

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Franci TAJNER

**PROUČITEV RAZNOLIKOSTI AKCESIJ ŠENTJANŽEVKE
(*Hypericum perforatum* L.) GLEDE NA TVORBO IZBRANIH
METABOLITOV V ODVISNOSTI OD GENOTIPA IN
NAČINA RASTI**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Franci TAJNER

**PROUČITEV RAZNOLIKOSTI AKCESIJ ŠENTJANŽEVKE
(*Hypericum perforatum* L.) GLEDE NA TVORBO IZBRANIH
METABOLITOV V ODVISNOSTI OD GENOTIPA IN
NAČINA RASTI**

MAGISTRSKO DELO

**VARIABILITY IN SECONDARY METABOLITES PRODUCTION BY
THE ST. JOHN'S WORT (*Hypericum perforatum* L.) RELATED TO
GENOTYPE AND GROWTH DEPENDED RESPONSE**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2014

Na podlagi statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 23. 4. 2012 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja biotehnologije.

Magistrsko delo je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja biotehnologije. Senat Biotehniške fakultete je za mentorico in somentorja magistrskega dela imenoval doc. dr. Natašo ŠTAJNER in prof. dr. Boruta BOHANCA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Robert VEBERIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.

Član: doc. dr. Nataša ŠTAJNER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.

Član: prof. dr. Borut BOHANEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.

Član: izr. prof. dr. Mitja KALIGARIČ
Univerza v Mariboru, Pedagoška fakulteta, Oddelek za biologijo.

Datum zagovora: 13. 05. 2014

Magistrsko delo je rezultat lastnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Franci TAJNER

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK 633.88:582.684.1:631.526.2:631.524 (043.3)
KG	Šentjanževka/ <i>Hypericum perforatum</i> /sorte/populacije/linije/sekundarni metaboliti
KK	AGRIS F30
AV	TAJNER, Franci, uni. dipl. ing. agr.
SA	ŠTAJNER, Nataša (mentor) / BOHANEC, Borut (so-mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
LI	2014
IN	PROUČITEV RAZNOLIKOSTI AKCESIJ ŠENTJANŽEVKE (<i>Hypericum perforatum</i> L.) GLEDE NA TVORBO IZBRANIH METABOLITOV V ODVISNOSTI OD GENOTIPA IN NAČINA RASTI
TD	Magistrsko delo
OP	XII, 76 str., [12] str., 17 pregl., 25 sl., 3 pril., 154 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p><i>Hypericum perforatum</i> L. je tradicionalna zdravilna rastlina, pri nas poznana pod imenom šentjanževka. V raziskavo smo vključili 16 različnih sort, populacij in linij (sorte: 'Maja', 'Anthos', 'Taubertal', 'Topas', 'Gemo' in populacije: 6/15 Maja, 6/9, BFL 18 – 002/05, BFL 21 – 004/05, 6/4, 6/8, 6/2 (slednji vzorci so iz slovenske genske banke BF), prostoživečo populacijo iz Kanade in linije: Stamm 21, Stamm 710, Stamm 715). V okviru raziskave smo glede ploidnosti in vsebnosti metabolita določali raznolikost med izbranimi akcesijami vrste <i>Hypericum perforatum</i> L. <i>in vivo</i> in <i>in vitro</i>. V raziskavi smo analizirali kalivost semen izbranih rastlin šentjanževke na 5 različnih gojiščih, gojitev starševskih rastlin v <i>in vitro</i> pogojih na gojišču za koreninjenje in tudi pridobivanje kalusa iz <i>in vitro</i> gojenih rastlin. Določili smo velikost genoma oz. vsebnost jedrne DNA s pretočnim citometrom. Rezultati so pokazali, da so različni genotipi različno ploidni, in sicer diploidni, tetraploidni in heksaploidni. Predmet našega raziskovanja je bila tudi primerjava med vsebnostjo floroglucinolnih derivatov (hiperforina) pri <i>in vivo</i> rastlinah ter pri <i>in vitro</i> suspenzijskih kulturah izbranih akcesij šentjanževke. Rezultati so pokazali, da je diploidna akcesija ('Gemo': 30,726 µg/g) najbolj produktivna. V sklopu tega smo analizirali tudi različne vplive na vsebnost sekundarnih metabolitov pri izbranih akcesijah. Ugotovljeno je bilo, da je vsebnost derivatov v <i>in vitro</i> kulturah nižja kot v zelenih rastlinah. Slednjega z izvedeno statistično analizo glede vsebnosti derivatov pri sortah, populacijah ali linijah ne moremo trditi. V povprečju izbrane šentjanževke slovenskega porekla glede na vsebnosti hiperforina ne odstopajo od drugih sort, populacij in linij šentjanževke vključenih v raziskavo.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 633.88:582.684.1:631.526.2:631.524 (043.3)
CX St. John's wort/*Hypericum perforatum*/cultivars/populations/lineages/secondary metabolites
CC AGRIS F30
AU TAJNER, Franci
AA ŠTAJNER, Nataša (supervisor) / BOHANEC, Borut (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of Biological and Biotechnical science, field: biotechnology
PY 2014
TI VARIABILITY IN SECONDARY METABOLITES PRODUCTION BY THE ST. JOHN'S WORT (*Hypericum perforatum* L.) RELATED TO GENOTYPE AND GROWTH DEPENDED RESPONSE
DT M. Sc. Thesis
NO XII, 76 p., [12] p., 17 tab., 25 fig., 3 ann., 154 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Hypericum perforatum* L. is traditional medicinal plant, also known as St. John's wort. We included 16 different cultivars, populations and lineages of plant species *Hypericum perforatum* L. into research. (cultivars: 'Maja', 'Anthos', 'Taubertal', 'Topas', 'Gemo', populations: 6/15 Maja, 6/9, BFL 18 – 002/05, BFL 21 – 004/05, 6/4, 6/8, 6/2 (the last samples are from Slovenian gene bank BF), freeliving population of *Hypericum perforatum* L. from Canada (»prostoživeča populacija«) and lineages: Stamm 21, Stamm 710, Stamm 715). Within research we were establishing the variability amongs chosen accessions of species *H. perforatum* L. *in vivo* and *in vitro*. We were analyzing germination of seeds of chosen herbs of St. John's wort on 5 different culture medium, growing parental herbs in *in vitro* conditions on culture medium for rooting purpose and also aquiring callus from *in vitro* cultivated herbs. We also defined the size of genome or content of DNA core with flow cytometer. The results showed that different genotype differ in ploidy level. In fact, they are diploid, tetraploid and hexaploid. The subject of research was also the comparison between content of floroglucinol derivate (hyperforin) both in *in vivo* herbs and *in vitro* suspension cultures of the chosen accessions of St. John's wort. Results showed, that diploid accession ('Gemo': 30, 726 µg/g) is most productive. Further more, we have analyzed potential effect on secondary metabolite in chosen accessions. We found out, that the content of derivate in *in vitro* cultures is lower than in green plants. The content of derivate not differs according to species, populations and lines. According to results, chosen slovenian samples of St. John's wort do not significantly deviate from world samples.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMETACIJSKA INFROMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 <i>H. PERFORATUM</i> L.	4
2.1.1 Uvrstitev v sistem in botanični opis	4
2.1.2 Zdravilna vrednost šentjanževke	6
2.2 TKIVNE KULTURE PRI <i>H. PERFORATUM</i> L.	7
2.2.1 Splošni pogoji dela s tkivnimi kulturami	7
2.2.2 Pregled uporabe tkivnih kultur pri <i>H. perforatum</i> L.	8
2.2.3 Mikropagacija	9
2.2.3.1 Razvojne poti	9
2.2.4 Gojitev maternih rastlin in izbira izsečka (iniciacija kulture)	9
2.2.5 Kultura kalusa, celične suspenzije	10
2.2.5.1 Pogoji za uspešno rast tkivne kulture	10
2.2.6 Mikropagacija pri šentjanževki	12
2.2.6.1 Iniciacija kulture pri šentjanževki iz semen	12
2.2.6.2 Iniciacija kalusa pri šentjanževki	13
2.2.6.3 Iniciacija celične suspenzije pri šentjanževki	14
2.3 ANALIZA VELIKOSTI GENOMA <i>H. PERFORATUM</i> L.	15
2.3.1 Ploidnost v rodu <i>Hypericum</i>	15
2.3.2 Velikost genoma – merjenje ploidnosti s pretočno citometrijo	16
2.4 SPLOŠNO O SEKUNDARNIH METABOLITIH	16

2.4.1 Sekundarni metaboliti pri <i>H. perforatum</i> L.	17
2.4.1.1 Floroglucinoli	18
2.4.1.2 Producija sekundarnih metabolitov pri rastlinskih tkivnih kulturah šentjanževke	19
2.5 KROMATOGRAFIJA	21
2.5.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	21
2.5.2 Pregled separacijskih metod za določitev hiperforina	22
3 MATERIAL IN METODE	24
3.1 MATERIAL	24
3.1.1 Izvorni rastlinski material	24
3.2 METODE DELA	24
3.2.1 Potek mikropropagacije	25
3.2.1.1 Sestava in priprava gojišč	25
3.2.1.2 Sterilizacija rastlinskega materiala	27
3.2.1.3 Iniciacijia kulture	27
3.2.1.4 Razmnoževanje rastlinskega materiala	28
3.2.1.5 Kalusna kultura	28
3.2.1.6 Celična kultura	29
3.2.2 Prirast biomase celične kulture	29
3.2.3 Analiza velikosti genoma z uporabo pretočne citometrije	31
3.2.4 Kromatografija (HPLC)	31
3.2.4.1 Materiali za HPLC analizo	33
3.2.5 Analiza podatkov	33
3.2.5.1 Vrednotenje rezultatov prirasta biomase	33
3.2.5.2 Vrednotenje ploidnosti	33
3.2.5.3 Vrednotenje kromatografskih rezultatov	34
4 REZULTATI	35
4.1 KALIVOST SEMENA	35
4.2 KALUS	35
4.3 PRIRAST BIOMASE SUSPENZIJSKE KULTURE	37
4.4 PLOIDNOST	44
4.5 HPLC	47
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	52

5.1	RAZPRAVA	52
5.1.1	Prirast biomase	52
5.1.2	Velikost genoma	52
5.1.3	Rezultati kromatografije	53
5.2	SKLEPI	56
6	POVZETEK (SUMMARY)	58
6.1	POVZETEK	58
6.2	SUMMARY	60
7	VIRI	63
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Tradicionalno poimenovanje <i>H. perforatum</i> L. v izbranih državah sveta (Ross, 2010)	6
Preglednica 2: Seznam populacij, sort in linij <i>H. perforatum</i> L. uporabljenih pri poskusih	24
Preglednica 3: Sestava MS (Murashige in Skoog) gojišča (Murashige in Skoog, 1962)	26
Preglednica 4: Uporabljeni rastni hormoni (založne raztopine)	26
Preglednica 5: Opis kalusa po obravnavanih sortah, populacijah in linijah <i>H. perforatum</i> L.	36
Preglednica 6: Teža suspenzijske kulture posameznih akcesij v 4-dnevnih intervalih (g)	39
Preglednica 7: Prirast sveže snovi posameznih akcesij v 4-dnevnih intervalih (g)	40
Preglednica 8: Prirast suspenzijske kulture po posameznih skupinah akcesij šentjanževke (g)	42
Preglednica 9: Prirast suspenzije - sveže snovi po dnevih glede na populacije, sorte, linije šentjanževke (povprečje) (g)	43
Preglednica 10: Prirast suspenzije - sveže snovi po dnevih glede na ploidnost šentjanževke (povprečje) (g)	43
Preglednica 11: Indeks prirasta sveže snovi pri izbranih akcesijah šentjanževke	44
Preglednica 12: Analiza velikosti genoma po obravnavanih šentjanževkah	47
Preglednica 13: Hiperforin pri rastlinskih vzorcih šentjanževke ($\mu\text{g/g}$)	48
Preglednica 14: Vsebnost hiperforina v vzorcih celičnih suspenzij šentjanževke ($\mu\text{g/g}$)	49
Preglednica 15: Vsebnost hiperforina pri najbolj produktivnih akcesijah šentjanževke v raziskavi ($\mu\text{g/g}$)	51
Preglednica 16: Vsebnost hiperforina pri sortah, populacijah in linijah šentjanževke (rastlinski vzorci) ($\mu\text{g/g}$)	51
Preglednica 17: Vsebnost hiperforina glede na ploidnost šentjanževke (rastlinski vzorci) ($\mu\text{g/g}$)	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Rastlina šentjanževke (Tajner, 2012)	2
Slika 2: (A) Aksilarni list <i>H. perforatum</i> L.; translucentne in temne žleze. (B) Prečni prerez lista s translucentno žlezo in (C) paradermalna plast lista s translucentno žlezo; kloroplastne celice mejijo na žlezo. (D) Snovi v sintezi hiperforina nastajajo pri sintezi monoterpenov, ki nastajajo v kloroplastih, ki so obdani s pikčastimi linijami (Soelberg in sod., 2007). (E) Temne žleze locirane na listnih robovih <i>in vitro</i> vzgojenih rastlinic <i>Hypericum adenotrichum</i> (Yamaner in sod., 2013).	5
Slika 3: Rastna krivulja – sigmoidna oblika krivulje (Ramawat in Merillon, 2007)	11
Slika 4: Glavni koraki kultivacije celične suspenzijske kulture (Ramawat in Merillon, 2007)	12
Slika 5: Metoda, uporabljena pri <i>in vitro</i> tkivnih kulturah – celične kulture (Ramawat in Merillon, 2007)	17
Slika 6: Strukturne formule dveh najpomembnejših floroglucinolov, ki sta prisotna v šentjanževki (Karppinen, 2010)	19
Slika 7: <i>In vitro</i> produkcija sekundarnih metabolitov (Ramawat in Merillon, 2007)	20
Slika 8: Iniciacija kulture šentjanževke ('Taubertal')	27
Slika 9: Mikropropagacija šentjanževke	28
Slika 10: Iniciacija kalusa iz rastlinskega tkiva (listkov) pri šentjanževki	29
Slika 11: Meritev prirasta biomase šentjanževke	30
Slika 12: Kalus izbranih sort, populacij in linij šentjanževke. Legenda: 1 (6/8 BF LP 2006), 2 (6/9 BF LP 2006), 3 (6/2 BF LP 2006), 4 (BFL 18-02/05), 5 (6/15 Maja), 6 (BFL 21-04/05), 7 (6/4 BF LP 2006), 8 (prostoživeča populacija), 9 ('Topas'), 10 ('Maja'), 11 ('Gemo'), 12 ('Anthos'), 13 ('Taubertal'), 14 (Stamm 710), 15 (Stamm 715), 16 (Stamm 21).	36
Slika 13: Celične suspenzije izbranih sort, populacij in linij šentjanževke. Legenda: 1 (6/8 BF LP 2006), 2 (6/9 BF LP 2006), 3 (6/2 BF LP 2006), 4 (BFL 18- 02/05), 5 (6/15 Maja), 6 (BFL 21-04/05), 7 (6/4 BF LP 2006), 8 (prostoživeča populacija), 9 ('Topas'), 10 ('Maja'), 11 ('Gemo'), 12 ('Anthos'), 13 ('Taubertal'), 14 (Stamm 710), 15 (Stamm 715), 16 (Stamm 21).	38
Slika 14: Teža zatehte (iniciacija) in teža suspenzijske kulture - sveže snovi (g). Rezultati predstavljam povprečje dobljeno iz 4-ih ponovitev.	40
Slika 15: Prirast sveže snovi posameznih akcesij v 4-dnevnih intervalih (g)	41
Slika 16: Prirast mase v suspenziji na 4., 8., 12. ali 16. dan od vzpostavitve kulture (sveža snov) (g)	41
Slika 17: Prirast suspenzije - sveže snovi po dnevih glede na populacijo, sorto, linijo (povprečje) (g)	42

Slika 18: Histogram velikosti genoma <i>H. perforatum</i> L. 4n (6/2 BF LP 2006 z dodatkom standarda <i>Trifolium repens</i> - desni vrh)	45
Slika 19: Histogram velikosti genoma <i>H. perforatum</i> L. ('Maja') 2n	45
Slika 20: Histogram velikosti genoma <i>H. perforatum</i> L. (6/2 BF LP 2006) 4n	46
Slika 21: Histogram velikosti genoma <i>H. perforatum</i> L. ('Topas') 6n	46
Slika 22: Vsebnost hiperforina pri rastlinskih vzorcih šentjanževke ob dodatku HP β CD (μ g/g)	48
Slika 23: Vsebnost hiperforina pri rastlinskih vzorcih šentjanževke (μ g/g)	49
Slika 24: Vsebnost hiperforina pri vzorcih celičnih suspenzij šentjanževke ob dodatku HP β CD (μ g/g)	50
Slika 25: Vsebnost hiperforina pri vzorcih celičnih suspenzij šentjanževke (μ g/g)	50

KAZALO PRILOG

Priloga A: Suspenzijske kulture po akcesijah

Priloga B: Prirast biomase po posamezni akcesiji na 4-dnevni interval (g)

Priloga C: Izhodiščni podatki za prirast biomase (g)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

IAA	indol-3-ocetna kislina
IBA	indol-3-butrinska kislina
NAA	1-naftalenocetna kislina
2,4-D	diklorofenoksiocetna kislina
GA ₃	giberelinska kislina
B5	gojišče Gamborg in sodelavci
BAP	6-benzilaminopurin
DIC	2-metoksi-3,6 diklorobenzojska kislina
BA	N-6-benziladenin
TDZ	tidiazuron
OTTO 1	C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O
OTTO 2	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
DICA	dikloroizocianurna kislina (C ₃ Cl ₂ N ₃ NaO ₃)
HPβCD	hidroksipropil-beta-ciklodekstrin
PFTE filter	politetrafluoroetylenski filter
ODS	oktadecil silika (C ₁₈)
PEG	polietilen glikol
DAPI	4,6 – diamino-2-fenilindol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

1 UVOD

Šentjanževka (*Hypericum perforatum* L.) (slika 1) je dobila svoje ime po svetniku, sv. Janezu, ki goduje 24. junija, saj v tem času cvete. Že več kot 2000 let se jo omenja kot zdravilno rastlino, ki se uporablja v različne namene. O tem pričajo zapisi, ki segajo že v čas Hipokrata, Plinija, Dioskurida, Galena. Njeno uporabnost potrjuje tudi podatek, da je zadnje čase šentjanževka predmet številnih raziskav, predvsem zato, ker vsebuje nekatere medicinsko uporabne učinkovine (Ivanovič, 2000).

Pri nas je šentjanževka tradicionalno rastlinsko zdravilo za rane, opeklino in kožna vnetja. Uporaba pripravkov iz šentjanževke pri poškodbah in obolenjih kože danes pridobiva na pomenu. V zadnjem času pa so v ospredju testiranja na protivirusno in protidepresivno delovanje (Gorenjske lekarne ..., 2004). Rastlina je prav tako pod intenzivnim preučevanjem zaradi svojega protivnetnega, protibakterijskega in tudi protikancerogenega učinkovanja (Schempp in sod., 2000; Kubin in sod., 2005; Medina in sod., 2006). Bila je predlagana za zdravljenje odvisnosti od zdravil oziroma nedovoljenih substanc (Uzbay, 2008). Pripisujejo ji zdravilne lastnosti in sposobnost celjenja ran, prav tako deluje kot diuretik in sredstvo proti malariji. V Evropi se rastlina uporablja za lajšanje težav žensk v menopavzi, za lajšanje občutkov strahu in depresije ter vrsto drugih namenov. Uporaba ekstraktov iz *Hypericum perforatum* L. (*H. perforatum* L.) je množična, saj se na našem kontinentu predpiše nekaj 100 milijonov odmerkov te učinkovine na dan (Jerman, 2005).

V ljudski medicini se izmed pripravkov največkrat uporablja šentjanžovo olje, alkoholni ekstrakt ali zgolj posušena rastlina za pripravo čaja. H. Braun je v letu 1971 zapisal, da je namesto rdečega olja v navadi mazilo, ki je po učinku enako (Bohinc, 1985). V preteklosti so pripravke iz šentjanževke uporabljali zgolj kot »zunanje zdravilo«, danes pa se uporablja tudi kot »notranje zdravilo«. Pri slednjem jo zaužijejo kot sokove ali čaje in za ta namen uporabijo celotno rastlino. Pripravki imajo učinek, če se uporabljajo v velikih količinah, tako da terapija poteka od 4 do 6 tednov (Jerman, 2005). Ob daljšem uživanju naj bi njen čaj celo dvigoval razpoloženje in s tem pomagal proti potrstosti, migreni, pri okrevanju po boleznih, pri živčni izčrpanosti ... Uporabljajo ga pri otrocih, ki jecljajo, močijo posteljo ali jih je ponoči strah. Vse to naj bi bil sinergistični učinek sekundarnih metabolitov šentjanževke, ki naj bi vzpodbjali, uravnavali in krepili življenske sile ter preko živčnega sistema uravnavali tudi neuravnovešeno delovanje žlez. Šentjanževka krepi krvni odtok in spodbuja prebavne žleze, pospešuje pa tudi izločanje žolča ter pomirja vznemirjen želodec. Zaradi vsebnosti eteričnega olja, smole so cvetoči vršički zelo koristen antiseptik za zdravljenje ran, gnojnih tvorov in opeklino.



Slika 1: Rastlina šentjanževke (Tajner, 2012)

Figure 1: St. John's wort plant (Tajner, 2012)

Obstajajo tudi študije, ki kažejo na to, da so ekstrakti šentjanževke enako uspešni kot konvencionalni sintetični antidepresivi, še več, prvi imajo manj stranskih učinkov (Nathan, 2001; Agostinis in sod., 2002; Bilia in sod., 2002; Lawvere in Mahoney, 2005; Linde in sod., 2008). Morebitni stranski učinki preparatov *H. perforatum* L. so predvsem osredotočeni na fotosenzitivnost, ko poteka terapija z velikimi odmerki in pri interakciji z nekaterimi farmacevtskimi preparati (Greeson in sod., 2001; Bilia in sod., 2002; Lawvere in Mahoney, 2005; Wurglics in Schubert-Zsilavec, 2006).

1.1 NAMEN DELA

V raziskavo smo vključili 16 različnih sort, populacij in linij rastlinske vrste *H. perforatum* L. (sorte: 'Maja', 'Anthos', 'Taubertal', 'Topas', 'Gemo' in populacije: 6/15 Maja, 6/9 BF LP 2006, BFL 18 – 002/05, BFL 21 – 004/05, 6/4 BF LP 2006, 6/8 BF LP 2006, 6/2 BF LP 2006 (slednji vzorci so iz slovenske genske banke BF) in prostoživeča populacija *H. perforatum* L. divja iz Kanade ter linije: Stamm 21, Stamm 710, Stamm 715). Ovrednotili smo variabilnosti med izbranimi sortami, populacijami in linijami šentjanževke v povezavi z vsebnostjo floroglucinolnih derivatov (hiperforina) v *in vivo* ter v *in vitro* (celičnih suspenzijskih kulturah) pogojih rasti. Poseben poudarek smo namenili primerjavi rezultatov slovenskih populacij v primerjavi z znanimi »svetovnimi« sortami in linijami ter populacijo iz Kanade. Z analizo velikosti genoma s pretočno citometrijo smo določili velikost genoma oz. vsebnost jedrne DNA posameznih sort, populacij in linij šentjanževke. V skladu z obstoječimi viri se je potrdilo pričakovanje, da so različni genotipi različno ploidni, in sicer diploidni, tetraploidni, kot tudi heksaploidni.

