus účinku

Většina biotických elicitorů je identifikována specifickými receptory plasmatické membrány. Tyto stimuly jsou dále přeneseny do buňky signálním transdukčním systémem, zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (tzv. druhých posílů, angl. *second messengers*). Přenos od aktivovaných receptorů v plasmatické membráně k DNA v jádře je možný více systémy:

- **Fosfoinozitolový systém.** Hydrolýzou membránového lipidu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) dojde ke vzniku dvou signálních sloučenin, a to konkrétně inositolu-1,4,5-trifosfátu (IP₃) a diacylglycerolu (DAG). DAG je lipofilní molekula, která zůstává v membráně a změnu fosforylace proteinů ovlivňuje přímo přes proteinkinázy. IP₃ působí za účasti dalších nosičů signálu, a to konkrétně vápníku a bílkoviny kalmodulinu a ovlivňuje kromě fosforylace proteinů posléze i expresi genů. [52]
- **Systém cAMP.** Změna struktury receptoru je pomocí guanosintrifosfát-vážího proteinu (G-proteinu) přenesena na enzym adenylátcyklázu. Adenylátcykláza přeměňuje adenosintrifosfát na cAMP. Nakonec cAMP působí změnu fosforylace proteinů přímo aktivací proteinkináz. [52]
- **Tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku** vyvolaná elicitory je velmi častým a neobyčejně rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese. Kromě možného přímého účinku peroxidu vodíku na expresi genů existuje ještě nepřímá cesta. Při nepřímé cestě peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmonová a metyljasmonát, a ty pak teprve ovlivňují transkripci. [52]

- **Systém tvorby ethylenu a další systémy** jsou zatím nedostatečně prozkoumané. [52]

3.5.1.3 Parametry elicitorů

3.5.1.3.1 *Specifita elicitoru*

V několika studiích bylo dokázáno, že jeden druh elicitoru může podpořit produkci sekundárního metabolitu u různých druhů explantátových kultur. Na druhou stranu u jednoho druhu kultury se můžeme setkat se zvýšenou produkcí sekundárních metabolitů vyvolanou rozdílnými druhy elicitorů. Obecným pravidlem je fakt, že produkce sekundárních metabolitů, které jsou specifické pro určitou kulturu, nejsou závislé na druhu elicitoru. [69]

3.5.1.3.2 *Koncentrace a doba působení elicitoru*

Použitá koncentrace je faktor, který výrazně ovlivňuje intenzitu odezvy, a efektivní dávku, která se liší u odlišných druhů rostlin, lze nalézt pouze empiricky. Bylo dokázáno, že koncentrace elicitoru, která stimulovala produkci u určitého rostlinného druhu, u jiného tuto aktivitu neprojevovala. Například u buněčných kultur *Rubia akane* (Nakai) elicitor chitosan vyvolal maximální produkci antrachinonů v koncentraci 20 mg/l, zatímco u kultur *Mentha piperita* a suspenzních kultur *Rubia tinctorum* byla optimální použitá koncentrace 200 mg/l. [69]

Obecně je elicitor v kontaktu se systémem až do sklizně, ale čas potřebný pro maximální produkci sekundárních metabolitů je charakteristický pro každý druh rostliny a odvíjí se od zvýšení aktivity jeho metabolických enzymů. Optimální doba působení elicitoru se opět stanovuje empiricky. [69]

3.5.1.3.3 *Podmínky pěstování kultury*

Mezi podmínky pěstování kultury můžeme zahrnout stádium růstu, složení živného média a osvětlení. Obvykle je v literatuře zastáván názor, že nejadekvátnější moment přidání elicitoru je během exponenciální fáze růstu, kdy je aktivita enzymů největší. Dalším důležitým faktorem je samotné složení živného média, a to konkrétně přítomnost regulátorů růstu v médiu, které mohou výrazně ovlivnit vyvolání sekundárního metabolismu. Příkladem mohou být kultivované buňky mrkve, které bez přítomnosti

auxinu na elicitaci nereagovaly. Neméně důležité jsou světelné podmínky, které také hrají významnou roli. Příkladem může být produkce hypericinu u kultury *Hypericum perforatum* L. po elicitaci kyselinou jasmonovou, kdy inkubace za tmy vykazovala vyšší růst buněk a produkci sekundárního metabolitu než za světla. [69]

Vzhledem k variabilitě odpovědí rostlin a rostlinných kultur na elitaci je důležitým aspektem této metody optimalizace složení média a všech ostatních podmínek pěstování rostlinné kultury. [69]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Pomůcky a přístrojové vybavení

Při experimentech byly použity následující přístroje:

- Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen
- Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, Žilina
- Centrifuga MPW 342, Mechanika precyzyjna, Varšava
- Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko
- Horkovzdušný sterilizátor HS 31 A, Chirana, Brno
- Chromatografická soustava JASCO 2000-Plus, Jasco, Tokyo
- Mikrofiltry (0,20 µm), Corning NY 14831, Německo
- Třepačka VKS 75A, Edmund Buehler GmbH, Hechingen
- Ultrazvuková lázeň RK 100H, Bandelin electronic GmbH, Berlín
- Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc ČR.

4.2 Kultivace explantátových kultur *Juniperus virginiana* L.

4.2.1 Rostlinný materiál

V diplomové práci byly k pokusům použity čtyřleté kalusové kultury *Juniperus virginiana* L., a to konkrétně variety Glauca a Hetzii. U variety Glauca byla pozorována produkce podofylotoxinu této kultury v 59. pasáži. U variety Hetzii byla pozorována produkce podofylotoxinu této kultury v 51. pasáži.

Suspenzní kultura *Juniperus virginiana* varieta Glauca byla odvozena od čtyřleté kalusové kultury. V diplomové práci byla sledována produkce podofylotoxinu ve 4. pasáži.

4.2.2 Kultivační nádoby a nástroje

Experimenty probíhaly za použití žáruvzdorného skla značky SIAL, které je navíc dostatečně odolné vůči chemikáliím. Kovové nástroje, které byly použity při práci s rostlinným materiálem, byly opláchnuté 96% etanolem a sterilizovány v hliníkové fólii horkovzdušným sterilizátorem po dobu 2 hodin a při teplotě 200 °C.

4.2.3 Složení kultivačního média

Explantátové kultury *Juniperus virginiana* byly kultivovány v kultivačním médiu dle Schenka a Hildebrandta (SH médium). [70]

Při přípravě kultivačního média SH byly použity následující chemikálie:

- makroelementy:
 - KNO_3 2 500,00 mg.l^{-1}
 - CaCl_2 151,00 mg.l^{-1}
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 195,00 mg.l^{-1}
 - $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 300,00 mg.l^{-1}
- mikroelementy:
 - KI 1,00 mg.l^{-1}
 - H_3BO_3 5,00 mg.l^{-1}
 - $\text{MnSO}_4 \text{H}_2\text{O}$ 10,00 mg.l^{-1}
 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,00 mg.l^{-1}
 - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,10 mg.l^{-1}
 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,20 mg.l^{-1}
 - $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,10 mg.l^{-1}
- železnatý komplex:
 - NaFeEDTA 19,80 mg.l^{-1}
- vitamíny:
 - kyselina nikotinová 5,00 mg.l^{-1}
 - pyridoxin chlorid 0,50 mg.l^{-1}
 - tiamin chlorid 5,00 mg.l^{-1}
- myoinositol 1000,00 mg.l^{-1}
- sacharóza 30 000,00 mg.l^{-1}

K takto složenému médiu byly přidány následující látky:

- kyselina α -naftyloctová 3,0 mg.l⁻¹
- kinetin 0,2 mg.l⁻¹
- kyselina askorbová 15,0 mg.l⁻¹

4.2.4 Příprava kultivačního média

Chemikálie, které byly potřeba k přípravě kultivačního média, byly vždy naváženy na analytických vahách anebo odpipetované ze zásobních roztoků. Takto připravené živné médium s dobře rozpuštěnými a smíchanými složkami bylo doplněno destilovanou vodou na objem 1 litr. Následně bylo toto médium po kompletním rozpuštění a řádném promíchání rozlito po 30 ml do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml, do nichž při kultivaci kalusových kultur byly předem vloženy můstky z filtračního papíru. Nakonec byla hrdla baněk překryta hliníkovou fólií. Všechny baňky byly sterilizovány v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku par 0,1 MPa.