V raziskavi smo ovrednotili kalivost semen sort, populacij in linij šentjanževke, gojitev starševskih rastlin in *in vitro* pogojih in pridobivanje kalusa iz *in vitro* gojenih rastlin. Opredelili smo vpliv genotipa na vzpostavitev tkivne kulture in kulture kalusa ter na pridobivanje celične suspenzijske kulture in opredelili raznolikosti v okviru pridobivanja sekundarnih metabolitov *in vivo* ter *in vitro* pogojih.

V sklopu tega smo proučili tudi vpliv tipa akcesije ali ploidnosti preučevane šentjanževke na vsebnost sekundarnih metabolitov pri izbranih sortah, populacijah in linijah rastline *H. perforatum* L. Potrdilo se je pričakovanje, da bo vsebnost derivatov v suspenzijskih kulturah nižja kot v zelenih rastlinah in da bo vsebnost derivatov različna tudi glede na sorto, populacijo oziroma linijo. Slednjega nismo potrdili s statistično analizo.

1.2 HIPOTEZE

Predpostavljam, da bo:

- obstajala odvisnost tipa akcesije ali ploidnosti preučevane šentjanževke na koncentracijo derivatov v suspenzijskih kulturah,
- prirast celične biomase v suspenzijskih kulturah različen glede na sorto oz. populacijo ali linijo,
- stopnja ploidnosti različna med sortami in ostalimi akcesijami,
- obstajala povezave med ploidnostjo in produktivnostjo akcesij,
- vsebnost derivatov (hiperforina) v vzorcih različna glede na sorto oz. populacijo ali linijo,
- vsebnost derivatov (hiperforina) v vzorcih zelenih rastlin večja kot v vzorcih iz suspenzijskih kultur.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *H. PERFORATUM* L.

2.1.1 Uvrstitev v sistem in botanični opis

Šentjanževko uvrščamo v družino Hypericaceae (krčničevke), po določeni terminologiji tudi v družino Guttiferae ozziroma Clusiaceae, ki spada v deblo Spermatophyta (semenke), poddeblo Magnoliophytina (kritosemenke), razred Magnoliopsida (Dicotyledonae) (dvokaličnice), podrazred Rosidae, nadred Violanae, red Guttiferales (krčničevci), rod *Hypericum* (United States Department ..., 2012).

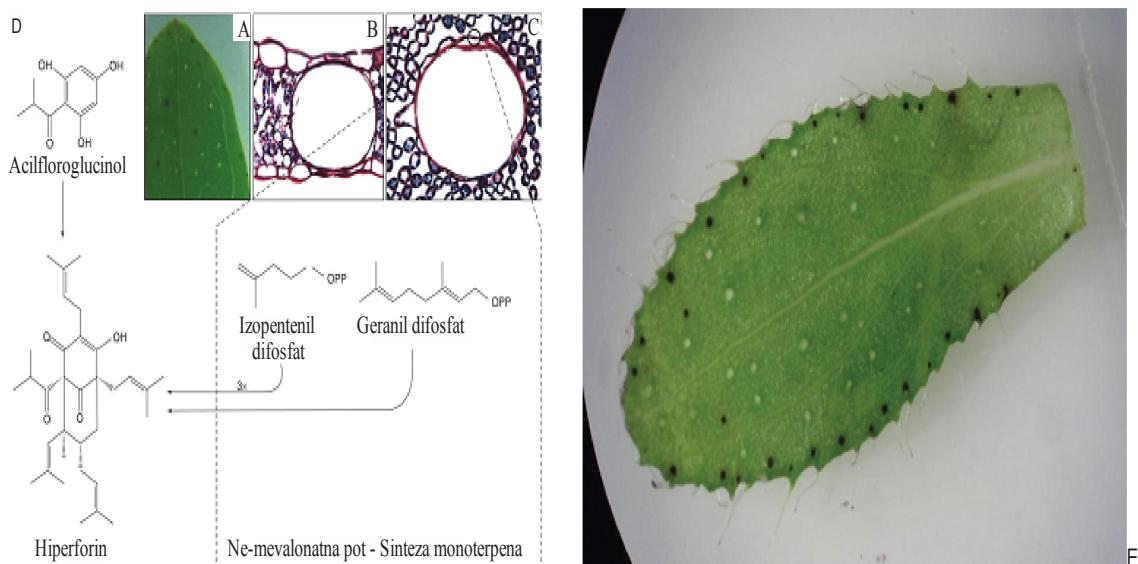
Vrste rodu *Hypericum*, kamor je uvrščena tudi šentjanževka, se po sistematizaciji uvrščajo v družino Hypericaceae (krčničevke), ki šteje več kot 450 rastlinskih vrst, razširjenih po vsem svetu (Kirakosyan in sod., 2004; Beerhues, 2006; Ayan in Çirak, 2008; Bruni in Sacchetti, 2009; Karioti in Bilia, 2010). V Sloveniji jih je po navedbah male flore 11 (Martinčič in Sušnik, 1969). Uradno izmed vseh vrst kot vir za pridobivanje ekstrakta velja vrsta *H. perforatum* L. ali po slovensko šentjanževka, možno tudi katero drugo »ljudsko« ime, kot je krčnica, krčna zel ... (Mlinarič, 2000). Prvotno okolje je našla v Evropi, zahodni Aziji, severni Afriki, Medeiri in Azorih, od koder se je razširila po celem svetu (Ross, 2010), in tako jo najdemo tudi v severni Ameriki, Turčiji, Rusiji, Indiji, Braziliji, na Kitajskem, na Havajih, v Avstraliji in tudi na Novi Zelandiji (Seliškar in Wraber, 1996). Pri nas uspeva po vsej Sloveniji, predvsem na suhih, travnatih pobočjih, posekah, prodiščih, med grmovjem in po nasipih do nadmorske višine 1400 m (Ivanovič, 2000; Galle Toplak, 2000).

Evolucijsko se predvideva, da se je *H. perforatum* L. razvila iz *Hypericum maculatum* Crantz ali njunega skupnega prednika (Brutovská in sod., 2000a).

Ime rodu *Hypericum* izhaja iz grške besede *hyper* (nad) in *eikon* (slika) in v povezavi z imenom so po običajih uporabljali rastlino za odganjanje vsega slabega z obešanjem rastline preko religioznih ikon v hišah na god sv. Janeza. Ime vrste *perforatum* se nanaša na prisotnost drobnih oljnih žlez v listih, ki izgledajo kot okanca in so vidna s prostim očesom, če list obrnemo proti svetlobi. Prisotnost različnih tipov sekretornih struktur, vključujuč črne žleze in translucentne žleze ter različne sekretorne kanale, je karakteristično za *H. perforatum* L. (Curtis in Lersten, 1990; Fornasiero in sod., 1998; Ciccarelli in sod., 2001b; Onelli in sod., 2002). To so večcelične žleze, napolnjene z eteričnim oljem (slika 2). Poleti ali zgodaj jeseni se pojavijo rumeni cvetovi v pakobulastem socvetju. Številne prašnice so združene v 3 šope. Črne žleze se pojavijo kot črne ozziroma temno rdeče multicelične strukture in so vidne na robovih listkov, stebel, cvetnih listov (Fornasiero in sod., 1998; Zobayed in sod., 2006).

H. perforatum L. je zelnata, rumeno cvetoča trajnica s 30 do 100 cm visokimi stebli, ki se dvigajo s poleglega ukoreninjajočega se dna. Iz razvezjane korenike zraste spomladi nekaj trdih, pogosto rdeče obarvanih golih stebel. Za razliko od drugih vrst rodu *Hypericum* ima steblo 2 vzdolžna roba (Ivanovič, 2000). Karakteristično za šentjanževko je, da ima

nasprotne jajčaste liste brez pecljev, ki so posejani z mnogimi žlezami, pri katerih se akumulirajo nekateri sekundarni metaboliti (hiperforin, hipericin).



Slika 2: (A) Aksilarni list *H. perforatum* L.; transluscentne in temne žleze. (B) Prečni prerez lista s transluscentno žlezo in (C) paradermalna plast lista s transluscentno žlezo; kloroplastne celice mejijo na žlezo. (D) Snovi v sintezi hiperforina nastajajo pri sintezi monoterpenov, ki nastajajo v kloroplastih, ki so obdani s pikčastimi linijami (Soelberg in sod., 2007). (E) Temne žleze locirane na listnih robovih *in vitro* vzgojenih rastlinic *Hypericum adenotrichum* (Yamaner in sod., 2013).

Figure 2: (A) Tip of axillary leaf of *H. perforatum* L.; note translucent and dark glands. (B) Cross-section of leaf with translucent gland and (C) paradermal section of leaf with translucent gland; note chloroplast-containing cells delimiting the gland. (D) Compounds of hyperforin synthesis (compounds originating from the synthesis of monoterpenes taking place in chloroplasts are enclosed by stippled lines) (Soelberg in sod., 2007). (E) The dark glands located on leaf margin of *in vitro* *Hypericum adenotrichum* seedling (Yamaner in sod., 2013).

Asimetrični venčni listi imajo ravno tako ekskrecijske žleze. Če se cvet zmečka, priteče krvavo rdeč sok, ki prsteobarva modrovijolično. Čašni listi so suličasti ali poldogovati, koničasti ali tudi resasti, navadno celi, redko s temnimi pegami. Prašniki so številni, v treh snopičih pred venčnimi listi. Plod je glavica, ki se odpira s 3 do 5 loputami. Razmnožuje se vegetativno (živice ali stoloni poženejo pri dnu stebla in se širijo pod zemljo) ali s semenii (apomixis ali nespolno razmnoževanje – asekualna reprodukcija s pomočjo semen) (Willfort, 1971).

H. perforatum L. ima 3 podvrste, ki se razlikujejo po širini čašnih listov. Pogosto jo zamenjujejo s sorodnimi vrstami. Prepoznavati jih je mogoče po koščkih stebla ali s tenkoplastno kromatografijo (TLC). Rastlina ima karakterističen balzamičen vonj in grenak do trpeč okus (Ross, 2010). Cveti od junija do avgusta.

Tradicionalno poimenovanje (preglednica 1) je zelo pestro, kot je tudi zelo pestra uporabnost same rastline šentjanževke v različne namene. Njena prepoznavnost je najbolj pogojena zaradi pogoste uporabe rastline v medicinske namene.

Preglednica 1: Tradicionalno poimenovanje *H. perforatum* L. v izbranih državah sveta (Ross, 2010)
Table 1: Tradicional names for *H. perforatum* L. in different parts of world (Ross, 2010)

Tradicionalno poimenovanje	Država
Balsana, Heofariqon	Arabske države
Corazoncillo, Hiperico, Hipericon	Argentina
St. John's wort	Estonija
Herba de Millepertuis, Herba de Saint Jean, Toutsaine	Francija
Saint John's wort	Grčija
Pljuskavica, Gospina trava, Strašno zelje	Hrvaška
Balsana, Bassant, Dendhu	Indija
Ipericao, Pelatro, Perforata	Italija
St. John's wort	Kanada
Qian Ceng Iou	Kitajska
Flor De Sao Joao, Hipericao, Pelicao	Madeira
Blutkraut, Herrgotsblut, Johaniskraut	Nemčija
Sint-Janskruid	Nizozemska
St. John's wort	Rusija
Šentjanževka, Krčnica, Jezusova kri	Slovenija
Corazancillo, Hierba De San Juan, Pinill de Oro	Španija
Johannesort	Švedska
Tenturotou	Turčija
St. John's wort	ZDA

2.1.2 Zdravilna vrednost šentjanževke

Uporaba šentjanževke sega skozi dve tisočletji. Paracelzus naj bi poznal njen ugodno delovanje pri duševnih motnjah (Czygan, 1993). Že grške in rimske legende omenjajo šentjanževko kot tradicionalno ljudsko zdravilno rastlino. V srednjem veku so verjeli, da odganja zlobne duhove in čarownice. Od tod tudi ime rodu *Hypericum*, saj so po običajih uporabljali rastlino za odganjanje vsega slabega. To so dosegli z obešanjem rastline preko religioznih ikon v hišah. Slednjega danes ni več, se je pa ohranila njen uporaba v zdravilne namene.

Nemški avtor Kerner je v začetku 19. stoletja poročal o zdravljenju motenj razpoloženja. V pisnih virih so šentjanževko, po stoletju premora, pri zdravljenju depresije začeli omenjati zopet leta 1939. V 80-ih in 90-ih letih so kemijske, farmakološke in klinične študije ekstraktov šentjanževke, predvsem v Nemčiji, močno zaznamovale področje fitoterapije. Šentjanževka sodi med redke zdravilne rastline, katerih učinkovitost je tudi klinično preizkušena in dokazana (Mlinarič, 2000). Trenutno potekajo številne raziskave njenih učinkovin, njeni ekstrakti pa so pogosto uporabljeni kot zdravilo za lajšanje številnih bolezni in tegob: blaži bolečine in krče, zdravi živčne bolezni (depresija, strah, hysterija), šentjanžovo olje se priporoča za opeklime, sveže krvaveče rane, zmečkanine, revmo, zdravljenje tvorov, čirov, bul, pri gastritisu in bolečinah v trebuhu. Čez čas je bilo odkrito tudi njen protibakterijsko in protivirusno delovanje. Še posebej obetavna je aktivnost proti mnogim retrovirusom, kar dokazujejo številne raziskave (Ivanovič, 2000). Rastlina je prav tako pod intenzivnim preučevanjem zaradi njenega protikancerogenega učinkovanja (Schempp in sod., 2000; Kubin in sod., 2005; Medina in sod., 2006).

Na področju antidepresivnega delovanja so bile opravljene številne klinične študije, v katerih so avtorji primerjali aktivnosti pripravkov z znano oziroma standardizirano

vsebnostjo učinkovine s placebom in uveljavljenimi, sinetično pridobljenimi antidepresivno delujočimi učinkovinami (Volz, 1997). Omeniti velja, da so rezultati omenjenih študij podprtli hipotezo o učinkovitosti izvlečka šentjanževke v primerjavi s placebom in sintetičnim antidepresivom (Schulz in sod., 1998). Nadalje, pri primerjavi stranskih učinkovin metanolnega (MeOH) izvlečka šentjanževke in sintetičnega antidepresiva (amitriptilin) so bolniki slednjega slabše prenašali (Wheatley, 1997).

Običajno se priporoča dnevni odmerek ekstrakta v količini 900 mg. Iz previdnosti je tudi odsvetovano pretirano izpostavljanje soncu v času zdravljenja: hipericizem. Pripravke iz šentjanževke odsvetujejo uživati nosečnicam in doječim materam (Mlinarič, 2000). Večina zdravilnih pripravkov iz šentjanževke je izdelanih na alkoholnih ekstraktih v razmerju droga – ekstrakt od 4 : 1 do 7 : 1. Za ekstrakcijo uporabljajo MeOH ali etanol. Najboljši izkoristek je z uporabo zmesi MeOH in vode (V : V 60-80 % : 20-40 %) (Schulz in sod., 1998).

Zelo pomembne so tudi reakcije z nekaterimi zdravili. Pripravki iz šentjanževke lahko vzpodujajo ali inhibirajo delovanje ostalih encimov prisotnih v metabolizmu organizma. Metabolizem zdravilnih učinkovin, ki poteka ob sodelovanju teh encimov, je pomembno spremenjen, posledično se lahko zmanjša tudi učinek učinkovin, ki se jih istočasno uporablja. Lahko se pojavijo interakcije s podobno delujočimi učinkovinami. Svetuje se, da se pripravkov iz *H. perforatum* L. ne uporablja skupaj z ostalimi zdravilnimi učinkovinami.

Opozoriti je potrebno tudi na nekatere stranske učinke, ki se lahko pojavijo pri uživanju pripravkov iz šentjanževke. Najbolj znan stranski učinek je fototoksičnost pod imenom hipericizem: pojav je znan predvsem v veterini, pri živini, ki je popasla zel šentjanževke in bila izpostavljena soncu, so se na smrčku, uhljijih, vekah in na ostalih delih telesa z malo dlake ali pigmenta pojatile hude kožne spremembe z oteklinami, ki lahko vodijo tudi v nekrozo (Bruneton, 1999). Omenjene spremembe verjetno povzročajo močno aktivne spojine, nastale iz ali ob pomoči metabolitov šentjanževke po interakciji z ultravijoličnimi (UV) žarki. Izvedli so študijo na prostovoljcih z različnimi odmerki ekstrakta šentjanževke (Brockmoeller in sod., 1997) in ugotovili, naj dnevni odmerek ne preseže 1800 mg.

2.2 TKIVNE KULTURE PRI *H. PERFORATUM* L.

2.2.1 Splošni pogoji dela s tkivnimi kulturami

Tkivne kulture v prvi vrsti potrebujejo uravnavano okolje za normalen razvoj. Zagotovljena mora biti možnost kontroliranja temperature in svetlobe, včasih tudi vlage. V ta namen se uravnava klimatizacija prostora ali pa se uporablja posebne inkubatorje, ki se jih postavi v neklimatiziran prostor. Za uspešno delovanje morata oba načina zagotoviti (Bohanec, 1992):

- točnost uravnavanja temperature,
- možnost nastavitev intervala osvetlitve in temperature,
- vir svetlobe,
- mešanje zraka.

Tudi z *in vitro* postopki je možno vzgajati rastline, vendar jim moramo zagotoviti vse, kar sicer dobijo v naravi, in tudi druge substance, ki jih normalno rastline sicer ne potrebujejo. To so hranila, fizikalni rastni faktorji, organske snovi (Pierik, 1987).

Sestava gojišča je tisti del postopka, ki ga najlažje spreminjamamo. Želja raziskovalcev je, da bi v gojišča vključevali le kemično točno definirane snovi, kar bi omogočilo čim večjo ponovljivost (Bohanec, 1992). V gojišču najdemo (Ramawat in Merillon, 2007):

- minerale (makro in mikroelementi),
- vir ogljika (fotosintetska aktivnost kultiviranih celic je majhna – saharoza, glukoza, fruktoza, maltoza),
- rastne regulatorje ali rastlinske hormone (citokinini – kinetin, benzilaminopurin, 2-izopentenil adenin, zeatin; avksini – indol-3-ocetna kislina (IAA), indol-3-maslena kislina (IBA), naftil acetna kislina (NAA), 2,4-diklorofenoksi acetna kilsina (2,4-D) in včasih giberelinska kislina (GA₃)),
- aminokisline (AK) (glicin, glutamin, prolin, fenilalanin, arginin) in vitamine (piridoksin, thiamin, biotin, cianokobalamin),
- včasih organske dodatke nedoločljivih sestavin (ekstrakt kvasovk, kokosovo mleko ...),
- strjevalce gojišča (agar-agar (v tkivni kulturi tobaka vpliva na tvorbo sekundarnih metabolitov), gelum gel).

2.2.2 Pregled uporabe tkivnih kultur pri *H. perforatum* L.

Ker je šentjanževka medicinsko ena pomembnejših rastlin, se veliko raziskav osredotoča na sintezo njenih sekundarnih metabolitov; ena izmed možnosti je tudi gojenje in pridobivanje sekundarnih metabolitov *in vitro*. S sistemom regeneracije poganjkov *in vitro* se lahko poveča variabilnost rastlin v mnogih morfoloških značilnostih, kakor tudi v vsebnosti hiperforina in tudi drugih učinkovin.

Čellárová in sod. (1992) poročajo o uspešnem sistemu regeneracije *in vitro* na gojišču z dodatkom rastnega hormona 6-benzilaminopurin (BAP). Raziskavo so oprli na primerjavo morfoloških lastnosti regeneriranih rastlin v primerjavi z izvornimi rastlinami.

Poleg tega so Čellarova in sod. (1994) preučevali tudi vsebnost sekundarnega metabolita (hipericina) v *in vitro* regeneriranih rastlinah.

Kartník in sod. (1996) so vzpostavili suspenzijske kulture kalusa različnih vrst iz rodu *Hypericum*, med njimi tudi šentjanževke, da bi določili vsebnost sekundarnih metabolitov. Semena rastlin so v sterilnih pogojih kalila v tekočem Murashige in Skoog (MS) gojišču z dodatkom BAP in NAA. Kalus, ki se je razvil, so subkultivirali v enako gojišče. Ugotovili so, da je vsebnost sekundarnih metabolitov v regeneriranih rastlinah večja kot v kalusnem tkivu.

Čellárová in Kimakova (1999) sta v raziskavi ugotavljali tudi morforegulatorni vpliv različnih rastlinskih regulatorjev (avksinov in citokininov) na rastline *H. perforatum* L. *in vitro*. Ugotovili sta, da hormona IAA in IBA v gojišču pospešujejo koreninjenje rastlin, medtem ko 2,4-D in NAA ne vplivata na tvorbo korenin. Razvite korenine sta izolirali in

kultivirali v tekočem gojišču ob dodatku avksinov in citokinov. Ugotovili sta, da je do tvorbe poganjkov je prišlo pod vplivom BAP in kinetina. Ugotovili sta tudi, da so regenerirane rastline kromosomske zelo nestabilne, vendar med diploidnimi in tetraploidnimi rastlinami ni bilo opaziti statistične razlike v odzivu na avksine in citokinine.

2.2.3 Mikropropagacija

Mikropropagacija je nedvomno temeljna tehnika tkivnih kultur. Je tudi osnova vseh ostalih tehnik. Končna faza je rastlinica, ki jo na ta način ohranjam in razmnožujemo.

Pri mikropropagaciji ločimo več faz, ki jih delimo na (Bohanec, 1992):

- priprava maternih rastlin,
- iniciacija kulture,
- razmnoževanje poganjkov,
- podaljševanje poganjkov in koreninjenje,
- aklimatizacija.

2.2.3.1 Razvojne poti

Najenostavnejša razvojna pot, ki vključuje *in vitro* postopke, je vzgoja rastlinic iz semen v *in vitro* razmerah.

Za iniciacijo tkivne kulture se lahko uporabi vršičke. Če smo to uspešno opravili, so ob enem vršičku nastali številni novi, kar imenujemo kultura poganjkov. V kulturi lahko iz vršičkov nastajajo adventivni brsti neposredno (direktna organogeneza) ali pa kot vmesna faza nastaja kalus. Iz kalusa je z uporabo ustreznegogojjišča možno ponovno vzpodbuditi nastajanje brstov. Z razbitjem kalusa v tekočem gojišču dobimo celične suspenzije, katere lahko izkoristimo za proizvodnjo sekundarnih metabolitov. Če tkivo listov ali stebelc tretiramo z encimi, ki razgrajujejo celične stene, nastanejo kulture protoplastov (Bohanec, 1992).

2.2.4 Gojitev maternih rastlin in izbira izsečka (iniciacija kulture)

Zelo pomembno je, od kod izvira izvorni material. Pomembno je, ali so materne rastline rasle na prostem ali v rastlinjaku, oziroma ali je bilo seme pridelano pred kratkim ali pred več leti. Velik pomen imajo tudi rastne razmere, zlasti vpliv odmerkov osvetlitve in vodnega režima, vse to močno vpliva na kasnejši uspeh mikropropagacije (Bohanec, 1992).

Izvorni material (izsečke) jemljemo iz različnih delov rastline. Pri izbiri izsečka si torej želimo dobiti čim bolj sterilni delček rastline, ki naj zajema del meristemskega tkiva. (Bohanec, 1992).