4.2.5 Pasážování a kultivace kalusových a suspenzních kultur

Kalusové kultury byly získány pasážováním za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Box byl před samotným pasážováním sterilizován germicidním zářením. Vhodné části kalusu byly přeneseny pomocí pinzet na můstek z filtračního papíru, který byl umístěn v Erlenmeyerově baňce. Nakonec byla hrdla baněk překryta hliníkovou fólií. Kultivace probíhala po dobu 21 dnů v kultivační místnosti, ve které byla udržována teplota 25 °C a světelná perioda 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

Suspenzní kultury byly získány z rozpadavé kalusové kultury mechanickým roztřepáním na třepačce v Erlenmeyerově baňce s živným médiem. Pasážování kultur bylo prováděno odpipetováním části narostlé suspenze do předem připravených baněk s čerstvým médiem. Kultivace probíhala po dobu 14 dnů na rotační třepačce (115 otáček za minutu) v kultivační místnosti při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma.



Obr. č. 8. Kalusová kultura *Juniperus virginiana* var. *Glauca*



Obr. č. 9. Suspenzní kultura *Juniperus virginiana* var. *Glauca*

4.3 Elicitace

4.3.1 Příprava elicitoru

Jako elicitor byl použit chitosan, který byl získán alkalickou deacetylací (75 %) chitinu z krunýřů krevet *Pandalus borealis* (C3646, Sigma-Aldrich, USA).

Byly připraveny čtyři koncentrace roztoku chitosanu v 1% kyselině octové (naředěním z nejsilnější koncentrace). Roztok o koncentraci C₄ byl připraven navážením 1000 mg čisté látky a naředěním 1% roztokem kyseliny octové do 100 ml. Roztok o koncentraci C₃ byl získán naředěním 10 ml roztoku C₄ v odměrné baňce na 100 ml 1% roztokem kyseliny octové. Roztok o koncentraci C₂ byl získán naředěním 10 ml roztoku C₃ v odměrné baňce na 100 ml 1% roztokem kyseliny octové. Roztok o koncentraci C₁ byl získán naředěním 10 ml roztoku C₂ v odměrné baňce na 100 ml 1% roztokem kyseliny octové. Připravené roztoky byly vysterilizovány a uchovávány v lednici.

Tab. 1. Výsledné koncentrace roztoku chitosanu v 1% kyselině octové

	Koncentrace (g/100 ml)
C ₁	0,001 g/100 ml
C ₂	0,01 g/100 ml
C ₃	0,1 g/100 ml
C ₄	1,0 g/100 ml

4.3.2 Elicitace explantátových kultur *Juniperus virginiana* L.

Ke každému pokusu bylo použito 24 baňek s kalusovými nebo suspenzními kulturami. Práce probíhala za aseptických podmínek v laminárním boxu, který byl nejméně hodinu před započatou prací vysvícen germicidní zářivkou. K 16 baňkám se přidal 1 ml elicitoru příslušné koncentrace. Ke zbývajícím 8 baňkám se přidal 1 ml 1% roztoku kyseliny octové. Tyto baňky sloužily jako kontrolní vzorky. Hrdla baňek byla opět zakryta hliníkovou fólií a označila se počtem hodin, za který by měl být proveden odběr vzorků. Vždy 4 baňky s elicitem byly označeny pro odběr po 6 h, 24 h, 48 h a 168 h. 4 baňky bez elicitoru sloužící jako kontrola byly označeny pro odběr po 6 h a další 4 baňky byly označeny pro odběr po 168 h.

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

Po 6, 24, 48 a 168 hodinách byly buňky odděleny od média odsátím za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a usušeny za laboratorní teploty.

4.4 Stanovení obsahu podofylotoxinu

4.4.1 Příprava vzorku k analýze

Vysušený vzorek byl nejprve upráškován v třecí misce s tloučkem kvůli zvětšení povrchu materiálu a zlepšení extrakce. Rozetřený vzorek příslušné kultury a koncentrace elicitoru se zvažil na analytických vahách (cca 0,3000–0,5000 g) a kvantitativně převedl do odměrné baňky o objemu 10,0 ml, kde byl smísen s 10,0 ml metanolu (100%). Řádně označené baňky byly poté extrahovány v ultrazvukové lázni po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Posléze byl extrakt z baňky převeden do centrifugační zkumavky. Vzorky byly odstředovány po dobu 5 minut při 4500 otáčkách za minutu. Ze zkumavek byl pomocí injekční stříkačky odebrán supernatant a přeplněn přes mikrofiltr (0,20 µm) do vialek, které byly před analýzou HPLC uchovány v lednici. [72]

4.4.2 HPLC analýza vzorků

K analýze vzorků byla použita metoda HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), což je analytická separační metoda sloužící jak ke kvantitativnímu, tak kvalitativnímu stanovení. Obsah všech měřených látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky. [72]

Konkrétně byla použita sestava JASCO 2000-Plus s kolonou Lichrospher RP-18 (250 x 4 mm; velikost částic 5 µm) s ochrannou předkolonkou ze stejného materiálu. HPLC podmínky byly stanoveny následovně:

- hlavní vlnová délka – 280 nm
- referenční vlnové délky pro lepší identifikaci píku – 270 a 290 nm
- vstříkované objemy vzorků a standardu – 20 µl
- teplota při vyvíjení kolony – 25 °C

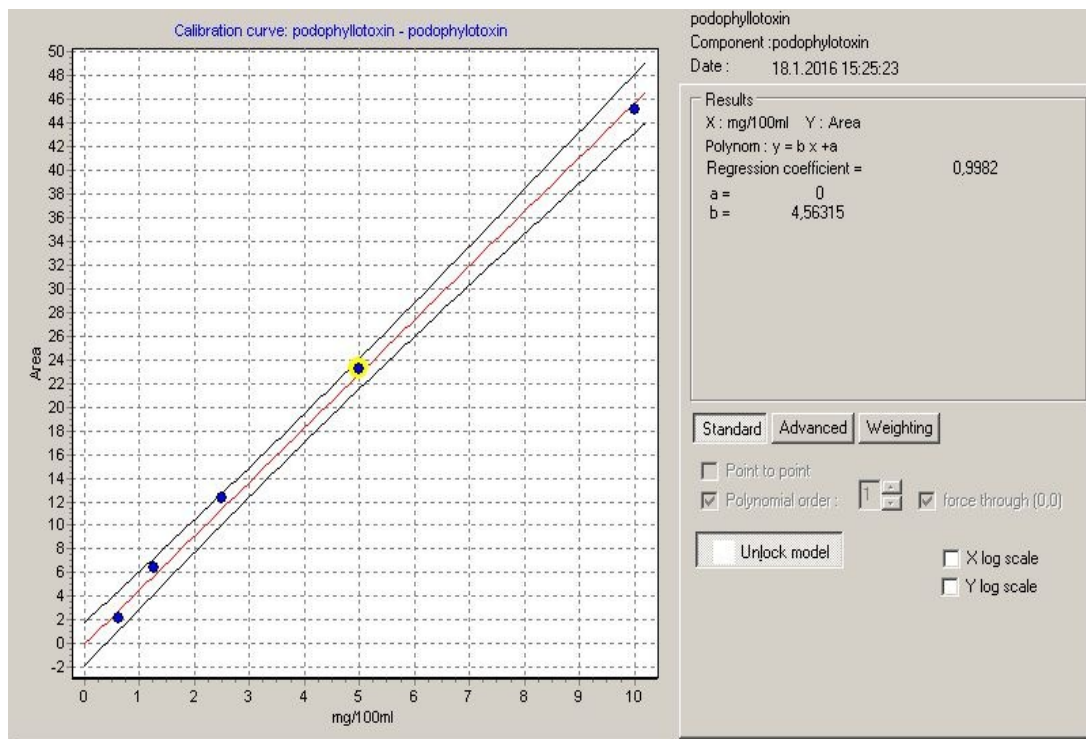
Mobilní fáze byla složena z:

- (A) metanol/voda/kyselina fosforečná (60:39,7:0,3; v/v/v)
- (B) metanol/kyselina fosforečná (99,7:0,3; v/v)

Eluční gradient byl navrhnutý následovně: 0-8 min, 0-80 %; 8-9 min, 80-100 %; 9-10 min, 100 %; 10-11 min, 100 %; 11-13 min, 0 % rozpouštědla B.

Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min.

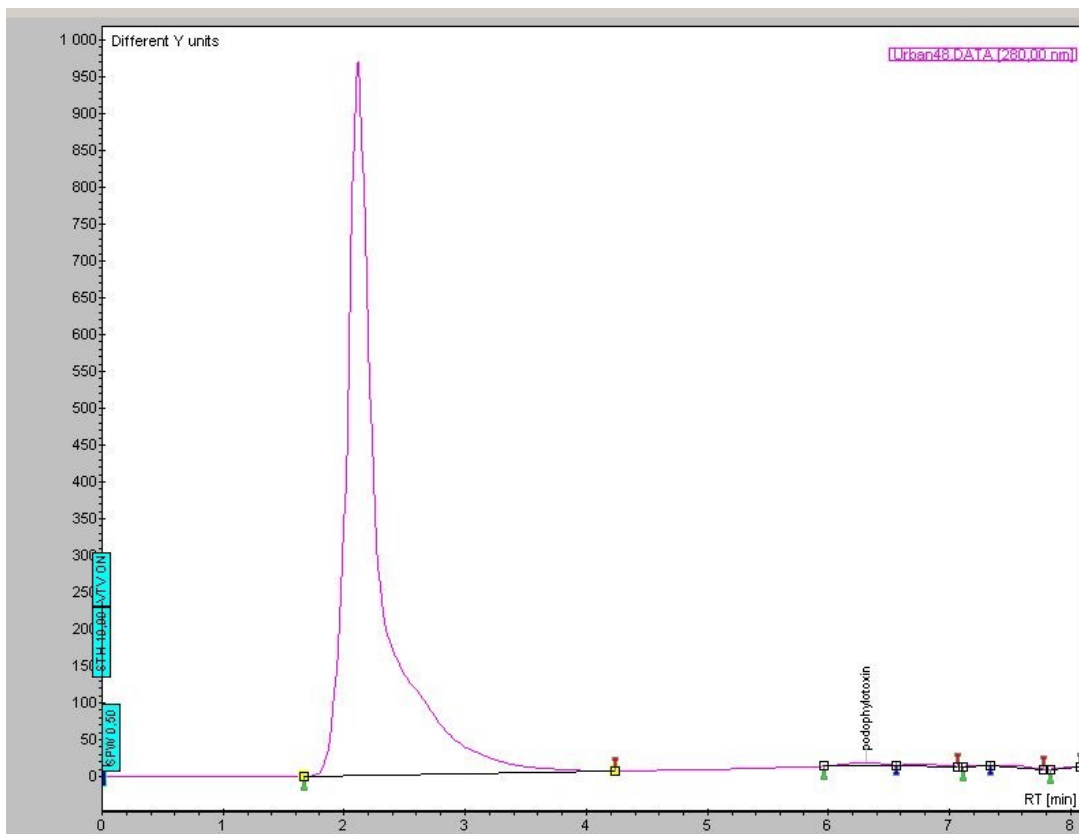
Pro stanovení podofylotoxinu byla vytvořena kalibrační křivka.



Obr. č. 10. Kalibrační křivka podofylotoxinu

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

- y = plocha
- x = koncentrace (mg/100ml)
- $a = 0$
- b = rozličné hodnoty dle konkrétního sekundárního metabolitu



Obr. č. 11. Příklad chromatografického záznamu elicitovaného vzorku

4.5 Statistické zpracování dat

Pro zpracování získaných hodnot byly použity vzorce na určení aritmetického průměru a směrodatné odchylky.

- **Aritmetický průměr:**

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

- \bar{x} = aritmetický průměr
- n = celkový počet hodnot
- x_i = naměřené hodnoty

- **Směrodatná odchylka:**

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

- s = směrodatná odchylka
- n – celkový počet hodnot
- x_i = naměřené hodnoty

Statistické zpracování naměřených hodnot obsahu podofylotoxinu v explantátových kulturách *Juniperus virginiana* L. bylo provedeno na základě T – testu (test významnosti rozdílu dvou průměrů), pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$.

- Testovací kritérium definuje tento vztah:

$$T = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

- T – testovací kritérium
 - x_1 – aritmetický průměr kontrolního souboru
 - x_2 – aritmetický průměr pokusného souboru
 - s_1 – směrodatná odchylka kontrolního souboru
 - s_2 – směrodatná odchylka pokusného souboru
 - n_1 – počet členů kontrolního souboru
 - n_2 – počet členů pokusného souboru
- Počet stupňů volnosti definuje tento vztah:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

- v – počet stupňů volnosti
- n_1 – počet členů kontrolního souboru
- n_2 – počet členů pokusného souboru

Počet členů kontrolního a pokusného souboru je $n_1 = n_2 = 2$, tudíž platí $v = 2$. Při daném počtu stupňů volnosti $v = 2$ a hladině významnosti $p = 0,05$ je kritická hodnota testovacího kritéria $t(v)_p = 3,182$. Statisticky významné jsou ty výsledky, u kterých je hodnota testovacího kritéria vyšší než kritická hodnota. [71]

Jako kontrolní hodnoty k výpočtu testovacího kritéria pro odběry po 6, 24 a 48 h byly využity hodnoty odběru v čase 6 h, protože v tak krátkých časových intervalech nejsou změny obsahu podofylotoxinu u neelicitované kultury významné. Kontrolní hodnota obsahu podofylotoxinu pro odběr 168 hodin byla stanovena.

5. VÝSLEDKY

5.1 Tabulky

Tab. 2. Vliv chitosanu na produkci podofylotoxinu v kalusové kultuře *Juniperus virginiana* (varieta Glauca)

Koncentrace elicitoru (g/100 ml)	Doba aplikace elicitoru (h)	ELICITACE		KONTROLA		T-test
		Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	
I 0,001	6	0,070	0,020	0,050	0,010	0,894
	24	0,210	0,025	0,050	0,010	5,942
	48	0,175	0,010	0,050	0,010	8,839
	168	0,155	0,005	0,015	0,005	19,799
II 0,01	6	0,100	0,020	0,050	0,010	2,236
	24	0,050	0,000	0,050	0,010	0,000
	48	0,070	0,000	0,050	0,010	2,000
	168	0,065	0,005	0,015	0,005	7,071
III 0,1	6	0,115	0,015	0,050	0,010	6,500
	24	0,060	0,000	0,050	0,010	1,000
	48	0,055	0,005	0,050	0,010	0,447
	168	0,055	0,005	0,015	0,005	5,657
IV 1	6	0,060	0,000	0,050	0,010	1,000
	24	0,055	0,005	0,050	0,010	0,447
	48	0,050	0,010	0,050	0,010	0,000
	168	0,020	0,000	0,015	0,005	1,000

Zvýrazněné hodnoty obsahu podofylotoxinu jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly; $p = 0,05$.

Tab. 3. Vliv chitosanu na produkci podofylotoxinu v kalusové kultuře *Juniperus virginiana* (varieta Hetzii)

Koncentrace elicitoru (g/100 ml)	Doba aplikace elicitoru (h)	ELICITACE		KONTROLA		T-test
		Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	
I 0,001	6	0,005	0,005	0,010	0,010	0,447
	24	0,000	0,000	0,010	0,010	1,000
	48	0,000	0,000	0,010	0,010	1,000
	168	0,030	0,000	0,005	0,005	5,000
II 0,01	6	0,015	0,005	0,010	0,010	0,447
	24	0,005	0,005	0,010	0,010	0,447
	48	0,000	0,000	0,010	0,010	1,000
	168	0,000	0,000	0,005	0,005	1,000
III 0,1	6	0,030	0,000	0,010	0,010	2,000
	24	0,015	0,005	0,010	0,010	0,447
	48	0,000	0,000	0,010	0,010	1,000
	168	0,000	0,000	0,005	0,005	1,000
IV 1	6	0,005	0,005	0,010	0,010	0,447
	24	0,000	0,000	0,010	0,010	1,000
	48	0,000	0,000	0,010	0,010	1,000
	168	0,000	0,000	0,005	0,005	1,000

Zvýrazněné hodnoty obsahu podofylotoxinu jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly; $p = 0,05$.