Odbira ali izrez primernega tkiva ter predhodna ali naknadna sterilizacija je prvi postopek mikropropagacije. Postopek je izrednega pomena, ker je rastlinski material lahko okužen z bakterijami ali glivami, in to površinsko ali notranje. Temu primerno so prilagojeni tudi

ukrepi za razkuževanje, s ciljem dobiti sterilen izseček. Za sterilizacijo tkiv se največ uporablja natrijev hipoklorit (NaOCl), dostikrat v kombinaciji z detergentom (tween 20 ali 80) za boljšo omočljivost. Poleg natrievega se uporablja tudi kalcijev hipoklorit, živosrebrov klorit, manj običajno pa še vodikov peroksid, bromova raztopina in srebrov nitrat.

Razkužen rastlinski material od razkuževanja naprej obravnavamo kot sterilen. Vsi postopki torej potekajo v posebnih komorah za aseptično delo, zato velja (Bohanec, 1992):

- delovno površino občasno očistimo z alkoholom ali razkužimo z UV svetlobo,
- tkiva manipuliramo v razkuženih petrijevkah ustreznega premera, na steklenih ploščicah ali na avtoklaviranem trdem papirju,
- orodje za delo razkužujemo občasno z avtoklaviranjem ali suhim steriliziranjem, med delom pa na več načinov, od katerih je najbolj razširjeno pomakanje orodja v alkohol in razkuževanje nad gorilnikom ali v posebnih aparativih za razkuževanje,
- če pri delu potrebujemo preparacijski mikroskop, je najbolje izbrati model, ki ima držalo obrnjeno proti nam, da ne zadržuje toka filtriranega zraka,
- zelo pomemben vir okužb je tudi človek. Roke si umijemo, lahko si jih razkužimo z alkoholom ... Vzorce držimo, kolikor je mogoče, stran od sebe v notranjost komore. Med delom čim manj govorimo in po potrebi nosimo filtrske maske. Izurjenost pri delu je morda najpomembnejša za uspeh teh postopkov.

Ni potrebno, da bi faza iniciacije kulture uspela v popolnosti, dovolj je že, da uspemo zagotoviti ponovljiv začetek kulture, z drugimi besedami, da je naš izseček živ in neokužen (Debergh, 1987).

Sledi faza razmnoževanja poganjkov. V tej fazi inokulum zraste in začne oblikovati nove poganjke, pač glede na določeno pot razvoja. V tej fazi dodamo gojiščem običajno citokinine, avksine pa izpustimo ali dodamo le v manjši koncentraciji. Poganjke, ko smo jih dovolj razmnožili, je potrebno ukoreniniti. Na koncu sledi aklimatizacija sadik, kar je zadnja faza mikropropagacije. V tej fazi poganjke, rasle v heterotrofnih razmerah, ponovno navajamo na avtotrofni način rasti (Bohanec, 1992).

2.2.5 Kultura kalusa, celične suspenzije

Kalusno tkivo nastaja v različnih razmerah. Opišemo ga lahko kot neorganizirano rastlinsko tkivo, ki je lahko različne sestave in različnih barv. Vzpodbudimo ga z avksini, lahko pa tudi citokinini. Nastali kalus je kompakten ali rahel ter sčasoma lahko postane »habituiran« ali neodvisen od dodanih hormonov in kot takšen lahko raste tudi na brezhormonskem gojišču (Bohanec, 1992).

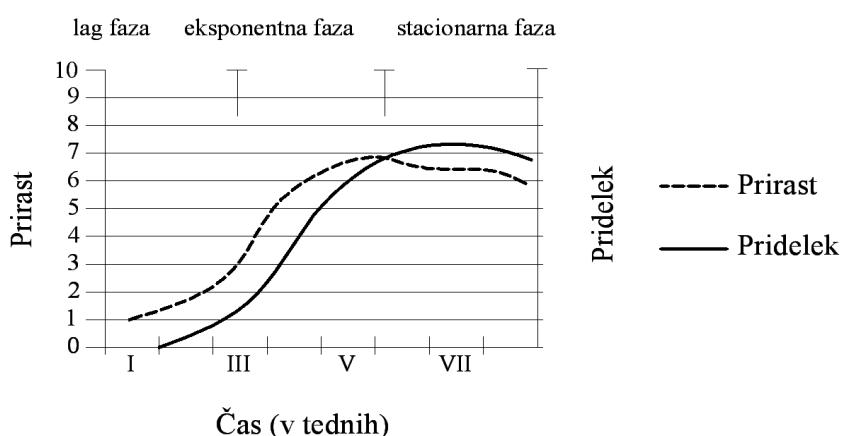
2.2.5.1 Pogoji za uspešno rast tkivne kulture

Optimizacija dejavnikov oziroma pogojev, ki odločilno vplivajo na uspešnost rasti tkivnih kultur in pridobivanje sekundarnih metabolitov, je poglavitnega pomena za uspešen končni rezultat. V naslednjih nekaj stavkih je predstavljen kratek pregled eksogenih dejavnikov, ki odločilne vplivajo na *in vitro* tkivne kulture.

Eden izmed glavnih dejavnikov, ki vplivajo na uspešnost gojenja tkivnih kultur, je okolje kulture, ki ga sestavljajo raztopina hranil in fizikalni pogoji, pri katerih kultura uspeva. Fizikalni pogoji imajo direkten vpliv na rastne pogoje v tkivni kulturi. Splošni fizikalni pogoji so 22-28 °C, osvetlitev 0-5000 lux, s fotoperiodo 16-8 h (dan/noč) in subkultivacijo 2-8 tednov na trdnem gojišču in nekje 1-2 tedna na tekočem gojišču (kultura celičnih suspenzij) (Ramawat in Merillon, 2007).

Prav tako pomembna je tudi izbira rastline za izseček, saj z velikostjo le-tega in izbiro linije za izsečke pomembno vplivamo na količino pridelka. Izseček na trdnem gojišču producira nediferencirane celice (kalus) ali pa celice disociirajo iz izsečka na tekočem gojišču. Kalus se lahko uporabi tudi za iniciacijo suspenzijske kulture (Ramawat in Merillon, 2007).

Ko se pridobi zadostna količina kalusa, se le-ta periodično subkultivira. Tako vzpostavljeni kultura se šteje za zasnovano raziskovalnega dela, s katerim želimo determinirati selekcionirani material. Začne se z določitvijo periodike subkultivacije in periodike produkcije sekundarnih metabolitov. Z razumevanjem obeh lahko dosežemo najboljše rezultate pri raziskovanem problemu. To si zagotovimo s poznavanjem rastne krivulje. Rastna krivulja je vedno sigmoidne oblike (slika 3) in ima značilne faze: (1) lag faza: ni rasti (prilagoditev celic na nove rastne pogoje/najnižja aktivnost sekundarnega metabolizma); (2) eksponentna rast: maksimalen primarni metabolizem – najhitrejša rast celic/proti koncu se sekundarni metabolizem poveča (prevoj med primarnim in sekundarnim metabolizmom); (3) stacionarna faza: zastoj v primarnem metabolizmu – ni več rasti, ni več hranil v gojišču/maksimalen sekundarni metabolizem (Ramawat in Merillon, 2007).

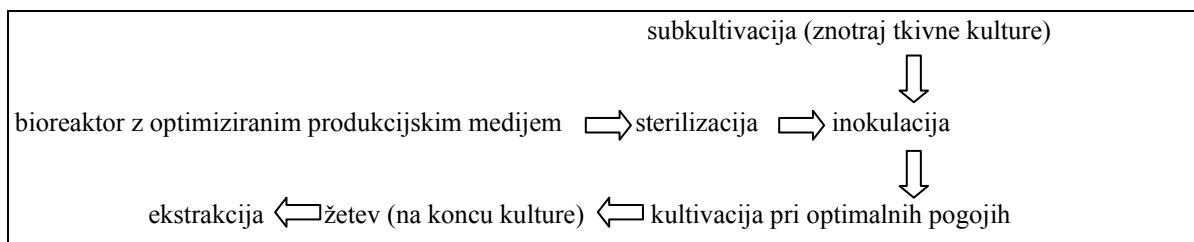


Slika 3: Rastna krivulja – sigmoidna oblika krivulje (Ramawat in Merillon, 2007)
Figure 3: Growth curve – sigmoid shape of curve (Ramawat and Merillon, 2007)

Za uspešno rast celic je potrebno proučiti ustrezne sestavine gojišč in raziskati potek rasti. Po začetni krajši stagnaciji se začne eksponentna rast, ki nato ponovno zastane (Bohanec, 1992).

Iz rastne krivulje je razvidno, da sta primarni in sekundarni metabolizem obratno sorazmerna. Porast enega pomeni upad drugega in obratno. Zato je največja produkcija

sekundarnih metabolitov v stacionarni fazi in temu primerno je potrebno predvideti žetev tkivnih kultur. Če planiramo čas žetve prezgodaj, proizvodnja sekundarnih metabolitov ne bo optimalna, ker bo aktiven primarni metabolizem. Ta ima po naravi prednost pred sekundarnim metabolizmom in če zamudimo stacionarno fazo, lahko pride do degradacije nastalih produktov s strani novega cikla primarnega metabolizma. Z obvladovanjem vseh teh dejavnikov pridemo do optimizacije pridelka (slika 4) (Ramawat in Merillon, 2007).



Slika 4: Glavni koraki kultivacije celične suspenzijske kulture (Ramawat in Merillon, 2007)

Figure 4: Principal factors in cultivation of plant cell culture St. John's wort (Ramawat and Merillon, 2007)

2.2.6 Mikropagacija pri šentjanževki

2.2.6.1 Iniciacija kulture pri šentjanževki iz semen

V literaturi smo zasledili različne opise postopka sterilizacije semen šentjanževke; Liu in sod. (2007a) opisujejo sterilizacijo površine semen *H. perforatum* L. in *Hypericum sampsonii* Hance s 30 sek izpostavitvijo v 75 % etanolni raztopini, kateri sledi 10 min izpostavitev 4,5 % (v/v) NaOCl ob dodatku detergenta Tween 80. Temu sledi 5-kratno izpiranje s sterilno vodo. Drugje je sterilizacija semena opravljena nekoliko drugače, in sicer tako, da so semena namočili v vodo, jih precedili in pustili, da se posušijo na sobni temperaturi, nato površino sterilizirali z 1 % NaOCl, tako da so semena izpostavili kemikaliji za 10 min in nazadnje semena 3-kratno sprali z destilirano vodo (Gadzovska in sod., 2007). Zopet drugi so sterilizacijo opravili čisto po svoje. Semena so potopili v 70 % etanolno raztopino za 5 sek, takoj zatem pa za 20 min izpostavili 30 % vodni raztopini 5,4 % NaOCl, kateri so dodali kapljico detergenta Tween 20 na 500 mL. Tako tretirana semena so sprali s tremi curki destilirane vode (Murch in sod., 2000). Franklin in Dias (2006) sta sterilizacijo opisala na način, da semena postavita v Eppendorf kivete, v katerih se predhodno nahaja 1 mL sterilne vode ob predhodnem dodatku kapljice detergenta Tween 20. Tako potopljena semena sta pustila v temi za 12 ur. Po pretečenem času se odtoči raztopina in površina semen se sterilizira s 70 % etilnim alkoholom (60 sek); kasneje se semena 3 min izpostavljajo komercialni varikini (NaOCl). Na koncu se 3-kratno spirajo s sterilno destilirano vodo. Vinterhalter in sod. (2006) so pri delu s semenami dosegli aseptično delo tako, da so jih sprali s 70 % etanolom (1 min) in sterilizirali s 15 % varikino (4-5 %) za 15 min. Sterilna semena so 3-kratno po 5 min spirali z avtoklavirano vodo.

Tretirana semena se dajo na petrijevke, v katerih se nahaja brezhormonsko MS gojišče ob dodatku 0,6 % agarja in 3 % saharoze. pH gojišča se umeri na 5,7-5,8 predhodno pred avtoklaviranjem (121°C, 0,105 MPa, 15 min). Po 25 dneh vzkalijo rastlinice, ki se jih subkultivira v večjih posodicah teoretično neomejeno dolgo (Liu in sod., 2007a). Pri drugih avtorjih kalitev semen izvedejo na nekoliko drugačnem gojišču pod sterilnimi pogoji na pol močnem MS gojišču ob dodatku 0,22 mg/L BAP, 0,22 mg/L NAA, 2 %

saharoze (w/v) in 1 % agarja (w/v). Semena kalijo na fotoperiodi 16/8 (dan/noč) pri 26 ± 1 °C (foton flux 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sek}$) (Pasqua in sod., 2003). Pestrost izbire možnih gojišč za kalitev semen ponazarjajo naslednji štirje primeri. Gadzovska in sod. (2007) so za kalitev uporabili MS/B5 medij z dodatkom 3 % saharoze in 0,7 % strjevalca gojišča (agar), brez dodatka rastlinskih hormonov. Za kalitev pa se lahko uporabi tudi sterilni filtrni papir, katerega se navlaži s 3,5 mL sterilne bidestilirane vode. Petrijeve so inkubirane na spreminjači se temperaturi 25/15 °C v temnih pogojih oziroma na fotoperiodi 16/8 (dan/noč) (Pérez-García in sod., 2006). Zopet drugi so semena kalili na samem agarju (8 g/L) v popolni temi 16 dni na 24 °C (Murch in sod., 2000). V članku avtorjev Vinterhalter in sod. (2006) so kalitev opravili na gojišču za WPM (woody plant medium ali gojišče za lesnate rastline) ob dodatku soli ter na MS gojišču hormonov, ob dodatku železa in vitaminov. Gojišču so dodali 0,62 % agarja kot strjevalca gojišča in 2 % saharoze kot vir ogljikovih hidratov. pH gojišča je bil umerjen na 5,8 pred avtoklaviranjem, ki se je izvedel na 114 °C, 20 min. Pogoji v rastni komori so: 25 ± 2 °C, fotoperioda 16/8 (dan/noč) in osvetlitev 46,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sek}$.

Tako dobljene rastlinice se lahko nadalje uporabijo za izsečke za tvorbo ranitvenega tkiva (kalusa), ki nastane na zato predhodno pripravljenih gojiščih ob dodatku rastlinskih hormonov. Del rastlinic pa se subkultivira ne enakem gojišču z namenom, da se obdrži nastavek aseptične kulture, kar se z rednim subkultiviranjem lahko izvaja neomejeno dolgo.

2.2.6.2 Iniciacija kalusa pri šentjanževki

Kalus gojimo zaradi več namenov; s preučevanjem rasti kalusa na gojiščih z različnimi sestavinami lahko proučujemo odziv tkiva na določene komponente gojišč (merimo svežo ali suho maso kalusa), lahko ga uporabimo tudi za izzivanje mutacij ali za produkcijo sekundarnih metabolitov (Bohanec, 1992). Običajno lahko različne odzive tolmačimo z različnim endogenim nivojem hormonov pri različnih rastlinah (Thorpe, 1983). Oblikovanje kalusa je izhodiščna točka za nastanek celičnih suspenzij.

Do sedaj je bilo zapisano za iniciacijo kulture kalusa, da se lahko le-to inicira po nastanku prvega para listov, ki se ga nekje po dveh tednih uporabi kot izseček za iniciacijo kulture kalusa. Kultura se goji v petrijevkah na MS/B5 gojitenem mediju ob dodatku 1 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L N-6-benziladenin (BA), 0,1 mg/L NAA, 3 % saharoze in 0,7 % agarja. Subkultivacija kalusne kulture se izvaja na vsakih 14 dni, s tem se pridobi zadostna količina kalusa, ki se nadalje lahko uporabi za pridobivanje celičnih suspenzij (Gadzovska in sod., 2007). Prav tako se lahko kalusna kultura vzpostavi iz izsečkov stebla kulture poganjkov *H. perforatum* L. Kalus se inicira in vzgaja na trdnem MS gojišču, kateremu se doda 4,5 μM NAA in 2,3 μM kinetin. Kalusna kultura raste na 25 ± 1 °C ter na fotoperiodi 16/8 (dan/noč). Kalus se na koncu eksponentne rastne faze vsakokratno subkultivira v intervalu štirih tednov (Dias in sod., 1998). Ena izmed možnosti je tudi, da se izsečki, ki se bodo uporabili za iniciacijo kalusa, predhodno vzgojijo in kot taki uporabijo za kalusno iniciacijo na gojitenem mediju MS ob dodatku vitaminov. Predhodno se gojišču uravna pH na 5,8 pred avtoklaviranjem na 121 °C za 20 min. Kultura kalusa kot taka, brez subkultiviranja, se lahko 8 tednov goji na 26 ± 2 °C in pod fotoperiodo 16/8 (dan/noč). Najoptimalnejši razvoj kalusa je nekje med 20. do 25. dnevom po iniciaciji (Çirak in sod.,

2007). Druga možnost je, da se listni izsečki, pridobljeni iz 6 tednov starih rastlinic, obdelajo, tako da se najstarejši in najmlajši listi na rastlinici odstranijo, ostali pa se uporabijo za kulturo kalusa. Dobri listki se transverzalno narežejo na 2-3 mm debele fragmente. Tako pripravljeni izsečki se kultivirajo na MS gojišču, ki vsebuje B5 vitamine, 30 g/L saharoze in 8 g/L strjevalca gojišča (agar) ter na pH 5,8. Avtorji članka so gojišču dodali številne rastlinske rastne hormone, odvisno od tega, kaj so žeeli doseči. Uporabili so 2,4-D, 2-metoxy-3,6 diklorbenzojsko kislino (DIC), NAA, IAA v kombinaciji s kinetinom in BAP-om ter tidiazuron-om (TDZ). Ob dodatku vseh omenjenih hormonov se inducira organogeneza. Kulture so bile gojene na petrijevkah v rastni komori pri popolni temi na 25 °C. Prvi znaki organogeneze se začno kazati po 21. dnevu iniciacije kulture kalusa (Wójcik in Podstolski, 2007). Kalusna kultura je lahko iniciirana z uporabo listov iz 10 dni starih rastlin gojenih *in vitro*, katerih izsečki so bili kultivirani na MS gojišču z vitaminimi in dodanimi 2,4-D, kinetinom in saharozo. Kulture so gojene v temi in pod svetlobo pri 25 ± 2 °C (Walker in sod., 2002).

Celoten postopek kalusne iniciacije poteka pod sterilnimi pogoji, saj se samo tako lahko nadaljuje aseptična kultura, ki je predpogoj za iniciacijo zdrave kulture celičnih suspenzij.

2.2.6.3 Iniciacija celične suspenzije pri šentjanževki

Celične in tkivne kulture, katerih namen je proizvodnja (pridobivanje) sekundarnih metabolitov, se lahko iniciirajo pod sterilnimi pogoji iz različnih izsečkov. Po vzpostavitvi drobljiv kalus prenesemo na tekoče gojišče in ga stresamo, tako razpade na manjše delce in posamezne celice. Ena od možnosti, kako razbijemo kalus, je ta, da ga stresamo pri višjih obratih (130/min) cca. 2 dni. Nato po preceditvi nadaljujemo gojenje pri nižjih obratih (85/min), ki zagotavljajo zračenje gojišča (Bohanec, 1989). Z odfiltriranjem večjih skupkov kalusa nastanejo celične suspenzije, ki so skoraj vedno sestavljene ne le iz posameznih celic, temveč tudi iz skupkov celic. Predpogoj je, da začnemo iz dovolj velike gmote kalusa, da zagotovimo zadostno število celic ali skupkov v celični suspenziji. Za uspešno rast celic je potrebno preučiti ustrezne sestavine gojišč in raziskati potek rasti. Po subkultivaciji, ki sledi vsakih 7 dni, se začne po začetni krajši stagnaciji eksponentna rast, ki nato ponovno zastane. Aktivno rastoče celične suspenzije so sestavljene navadno iz majhnih agregatov do 15 celic. Ločimo embriogene in neembriogene celične suspenzije. Neembriogene celične suspenzije se uporabljam predvsem kot možni vir sekundarnih metabolitov (Bohanec, 1992).

Največkrat se suspenzijske kulture gojijo v gojišču z enako sestavo, kot jo je imelo gojišče, v katerem je bil vzgojen kalus, vendar z eno razliko, v gojišču za kalus ni strjevalca gojišča (agarja), tako da so gojišča za celične suspenzije tekoča.

Kulture celičnih suspenzij se vzpostavijo iz kultur kalusa in so gojene v erlenmajericah z 50 mL hranljivega medija, ki vsebuje 2,4-D, kinetin in saharozo. Kulture celičnih suspenzij se pogosto subkultivirajo na 2 tedna. Gnjene so na stresniku ki je nastavljen pri 90 rpm, temperatura v rastni komori je 25 ± 2 °C (Walker in sod., 2002).

Potrebno je proučiti številne dejavnike, ki vplivajo na stabilno rast celičnih suspenzij in na stabilno produkcijo iskanih snovi. Znano je namreč, da vse celične suspenzije ne

proizvajajo želenih snovi, ki sicer nastajajo v rastlinah *in vivo*. Dogodi se tudi, da določeni kloni po določenem času kultiviranja izgubljajo to lastnost. Alternativa celičnim suspenzijam je vzgoja celih organov, zlasti korenin, ki naj bi te snovi proizvajale bolj konstantno. Za ohranitev kvalitetnih linij z veliko sposobnostjo proizvodnje sekundarnih metabolitov raziskujejo tudi shranjevanje takšnih linij. Mannonen in sod. (1990) ugotavljajo na primer, da je možno celične suspenzije ginsenga ali *Catharanthus roseus* ohraniti s krioprezervacijo. Pri tem lahko na povečanje produkcije sekundarnih metabolitov vplivamo z izboljšanjem linije s selekcijo oziroma odbiro linij z visoko produkcijo sekundarnih metabolitov ali z optimizacijo rastnega medija/gojišča (Karuppusamy, 2009). Vendar se kljub vsemu lahko zgodi, da rastlinske celične kulture ne proizvedejo želenih produktov. Takrat pridejo na plan tudi nekatere druge strategije izboljšanja produkcije sekundarnih metabolitov.

2.3 ANALIZA VELIKOSTI GENOMA *H. PERFORATUM* L.

2.3.1 Ploidnost v rodu *Hypericum*

Čellárová in sod. (1997) so opazovali spremembo kromosomskega števila rastline šentjanževke, regenerirane iz adventivnih poganjkov *in vitro*. Za tvorbo poganjkov so uporabili postopek po raziskavi Čellarova in sod. (1994). Regenerirane rastline so prenesli v zemljo in jih aklimatizirali pri 90 % vlažnosti. Nato so jih presadili na večje površine in na koncu vegetacijske dobe pobrali njihova semena. To je bila starševska generacija R₀. Generaciji R₁ in R₂ pa sta izvirali iz semen, ki so jih posejali in gojili v kontroliranih pogojih. Šentjanževka je tetraploid ($2n = 4x = 32$), citogenetska analiza pa je pokazala, da so regeneranti R₀ imeli različno število kromosomov, približno polovica je bila tetraploidov, ostali so bili diploidi, triploidi in miksopljadi. Citogenetska analiza R₁ in R₂ potomcev nakazuje na to, da se kromosomska nestabilnost R₀ somaklonov prenese na naslednjo generacijo. Določili so tudi vsebnost hipericina v regenerantih in ugotovili, da obstaja povezava med vsebnostjo hipericina in številom kromosomov R₀, R₁ in R₂ generacij. Glavni dosežek raziskave je bil, da so identificirali stabilne regenerante R₀, ki so vsebovali veliko hipericina, kar se je preneslo tudi na naslednje generacije. Dejstvo, da so diploidne rastline genetsko stabilne, nakazuje njihovo potencialno vrednost pri vzgoji šentjanževke.

Večina diploidnih potomcev, ki izhajajo iz semen (100 % pri R₁ in 94 % pri R₂), in več kot 60 % tetraploidov (61 % pri R₁ in 73 % pri R₂) ohranja kromosomskega števila, citogenetska raznolikost je opazna pri potomcih triploidov, miksopljadih in nekaterih tetraploidih.