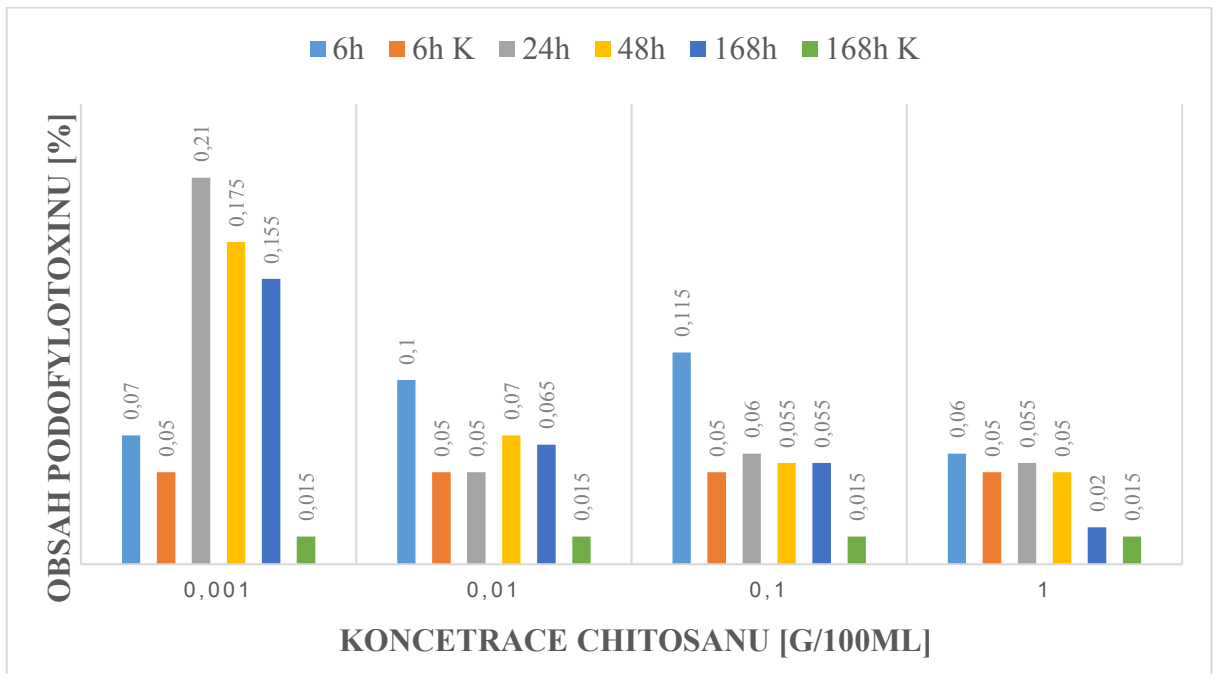
Tab. 4. Vliv chitosanu na produkci podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* (varieta Glauca)

Koncentrace elicitoru (g/100 ml)	Doba aplikace elicitoru (h)	ELICITACE		KONTROLA		T-test
		Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	
I 0,001	6	0,025	0,015	0,045	0,005	1,265
	24	0,110	0,010	0,045	0,005	5,814
	48	0,120	0,020	0,045	0,005	3,683
	168	0,045	0,005	0,050	0,010	0,447
II 0,01	6	0,030	0,010	0,045	0,005	1,342
	24	0,135	0,015	0,045	0,005	5,692
	48	0,080	0,020	0,045	0,005	1,698
	168	0,020	0,000	0,050	0,010	3,000
III 0,1	6	0,045	0,005	0,045	0,005	0,000
	24	0,140	0,020	0,045	0,005	4,608
	48	0,075	0,005	0,045	0,005	4,243
	168	0,015	0,005	0,050	0,010	3,130
IV 1	6	0,005	0,005	0,045	0,005	5,567
	24	0,085	0,015	0,045	0,005	2,530
	48	0,065	0,015	0,045	0,005	1,265
	168	0,025	0,005	0,050	0,010	2,236

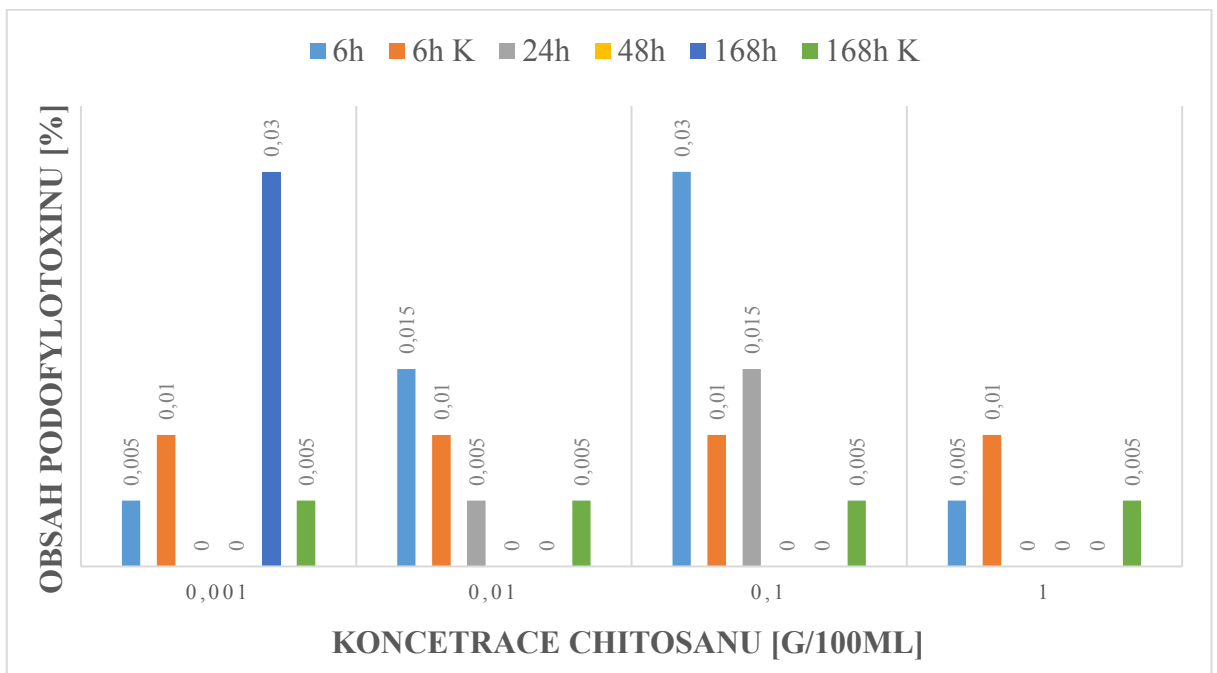
Zvýrazněné hodnoty obsahu podofylotoxinu jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly; $p = 0,05$.

5.2 Grafy

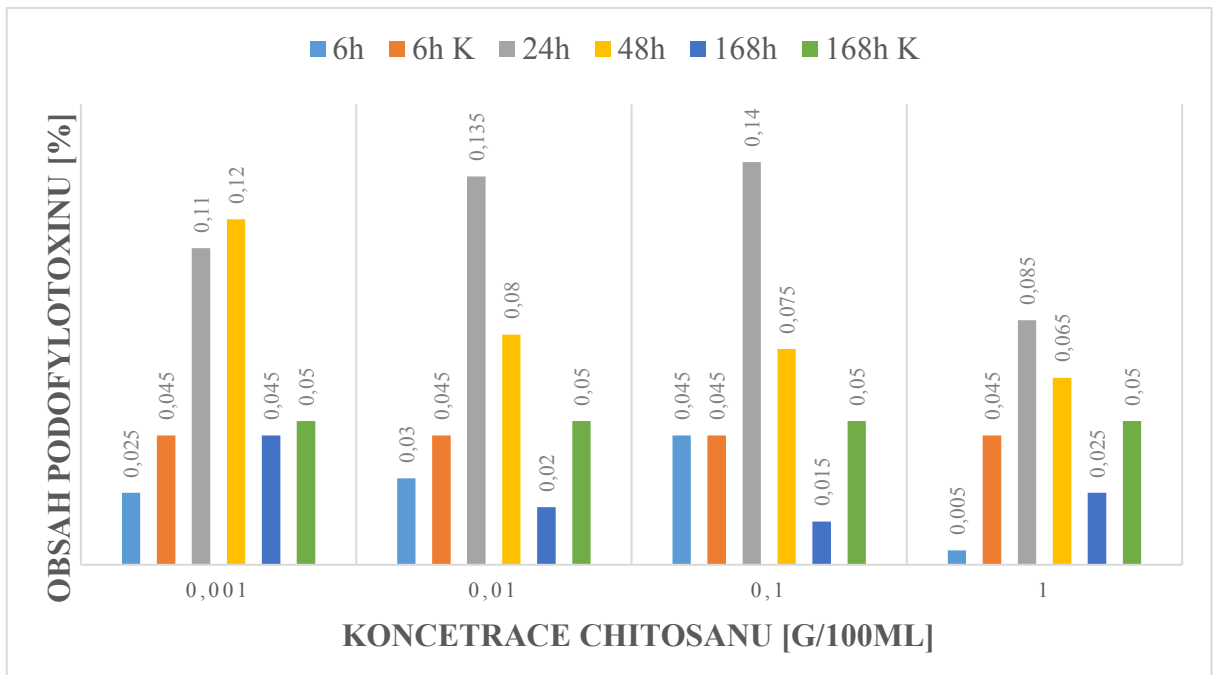
Graf 1. Závislost obsahu podofylotoxinu v kalusové kultuře *Juniperus virginiana* var. *Glauca* na době působení a koncentraci chitosanu