Somakloni in njihovi potomci so bili preučeni na prisotnost sekundarnih metabolitov. Statistična obdelava podatkov je pokazala na korelacijo med vsebnostjo učinkovin in ploidnostjo med dvoletno kultivacijo R₀ somaklonov in njihovih R₁ in R₂ potomcev (Čellárová in sod., 1997).

Koperdáková in sod. (2007) so ugotovili, da je vsebnost preučevanega metabolita v *in vitro* regeneriranih rastlinah *H. perforatum* L. Pri R₀ in pri štirih generacijah potomcev (vzgojenih iz semen) (R₁-R₄) iz generacije v generacijo višja. Vsebnost v rastlinah gojenih na polju v času od 1992 do 2002 se je s selekcijo rastlin povečevala in je v R₄ generaciji

dosegla skoraj 7-krat višjo vrednost kot pri R_0 somaklonih. Prav tako je bila detektirana omembe vredna razlika med vsebnostjo metabolita v diploidih in tetraploidih pri R_0 , R_1 in R_3 generaciji. Rezultati raziskave so pokazali, da je bila v štirih zaporednih generacijah največja vsebnost pri diploidih vzgojenih v *in vitro* pogojih. Medtem ko je bila presenetljivo najnižja vsebnost pri diploidnih rastlinah, vzgojenih iz semen somaklonov.

2.3.2 Velikost genoma – merjenje ploidnosti s pretočno citometrijo

Pretočna citometrija je tehnika, ki nam prek opazovanja optičnih lastnosti omogoča analizo mnogih parametrov in sortiranje živih celic znotraj heterogenih populacij. Je napredno orodje, ki omogoča simultano analizo velikega števila fizikalnih in kemičnih parametrov v zelo kratkem času (nekaj sek). Pretočni citometer opravlja analizo na podlagi disperzije preučevanega materiala v tekočem mediju. Ko material potuje (na tisoče celic v sek ena za eno) mimo točke analize, takrat svetlobni žarek zadane ob celico, ki se od nje odbije, lomi ali pa se absorbira v fluorokromih, ki jih predhodno vežemo na celice. Celica z vezanim fluorokromom nato oddaja svetlubo daljše valovne dolžine. Dobljene podatke software pretočnega citometra predstavi v poročilu o karakteristiki celice (Introduction ..., 2013). Z meritnimi napravami merimo sipanje laserske svetlobe na posamezni celici, in sicer v smeri naprej in vstran. V smeri vstran lahko poleg sipanja merimo še fluorescenco. Tako lahko pridobimo informacije o velikosti in notranji granulaciji celice (sipanje) ter podatke o kemični sestavi celice (fluorescanca) (Turk, 2012).

Pretočna citometrija ima zelo velik spekter uporabe, in sicer na področju štetja celic, genetike, analize ploidnosti, medicine, imunofenotipiziranja ... (News medical ..., 2013). Analizirani podatki so lahko predstavljeni na dva načina, v histogramu ali v citogramu (Ormerod, 2008).

2.4 SPLOŠNO O SEKUNDARNIH METABOLITIH

Človek od nekdaj razlikuje med rastlinami, ki so koristne, in rastlinami, ki mu škodujejo. Botanika in medicina sta bili tesno povezani v vsej človeški zgodovini. Že od nekdaj so zdravniki, homeopati, naturopati, zeliščarji in šamani poznali rastline v svojem okolju in jih uporabljali, saj so v glavnem zdravila izhajala prav iz rastlin. Še okoli leta 1900 je 80 % zdravil izhajalo iz rastlin. Nekateri ocenjujejo, da poznamo le okoli 10 % naravnih spojin. Da bi o njih čim več izvedeli, raziskovalci uporabljajo različne pristope (Dermastia, 2006).

Za farmakološke učinke rastlin so odgovorne organske spojine, ki se povsem razlikujejo od znanih vmesnih produktov reakcij ali končnih produktov primarnega metabolizma, zato jih označujemo kot sekundarne metabolite. Te spojine se zelo razlikujejo tako med družinami, kot tudi med vrstami znotraj družin. Taka omejena razširjenost omogoča, da sekundarne produkte lahko uporabljamо kot taksonomske markerje. Sekundarni metaboliti so glavne spojine, ki rastlinam dajejo vonj, okus in barvo (Dermastia, 2006).

Izraz sekundarni metaboliti brez razlikovanja pokriva zelo veliko nesorodnih spojin in jim dodeljuje sekundarno, manj pomembno vlogo. Vendar so mnogi sekundarni metaboliti ključne komponente aktivnih in učinkovitih obrambnih mehanizmov, ki rastlino varujejo pred škodljivci in patogenimi mikroorganizmi. Te nekatere naravne učinkovine rastlin se že stoletja uporablja v terapevtske namene, od tod tudi njihovo poimenovanje kot zdravilne

rastline (Ramawat in Merillon, 2007). Pretežno pa velja dejstvo, da niso neobhodno potrebni za rast in razvoj rastline. Zato jih tudi imenujemo sekundarni metaboliti, medtem ko so neobhodno potrebni primarni metaboliti. Sekundarni metaboliti so lahko rastlinska barvila, farmacevtske snovi, insekticidne snovi, encimi in podobno, iščejo pa se tudi nove snovi (Phillipson, 1990). Z možnostjo vzgoje rastlinskih celic, kot je to na primer vzgoja kalusa, celičnih suspenzij ali kulture korenin, so se odprle nove možnosti za uravnavano proizvodnjo določenih snovi namesto na polju v industrijskih bioreaktorjih (Bohanec, 1992). Rastlinske tkivne kulture so učinkovit proizvajalec nekaterih biološko aktivnih molekul in v nekaterih primerih tudi alternativni vir želenih substanc (slika 5). Analize so pokazale, da se nekatere substance akumulirajo v suspenzijskih kulturah v enakih ali višjih koncentracijah, kot je to značilno pri rastlinah v naravi (Ramawat in Merillon, 2007).



Slika 5: Metoda, uporabljena pri *in vitro* tkivnih kulturah – celične kulture (Ramawat in Merillon, 2007)
Figure 5: Methodology used for production of secondary metabolites by cell culture (Ramawat and Merillon, 2007)

2.4.1 Sekundarni metaboliti pri *H. perforatum* L.

Večino sekundarnih produktov lahko razdelimo v razrede glede na strukturne podobnosti, biosintetske poti ali na vrste rastlin, ki jih izdelujejo. Največ jih spada med dušik vsebujoče snovi, terpenoide in fenole, obstajajo pa še nekateri drugi razredi, ki pa niso nič manj pomembni (Dermastia, 2006).

Vrsta *H. perforatum* L. poseduje širok spekter različnih biološko aktivnih sekundarnih metabolitov, ki se uvrščajo po lastnostih v različne kemijske skupine. Floroglucinole, naftodianrone, ksantone, eterična olja, fenolne kisline in širok spekter flavonoidov ter derivate flavonov, diflavonov, procianidinov so identificirali v ekstraktih rastline (Greeson in sod., 2001; Bilia in sod., 2002; Butterweck, 2003; Patočka, 2003; Tatsis in sod., 2007). Še posebej floroglucinoli, naftodianroni in flavonoidi so prisotni v tkivih vrste *H. perforatum* L. Številne farmakološke študije so potrdile, da imajo prav te sestavine največ zaslug za antidepresivno delovanje šentjanževke (Nathan, 2001; Butterweck, 2003; Butterweck in sod., 2003; Medina in sod., 2006). V indijskih sortah šentjanževke so odkrili nenavadno velike količine ksantonov, ki imajo antidepresivne lastnosti (Muruganandam in sod., 2000). Ksantoni in naftodianroni so prisotni v manjši količini (manj kot 1 %), zadnjo skupino pa tvorijo floroglucinoli, katerih večjo koncentracijo (5 %) so zasledili v svežih rastlinah (Nahrstedt in Butterweck, 1997).

Floroglucinoli so prisotni v številnih rastlinskih družinah (Hypericaceae, Gentianaceae, Cannabidaceae, Rosaceae). Za *H. perforatum* L. sta značilna hiperforin in adhiperforin. Po viru (Nahrstedt in Butterweck, 1997) se ti spojini pojavljata samo v cvetovih in plodovih, v

raziskavi, izvedeni na Fakulteti za farmacijo, pa so dokazali sled tudi v zelenih listih (Mlinarič, 2000). Spojini sta lipofilni in občutljivi na povišano temperaturo in svetlobo (Nahrstedt in Butterweck, 1997). Hiperforin je najpogosteji razlog vseh farmakološko povezanih študij glede antidepresivnih lastnosti šentjanževke v zadnjem času. Glavni problem detekcije hiperforina je v tem, da je izredno nestabilen v prisotnosti kisika in svetlobe (de los Reyes in Koda, 2001). Nekatere raziskovalne skupine so se v zadnjih letih usmerile predvsem na raziskovanje antidepresivnega delovanja hiperforina. Ugotovili so, da pri *in vitro* poskusih hiperforin zavira ponovni privzem živčnih prenašalcev serotoninina, noradrenalina in dopamina, katerih znižana koncentracija igra bistveno vlogo pri depresiji. Novejše študije antidepresivnega delovanja izvlečkov šentjanževke poudarjajo predvsem vlogo hiperforina (Mlinarič, 2000).

2.4.1.1 Floroglucinoli

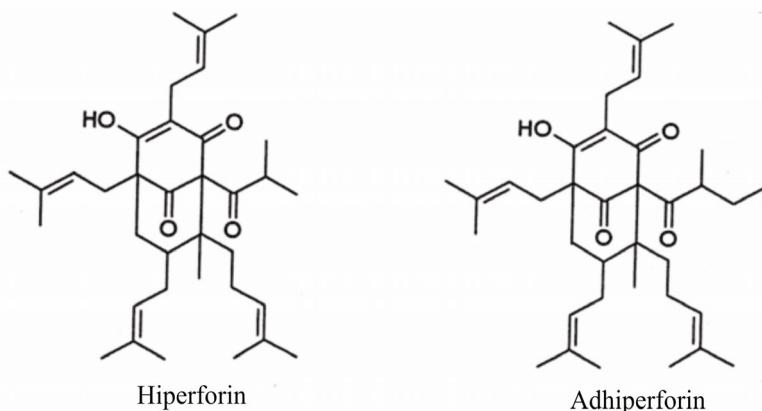
Različni tipi floroglucinolnih derivatov so razpoznavni znak rodu *Hypericum*, ki so znotraj tega široko razširjeni (Patočka, 2003; Crockett in sod., 2005; Dall'Agnaol in sod., 2005; Beerhues, 2006). Glavni predstavnik, najden v *H. perforatum* L., je hiperforin in njegov homolog adhiperforin (slika 6). Hiperforin se v glavnem pojavlja v rastlini, in sicer v 2 do 10-krat večjih količinah kot njegov homolog adhiperforin (Greeson in sod., 2001; Patočka, 2003). Hiperforin in adhiperforin kot tudi homolog secohiperforin se lahko detektirajo v manjših količinah v *H. perforatum* L. (Kirakosyan in sod., 2004; Charchoglyan in sod., 2007; Tatsis in sod., 2007; Hölscher in sod., 2009). V manjših količinah, v ekstraktih znotraj te vrste, se lahko detektira oksigenirane analoge hiperforina (Trifunović in sod., 1998; Brolis in sod., 1998; Verotta in sod., 1999; Verotta in sod., 2000). Še do danes ni razjasnjeno, ali so poznani analogi naravne komponente ali so razgradni produkti hiperforina, ki so generirani med ekstrakcijskim postopkom (Verotta in sod., 2000; Kirakosyan in sod., 2004; Beerhues, 2006).

Hiperforin se v rastlini ne akumulira v tako veliki meri. V zelo nizkih koncentracijah se nahaja v temnih žlezah, medtem ko ga v nesekretornih žlezah niso uspeli detektrirati. Prav tako se predpostavlja, da se lahko hiperforin biosintetizira v parenhimskih sekretornih celicah (Soelberg in sod., 2007), in izkazalo se je, da se akumulira v translucentnih žlezah *H. perforatum* L. (Soelberg in sod., 2007; Hölscher in sod., 2009). Hiperforini se v največjih koncentracijah oz. količinah pojavljajo v cvetovih *H. perforatum* L., posledično v nastalih sadežih, prav tako so v velikih količinah prisotni v listih (Repčák in Mártonfi, 1997; Tekel'lová in sod., 2000; Sirvent in sod., 2003; Beerhues, 2006). Podatki kažejo, da se lahko hiperforin pojavlja v deležih 6,9 % v cvetovih rastlin, 8,5 % v nezrelih sadežih in v deležu 1,5 % v listih istih rastlin (Tekel'lová in sod., 2000; Sirvent in sod., 2003).

V čem hiperforini koristijo rastlini, še ni povsem jasno, predvideva pa se, da služijo kot obrambni mehanizem zoper herbivore in ostale rastlinske škodljivce (Sirvent in Gibson, 2002; Sirvent in sod., 2003; Beerhues, 2006).

Hiperforin je zelo nestabilen metabolit, ki se razgradi, če je izpostavljen vročini, svetlobi in kisiku - oksigenacija (Beerhues, 2006; Medina in sod., 2006). Zaradi tega je bilo njegovo bioaktivnost težko preučiti in do nedavnega ni bil obravnavan kot farmakološko aktivna snov šentjanževke (Beerhues, 2006; Wurglies in Schubert-Zsilavecz, 2006). Danes se

hiperforin uvršča med glavne bioaktivne snovi, ki imajo eno izmed glavnih vlog pri antidepresivnem učinkovanju šentjanževke (Müller, 2003; Patočka, 2003; Medina in sod., 2006; Wurglics in Schubert-Zsilavecz, 2006). Podobne lastnosti so bile odkrite pri njegovih homologih, in sicer pri adhiperforinu (Jensen in sod., 2001; Müller, 2003). Poleg antidepresivne vloge hiperforina so bili raziskani tudi ostali neurološki efekti (Medina in sod., 2006), kot tudi antikancerogena (Schempp in sod., 2000; Hostanska in sod., 2003; Donà in sod., 2004; Medina in sod., 2006), protivnetna (Schempp in sod., 2000; Schempp in sod., 2003; Medina in sod., 2006), protibakteriološka (Reichling in sod., 2001; Medina in sod., 2006) in antiprotozoološka vloga (Verotta in sod., 2007).



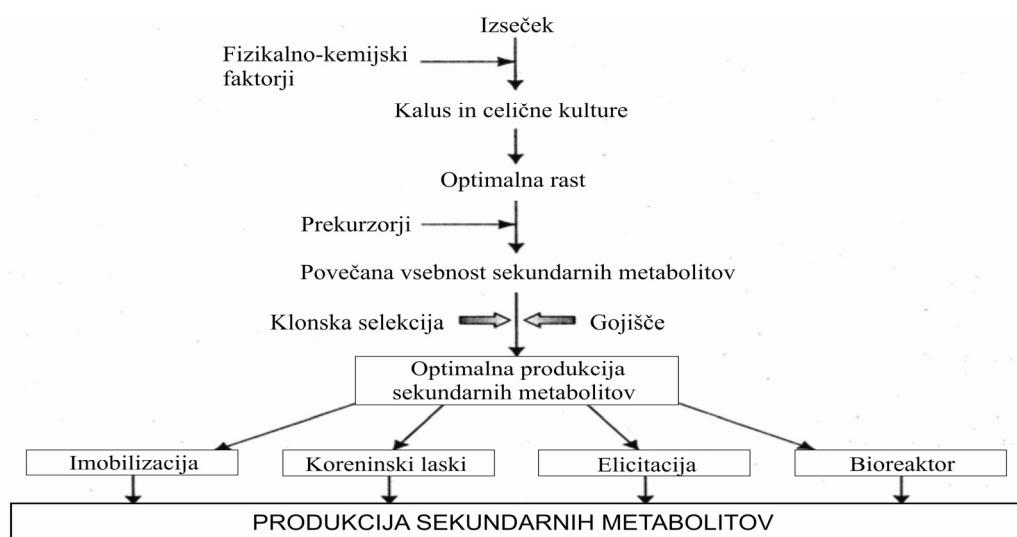
Slika 6: Strukturne formule dveh najpomembnejših floroglucinolov, ki sta prisotna v šentjanževki (Karppinen, 2010)

Figure 6: The main phloroglucinols in St. John's wort (Karppinen, 2010)

2.4.1.2 Producija sekundarnih metabolitov pri rastlinskih tkivnih kulturah šentjanževke

Nastanek sekundarnih metabolitov je nadzorovan s strani genov, zato tudi zmožnost rastlinskih celic gojenih v tkivnih kulturah, da tvorijo enake produkte kot rastline v naravi. Poglavitna razlika je v tem, da je delež produktov, ki nastanejo pri celicah gojenih v kulturah, precej nižji kot pri rastlinah v naravi. Vendar kot vedno obstajajo nekatere izjeme, pri katerih količina nastalih produktov presega količino pri rastlinah v naravi. Zato se večina raziskav s tega področja osredotoča na področje povečanja produkcije s povečanjem sinteze in akumulacije produkta in selekcijo celic/tkiv, ki so namenjene za producijo sekundarnih metabolitov.

Po odbiru najboljših izsečkov sta zelo pomembni izbira gojitvenega medija (gojišča) in gojitvene metode, kot so elicitacija, kultura korenin, imobilizacija ali gojenje v bioreaktorju (slika 7).



Slika 7: *In vitro* produkcija sekundarnih metabolitov (Ramawat in Merillon, 2007)
Figure 7: *In vitro* production of secondary metabolites (Ramawat and Merillon, 2007)

Na vsebnost hiperforinov v ekstraktih pripravljenih iz rastlin, ki so gojene na poljih ali v kontroliranih pogojih – rastlinjakih, močno vplivajo mnogi faktorji, kot so čas žetve (Southwell in Bourke, 2001; Walker in sod., 2001; Gray in sod., 2003; Couceiro in sod., 2006), geografsko poreklo preučevane rastline (Walker in sod., 2001), kot tudi prisotnost biotskih ali abiotskih kontaminantov (Sirvent in Gibson, 2002; Murch in sod., 2003; Bruni in sod., 2005; Tirillini in sod., 2006). Količina posameznih komponent – metabolitov je v veliki meri odvisna od genotipa rastline (Couceiro in sod., 2006), kot tudi od nekaterih eksogenih dejavnikov, kot so koncentracija CO₂ (Mosaleeyanon in sod., 2005), temperatura (Zobayed in sod., 2005; Couceiro in sod., 2006), razpoložljivost vode (Gray in sod., 2003; Zobayed in sod., 2007), prisotnost dušika in osvetlitve (Briskin in Gawienowski, 2001; Germ in sod., 2010).

Sistem *in vitro* kultur naj bi bil resna alternativa komercialni produkciji rastlinskega materiala v farmacevtski industriji, z namenom zadovoljitev vse večjih zahtev po naravnih učinkovinah, kot tudi doseganja manjše variabilnosti aktivnih komponent (Bourgaud in sod., 2001; Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002; Verpoorte in sod., 2002; Kirakosyan in sod., 2004; Zhou in Wu, 2006; Karuppusamy, 2009). S tem razlogom so se protokoli *in vitro* propagacije razvili tudi pri *H. perforatum* L. (Čellárová in sod., 1992; Zdunek in Alfermann, 1992). Razvili so se številni protokoli za proizvodnjo sekundarnih metabolitov, ki so podrobno opisani, z namenom detekcije količine hiperforinov v *in vitro* tkivnih kulturah (Murch in sod., 2000; Bais in sod., 2002; Košuth in sod., 2003; Pasqua in sod., 2003; Kirakosyan in sod., 2004; Gadzovska in sod., 2005; Karppinen in sod., 2006a). Poleg tega je aktualna *in vitro* produkcija *H. perforatum* L. tudi v bioreaktorjih (Zobayed in sod., 2003; Zobayed in Saxena, 2003; Zobayed in sod., 2004; Karppinen in sod., 2006a; Karppinen in sod., 2006b; Karppinen in sod., 2006c; Cui in sod., 2010). Kljub vsemu je uporaba tkivnih kultur v komercialne namene zelo omejena, ker je količina proizvedenih sekundarnih metabolitov za komercialne namene prenizka (Verpoorte in sod., 2002; Kirakosyan in sod., 2004; Zhou in Wu, 2006).

Poleg optimizacije rastnih pogojev in selekcije visoko produktivnih celičnih linij so bile implementirane elicitacija, biotransformacija prekurzorjev in genetski inženiring kot nove strategije, s pomočjo katerih bi lahko izboljšali biosintezo sekundarnih komponent (metabolitov) pri rastlinskih tkivnih kulturah (Bourgaud in sod., 2001; Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002; Verpoorte in sod., 2002; Zhou in Wu, 2006; Karuppusamy, 2009). Tako poskušajo razviti metode, s katerimi bi dosegli večjo raven hiperforinov v tkivnih kulturah *H. perforatum* L. ob dodatku elicitorjev (Kirakosyan in sod., 2000; Walker in sod., 2002; Kirakosyan in sod., 2004; Gadzovska in sod., 2007; Liu in sod., 2007a; Pavlíc in sod., 2007) in z dodajanjem potencialnih prekurzorjev v tkivne kulture (Liu in sod., 2007b). Del raziskav je osredotočenih na razvoj učinkovite transformacijske metode za določene *Hypericum* vrste z namenom izboljšanja biosinteze terapevtsko učinkovitih komponent s pomočjo genetskega inženiringa (Di Guardo in sod., 2003; Vinterhalter in sod., 2006; Franklin in sod., 2007; Komarovská in sod., 2009). Razumevanje biosintetskih poti in njihova regulacija je predpogoj za učinkovito manipulacijo želenih sekundarnih metabolitov v *in vitro* kulturah (Verpoorte in sod., 2002; Kirakosyan in sod., 2004; Zhou in Wu, 2006; Bruni in Sacchetti, 2009; Karuppusamy, 2009).

2.5 KROMATOGRAFIJA

Kromatografske metode ali kromatografija je družina tehnik analitične kemije za ločevanje zmesi, ki so sicer težko ločljive med seboj. Uporabne so za ločevanje večjih količin (več gramov) snovi, kot tudi za izolacijo zelo majhnih (pg) množin. Tako lahko uporabimo kromatografijo kot preparativno in kot analitsko tehniko. Termin je bil prvič uporabljen s strani ruskega botanika Tswett-a, ki je hotel opisati separacijo rastlinskih pigmentov na koloni aluminijevega oksida. Poznamo več različnih tipov kromatografije, ki pa vse temeljijo na interakcijah med komponentami: raztopino, ki jo želimo separirati, trdno fazo in topilom. Jakost med temi interakcijami je odvisna od metode, ki jo uporabimo (Ramawat in Merillon, 2007).

2.5.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je separacijska tehnika, ki temelji na porazdelitvi vzorca med mobilno fazo, ki je tekočina majhne viskoznosti, in stacionarno fazo, ki je trda snov. Mobilna faza potuje skozi stacionarno fazo v določeni smeri. Kromatografski proces, ki pri tem nastaja, je rezultat ponavljače se sorpcije in desorpcije s stacionarno fazo, ki poteka med potovanjem komponent vzdolž kolone. Do separacije pride zaradi razlik v porazdelitvenih konstantah posameznih komponent vzorca, ki so posledica različnih termodynamičnih lastnosti topljencev. Topljenci, ki imajo večjo afiniteto do mobilne faze, pridejo hitreje iz kolone kot topljenci, ki se zadržujejo v stacionarni fazi. Eluirajo se v vrstnem redu po velikosti porazdelitvenih koeficientov glede na stacionarno fazo. Porazdelitev je posledica velikosti molekulskih sil med molekulami topljenca in molekulami obeh faz. Močnejše kot so sile med molekulami topljenca in molekulami v stacionarni fazi, počasneje se topljenec eluira (Ramawat in Merillon, 2007).

Sestava mobilne faze se lahko med separacijo spreminja. Ta način separacije se imenuje gradientno izpiranje. Pri izokratskem izpiranju ostane polarnost mobilne faze nespremenjena. Z razvojem visokotlačnih črpalk, ki omogočajo konstantne pretoke brez

pulziranja, in z razvojem tehnologije izdelave kolon ter različnih detektorjev je postala HPLC nepogrešljiva metoda za separacijo in določevanje večine organskih in anorganskih spojin. Odlikuje se po hitrosti, občutljivosti, ločljivosti, majhni množini vzorca ter večkratni uporabi kolone (Pečavar, 1998).

2.5.2 Pregled separacijskih metod za določitev hiperforina

Za nekatere analize velja, da so bolj specifične kot druge za določitev neke snovi. Tako so ene bolj specifične za določitev hiperforina kot ostale. Tretje so univerzalne, z njimi se lahko določi celoten spekter metabolitov v rastlini.

Glede detektiranja hiperforina pri rastlini šentjanževke se iz objavljene literature sklepa, da izmed vseh separacijskih načinov prevladujejo metode HPLC z različnimi načini detekcije. Primerne za analitsko delo te vrste so zaradi svojih številnih karakteristik. Drugi dejavnik, ki opredeli HPLC metode kot učinkovite za detekcijo floroglucinolnih spojin, je izredna občutljivost hiperforina na eksogene pogoje, kot so svetloba, temperatura in kisik. Poleg tega so bili razviti številni postopki za potrebe analize floroglucinolov. Te vključujejo vse od UV spektroskopije, tankoplastne kromatografije (TLC), HPLC, HPLC dopolnjene z masno spektrometrijo (HPLC-MS), vse do kapilarne elektroforeze (CE). Pred temi analizami se pogosto izvede posebno predtretiranje vzorcev, ki vključuje tekočo-tekočo ekstrakcijo (LLE) in trdno-fazno ekstrakcijo (SPE) (Huck in sod., 2006).

V zadavi tretiranja vzorcev je pomembno, da so aktivne sestavine ponavadi ekstrahirane z etanolom, MeOH ali acetonom, lahko pa se uporabi tudi vodna raztopina alkoholnih mešanic. Ta korak ekstrakcije se lahko izvede z mešanjem, pri sobni temperaturi, pri temperaturah med 50 do 100 °C ali pa s sonifikacijo, kjer se s pomočjo ultrazvoka opravi razstavitev zmesi na komponente. Najpogostejsa ugotovitev pri ekstrakciji je, da je hladna ekstrakcija s polarnima topiloma, kot sta MeOH ali etanol, najprimernejša metoda, saj minimizira količino razgradnih produktov. Hkrati je zelo priporočljiva zatemnitve delovnega prostora, saj velja, da so metaboliti izredno fotoobčutljivi (Pages in sod., 2007). Opazili smo, da so metode ekstrakcije standardizirane tudi za določanje hiperforina. Zadnje čase se je vse več raziskav osredotočilo na ekstrahiranje najpomembnejšega naravnega antidepresiva hiperforina z uporabo superkritičnega ogljikovega dioksida (CO₂) (Catchpole in sod., 2002).

HPLC je množično uporabljen za analizo številnih snovi, ne samo hiperforina. Do sedaj je uspelo strokovnjakom tega področja razviti kar nekaj metod, ki so uporabne za določitev vseh ali vsaj večine aktivnih sestavin pri šentjanževki (Pellati in sod., 2005).

Do sedaj se je razvilo kar nekaj analitičnih tehnik za identifikacijo in karakterizacijo aktivnih substanc ekstraktov *H. perforatum* L. Pri HPLC separaciji se le-ta izvede pod pogoji reverzne faze v večini navedenih virov.

Največkrat samo HPLC naredi možno identifikacijo in kvantifikacijo vseh aktivnih sestavin. Glavna pomanjkljivost te metode je dolgotrajnost postopka oziroma čas, potreben za analizo, in pogostokrat nedokončana separacija nekaterih komponent oziroma substanc. Za izboljšanje teh pomanjkljivosti so strokovnjaki iskali možne rešitve, kot so uporaba

monolitičnih suporterjev za zmanjšanje potrebnega časa za analizo, kot tudi razvoj kompleksnih elucijskih mešanic, s katerimi se izboljša selektivnost in tudi resolucija kromatografskega sistema (Pages in sod., 2007).

V preteklih letih je s pomočjo akumuliranega znanja prišlo do razvoja RP-HPLC metode (reverzno fazna-tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) s polarno stacionarna fazo. Na ta način je omogočena učinkovitejša analiza vzorca, ki vsebuje širok spekter polarnih komponent in omogočena občutna redukcija v času, potrebnem za analizo. Za stacionarno fazo je bil uporabljen polietilenglikol (PEG) (Pellati in sod., 2005). Z optimizacijo stacionarne in mobilne faze v reverzno fazni tekočinski kromatografiji (RP-LC) se doseže separacija derivatov. Elucija je odvisna od poroznosti medija in traja okrog 15 na poroznem mediju do 25 minut na silika C₁₈ (Huck in sod., 2006).

Zasledili smo tudi metodo LC/SPE/NMR (UV). Gre za metodo LC/NMR (UV), v katero je po premisleku vstavljenia SPE enota oziroma kiveta, ki se nahaja med LC – UV enoto in NMR spektrometrom. Naloga te je ujeti eluate iz kolone v kivete, vsakega posebej, in jih nato izpostaviti spektrometrični analizi (Tatsis in sod., 2007). Ta metoda je natančna, saj so z njo odkrili sekundarne metabolite, za katere so mislili, da so samo kot prekurzorji v biosintezi hiperforina in adhyperforina. Prav dopolnjevanje LC s spektrometričnimi tehnikami, kot so UV, MS, NMR, omogoča orodje za hitro analizo. Uporaba LC/UV/MS instrumentacije omogoča kratko izpostavitev metabolitov svetlobi in zraku (eksogenim dejavnikom), in tako zmanjša verjetnost dejavnikov, ki omogočajo njihovo degradacijo (Tatsis in sod., 2007).

LC/DAD je metoda za hitro in učinkovito skeniranje posebnih »koktejlov« sekundarnih metabolitov, vendar so podatki pridobljeni na ta način (absorbanca svetlobe) nezadovoljivi za strukturno določitev.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Izvorni rastlinski material

Decembra 2009 smo za iniciacijo tkivne kulture uporabili seme *H. perforatum* L. različnih sort, populacij in linij.

Iz slovenske genske banke smo pridobili populacije, ki smo jih vključili v raziskavo: 6/15 Maja, 6/9 BF LP 2006, BFL 18 – 002/05, BFL 21 – 004/05, 6/4 BF LP 2006, 6/8 BF LP 2006, 6/2 BF LP 2006. Ostale sorte in linije ter populacijo smo pridobili izven Slovenije: 'Maja' (Srbija), 'Anthos' (Nemčija – Chrestensen), 'Taubertal' (Nemčija – Rieger Hofmann), 'Topas' (ZDA – Swallowtail Garden), 'Gemo' (ZDA – Botanic Garden Brooklyn) in linije Stamm 21 (Nemčija – Chrestensen), Stamm 710 (Nemčija – Chrestensen), Stamm 715 (Nemčija – Chrestensen) ter prostoživeča populacija (divja iz Kanade) (preglednica 2).

Pri posameznih rastlinah šentjanževke smo odstranili vršiček in spodnja dva bazalna lista, kot izhodni rastlinski material za iniciacijo kalusa pa smo uporabili mlade liste. Pri analizi koncentracije hiperforina smo uporabili vršičke in cvetove rastline šentjanževke, ki smo jih nabrali v času cvetenja.

Velikost genoma smo analizirali pri vseh razpložljivih sortah in linijah *H. perforatum* L. Vsak analizirani vzorec je vseboval rastlinski material petih rastlin.

Preglednica 2: Seznam populacij, sort in linij *H. perforatum* L. uporabljenih pri poskusih
Table 2: List of populations, cultivars and lineages of *H. perforatum* L. used in experiments

Populacija/sorta/linija	Izvor (poreklo)
populacija 6/8 BF LP 2006	Slovenija – lab. polje BF
populacija 6/9 BF LP 2006	Slovenija – lab. polje BF
populacija 6/2 BF LP 2006	Slovenija – lab. polje BF
populacija BFL 18 – 002/05	Slovenija – lab. polje BF
populacija 6/15 Maja	Slovenija – lab. polje BF
populacija BFL 21 – 004/05	Rakitovec
populacija 6/4 BF LP 2006	Slovenija – lab. polje BF
prostoživeča populacija	Kanada
'Topas'	ZDA – Swallowtail Garden
'Maja'	Srbija
'Gemo'	ZDA – Botanic Garden Brooklyn
'Anthos'	Nemčija – Chrestensen
'Taubertal'	Nemčija – Rieger Hofmann
linija Stamm 710	Nemčija – Chrestensen
linija Stamm 715	Nemčija – Chrestensen
linija Stamm 21	Nemčija – Chrestensen

3.2 METODE DELA

Omenjeni rastlinski material, pridobljen iz semena, smo gojili tudi v rastlinjaku in smo ga kasneje uporabili za HPLC analize vsebnosti hiperforina in za analizo velikosti genoma.

3.2.1 Potek mikropropagacije

Delo je potekalo v aseptičnih komorah, ki zagotavljajo visoko stopnjo sterilnosti vpihovanega zraka, in s tem atmosfere v komori. Za pripravo rastlinskega materiala smo uporabljali skalpele in pincete, ki smo jih pred vsako uporabo razkužili v električnem visokotemperaturnem grelcu. Poleg tega smo potrebovali ostali pribor, kot so papirnatи pladnji in filter papir, vse predhodno sterilno z namenom ohranitve aseptične kulture.

V času rasti so bili izsečki gojeni v tkivni kulturi, v klimatiziranih komorah z regulacijo časovnega razporeda in intenzivnosti osvetlitve ter regulacijo temperature. V rastnih komorah smo vzdrževali temperaturo 23 ± 1 °C, fotoperiodo 16/8 (dan/noč) na osvetlitvi z neonskimi žarnicami (Cool White), pri povprečni intenzivnosti osvetlitve $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sek}$.

3.2.1.1 Sestava in priprava gojišč

Sestava posameznih gojišč in pogoji za kalitev:

1. Agar (8 g/L) ... fotoperioda (tema) (Franklin in Dias, 2006).
2. MS (4,302 g/L) + saharoza (30 g/L) + agar (6 g/L) ... pH = 5,8 in fotoperioda 16/8 (dan/noč) (Liu in sod., 2007a).
3. $\frac{1}{2}$ MS (2,151 g/L) + BAP (0,20 mg/L) + NAA (0,20 mg/L) + saharoza (20 g/L) + agar (10 g/L) ... pH = 5,8 in fotoperioda 16/8 (dan/noč) (Pasqua in sod., 2003).
4. Sterilen papir (2 kom/petrijevko) + sterilna voda (3,5 mL/petrijevko) ... fotoperioda 16/8 (dan/noč) (Pérez-García in sod., 2006).
5. MS (4,302 g/L) + agar (8g/L) ... pH = 5,8 in fotoperioda 16/8 (dan/noč) (Çirak in sod., 2007).

Sestava gojišč za iniciacijo kalusa:

1. MS z vitaminimi (4,405g/L) + 2,4-D (0,2 mg/L) + kinetin (0,02 mg/L) + saharoza (30 g/L) + agar (8 g/L) ... pH = 5,8 in fotoperioda (tema) (Walker in sod., 2002).
2. MS z vitaminimi (4,405g/L) + 2,4-D (1 mg/L) + BA(P) (1 mg/L) + saharoza (30 g/L) + agar (8 g/L) ... pH = 5,8 in fotoperioda (tema) (Çirak in sod., 2007).

Gojišče za razmnoževanje/koreninjenje

1. MS (4,302 g/L) + IAA (0,1 mg/L) + BAP (0,5 mg/L) + saharoza (20 g/L) + agar (8 g/L) ... pH = 5,8 in fotoperioda 16/8 (dan/noč) (McCoy in Camper, 2002).

Gojišče za celične suspenzije

1. MS z vitaminimi (4,405g/L) + 2,4-D (0,2 mg/L) + kinetin (0,02 mg/L) + saharoza (30 g/L) ... pH = 5,8 in fotoperioda (tema) (Walker in sod., 2002).

Pri poskusih smo uporabili MS anorganske soli v koncentraciji 4,405 g/L z vitaminimi (preglednica 3) in koncentracijo 4,302 g/L brez vitaminov.

Preglednica 3: Sestava MS (Murashige in Skoog) gojišča (Murashige in Skoog, 1962)
 Table 3: Composition of MS (Murashige and Skoog) basal medium (Murashige and Skoog, 1962)

	Snov	Koncentracija
makrohranila	Amonijev nitrat (NH_4NO_3)	1.650 mg/L
	Kalcijev klorit ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440 mg/L
	Magnezijev sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370 mg/L
	Kalijev fosfat (KH_2PO_4)	170 mg/L
	Kalijev nitrat (KNO_3)	1.900 mg/L
mikrohranila	Borova kislina (H_3BO_3)	6,2 mg/L
	Kabaltov klorid ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,025 mg/L
	Bakrov sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,025 mg/L
	Železov sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27,8 mg/L
	Manganov sulfat ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22,3 mg/L
	Kalijev jodid (KI)	0,83 mg/L
	Natrijev molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,25 mg/L
	Cinkov sulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8,6 mg/L
	Dinatrijeva sol EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37,2 mg/L
	Saharoza	30 g
vitamini	Mezo-inozitol	100 mg/L
	Nikotinska kislina	0,5 mg/L
	Piridoksin. HCl	0,5 mg/L
	Thiamine. HCl	0,1 mg/L
AK	Glicin	2,0 mg/L
hormoni	NAA/IAA/2,4-D	0,01 – 10,0 mg/L
	Kinetin	0,04 – 10,0 mg/L
	pH	5,7 – 7,0

Posebej smo pripravili založne raztopine rastnih regulatorjev, ki smo jih v opisanih koncentracijah dodali gojišču (preglednica 4):

Preglednica 4: Uporabljeni rastni hormoni (založne raztopine)
 Table 4: Growth regulators used in experiments

	Snov	Koncentracija
rastni hormoni	2,4 diklorofenoksiacetna kislina (2,4-D)	0,2 mg/L
	Kinetin	0,02 mg/L
	Indolocetna kislina (IAA)	0,1 mg/L
	Benzilaminopurin (BAP)	0,5 mg/L

Gojišču (razen tekočemu) smo dodajali še agar Difco-bacto 8g/L (0,8 %) ter 2-3 % saharoze.

Posamezne sestavine gojišča smo stehtali na elektronski tehnci, za nekatere manjše količine pa smo pripravili založne raztopine, ki so bile shranjene v hladilniku. Preden smo v raztopino gojišča dodali strjevalec gojišča, v našem primeru agar, smo s pH metrom, ob uporabi megnetenega mešala, umerili pH vrednost na $5,8 \pm 0,1$ – tako da smo dodajali 0,1-

1,0 M kalijev hidroksid (KOH) (za dvig pH) ali vodikovo kislino (HCl) (za nižanje pH). Po dodatku agarja smo pripravljeno gojišče sterilizirali z vročo paro (avtoklaviranje) pri 121 °C, 1,1 bar, 20 min, ob dodatku referenčne raztopine. V aseptičnih komorah smo sterilno gojišče, primerno ohlajeno, razlili v petrijevke ali kadičke, odvisno od namena uporabe pripravljenega gojišča. Gojišče brez dodatka strjevalca smo pred avtoklaviranjem razlili v erlenmajerice z namenskim dozatorjem gojišča. Erlenmajerice smo zaprli s čepi in prekrili z gospodinjsko aluminijasto (ALU) folijo.

3.2.1.2 Sterilizacija rastlinskega materiala

Za razkuževanje semena smo uporabili 75 % raztopino etanola, 1,66 % dikloroizocianosečno kislino (DICA) in sredstvo za oprijemanje Tween 15 ter bidestilirano avtoklavirano vodo za izpiranje semen.

Rastlinska semena smo najprej prelili s 70 % raztopino etanola (5 sek), zatem smo semena 20 min sterilizirali v 1,66 % raztopini DICA ob dodatku 2 kapljic sredstva za oprijemanje Tween 15. Tako smo pridobili sterilni material za vzpostavitev aseptične tkivne kulture. Po koncu razkuževanja smo tretirana semena 4-krat spirali s sterilno bidestilirano vodo.

3.2.1.3 Iniciacijia kulture

Decembra 2009 smo pričeli z iniciacijo tkivne kulture iz semen 16 sort, populacij in linij šentjanževke. Razpoložljiva semena smo kalili na predhodno pripravljenih štirih gojiščih in na sterilnem filterpapirju (slika 8). Kalus smo iniciirali na gojiščih, zapisanih v poglavju 3.2.1.1 (Sestava in priprava gojišč – Gojišče za kalus). Osnovno tehniko mikropropagacije, ki smo jo modificirali, smo povzeli po Walker in sod. (2002).



Slika 8: Iniciacijia kulture šentjanževke ('Taubertal')
Figure 8: Initiation of St. John's wort culture ('Taubertal')

3.2.1.4 Razmnoževanje rastlinskega materiala

Istočasno smo del rastlinic, ki so kalile, prestavili na gojišče za razmnoževanje/koreninjenje, z namenom ohranjanja aseptičnega rastlinskega materiala (slika 9). Izkoristili smo poganjek rastlinice, katerega smo odrezali pri 3 do 4 kolenu. Izseček smo položili v kadičke, v katerih je bilo primerno gojišče. Subkultivacijo rastlinskega materiala smo izvajali vsake 4 tedne, in s tem zagotovili razpoložljivost in aseptičnost mladega svežega rastlinskega materiala. Inteziteta svetlobe je bila pri obeh $4,41 \text{ J/m}^2\text{sek}$.



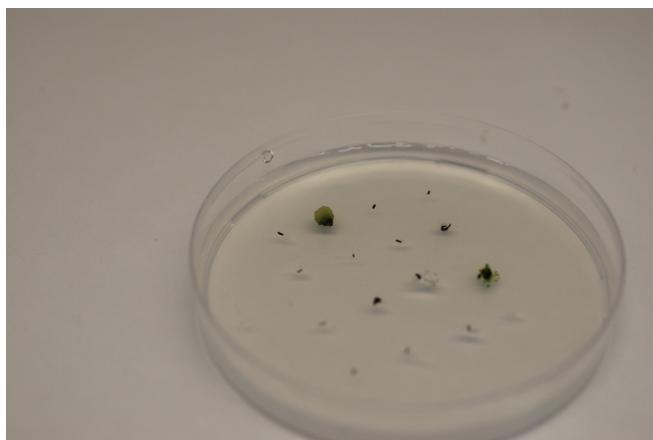
Slika 9: Mikropagacija šentjanževke
Figure 9: Micropagation of St. John's wort

3.2.1.5 Kalusna kultura

Kulturo kalusa smo vzpostavili iz mladih listkov nekaj dni starih rastlinic predhodno vzgojenih v aseptičnih pogojih (slika 10). Kulturo smo incuirali na predhodno pripravljenem gojišču MS z vitamini ($4,405 \text{ g/L}$) + 2,4-D ($0,2 \text{ mg/L}$), kinetinom ($0,02 \text{ mg/L}$), saharozo (30 g/L), agarjem (8 g/L), kateremu smo pred avtoklaviranjem pri 121°C za 20 min umerili pH na 5,8 (Walker in sod., 2002). Vzporedno smo preizkusili uspešnost tvorbe kalusa na gojišču MS z vitamini ($4,405 \text{ g/L}$) + 2,4-D (1 mg/L) + BA(P) (1 mg/L) + sahariza (30 g/L) + agar (8 g/L) (Çirak in sod., 2007). Vzpostavljeno kulturo smo gojili v temi.

Izsečke smo s pomočjo pincete in rezila odrezali od matične rastlinice v komori za aseptično delo (laminariju) ter položili na petrijevke napolnjene s pripravljenim gojiščem, tako da je bila spodnja stran listka položena na gojišče.

Kalusne kulture smo subkultivirali vsaka 2 tedna.



Slika 10: Iniciacija kalusa iz rastlinskega tkiva (listkov) pri šentjanževki
Figure 10: Initiation of callus from plant material (leaves) at St. John's wort

3.2.1.6 Celična kultura

Suspenzijsko kulturo smo inciirali iz kalusa, in sicer v 100 mL erlenmajericah, v katerih je bilo 25 mL tekočega gojišča MS z vitaminimi (4,405g/L) + 2,4-D (0,2 mg/L) + kinetin (0,02 mg/L) + saharoza (30 g/L), pH 5,8, avtoklaviranje pri 121 °C za 20 min. Gojišče je bilo enako kot za iniciacijo kalusa, vendar brez dodanega strjevalca. Suspenzijsko kulturo smo gojili v temi (Walker in sod., 2002), na stresalniku pri 90 obratih na minuto (rpm) pri 25 ± 1 °C. Prvotno iniciacijo smo za 48 ur izpostavili 120 rpm zaradi čim boljšega disociranja celic od kalusnih skupkov. Po 48 urah smo stresanje upočasnili na prej zapisanih 90 rpm.

Suspenzijsko kulturo smo subkultivirali vsaka 2 tedna.

3.2.2 Prirast biomase celične kulture

Rastni cikel tkivne kulture razdelimo na 3 faze in v odvisnosti od tega, v kateri fazi se nahajajo celice v kulturi, je tudi odvisno, ali le-ta pridobiva na biomasi ali gre predvsem za produkcijo sekundarnih metabolitov. Iz literature smo zasledili, da je cikel kulture približno 14 dni (Walker in sod., 2002) in temu primerno smo zastavili analizo. Na gojišče znane sestave smo dali inokulum in vsake 4 dni opravili tehtanje prirasta. Za vsako akcesijo šentjanževke smo tako v začetni fazi pripravili 4 erlenmajerice gojišča z inokulumom. Uporabili smo elrenmajerico, tekoče gojišče, pokrovček, filter papir in ALU folijo, tehtnico in podtlak za izsesevanje odvečne vode iz vzorca tkivne kulture (slika 11).



Slika 11: Meritev prirasta biomase šentjanževke
Figure 11: Measurement of biomass production St. John's wort

Odločili smo za način kultivacije, pri kateri smo za iniciacijo tkivne kulture uporabili znano količino gojišča in merili njen prirast do porabe le-tega brez dodajanja svežega gojišča, in s tem novih hranil.

V poglavju številka 4 (Rezultati) in podpoglavlju 4.2 (Prirast biomase suspenzijske kulture) smo izračune, ki smo jih uporabili za predstavitev podatkov, oprli na sledeče enačbe:

$$m_{si} = m_{tehtana} - m_{filter\ papirja} \quad \dots (1)$$

m_{si}	masa celične suspenzije
$m_{tehtana}$	masa celične suspenzije in filter papirja
$m_{filter\ papirja}$	masa filter papirja

$$m_{average} = m_1 + m_{i+1} + \dots + m_{n-1} + m_n / n \quad \dots (2)$$

$m_{average}$	povprečje mase kalusa pri zatehti
---------------	-----------------------------------

$$m_{prirasta} = m_{tehtana} - m_{iniciacija} - m_{filter\ papirja} \quad \dots (3)$$

m_{si}	masa celične suspenzije
$m_{tehtana}$	masa celične suspenzije in filter papirja
$m_{filter\ papirja}$	masa filter papirja

$$m_{stddev} = mstdev (m_1, m_{i+1}, \dots, m_{n-1}, m_n) \quad \dots (4)$$

m_{stddev}	standardni odklon mase zatehte, suspenzije
--------------	--

$$I_{m(i)} = m_i / m_{i-1} \quad \dots (5)$$

$I_{m(i)}$	indeks prirasta mase
------------	----------------------

3.2.3 Analiza velikosti genoma z uporabo pretočne citometrije

Za določitev velikosti genoma smo uporabili pretočni citometer Partec.