Graf 2. Závislost obsahu podofylotoxinu v kalusové kultuře *Juniperus virginiana* var. *Hetzii* na době působení a koncentraci chitosanu



Graf 3. Závislost obsahu podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* var. *Glauca* na době působení a koncentraci chitosanu



6. DISKUZE

Podofylotoxin je přirozeně se vyskytující lignan, který je dnes známý především jako důležitý prekurzor pro semi-syntézu klinicky významných protinádorových léčiv etoposidu, teniposidu a etopofózy. Tradičním zdrojem podofylotoxinu je podofylin, pryskyřice získávaná z oddenků rodu *Podophyllum*, ale byl detekován i v rostlinách rodu *Linum*, *Juniperus*, *Hyptis*, *Teuricum*, *Nepeta*, *Dysosma*, *Thymus* nebo *Thuja*. Bohužel dostupnost tohoto sekundárního metabolitu zůstává omezená, protože ho nelze získat ekonomicky přijatelnou syntézou a získ látek z přírodních surovin se zajišťuje stále obtížněji. Slibným alternativním postupem může být získ sekundárních metabolitů za pomoci biotechnologie, a to konkrétně pomocí explantátových kultur. Nicméně, i když charakteristickým problémem *in vitro* kultur je nízká produkce těchto metabolitů, bylo zjištěno, že tuto produkci je možno navýšit vlivem určitého stresu a jednou z možností je aplikace elicitoru jako stresového faktoru. [3, 4, 6, 72]

Cílem této diplomové práce bylo sledování vlivu různých koncentrací biogenního elicitoru chitosanu na produkci podofylotoxinu v kalusové a suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* L. (var. *Glauca*) a v kalusové kultuře *Juniperus virginiana* L. (var. *Hetzii*).

Na základě výsledků předcházejících diplomových prací a publikovaných studií, které hodnotily kultivaci kultur *Juniperus chinensis* a *Juniperus virginiana*, bylo zvoleno kultivační médium dle Schenka a Hildebrandta. Toto médium bylo doplněno o kyselinu α -naftyloctovou (3,0 mg/l), kinetin (0,2 mg/l) a kyselinu askorbovou (15,0 mg/l), která zabraňuje hnědnutí kultur. [72, 73, 74, 75]

K pokusům byly použity čtyřleté kalusové kultury *Juniperus virginiana* L., a to konkrétně variety *Glauca* a *Hetzii*. U variety *Glauca* byla pozorována produkce podofylotoxinu této kultury v 59. pasáži. U variety *Hetzii* byla pozorována produkce podofylotoxinu této kultury v 51. pasáži. Suspenzní kultura *Juniperus virginiana* varieta *Glauca* byla odvozena od čtyřleté kalusové kultury. Produkce podofylotoxinu byla pozorována ve 4. pasáži.

Chitosan jakožto elicitor byl do média obou variet přidán v koncentracích 0,001 (I), 0,01 (II), 0,1 (III), 1 (IV) g/100 ml. Ke kontrolním kulturám byl místo chitosanu přidán 1 ml 1% roztoku kyseliny octové. Také sledované doby působení (6, 24, 48 a 168 hodin) vycházely z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po přidání chitosanu. [7, 8, 62, 63, 76, 77]

Z výsledků biotické elicítace kalusové kultury *Juniperus virginiana* L. (varietu Glauca; Tab. 2, Graf 1) chitosanem vyplývá, že u většiny sledovaných koncentrací a časových intervalů došlo k pozitivnímu ovlivnění produkce podofylotoxinu.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo za použití nejnižší koncentrace (0,001 g/100 ml) chitosanu. Maximální efekt na produkci podofylotoxinu se ukázal po jeho 24 hodinové aplikaci. Obsah podofylotoxinu byl 0,210 %, což je o 320 % více než u kontrolních kultur. Ke statisticky významnému zvýšení produkce došlo také v dalších časových intervalech. Průměrný obsah po 48 hodinové aplikaci byl 0,175 % a po 168 hodinové aplikaci 0,155 %, což odpovídá statisticky významnému zvýšení produkce o 250 % a 933 %.

Kladně můžeme hodnotit i koncentrace 0,01 g/100 ml a 0,1 g/100 ml, kde po 168 hodinové aplikaci chitosanu došlo k nárůstu obsahu podofylotoxinu o 333 % a 267 %.

Při elicítaci suspenzní kultury *Juniperus virginiana* L. (varietu Glauca; Tab. 4, Graf 3) chitosanem byl maximální obsah podofylotoxinu (0,140 %) zjištěn po použití chitosanu o koncentraci 0,1 g/100 ml a jeho aplikaci po dobu 24 hodin. Ve srovnání s kontrolní kulturou se jedná o statisticky významné zvýšení produkce o 211 %. Pozitivní, statisticky významné zvýšení obsahu sekundárních metabolitů bylo zaznamenáno i u nejnižší koncentrace 0,001 g/100 ml, kde po 24 hodinovém působení chitosanu byl obsah podofylotoxinu 0,110 % a po 48 hodinovém působení chitosanu byl obsah podofylotoxinu 0,120 %. Dalšího významného zvýšení obsahu (0,135 %) bylo dosaženo po 24 hodinové kultivaci druhou nejnižší koncentrací chitosanu (0,01 g/100 ml).

Z výsledků dále vyplývá, že ze sledovaných časových intervalů je nejvhodnější 24 a 48 hodinová aplikace elicitoru. U 24 hodinové aplikace jsme zaznamenali (s výjimkou nejvyšší koncentrace) vzrůstající tendenci obsahu podofylotoxinu v závislosti na koncentraci chitosanu.

Nejkratší 6 hodinové a nejdelší 168 hodinové působení elicitoru u všech koncentrací (I-IV) vedlo ke snížení produkce podofylotoxinu, v porovnání s kontrolou. Výjimkou byla pouze 6 hodinová kultivace za použití koncentrace (0,1 g/100 ml), kdy se obsah sekundárního metabolitu nezměnil.

Koncentrace 1 g/100 ml nevedla v žádném sledovaném časovém intervalu k statisticky významnému pozitivnímu ovlivnění produkce podofylotoxinu.

V této práci byl sledován i obsah podofylotoxinu v kalusové kultuře *Juniperus virginiana* L. varieta *Hetzii* (Tab. 3, Graf 2). U této variety ve většině případů došlo k negativnímu ovlivnění produkce podofylotoxinu. Statisticky významný nárůst byl zaznamenán pouze v jednom případě. Obsah podofylotoxinu (0,030 %) byl sledován po 168 hodinové aplikaci nejslabší koncentrace elicitoru (0,001 g/100 ml). Šlo o statisticky významné zvýšení produkce o 500 %.

V porovnání s kalusovou kulturou odvozenou od variety *Glauca*, varieta *Hetzii* měla nižší průměrný obsah podofylotoxinu v kontrolních vzorcích a ve většině případů nedošlo k pozitivnímu ovlivnění obsahu elicitem, jako u variety *Glauca*.