Najprej smo umerili delovanje pretočnega citometra Partec s pomočjo standarda – bele detelje (*Trifolium repens*), ki ima velikost jedrnega genoma 2,07 pg/2C (Arumuganathan in Earle, 1991). Pred meritvami smo vzorcu analizirane sorte, populacije in linije dodali raztopino standarda, tako da je bilo razmerje standard : vzorec približno 1 : 2. Za analizo vzorca *H. perforatum* L. smo uporabili mlade poganjke rastline.

Za merjenje velikosti genoma s pretočno citometrijo smo uporabili modificirano metodo Otto in sod. (1981), ki temelji na izolaciji jeder s citronsko kislino in barvanju jeder s fluorokromom DAPI v fosfatnem pufru. Fluorokrom DAPI odlikuje predvsem visoka specifičnost za vezavo na DNK in fluoroscentna intenziteta. Rezultat analize je histogram vsebnosti jedrne DNK. Za analizo velikosti genoma smo uporabili mlade poganjke posameznih akcesij šentjanževke.

Sestava raztopin:

OTTO 1 (za 100 mL):

2,1 g C₆H₈O₇ x H₂O
0,5 g Tween 20 (polioksietilen-sorbitan monolaurat) (Otto in sod., 1981).

OTTO 2 (za 100 mL):

7,1 g Na₂HPO₄ x 2H₂O
(dinatrijevhidrogenfosfat dihidrat)
1,5 mL založne raztopine DAPI (Otto in sod., 1981).

ZALOŽNA RAZTOPINA DAPI:

10 mL deionizirane vode
3,5 mg DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol).

Pri metodi za merjenje velikosti genoma smo za vsako rastlino pripravili vzorec in v vsakem vzorcu s pretočnim citometrom Partec izmerili velikost genoma 10.000 jeder. V izogib napakam zaradi nestabilnosti inšumenta so pri vseh meritvah uporabljali enak interni standard, in sicer liste bele detelje *Trifolium repens* cv. Tara z znano velikostjo genoma 2,07 pg (slika 18), ki smo jih nabrali v kolekcijskem nasadu na poskusnem polju Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete.

Liste poskusne rastline in detelje smo z britvico narezali v raztopini OTTO1, v katero so se sprostila jedra iz poškodovanih celic. Raztopino z drobci listov in jedri smo precedili skozi filter s premerom 30 µm, ter ji dodali 4-kratni volumen raztopine OTTO2 (Doležel, 1991, Marie in Brown, 1993; Bohanec, 2003).

3.2.4 Kromatografija (HPLC)

Biokemijske analize so bile izvedene s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Analitsko delo s sekundarnimi metaboliti šentjanževke smo opravili na HPLC aparaturi Thermo Finnigan Surveyor z LC črpalko na Biotehniški fakulteti. Pomembno je, da postopek izvedemo pravilno in brez neposrednega stika sekundarnega metabolita z eksogenimi dejavniki, svetlobo, kisikom in tudi kondezom. Morebitni stik lahko privede do degradacije analiziranega metabolita, in s tem do nepravih rezultatov. Velja pa, da je hiperforin bolj stabilen v polarnih kot nepolarnih topilih. Homogenizacijo rastlinskega materiala smo opravili »na ledu« in v temi. Vzorce svežih rastlin, ki smo jih nabrali v začetni fazi cvetenja (mesec julij), kot tudi suspenzijskih kultur šentjanževke damo v centrifugirke (ki se nahajajo na ledu) in le-te napolnimo s primerno ohlajeno ekstrakcijsko raztopino. Pripravljeni material smo 30 sek homogenizirali s pomočjo naprave Ultra-Turrax T-25 (Ika-Labortechnik, Nemčija). Za ekstrakcijsko raztopino smo uporabili ohlajeno raztopino MeOH in bidestilirano vodo (80 : 20, V : V) s pH umerjenim na 2,5 s 85 % fosforno kislino (H_3PO_4). Ločeno smo v ekstrakcijsko raztopino dodali 5 % hidroksipropil-beta-ciklodekstrin (HP β CD) (na 100 mL raztopine dodamo 5 g topljenca). Pripravljeno ekstrakcijsko raztopino smo dali v hladilnik na hladno (de los Reyes in Koda, 2001). Homogenizirane vzorce smo centrifugirali na 4000 obratih/min za 10 min (Eppendorf Centrifuga 5810, Hamburg, Nemčija). Dobljeni supernatant smo prefiltrirali skozi 0,20 μ m PFTE filter (Sartorius Stedim) v viale (Kobis).

Glavni pomen HP β CD in nizkega pH je v tem, da stabilizira obstojnost sekundarnih metabolitov, sproščenih pri homogenizaciji rastlinskega materiala, saj je značilno, da so sekundarni metaboliti občutljivi na eksogene pogoje, in tako dovetni na degradacijo, še posebej ob prisotnosti svetlobe in kisika. To še posebej velja za hiperforin (Orth in sod., 1999; Orth in Schimdt, 2000).

Za analizo smo uporabili 5 in 25 μ L vzorca. Za separacijo dobljenega vzorca smo uporabili kolono Sigma-Aldrich Supelco Discovery C₁₈ 16 cm x 4,6 mm, 5 μ m in PDA detektor (273 nm). Mobilna faza sestoji iz acetonitrila in 0,3 % ortofosforne kisline (erto H_3PO_4) (90 : 10, V : V) s pH 2,5; s pretokom 1,5 mL/min. Analiza enega vzorca je potekala 10 min pri temperaturi 0 °C.

Koncentracijo sekundarnega metabolita smo določili po metodi eksternega standarda in preračunali glede na umeritveno krivuljo, ki je bila izračunana na podlagi raztopin standarda.

Uporabili smo reverzno fazno HPLC metodo, s katero determiniramo hiperforine v ekstraktih *H. perforatum* L. HPLC metodo, po kateri smo opravili detekcijo in determinacijo sekundarnega metabolita (hiperforina), smo povzeli po avtorjih de los Reyes in Koda iz leta 2001. Gre za enostavno, hitro in ponovljivo metodo, s katero se lahko določi vsebnost hiperforina brez kakršnega koli nezaželenega vpliva na ostale metabolite.

Na koncu analize sledi izpiranje analitske kolone v trajanju 120 min, pri čemer se začne izpiranje z mešanico 2 topil MeOH in bidestilirano vodo v razmerju 50 : 50, katero se nagiba v odvisnosti od časa v korist MeOH. Zadnjih 20 min se izpiranje izvaja s 100 % MeOH. Tako se doseže dolgotrajno obstojnost analitske kolone in možnost nadaljnje uporabe (de los Reyes in Koda, 2001). Istočasno je s to metodo mogoče analizirati več sekundarnih metabolitov hkrati.

Pri pripravi standardov se je upoštevalo enak postopek kot pri pripravi vzorcev iz rastlinskega materiala in vzorcev tkivnih kultur. Imeli smo standard hiperforin v raztopljeni obliki, ki smo ga razredčili do želenih koncentracij (100, 50, 20 in 10 µg/g), na podlagi katerih smo izdelali ozioroma te razredčitve uporabili za sestavo umeritvene krivulje, s katero smo detektirali in ovrednotili koncentracijo rezultata dobljenega iz vzorca.

3.2.4.1 Materiali za HPLC analizo

Uporabili smo kemikalije:

- hiperforin (Sigma-Aldrich),
- metanol (MeOH) (gradient grade for liquid chromatography) (Merck KGaA – Nemčija),
- orto H₃PO₄ 85 % (Merck KGaA – Nemčija),
- hidroksipropil beta ciklodekstrin (HPβCD),
- bidestilirano vodo,
- filterni papir,
- filtri Minisart SRP 15 (Sartorius Stedim Biotech GmbH 0,20 µm PFTE-membrana, PP-housing, nesterilno),
- kolona Supelco Analytical Discovery C18 15 cm x 4,6 mm, 5 µm (Sigma-Aldrich),
- acetonitril (gradient grade for liquid chromatography) (Merck KGaA – Nemčija),
- brizge,
- injekcijske igle (TIK medicinski pripomočki, d. o. o.),
- viale (PK100, 1,5 mL ABZ Viala 32 x 11,6 mm) (Supelco).

3.2.5 Analiza podatkov

3.2.5.1 Vrednotenje rezultatov prirasta biomase

Vrednotenje prirasta biomase smo statistično obdelali s pomočjo statističnega orodja Statgraphic Plus for Windows 4.0 in programa Microsoft Excel 2010. Statistično značilne razlike smo ugotavljali po metodi analize variance (ANOVA), pri čemer smo neodvisno vrednotili 4 zaporedne meritve za določitev prirasta po 4, 8, 12 in 16 dneh od inokulacije v tekoče gojišče. Za vsako sorto, populacijo in linijo smo tako pripravili 4 erlenmajerice. Iz tega smo poskušali zaslediti, kakšen prirast je bil glede na inokuliran kalus v posamezni akcesiji. Za tak način vrednotenja rezulatov prirasta smo se odločili zaradi možne okužbe, ki se lahko zgodi ob dejstvu, da bi eno erlenmajerico izkoristili za merjenje prirasta ene sorte, populacije ali linije. Tako smo lahko prirast biomase vrednotili nesterilno in po vrednotenju celično suspenzijo zavrgli. Tehtali smo tako svežo maso, kot tudi suho.

3.2.5.2 Vrednotenje ploidnosti

Vrednotenje analize velikosti genoma smo analizirali s programom, vgrajenim v software citometra Partec. Kot rezultat analize so bili dobljen histogrami vsebnosti jedrne DNK v posamezni akcesiji, ki so prikazani v poglavju rezultati (4.4 Ploidnost).

3.2.5.3 Vrednotenje kromatografskih rezultatov

Pridobljene rezultate kemičnih analiz smo statistično obdelali s pomočjo statističnega orodja Statgraphic Plus for Windows 4.0 in programa Microsoft Excel 2010. Statistično značilne razlike smo ugotavljali po metodi analize variance (ANOVA).

Analizirali smo tako vzorce, pridobljene direktno iz rastlinskega materiala, kot tudi vzorce, pridobljene iz tkivnih kultur. Nadalje smo slednje delili na 2 seriji (ponovitvi), ki sta bili različno časovno gojeni oz. pridobljeni.

Vzorci pa so se delili tudi glede na to, ali so ponovitve vsebovale dodatek v ekstrakcijski raztopini (s HP β CD) ali ne. Namen je bil evidentirati morebitne razlike med ponovitvama.

4 REZULTATI

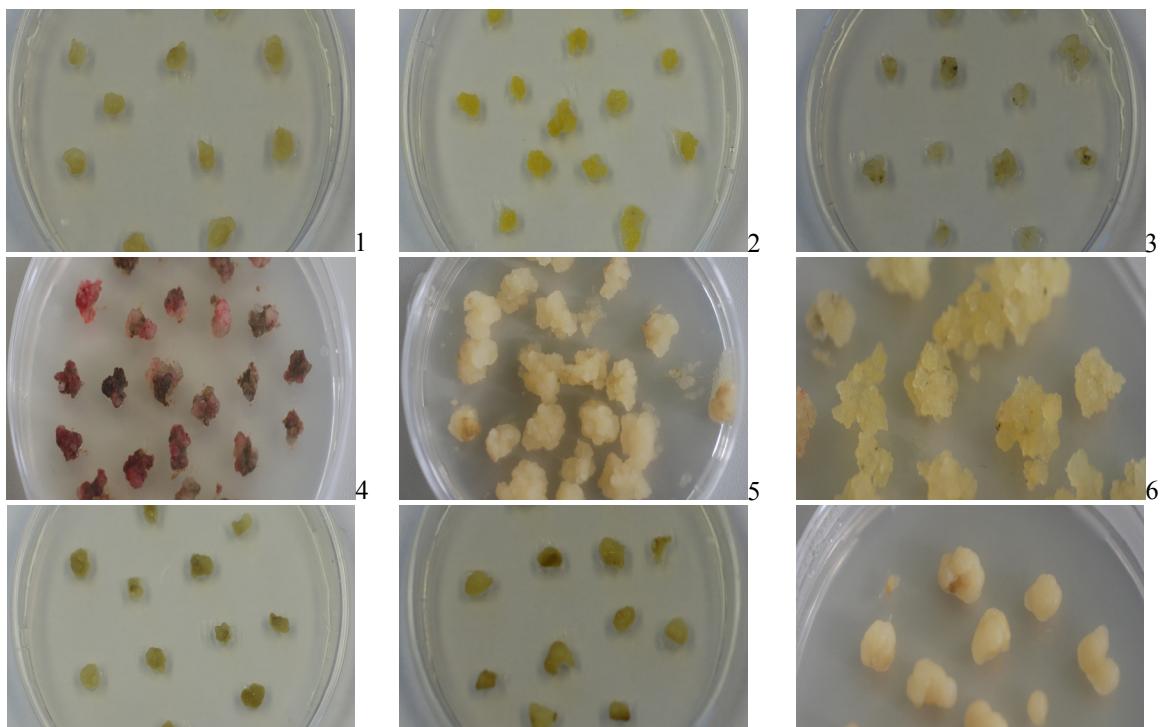
4.1 KALIVOST SEMENA

Delež kalitve preučevanih sort, populacij in linij šentjanževke je bil izredno visok. Sterilizirana semena so v velikem odstotku uspešno kalila tako *in vitro* kot tudi *in vivo* v rastlinjaku. Ni bilo nobenih posebnih odstopanj med obravnavanimi akcesijami. Zato smo lahko za mikropropagacijo uporabili *in vitro* pridobljen aseptičen rastlinski material, s tem smo se izognili sterilizaciji rastlinskega materiala vzgojenega *in vivo*.

4.2 KALUS

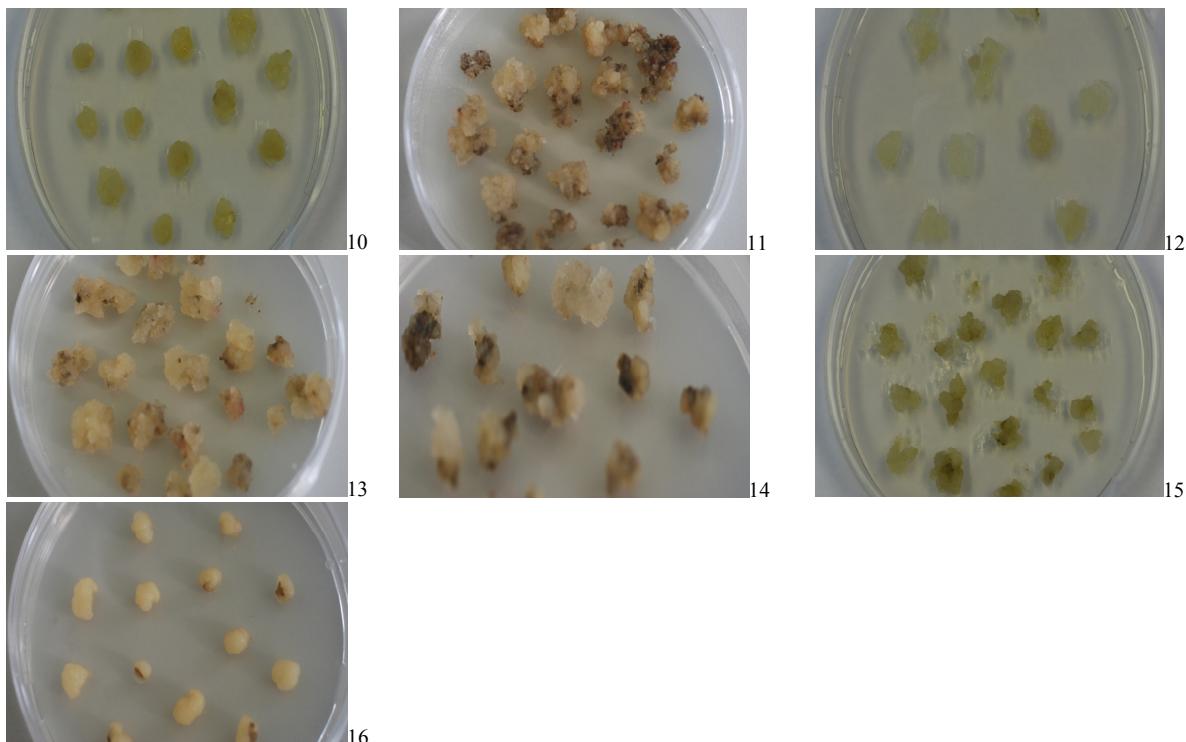
Za iniciacijo kalusa smo uporabili listke rastlinic, pridobljenih iz semena, ki smo jih kultivirali na dveh različnih gojiščih (poglavlje 3.2.1.1 Sestava in priprava gojišč – Sestava gojišč za iniciacijo kalusa). Rezultati kažejo, da je gojišče, ki je vsebovalo kinetin, boljše kot gojišče z dodatkom BAP, saj je kalus na gojišču s kinetinom neprimerno boljši kot nastali kalus na gojišču z BAP. Prvi je bolj rahel in drobljiv, medtem ko je slednji trd in kompakten in kot tak neuporaben za iniciacijo suspenzijske kulture.

Dobljeni kalus pri izbranih sortah, populacijah in linijah, gojenih na gojišču s kinetinom, je v glavnem rahel in drobljiv (slika 12), vendar se nekoliko razlikuje med posameznimi akcesijami (preglednica 5).



slika se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 12: Kalus izbranih sort, populacij in linij šentjanževke. Legenda: 1 (6/8 BF LP 2006), 2 (6/9 BF LP 2006), 3 (6/2 BF LP 2006), 4 (BFL 18-02/05), 5 (6/15 Maja), 6 (BFL 21-04/05), 7 (6/4 BF LP 2006), 8 (prostoživeča populacija), 9 ('Topas'), 10 ('Maja'), 11 ('Gemo'), 12 ('Anthos'), 13 ('Taubertal'), 14 (Stamm 710), 15 (Stamm 715), 16 (Stamm 21).

Figure 12: Callus in selected cultivars, populations and lineages of St. John's wort. Legend: 1 (6/8 BF LP 2006), 2 (6/9 BF LP 2006), 3 (6/2 BF LP 2006), 4 (BFL 18-02/05), 5 (6/15 Maja), 6 (BFL 21-04/05), 7 (6/4 BF LP 2006), 8 (»prostoživeča populacija«), 9 ('Topas'), 10 ('Maja'), 11 ('Gemo'), 12 ('Anthos'), 13 ('Taubertal'), 14 (Stamm 710), 15 (Stamm 715), 16 (Stamm 21).

Preglednica 5: Opis kalusa po obravnavanih sortah, populacijah in linijah *H. perforatum* L.

Table 5: Characterization of callus by treating cultivars, populations and lineages of *H. perforatum* L.

Akcesija	Opis kalusa
6/8 BF LP 2006	Kalus je bele barve in manj kompaktne, prhaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
6/9 BF LP 2006	Kalus je rumenkaste barve in manj kompaktne strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
6/2 BF LP 2006	Kalus je bele barve in bolj kompaktne, krpaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo krpasti delci.
BFL 18-002/05	Kalus je belo-rdečkaste barve in manj kompaktne, prhaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
6/15 Maja	Kalus je bele barve in bolj kompaktne, prhaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.

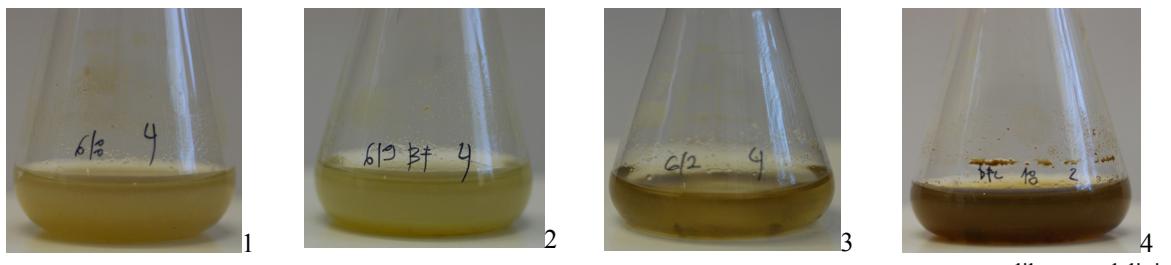
preglednica se nadaljuje

nadaljevanje

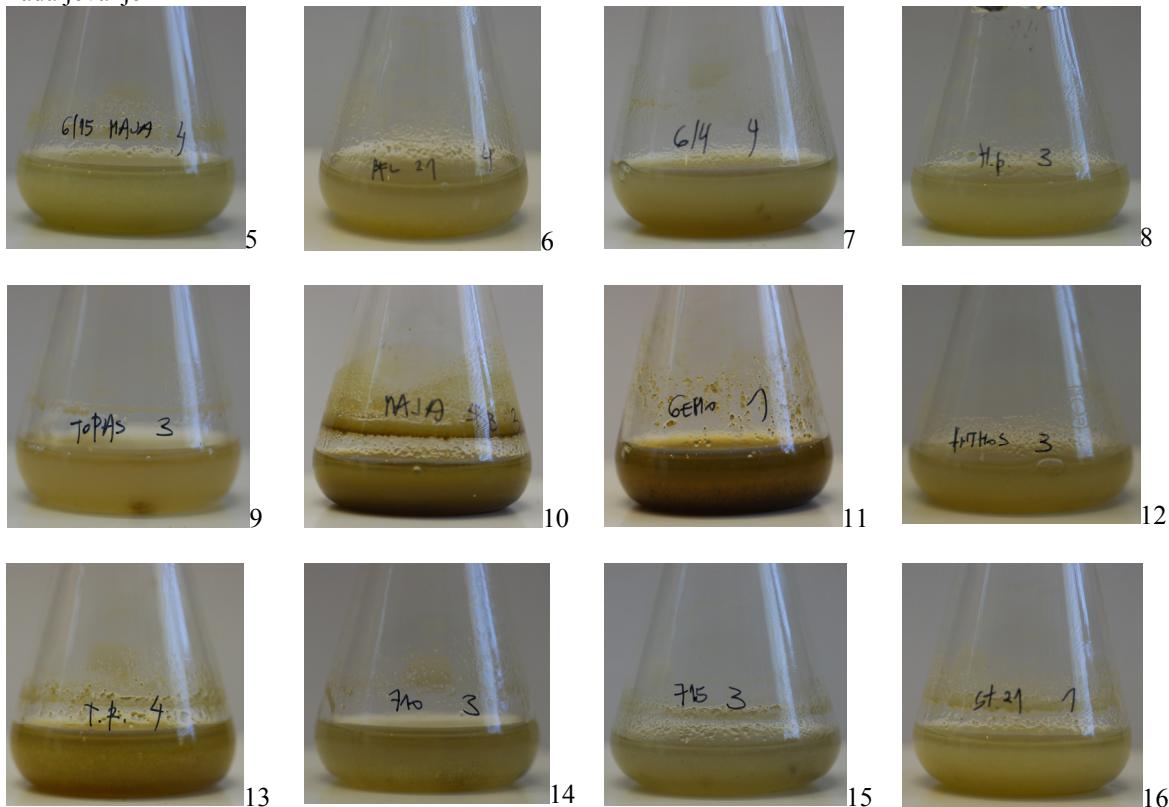
Akcesija	Opis kalusa
BFL 21-004/05	Kalus je rumene barve in manj kompaktne, prhaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
6/4 BF LP 2006	Kalus je belo-zelene barve in bolj kompaktne, krpaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo krpasti delci.
Prostoživeča populacija	Kalus je zelenkaste barve in bolj kompaktne, krpaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo krpasti delci.
'Topas'	Kalus je bele barve in bolj kompaktne, krpaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo krpasti delci.
'Maja'	Kalus je belo-zelene barve in manj kompaktne, prhaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
'Gemo'	Kalus je rjavkaste barve in manj kompaktne, prhaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
'Anthos'	Kalus je bele barve in bolj kompaktne, krpaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
'Taubertal'	Kalus je bele barve z rdečimi točkami in manj kompaktne, prhasto-krpaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
Stamm 710	Kalus je bele barve in manj kompaktne, prhaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
Stamm 715	Kalus je belo-zelenkaste barve in manj kompaktne, prhaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo grudasti delci.
Stamm 21	Kalus je belo-rjavkaste barve in bolj kompaktne, krpaste strukture. Pri delitvi biomase nastanejo krpasti delci.

4.3 PRIRAST BIOMASE SUSPENZIJSKE KULTURE

Pridobljeni kalus smo nadalje uporabili za vzpostavitev kultur celičnih suspenzij (slika 13, priloge A1-A16). Na vseh akcesijah smo preučili prirast sveže biomase celične suspenzionske kulture (priloga C).



nadaljevanje



Slika 13: Celične suspenzije izbranih sort, populacij in linij šentjanževke. Legenda: 1 (6/8 BF LP 2006), 2 (6/9 BF LP 2006), 3 (6/2 BF LP 2006), 4 (BFL 18-02/05), 5 (6/15 Maja), 6 (BFL 21-04/05), 7 (6/4 BF LP 2006), 8 (prostoživeča populacija), 9 ('Topas'), 10 ('Maja'), 11 ('Gemo'), 12 ('Anthos'), 13 ('Taubertal'), 14 (Stamm 710), 15 (Stamm 715), 16 (Stamm 21).

Figure 13: Cell suspensions selected cultivars, populations and lineages of St. John's wort. Legend: 1 (6/8 BF LP 2006), 2 (6/9 BF LP 2006), 3 (6/2 BF LP 2006), 4 (BFL 18-02/05), 5 (6/15 Maja), 6 (BFL 21-04/05), 7 (6/4 BF LP 2006), 8 (»prostoživeča populacija«), 9 ('Topas'), 10 ('Maja'), 11 ('Gemo'), 12 ('Anthos'), 13 ('Taubertal'), 14 (Stamm 710), 15 (Stamm 715), 16 (Stamm 21).

Kot je bilo pričakovano, je prirast biomase potekal v skladu s pravilom sigmoidne rastne krivulje (slika 3), iz katere je možno razbrati fazo prilagajanja (lag faza), eksponentno in stacionarno fazo rastne krivulje. V 16-dnevnom ciklu smo prirast biomase tehtali vsake 4 dni (preglednici 6 in 7, slika 16). Po pregledu obstoječe literature smo pričakovali, da bo po končnem tehtanju (slika 15, 16. dan) opazen prehod iz eksponentne v stacionarno fazo, kar pomeni tudi prehod primarnega v sekundarni metabolizem (preglednica 11), kot to navajajo viri (Walker in sod., 2002; Klingauf in sod., 2005; Ramawat in Merillon, 2007).

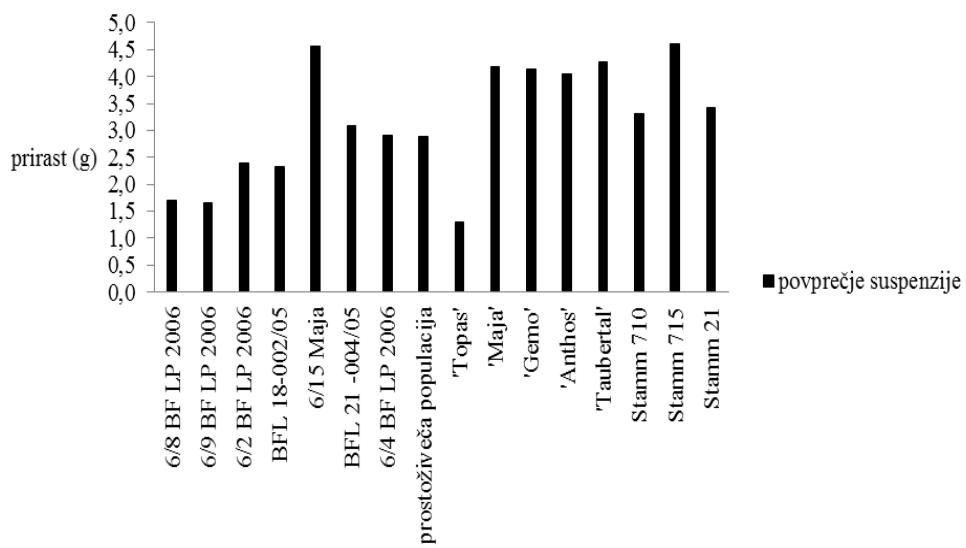
Iz vseh priloženih grafov (priloge B1-B16) je razvidna lag faza in eksponentna faza, ponekod pa tudi stacionarna faza. Rezultati so pokazali manjši prirast biomase pri populacijah, v primerjavi s sortami in linijami (preglednica 8, slika 14). Izmed preučevanih akcesij šentjanževke zelo izstopa sorta Topas, saj se pri analizi prirasta po 16. dneh pokaže celo upad pod začetno maso (končni prirast je -0,066 g) (preglednica 7, slika 16).

Iz preglednice 6 je razvidno, da je potreben določen čas, da se biomasa prilagodi na razmere in tako takoj ne pride do povečanega prirasta biomase, ampak ostane masa nespremenjena ali se celo nekoliko zmanjša, kot je bilo to opaziti pri celični suspenziji

'Maja' (preglednica 6). Od prvega tehtanja naprej rastna krivulja iz lag faze napreduje v eksponentno fazo, kjer je prirast biomase največji in le-ta hitro napreduje (slika 15). Približno okrog 16. dneva (ali pozneje) po iniciaciji kulture se začne prehod v stacionarno fazo rastne krivulje. To je razvidno pri akcesijah 6/9 BF LP 2006, prostoživeča populacija, 'Topas' in Stamm 715 (priloge B2, B8, B9 in B15). Pri omenjenih akcesijah je prišlo do spremembe v metabolizmu, nujne funkcije se zaradi stresnega okolja (pomankanja hranilnih snovi v gojišču) upočasnijo. Predvideva se, da je produkcija sekundarnih metabolitov tukaj na vrhuncu. Stacionarno fazo prekinemo tako, da kulturo subkultiviramo. Na tej točki velja omeniti, da pri analizi prirasta biomase nismo v vseh primerih dosegli stacionarne faze in zatorej ne moremo z vso gotovostjo trditi o poteku metabolne poti akcesije. Naše trditve tako opiramo tudi na zaključke iz strokovne literature (Walker in sod., 2002; Klingauf in sod., 2005; Ramawar in Merillon, 2007).

Preglednica 6: Teža suspenzijske kulture posameznih akcesij v 4-dnevnih intervalih (g)
Table 6: Mass of individual suspension culture in 4-day period (g)

Akcesija/masa (g)	Povprečje zatehte t_0	Masa sus. 4. dan	Masa sus. 8. dan	Masa sus. 12. dan	Masa sus. 16. dan	Povprečje suspenzije
6/8 BF LP 2006	1,068	1,419	1,674	1,603	2,117	1,703
6/9 BF LP 2006	1,031	1,167	1,414	1,964	2,086	1,658
6/2 BF LP 2006	1,048	1,406	2,564	2,720	2,872	2,391
BFL 18-002/05	1,097	1,756	1,940	2,402	3,253	2,338
6/15 Maja	1,111	1,633	1,894	5,910	8,805	4,561
BFL 21 -004/05	1,077	1,666	2,449	3,458	4,809	3,096
6/4 BF LP 2006	1,032	1,528	1,866	2,870	5,393	2,914
Prostoživeča populacija	0,988	1,761	2,511	3,526	3,781	2,895
'Topas'	1,046	1,326	1,352	1,498	0,975	1,288
'Maja'	1,036	0,658	3,905	5,592	6,589	4,186
'Gemo'	1,051	1,835	3,189	4,392	7,112	4,132
'Anthos'	1,048	1,649	2,736	3,829	8,013	4,057
'Taubertal'	1,080	1,473	2,378	4,264	8,930	4,261
Stamm 710	1,088	1,496	2,216	3,673	5,864	3,312
Stamm 715	1,052	1,451	2,465	6,774	7,737	4,607
Stamm 21	1,025	1,341	2,419	2,107	7,782	3,412

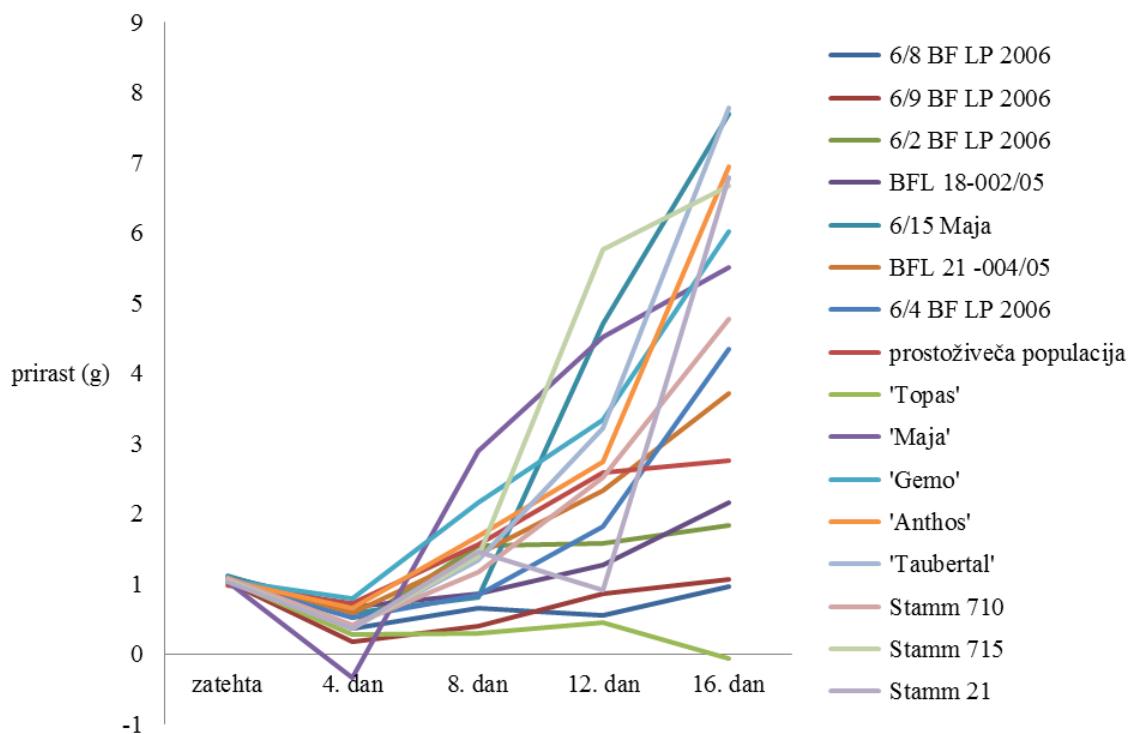


Slika 14: Teža zatehte (iniciacija) in teža suspenzijske kulture - sveže snovi (g). Rezultati predstavljajo povprečje dobljeno iz 4-ih ponovitev.

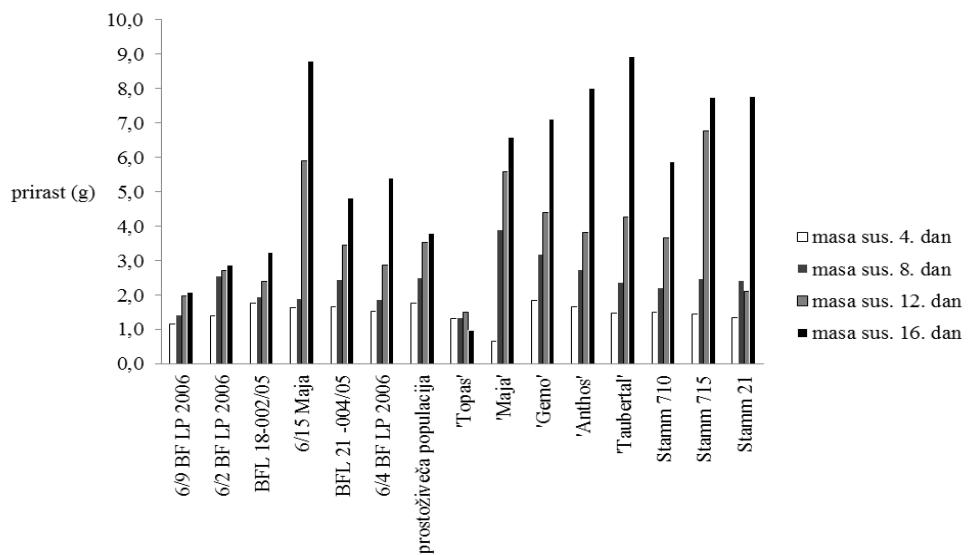
Figure 14: Weight of initiation plant material and weight of suspension culture of fresh biomass (g). Data represent average of 4 repeat.

Preglednica 7: Prirast sveže snovi posameznih akcесij v 4-dnevnih intervalih (g)
 Table 7: Growth of fresh mass in 4 day period (g)

Akcесija/prirast (g)	4. dan	8. dan	12. dan	16. dan	Povprečje zatehte t_0
6/8 BF LP 2006	0,369	0,663	0,550	0,958	1,068
6/9 BF LP 2006	0,176	0,404	0,864	1,062	1,031
6/2 BF LP 2006	0,406	1,554	1,580	1,832	1,048
BFL 18-002/05	0,671	0,860	1,270	2,163	1,097
6/15 Maja	0,591	0,808	4,700	7,700	1,111
BFL 21 -004/05	0,590	1,426	2,338	3,721	1,077
6/4 BF LP 2006	0,519	0,841	1,827	4,344	1,032
Prostoživeča populacija	0,725	1,565	2,586	2,753	0,988
'Topas'	0,282	0,297	0,454	-0,066	1,046
'Maja'	-0,329	2,897	4,525	5,509	1,036
'Gemo'	0,797	2,168	3,334	6,026	1,051
'Anthos'	0,659	1,686	2,737	6,953	1,048
'Taubertal'	0,375	1,345	3,216	7,790	1,080
Stamm 710	0,423	1,177	2,523	4,773	1,088
Stamm 715	0,373	1,393	5,771	6,682	1,052
Stamm 21	0,370	1,459	0,920	6,801	1,025



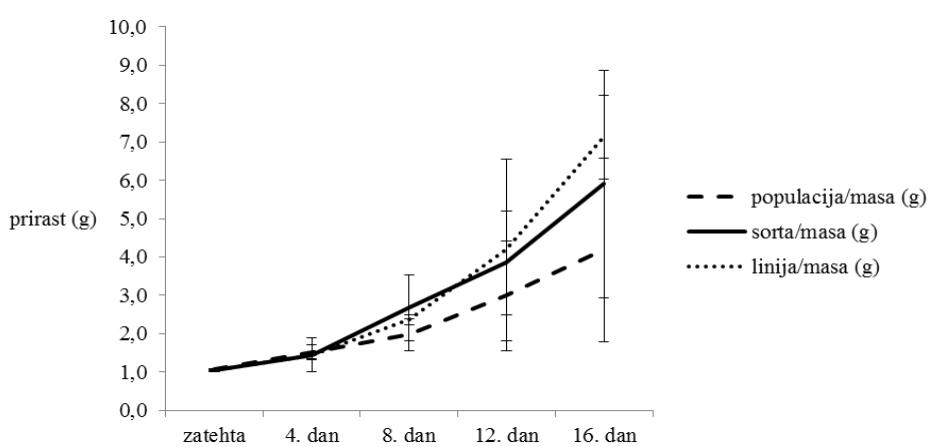
Slika 15: Prirast sveže snovi posameznih akcесij v 4-dnevnih intervalih (g)
 Figure 15: Growth of fresh mass in 4 day period (g)



Slika 16: Prirast mase v suspenziji na 4., 8., 12. ali 16. dan od vzpostavitev kulture (sveža snov) (g)
 Figure 16: Growth of biomass in cell suspension on 4th, 8th, 12th or 16th day of initiation culture (fresh mass) (g)

Preglednica 8: Prirast suspenzijske kulture po posameznih skupinah akcесij šentjanževke (g)
 Table 8: Growth of cell suspensions by organized groups of St. John's wort (g)

Akcесija/masa cel. sus. (g)	Ploidnost	Zatehta	4. dan	8. dan	12. dan	16. dan
Populacije šentjanževke						
6/8 BF LP 2006	4n	1,068	1,419	1,674	1,603	2,117
6/9 BF LP 2006	4n	1,031	1,167	1,414	1,964	2,086
6/2 BF LP 2006	4n	1,048	1,406	2,564	2,72	2,872
BFL 18-002/05	4n	1,097	1,756	1,94	2,402	3,253
6/15 Maja	2n	1,111	1,633	1,894	5,91	8,805
BFL 21 -004/05	6n	1,077	1,666	2,449	3,458	4,809
6/4 BF LP 2006	4n	1,032	1,528	1,866	2,87	5,393
Prostoživeča populacija	6n	0,988	1,761	2,511	3,526	3,781
povprečje		1,057	1,542	2,039	3,057	4,140
stdev		0,040	0,204	0,423	1,331	2,224
Sorte šentjanževke						
'Topas'	6n	1,046	1,326	1,352	1,498	0,975
'Maja'	2n	1,036	0,658	3,905	5,592	6,589
'Gemo'	2n	1,051	1,835	3,189	4,392	7,112
'Anthos'	4n	1,048	1,649	2,736	3,829	8,013
'Taubertal'	4n	1,080	1,473	2,378	4,264	8,930
povprečje		1,052	1,388	2,712	3,951	7,661
stdev		0,017	0,451	0,950	1,501	1,030
Linije šentjanževke						
Stamm 710	6n	1,088	1,496	2,216	3,673	5,864
Stamm 715	4n	1,052	1,451	2,465	6,774	7,737
Stamm 21	4n	1,025	1,341	2,419	2,107	7,782
povprečje		1,055	1,429	2,367	4,185	7,128
stdev		0,032	0,080	0,132	2,375	1,095



Slika 17: Prirast suspenzije - sveže snovi po dnevih glede na populacijo, sorto, linijo (povprečje) (g)
 Figure 17: Average growth of fresh biomass in cell suspension population, cultivar, lineage (g)

Pri obravnavanju sort šentjanževke smo iz analize odstranili podatke 'Topas', in sicer za 16. dan prirasta. Razlog leži v tem, ker sorta ni imela tipične rastne krivulje in je močno odstopala od ostalih preučevanih akcесij. Kot je razvidno iz preglednice 8, je imela sorta Topas zelo majhen prirast in na 16. dan po iniciaciji kulture je masa celične suspenzije upadla celo pod začetno maso. Statistična analiza po LSD je pokazala, da obstaja statistično značilna razlika med populacijami šentjanževke v primerjavi s sortami in linijami – 8. dan (samo linije) in 16. dan (preglednica 9, slika 17).

Preglednica 9: Prirast suspenzije - sveže snovi po dnevih glede na populacije, sorte, linije šentjanževke (povprečje) (g)

Table 9: Average growth of fresh biomass in cell suspension of populations, cultivars, lineages St. John's wort (g)

Tip akcесije/dan tehtanja	4. dan	8. dan	12. dan	16. dan
Populacije šentjanževke	1,542±0,204a	2,039±0,423a	3,057±1,331a	4,140±2,224a
Sorte šentjanževke	1,388±0,451a	2,712±0,950ab	3,915±1,501a	7,661±1,030b
Linije šentjanževke	1,429±0,080a	2,367±0,132b	4,185±2,375a	7,128±1,095b
	\bar{x} ± SD	\bar{x} ± SD	\bar{x} ± SD	\bar{x} ± SD

Statistična analiza prirasta biomase, glede na ploidnost izbranih šentjanževk, je pokazala, da so statistično značilne razlik med diploidnimi v primerjavi z heksaploidnimi akcесijami *H. perforatum* L. (preglednica 10). Pri pregledu rezultatov, smo opazili, da je od 8. do 12. dne prirast biomase pri diploidnih akcесijah šentjanževke večji kot pri heksaploidnih. Statistično analizo smo opravili po LSD testu. Enako kot pri analizi na vrsto akcесije smo odstranili podatek za 'Topas', in sicer za njen 16. dan prirasta.

Preglednica 10: Prirast suspenzije - sveže snovi po dnevih glede na ploidnost šentjanževke (povprečje) (g)
Table 10: Average growth of fresh biomass in cell suspension of different ploidy (g)

Tip akcесije/dan tehtanja	4. dan	8. dan	12. dan	16. dan
Diploidne šentjanževke	1,375±0,629a	2,996±1,019a	5,298±0,801a	7,502±1,158a
Tetraploidne šentjanževke	1,466±0,170a	2,162±0,451ab	3,170±1,602ab	5,354±2,810a
Heksaploidne šentjanževke	1,562±0,192a	2,132±0,535b	3,039±1,031b	3,857±2,101a
	\bar{x} ± SD	\bar{x} ± SD	\bar{x} ± SD	\bar{x} ± SD

V preglednici 11 so predstavljeni indeksi prirasta sveže snovi preučevane akcесije. Vidimo trend prirasta sveže snovi, ali je ta pozitivna ali negativna. Z drugimi besedami, če je indeks prirasti večji od 1, pomeni, da se je prirast sveže snovi v 4-dnevnom intervalu povečal (pozitiven). V primeru, da je indeks prirasta manjši, lahko razložimo, da se je prirast sveže snovi v 4-dnevnom intervalu zmanjšal.