Z uvedených výsledků vyplývá, že kultury odvozené od variety *Glauca* vykazovaly vyšší obsah podofylotoxinu a pozitivně reagovaly na přidavek chitosanu. Tyto výsledky navazují na poznatky z předchozích studií, kdy v porovnání s kulturami odvozených od variet *Hetzii* a *Grey Owl*, kultury odvozené od variety *Glauca* (jak kalusové, tak suspenzní) poskytovaly nejvíce biomasy a vykazovaly nejlepší produkci podofylotoxinu. [72]

Zatím nebyla publikována studie, která by popisovala zvýšení produkce podofylotoxinu pomocí chitosanu u druhu *Juniperus virginiana*, nebo u rodu *Juniperus*. Nicméně byl zkoumán vliv jeho derivátů na zvýšení produkce podofylotoxinu.

Produkcí podofylotoxinu u rodu *Juniperus*, konkrétně u druhu *Juniperus chinensis*, se zabýval Muranaka T. a kolektiv. Kalusové kultury nebyly elicítovány samotným chitosanem, ale chitooligosacharidy (COS). Jako nejlepší médium pro indukci kalusu bylo vyhodnoceno médium dle Shenka a Hildebrandta, které bylo doplněno o kyselinu α -nafytloctovou (3,0 mg/l) a kinetin (0,2 mg/l). Obsah podofylotoxinu byl stanovován pomocí HLPC. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo po přidání COS o koncentraci 1 mg/ml k čerstvému kalusu (1 g) po dobu 30 dní při 25 °C a ve tmě. V tomto případě

došlo až k patnáctinásobnému zvýšení produkce podofylotoxinu v porovnání s kontrolními vzorky. [73]

Využití chitosanu jako biotického elicitoru lze na základě literárních zdrojů dokumentovat na řadě níže uvedených příkladů.

Příkladem úspěšné elicítace je experiment, ve kterém byl studován efekt chitosanu a oligomerů chitinu na genovou expresi a produkci lignanů v buněčných kulturách *Linum album*. Kultury byly elicítovány chitinem a chitosanem (oligomery) o koncentraci 100 mg/l po dobu 5 dní. Obsah lignanů byl stanovován pomocí HPLC. Nejlepší výsledky byly zaregistrovány po elicítaci chitosanem (hexamer) 5 dnů po sklizni. Nejvyšší obsah podofylotoxinu v sušině byl (73,5 µg/g) a lariciresinolu (96 µg/g). Tyto hodnoty byly 3x vyšší u podofylotoxinu a 2x vyšší u lariciresinolu v porovnání s kontrolními vzorky. [7]

Pozitivní vliv chitosanu na biosyntézu podofylotoxinu byl studován i u suspenzní kultury *Linum album*. Při tomto experimentu byl zkoumán vliv pěti houbových extraktů, chitinu, chitosanu a metyljasmonátu na produkci lignanů u buněčných kultur *Linum album*. Nejvyšší zvýšení obsahu podofylotoxinu ze studovaných extraktů bylo zaznamenáno u extraktu *Fusarium graminearum*. Obsah podofylotoxinu v sušině byl po elicítaci tímto extraktem až 143 µg/g. Elicitory chitin, chitosan a metyljasmonát také pozitivně zvyšovaly produkci podofylotoxinu, ale v porovnání s houbovými extrakty byl obsah sekundárního metabolitu v sušině nižší. Chitosan byl v tomto experimentu aplikován v koncentracích 50, 100, 200 mg/l a vzorky byly sklizeny po 5 dnech. Nejlepší výsledky oproti kontrole vykazovala koncentrace 100 mg/l. [8]

Elicitační účinek chitosanu, methyl jasmonátu, Ag⁺ iontů a jejich kombinací byl také studován u suspenzní kultury *Taxus chinensis*. Samotný elicitor chitosan o koncentraci 50 mg/l vedl ke zvýšení produkce paklitaxelu. Zvláště ale kombinace chitosanu (50 mg/l), methyljasmonátu (60 µg/l) a stříbrných iontů (30 µg/l) měla významný synergický účinek na výslednou produkci sekundárního metabolitu. Nejvyšší obsah paklitaxelu byl až 25,4 mg/l, což odpovídá až 40x vyšším výnosům než u kontrolních kultur a 6x vyšším, než u elicítace samotným chitosanem (4,3 mg/l). [63]

V dalším pokuse byl studován efekt chitosanu na indukci produkce aromatických aminokyselin a sloučenin odvozených od fenypropanoidu u *in vitro* kultur *Scrophularia striata*. Chitosan byl do kultur přidáván v koncentracích 10, 50 a 100 mg/l

po dobu 5 dní. Negativní vliv měl chitosan ve všech použitých koncentracích na růst kultur a životaschopnost buněk. Produkci sekundárních metabolitů však ovlivňoval pozitivně. Všechny tři koncentrace chitosanu signifikantně indukovali produkci sloučenin odvozených od fenylypropanoidu i sekundárního metabolitu echinakosidu. Nejlepší výsledky oproti kontrole vykazovala koncentrace 100 mg/l. [62]

Pozitivní elicitální účinek chitosanu byl potvrzen i u kultury adventivních kořenů *Morinda citrifolia* L. V této studii byl studován efekt chitosanu a pektinu na biosyntézu antrachinonů, fenolů, flavonoidů. U kořenových kultur ošetřených různými kombinacemi chitosanu a pektinu, nebo samotným chitosanem došlo ke zvýšené biosyntéze sekundárního metabolitu, ale také došlo k inhibici růstu kořenů. Silná inhibice růstu kořenů může být způsobena letálním efektem elicitoru. Optimální koncentrace chitosanu ke zvýšení biosyntézy metabolitu byla 0,2 mg/l, při které byly hmotnosti antrachinonů v sušině 103,16 mg/g, fenolů 48,57 mg/g a flavonoidů 73,32 mg/g. [61]

Chitosan významně zvýšil produkci triterpenoidů v suspenzní kultuře *Betula platyphylla* Suk. Optimální koncentrace 100 mg/l zvýšila produkci triterpenoidů až 2,6x. Zároveň se zvýšila aktivita superoxid dismutáz (SOD), fenylyalanin amoniak lyáz (PAL), endochitináz (EDC) a exochitináz (EOC) 1,6 až 3,0 násobně. Tyto výsledky naznačují, že akumulace triterpenoidů v suspenzní kultuře byla důsledkem obranné reakce na elicitaci chitosanem. [9]

Chitosan dále zvýšil produkci xantonů v buněčné a kalusové kultuře *Hypericum perforatum*. Současně ale došlo k poklesu produkce flavonoidů. Chitosan rovněž indukoval produkci 1,7-dihydroxyxantonu (euxantonu) a kadensinu G, které nebyly v kontrolních kontrolách nalezeny. [68]

Chitosan dále pozitivně ovlivnil produkci fenylypropanoidových derivátů v suspenzní kultuře *Cocos nucifera* [65], artemisininu v kultuře *Artemisia annua* [66] fenylytanoidových glykosidů v suspenzní kultuře *Cistanche deserticola* [67], nebo mentolu v kultuře *Mentha piperita*. [64]

Také výsledky našeho experimentu naznačují, že sledovaný elicitor pozitivně ovlivnil produkci podofylotoxinu explantátovou kulturou *Juniperus virginiana* L., a že chitosan patří k důležitým látkám rostlinných obranných reakcí, které vedou ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů.

7. ZÁVĚR

V této práci byl sledován vliv chitosanu na obsah podofylotoxinu v *in vitro* kultuře *Juniperus virginiana* L. (varieta *Glauca* a *Hetzii*). Výsledky této práce lze shrnout následovně:

- Nejvyšší obsah podofylotoxinu (0,210 %) u kalusové kultury *Juniperus virginiana* L. (varieta *Glauca*) byl zaznamenán po aplikaci roztoku chitosanu o koncentraci 0,001 g/100 ml a jeho působení po dobu 24 hodin. Při porovnání s kontrolní kulturou vzestup podofylotoxinu činil 320 %, jde o statisticky významné zvýšení produkce.
- Nejvyšší obsah podofylotoxinu (0,140 %) u suspenzní kultury *Juniperus virginiana* L. (varieta *Glauca*) byl zaznamenán po aplikaci roztoku chitosanu o koncentraci 0,1 g/100 ml a jeho působení po dobu 24 hodin. V porovnání s kontrolní kulturou činil vzestup podofylotoxinu 211 %, jde o statisticky významné zvýšení produkce.
- Nejvyšší obsah podofylotoxinu (0,030 %) u kalusové kultury *Juniperus virginiana* L. (varieta *Hetzii*) byl zaznamenán po aplikaci roztoku chitosanu o koncentraci 0,001 g/100 ml a působení po dobu 168 hodin. Při porovnání s kontrolní kulturou vzestup podofylotoxinu činil 500 %, jde o statisticky významné zvýšení produkce.
- Ze získaných výsledků je zřejmé, že varieta *Glauca* vykazovala vyšší obsahy podofylotoxinu než varieta *Hetzii*.
- Chitosan může být využíván jako účinný elicitor, obzvláště ke zvýšení produkce podofylotoxinu v kalusové a suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* varieta *Glauca*.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Tůmová L., Tůma J.: Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat. *Chemické listy*. 2009; 103, 503-510.
- [2] Klener P., Klener P. jr.: Léky přírodního původu a jejich potencionální protinádorový účinek. *Onkologie*. 2013; 7, 47-49.
- [3] Gordaliza M., García P. A., Miguel del Corral J. M., et al.: Podophyllotoxin: Distribution, Sources, Applications And New Cytotoxic Derivatives. *Toxicon*. 2004; 44, 441-459.
- [4] Ardalani H., Avan A., Ghayour-Mobarhan M.: Podophyllotoxin: A Novel Potential Natural Anticancer Agent. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2017; 7, 285-294.
- [5] Vodrážka Z.: *Biotechnologie*. 1. vyd. Praha: Academia 1992.
- [6] Kašparová M., Siatka T., Klimešová V., et al.: Vliv syntetického benzylsulfanylpyridinového derivátu na produkci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. *Chemické listy*. 2012; 106, 660-664.
- [7] Bahabadi S. E, Sharifi M., Murata J., et al.: The Effect of Chitosan and Chitin Oligomers on Gene Expression and Lignans Production in *Linum Album* Cell Cultures. *Journal of Medicinal Plants*. 2014; 13, 46-53.
- [8] Bahabadi S. E., Sharifi M., Safaie N., et al.: Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures. *Plant Biotechnology Reports*. 2011; 5, 367-373.
- [9] Fan G., Li X., Wang X., et al.: Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9, 2816–2820.
- [10] Hejný S., Slavík B.: *Květena České socialistické republiky I*. 1. vyd. Praha: Academia 1988.
- [11] Hurych V.: *Okrasné dřeviny pro zahrady a parky*. 1. vyd. Praha: Květ 1996; s. 24.
- [12] Větvička V.: *Stromy a keře*. 2. vyd. Praha: Aventinum 2005; s. 94.

- [13] ---: <http://ontariotrees.com/main/species.php?id=2051>; použito 23.4. 2018
- [14] Jahodář L.: Farmakobotanika: semenné rostliny. 2. vyd. Praha: Karolinum 2009.
- [15] Koupal V.: Populace jalovce obecného (*Juniperus communis*) na území PP Česká Kanada v lokalitě Konrac. Diplomová práce. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice 2016; s. 13.
- [16] ---: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Juniperus_virginiana_drawing.png; použito 23.4.2018
- [17] ---: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:lpdpRhPyozEJ:www.taxonweb.cz/t/390/export.pdf%3Faction%3Dexport%26controller%3Dtaxons%26id%3D390+%&cd=10&hl=cs&ct=clnk&gl=cz>; použito 5. 3. 2018.
- [18] ---: <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=29091>; použito 5. 3. 2018
- [19] Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., et al.: Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. *Current Trends in Biotechnology*. 2015; 9, 293-304.
- [20] Buchanan B. B., Gruissem, W., Jones, R. L.: *Biochemistry & molecular biology of plants*. 1st. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists 2000.
- [21] Musilová L., Uhlík O., Macková M., Macek T.: Úloha sekundárních metabolitů rostlin v bakteriální degradaci organických xenobiotik. *Chemické listy*. 2012; 106, 1029-1033.
- [22] Vodrážka Z.: *Biochemie pro studenty středních škol a všechny, které láká tajemství živé přírody*. 1. vyd. Praha: Scientia 1998; s. 106.
- [23] Wink M.: *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology*. 1st ed. Sheffield: Sheffield Academic Press 1999.
- [24] Dunford N. T., Hiziroglu S., Holcomb R.: Effect of age on the distribution of oil in Eastern redcedar tree segments. *Bioresource Technology*. 2007; 98, 2636-2640.

- [25] Gawde A. J., Cantrell Ch. L., Zheljzkov V. D.: Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from *Juniperus virginiana*. *Industrial Crops and Products*. 2009; 30, 276-280.
- [26] Hădărugă N., Branic A., Hădărugă D., et al.: Comparative Study of *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* Essential Oils: TLC and GC analysis. *Journal of Planar Chromatography*. 2011; 24, 130-135.
- [27] Trifunči S., Ardelean D.: Studies on the optimal extraction of flavonoids from the fruit of *Juniperus virginiana* L. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*. 2010; 119, 127-133.
- [28] Cantrell C. L., Zheljzkov V. D., Osbrink W. L. A., et al.: Podophyllotoxin and Essentials oil profile of *Juniperus* and related species. *Industrial Crops and Products*. 2013; 43, 668-676.
- [29] Renouard S., Lopez T., Hendrawati O., et al.: Podophyllotoxin and Deoxypodophyllotoxin in *Juniperus bermudiana* and 12 Other *Juniperus* Species: Optimization of Extraction, Method Validation, and Quantification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59, 8101-8107.
- [30] Och M., Och A., Cieśla Ł., et al.: Study of cytotoxic activity, podophyllotoxin, and deoxypodophyllotoxin content in selected *Juniperus* species cultivated in Poland. *Pharmaceutical Biology*. 2015; 53, 831-837.
- [31] Maqbool M., Cushman K. E., Gerard P. D., et al.: Podophyllotoxin content in leaves of eastern red cedar (*Juniperus virginiana*). *Acta Horticulturae*. 2004; 629, 87-92.
- [32] Guerram M., Jiang Z.-Z., Zhang L.-Y.: Podophyllotoxin, a medicinal agent of plant origin: past, present and future. *Chinese Journal Of Natural Medicines*. 2012; 10, 161-169.
- [33] ---: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Podophyllotoxin2DCSD.svg>; použito 23. 4. 2018
- [34] Farkya S., Bisaria V. S., Srivastava A. K.: Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. *Applied Microbiology And Biotechnology*. 2004; 65, 504-519.

- [35] ---: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Etoposide.svg>; použito 23. 4. 2018
- [36] ---: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Teniposide2DACS.svg>; použito 23. 4. 2018
- [37] ---: <https://www.lktlabs.com/product/etoposide-phosphate/>; použito 23. 4. 2018
- [38] Klener P.: Principy systémové protinádorové léčby. 1. vyd. Praha: Grada 2013.
- [39] Hande K. R.: Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*. 1998; 34, 1514-1521.
- [40] Hande K. R.: Topoisomerase II inhibitors. *Update On Cancer Therapeutics*. 2006; 1, 3-15.
- [41] Řetovský F., Petrů E.: Rostlinné explantáty. 1 vyd. Praha: ČSAV 1956.
- [42] Sikyta, B., Dušek J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*. 3 vyd. Praha: Karolinum 2001.
- [43] Kováč J.: *Explantátové kultury rostlin*. 1. přepr. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci 1995.
- [44] George E. F., Hall M. A., Klerk G.-J. De: The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro and Micro-Nutrients. In: George E. F., Hall M. A., Klerk G.-J. De eds. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd ed. Dordrecht: Springer Netherlands 2007; 65-113.
- [45] Novák J. F.: *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. 1. vyd. Praha: Academia 1990.
- [46] Bhatia S., Sharma K., Dahiya R., et al.: *Modern applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Boston: Academic Press 2015.
- [47] Vejražka M.: *Buněčné kultury*. <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>; použito 20. 1. 2018.
- [48]---: http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf; použito 23. 4. 2018

- [49] Hradilík J.: Rostlinné explantáty. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita 2005; s. 38.
- [50] Trigiano R. N., Gray D. J.: Plant tissue culture, development and biotechnology. Boca Raton, FL: CRC Press 2011.
- [51] Gaspar T., Kevers C., Penel C., et al.: Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 1996; 32, 272-289.
- [52] Procházka S., Macháčková I., Krekule J., et al.: Fyziologie rostlin. 1. vyd. Praha: Academia 1998.
- [53] Ramirez-Estrada K., Vidal-Limon H., Hidalgo D., et al.: Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*. 2016; 21, 1-24.
- [54] Naik P. M., Al-Khayri J. M.: Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants. In: Shanker A. K., Shanker Ch., ed. *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. 1st. ed. InTech 2016; 249-262.
- [55] Naik P. M., Al-Khayri J. M.: Impact of Abiotic Elicitors on In vitro Production of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*. 2016; 7, 1-7.
- [56] Pavlík J., Amakorová P., Novák O.: Stanovení jasmínové kyseliny v biologickém materiálu. *Chemické listy*. 2012; 106, 90-95.
- [57] Vavříková E., Vinšová J.: Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009; 103, 56-65.
- [58] ---: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitosan_chemical_structural_formula.svg; použito 23. 4. 2018
- [59] Hadwiger L. A.: Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Science*. 2013; 208, 42-49.

- [60] Ferri, M., Tassoni, A.: Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites in *in vitro* plant cell cultures. Handbook of Chitosan Research and Applications 2011; 1, 389-413.
- [61] Baque M. A., Shiragi M. H. K., Lee E. J., et al.: Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of “*Morinda citrifolia*” (L.). Australian Journal of Crop Science. 2012; 6, 1349–1355.
- [62] Kamalipourazad M., Sharifi M., Maivan H.Z., et al.: Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. Plant Physiology and Biochemistry. 2016; 107, 374-384.
- [63] Zhank C. H., Mei X. G., Liu L., et al.: Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Biotechnology Letters. 2000, 22, 1561-1564.
- [64] Chang J. H., Shin J. H., Chung I. S.: Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. Biotechnology Letters. 1998; 20, 1097-1099.
- [65] Chakrabortya M., Karunb A., Mitraa A.: Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. Journal of Plant Physiology. 2009; 166, 63-71.
- [66] Putalun W., Luealon W., De-Eknamkul W.: Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. Biotechnolofy Letters. 2007; 29, 1143-1146.
- [67] Cheng X. Y., Zhou H. Y., Cui X., et al.: Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. Journal of Biotechnology. 2006; 121, 253–260.
- [68] Tocci N., Ferrari F., Santamaria A. R., et al.: Chitosan enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* cell cultures. Natural Product Research 2010; 24, 286-93.

- [69] Vasconsuelo A., Boland R.: Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 2007; 172, 861-875.
- [70] Schenk R. U., Hildebrandt A. C.: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotylenodous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 1972; 50, 199-204.
- [71] Klemera, P., Klemmerová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. 1. vyd. Praha: Karolinum 1999.
- [72] Kašparová M., Martin J., Tůmová L., et al.: Production of Podophyllotoxin by Plant Tissue Cultures of *Juniperus virginiana* L. *Natural Product Communications* 2017; 12, 101-103.
- [73] Muranaka T., Miyata M., Ito K., et al.: Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor. *Phytochemistry*. 1998; 49, 491-496.
- [74] Předota V.: *Explantátová kultura Juniperus virginiana*. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2014.
- [75] Damborská V.: *Optimalizace růstu explantátové kultury Juniperus virginiana vitro*. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2014.
- [76] Szopa A., Kokotkiewicz A., Król A., et al.: Improved production of dibenzocyclooctadiene lignans in the elicited microshoot cultures of *Schisandra chinensis* (Chinese magnolia vine). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018; 102, 945-959.
- [77] Krstić-Milošević D., Janković T., Uzelac B., et al.: Effect of elicitors on xanthone accumulation and biomass production in hairy root cultures of *Gentiana dinarica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2017; 130, 631-640.

9. POUŽITÉ OBRÁZKY

Obr. č. 1. Výskyt <i>Juniperus virginiana</i> L. [13]	10
Obr. č. 2. Větévka <i>Juniperus virginiana</i> L. s galbuly [16].....	11
Obr. č. 3. Struktura podofylotoxinu [33]	15
Obr. č. 4. Biosyntéza podofylotoxinu [18]	17
Obr. č. 5. Struktury: a) etoposid b) teniposid c) etopophos [35, 36, 37]	18
Obr. č. 6. Růstová křivka suspenzních kultur [48]	26
Obr. č. 7. Struktura chitosanu [58].....	42
Obr. č. 8. Kalusová kultura <i>Juniperus virginiana</i> var. <i>Glauca</i>	50
Obr. č. 9. Suspenzní kultura <i>Juniperus virginiana</i> var. <i>Glauca</i>	50
Obr. č. 11. Kalibrační křivka podofylotoxinu.....	53
Obr. č. 10. Příklad chromatografického záznamu elicitovaného vzorku.....	54

10. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Student: Nikola Urbanová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium sekundárních metabolitů v rostlinných explantátových kulturách II

Cílem této práce bylo zjistit vliv potencionálního elicitoru chitosanu na produkci podofylotoxinu v kalusové a suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* varieta Glauca a v kalusové kultuře *Juniperus virginiana* varieta Hetzii. Ke kultivaci bylo použito médium dle Schenka a Hildebrandta, které bylo doplněno o kyselinu α -naftyloctovou (3,0 mg/l), kinetin (0,2 mg/l) a kyselinu askorbovou (15,0 mg/l). Kultivary byly elicitovány roztoky chitosanu o různých koncentracích (0,001; 0,01; 0,1; 1 g/100 ml) po dobu 6, 24, 48 a 168 hodin. Obsah podofylotoxinu byl stanoven HPLC.

Vyšší hodnoty obsahu podofylotoxinu byly naměřeny v kulturách odvozených od variety Glauca. Maximálního obsahu podofylotoxinu (0,210%) bylo dosaženo v kalusové kultuře po 24 hodinovém působení elicitoru o koncentraci 0,001 g/100ml. Při porovnání s kontrolní kulturou došlo ke zvýšení produkce o 320 %. U suspenzní kultury byl naměřen nejvyšší obsah metabolitu (0,140 %) po 24 hodinovém působení roztoku elicitoru o koncentraci 0,1 g/100 ml. Produkce se v tomto případě zvýšila o 211 %. Varieta Hetzii v porovnání s kalusovou kulturou odvozenou od variety Glauca měla nižší průměrný obsah podofylotoxinu v kontrolních vzorcích a ve většině případů nedošlo k pozitivnímu ovlivnění produkce elicitem. Chitosan může být využíván jako účinný elicitor, obzvláště ke zvýšení produkce podofylotoxinu v kalusové a suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* varieta Glauca.

Klíčová slova: Protirakovinné lignany, podofylotoxin, *Juniperus virginiana*, suspenzní kultury.

11. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Student: Nikola Urbanová

Supervisor: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The study of secondary metabolites in plant tissue cultures II

The aim of this work was to determine the effect of the potential elicitor chitosan on production of podophyllotoxin in callus and suspension cultures of *Juniperus virginiana* Glauca variety and suspension cultures of *Juniperus virginiana* Hetzii variety. Schenk and Hildebrandt medium supplemented with α -naphthylacetic acid (3.0 mg/l), kinetin (0.2 mg/l) and ascorbic acid (15.0 mg/l) was used for the cultivation. Chitosan solutions of various concentrations (0.001; 0.01; 0.1; 1 g/100 ml) were affecting the cultures for 6, 24, 48 and 168 hours. The content of chitosan was determined by HPLC.

Higher values of podophyllotoxin content were measured in cultures derived from the Glauca variety. The best chitosan effect on podophyllotoxin production was manifested in callus cultures after 24 hours application of 0.001 g/100ml concentration. A podophyllotoxin content of 0.210 % was determined, which was about 320 % higher in comparison with the control. The maximum content (0.140 %) in suspension culture was induced by 24-hours application of a 0.1 g/100 ml concentration; this was about 211 % higher than the control. The callus culture derived from Hetzii variety compared to the Glauca variety had a lower average content of podophyllotoxin in control samples and in most cases, there was no positive effect on production by elicitor. Chitosan can be used as a potent elicitor and especially is able to increase podophyllotoxin production in *Juniperus virginiana* Glauca variety callus and suspension cultures *in vitro*.

Keywords: Anti-cancer lignans, podophyllotoxin, *Juniperus virginiana*, suspension cultures.