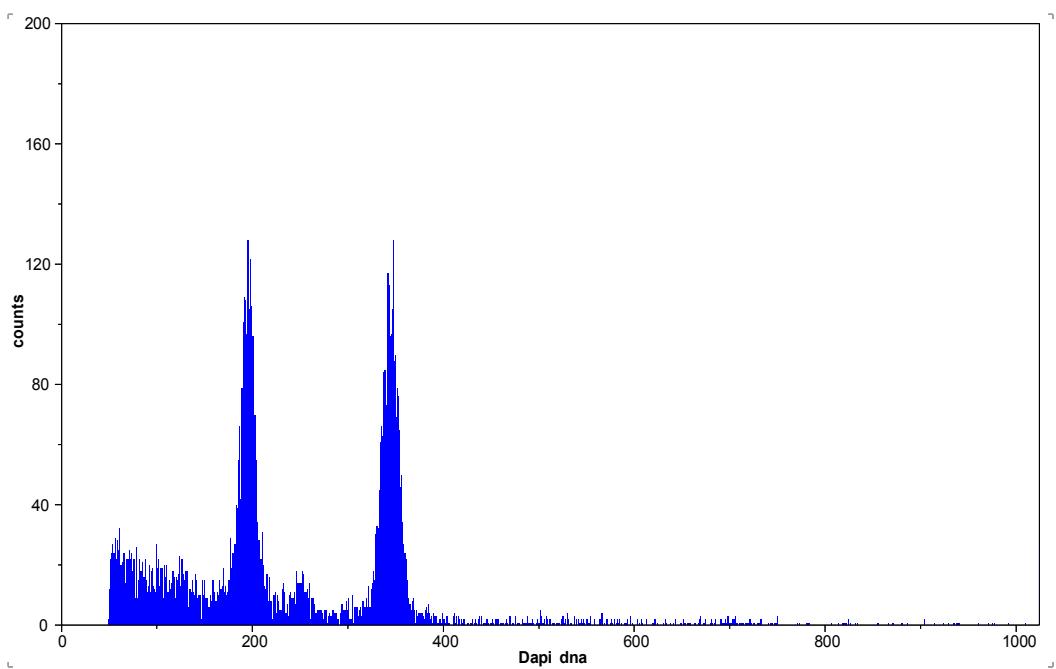
Preglednica 11: Indeks prirasta sveže snovi pri izbranih akcesijah šentjanževke
Table 11: Fresh biomass growth index in selected St. John's wort

Akcesija/indeks mase	I 4d/1d	I 8d/4d	I 12d/8d	I 16d/12d
6/8 BF LP 2006	1,328	1,180	0,958	1,321
6/9 BF LP 2006	1,132	1,212	1,389	1,062
6/2 BF LP 2006	1,342	1,824	1,061	1,056
BFL 18-002/05	1,601	1,105	1,238	1,354
6/15 Maja	1,470	1,160	3,120	1,490
BFL 21 -004/05	1,470	1,470	1,412	1,391
6/4 BF LP 2006	1,481	1,221	1,538	1,879
Prostoživeča populacija 'Topas'	1,783	1,426	1,404	1,072
'Maja'	1,268	1,020	1,108	0,651
'Gemo'	0,635	5,935	1,432	1,178
'Anthos'	1,746	1,738	1,377	1,619
'Taubertal'	1,573	1,659	1,399	2,093
Stamm 710	1,364	1,614	1,793	2,094
Stamm 715	1,375	1,481	1,657	1,597
Stamm 715	1,379	1,699	2,748	1,142
Stamm 21	1,309	1,804	0,871	3,693
	lag faza	eks faza		prehod e-s

4.4 PLOIDNOST

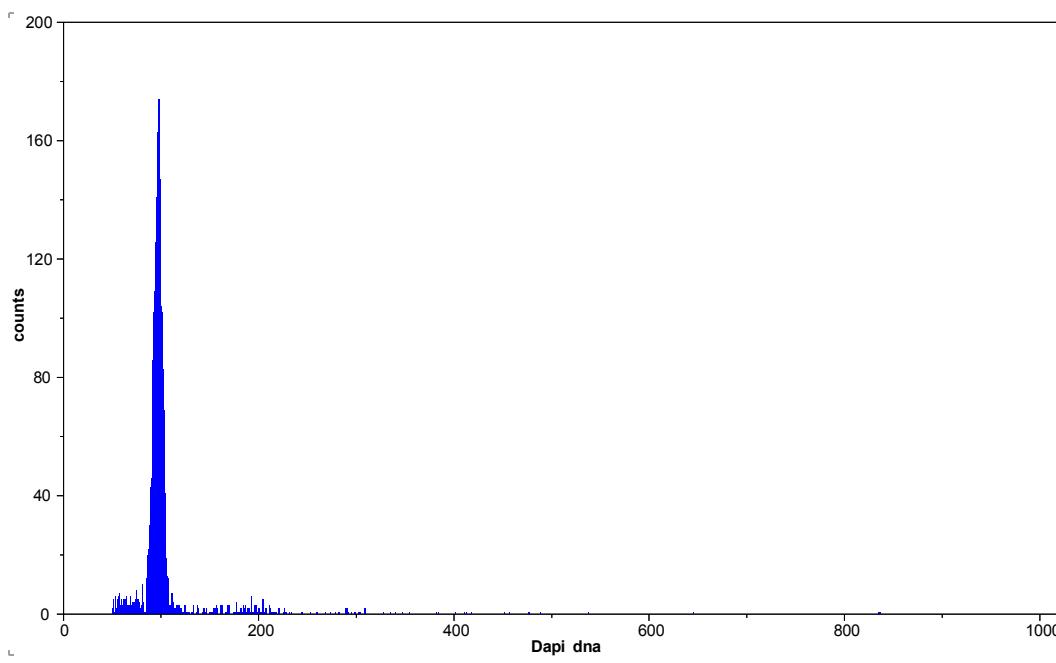
V analizo ugotavljanja razlik v velikosti genoma izbranih vzorcev šentjanževke smo vključili vse sorte, populacije in linije, kot je bilo navedeno v poglavju 3 (Material in metode).

Rezultati meritev velikosti genoma so podani v preglednici 12. Pred tem so podani primeri histogramov glede na dobljene vrhove pri analizi nekaterih preučevanih akcesij šentjanževke. Iz histogramov so razvidne relativno velike razlike med ploidnostjo obravnavanih rastlin. Analiza je pokazala tako prisotnost diploidov (slika 19), tetraploidov (slika 20) in tudi heksaploidov (slika 21) med izbranimi sortami, populacijami in linijami *H. perforatum* L.



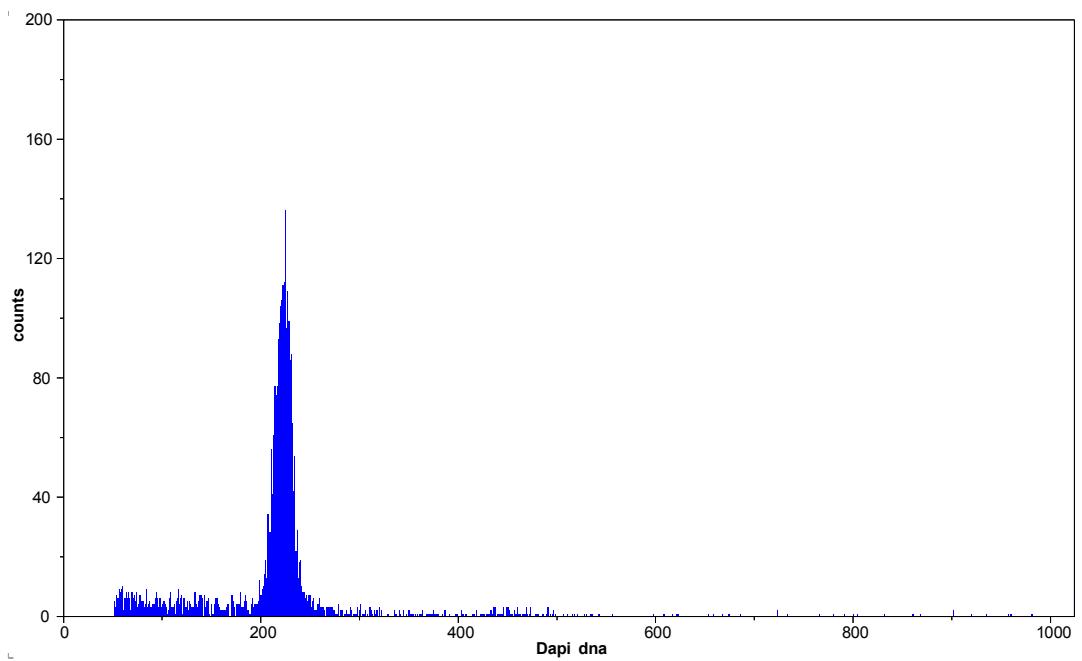
Slika 18: Histogram velikosti genoma *H. perforatum* L. 4n (6/2 BF LP 2006 z dodatkom standarda *Trifolium repens* - desni vrh)

Figure 18: Histogram of genome size *H. perforatum* L. 4n (6/2 BF LP 2006 with standard *Trifolium repens* - right peak)

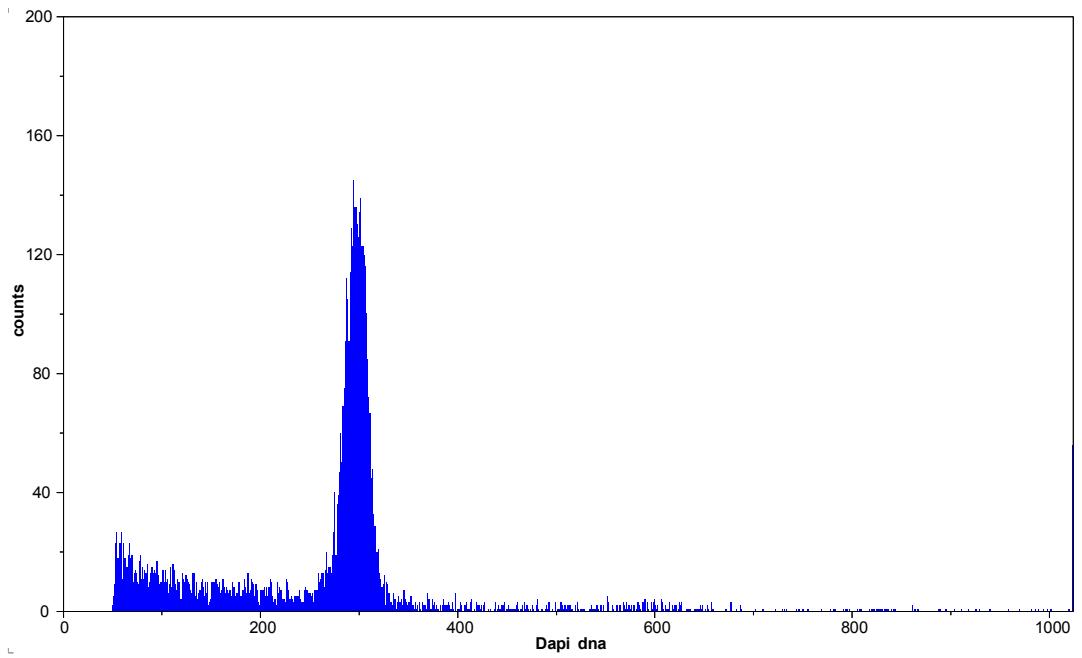


Slika 19: Histogram velikosti genoma *H. perforatum* L. ('Maja') 2n

Figure 19: Histogram of genome size *H. perforatum* L. ('Maja') 2n



Slika 20: Histogram velikosti genoma *H. perforatum* L. (6/2 BF LP 2006) 4n
Figure 20: Histogram of genome size *H. perforatum* L. (6/2 BF LP 2006) 4n



Slika 21: Histogram velikosti genoma *H. perforatum* L. ('Topas') 6n
Figure 21: Histogram of genome size *H. perforatum* L. ('Topas') 6n

Preglednica 12: Analiza velikosti genoma po obravnavanih šentjanževkah
Table 12: Genome size analysis of selected St. John's wort

Slovenske populacije šentjanževke		Ploidnost	
6/8 BF LP 2006	200	4n	tetraploid
6/9 BF LP 2006	200	4n	tetraploid
6/2 BF LP 2006	200	4n	tetraploid
BFL 18-002/05	200	4n	tetraploid
6/15 Maja	100	2n	diploid
BFL 21-004/05	300	6n	heksaploid
6/4 BF LP 2006	200	4n	tetraploid
Sorte, populacije in linije šentjanževke		Ploidnost	
Prostoživeča populacija	300	6n	heksaploid
'Topas'	300	6n	heksaploid
'Maja'	100	2n	diploid
'Gemo'	< 100	2n	diploid
'Anthos'	200	4n	tetraploid
'Taubertal'	200	4n	tetraploid
Stamm 710	300	6n	heksaploid
Stamm 715	200	4n	tetraploid
Stamm 21	200	4n	tetraploid

4.5 HPLC

Izredna občutljivost hiperforina in nagnjenost k razgradnji pri nekontroliranih eksogenih pogojih (de los Reyes in Koda, 2001) nam je pogojevala posebno skrb pri analizi. Zato je bilo zelo pomembno nadzorovati zunanje dejavnike, še posebej osvetljenost, temperaturo in izpostavljenost hiperforina zunanjim atmosferi – kisiku. HPLC analizo po izbrani metodi smo opravili na akcесijah šentjanževke, kot je razvidno iz preglednic 13 in 14.

Rezultati HPLC analize so pokazali, da je vsebnost sekundarnih metabolitov, pridobljenih iz rastlin *in vivo* večja (sliki 22-23) kot pa iz vzorcev, ekstrahiranih iz *in vitro* tkivnih kultur (sliki 24-25). To je zaradi nezmožnosti posnemanja vseh naravnih pogojev pri akcесijah tkivnih kultur tudi pričakovati. Pogoji, pri katerih se razvijajo *in vivo* rastline, so optimalnejši za nastanek sekundarnih metabolitov. Po večini k temu pripomore intenziteta osvetlitve in prisotnost kloroplastov ter starost (razvitost) celice, saj vse to odločilno vpliva na nastanek sekundarnih metabolitov (Croteau, 1987; Ciccarelli in sod., 2001b; Adam in sod., 2002). Največjo vsebnost sekundarnega metabolita ima akcесija 'Gemo' (30,726 µg/g), najmanjšo vsebnost metabolita pa ima Stamm 715 (0,619 µg/g) ter 6/4 BF LP 2006 (0,408 µg/g) izmed slovenskih populacij. Bistvenega odstopanja pri slovenskih populacijah ni, saj je največja vsebnost sekundarnega metabolita pri 6/2 BF LP 2006 (29,733 µg/g) (preglednica 13).

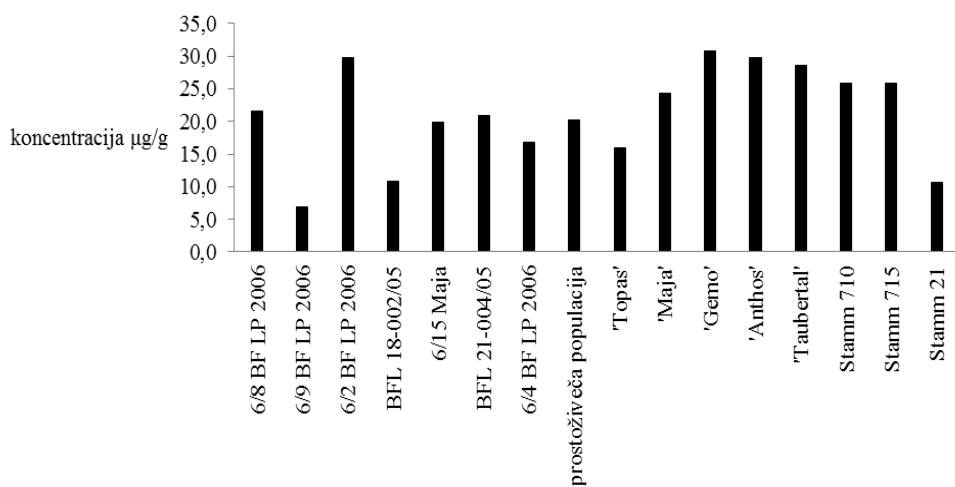
Preglednica 13: Hiperforin pri rastlinskih vzorcih šentjanževke ($\mu\text{g/g}$)
 Table 13: Hyperforin in selected St. John's wort (plant material) ($\mu\text{g/g}$)

Akcesija	Obravnavanje ¹	Hiperforin	Obravnavanje ²	Hiperforin
6/8 BF LP 2006	MeOH	0,617	HP β CD	21,655
6/9 BF LP 2006	MeOH	1,255	HP β CD	6,933
6/2 BF LP 2006	MeOH	1,621	HP β CD	29,733
BFL 18-002/05	MeOH	1,827	HP β CD	10,888
6/15 Maja	MeOH	1,173	HP β CD	19,888
BFL 21-004/05	MeOH	0,894	HP β CD	20,836
6/4 BF LP 2006	MeOH	0,408	HP β CD	16,887
Prostoživeča populacija	MeOH	1,264	HP β CD	20,214
'Topas'	MeOH	0,644	HP β CD	16,011
'Maja'	MeOH	1,417	HP β CD	24,375
'Gemo'	MeOH	1,877	HP β CD	30,726
'Anthos'	MeOH	1,981	HP β CD	29,823
'Taubertal'	MeOH	0,651	HP β CD	28,638
Stamm 710	MeOH	1,768	HP β CD	25,847
Stamm 715	MeOH	0,619	HP β CD	25,799
Stamm 21	MeOH	1,156	HP β CD	10,705

¹ ekstrakcijska raztopina (MeOH in bdestilirana voda (80 : 20, V : V)).

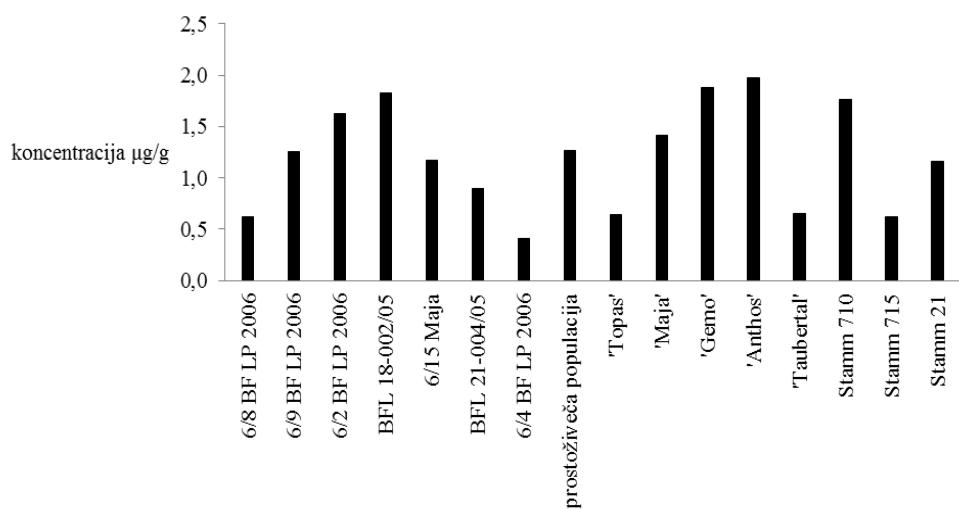
² ekstrakcijska raztopina (MeOH in bdestilirana voda (80 : 20, V : V)) ob dodatku 5% HP β CD.

Isočasno smo tudi preizkušali učinkovitost HP β CD na stabilizacijo sekundarnih metabolitov na nekontrolirane dejavnike. Izkazal se je kot dober »stabilizator«, saj je v njegovi prisotnosti količina sekundarnega metabolita pri istem obravnavanem vzorcu občutno višja (slika 22). Predstavljeni podatki kažejo, da je učinek HP β CD izrazito opazen, saj so dobljeni podatki pri ekstrakcijski raztopini brez dodatka HP β CD imeli manjše koncentracije metabolita v vzorcu. Sklepati je mogoče, da uspešno zaščiti metabolite na zunanje dejavnike, saj glede na zastavljen poskus na kaj drugega ni mogel imeti vpliva.



Slika 22: Vsebnost hiperforina pri rastlinskih vzorcih šentjanževke ob dodatku HP β CD ($\mu\text{g/g}$)

Figure 22: Hyperforin content in selected St. John's wort (plant material) with additional HP β CD ($\mu\text{g/g}$)



Slika 23: Vsebnost hiperforina pri rastlinskih vzorcih šentjanževke ($\mu\text{g/g}$)
 Figure 23: Hyperforin content in selected St. John's wort (plant material) ($\mu\text{g/g}$)

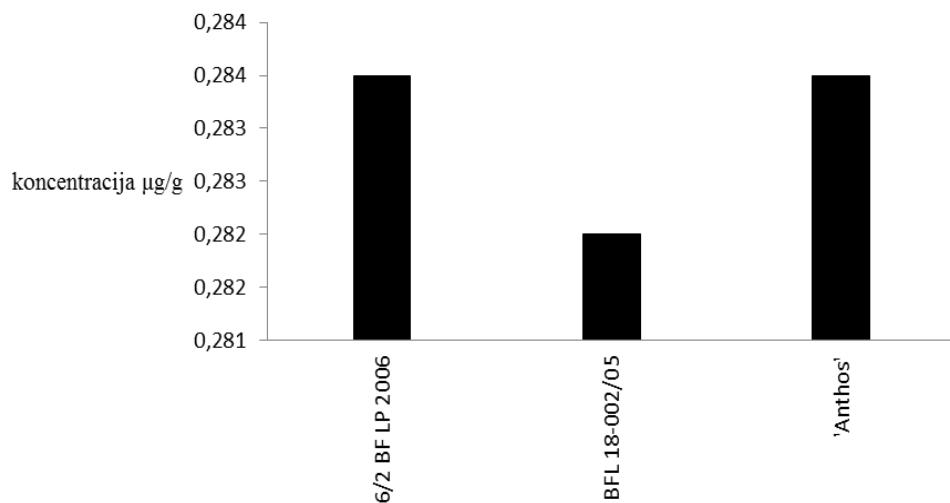
Pri detekciji sekundarnega metabolita v vzorcih celičnih suspenzij je bila vsebnost sekundarnega metabolita pri večini analiziranih vzorcev, razen pri akcesijah 6/2 BF LP 2006, 'Anthos' (oboje pri MeOH in HP β CD) in BFL 18-002/05 (samo pri HP β CD) pod mejo detekcije. Z drugimi besedami vsebnost sekundarnega metabolita je bila prenizka za ovrednotenje vzorca glede na njegovo vsebnost (preglednica 14).

Preglednica 14: Vsebnost hiperforina v vzorcih celičnih suspenzij šentjanževke ($\mu\text{g/g}$)
 Table 14: Hyperforin content in selected St. John's wort (cell suspension) ($\mu\text{g/g}$)

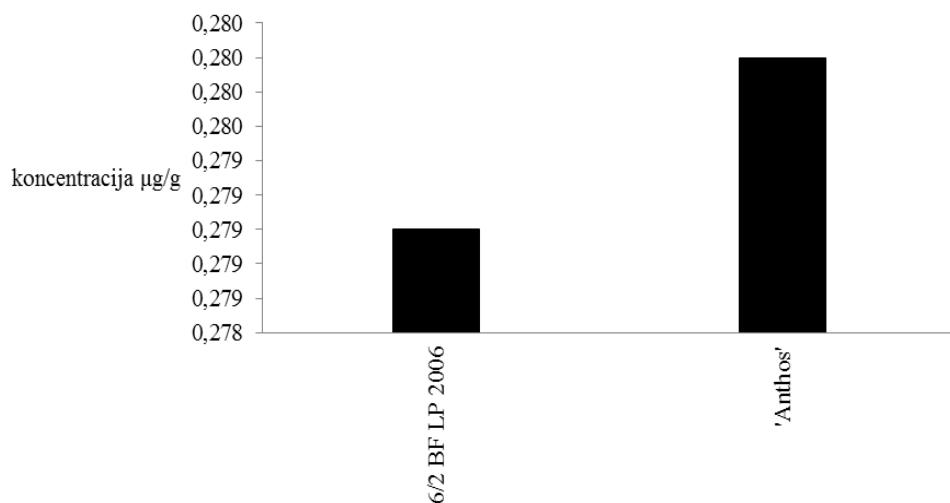
Akcesija	Obravnavanje ¹	Hiperforin	Obravnavanje ²	Hiperforin
6/8 BF LP 2006	MeOH	/	HP β CD	/
6/9 BF LP 06	MeOH	/	HP β CD	/
6/2 BF LP 2006	MeOH	0,279	HP β CD	0,284
BFL 18-002/05	MeOH	/	HP β CD	0,282
6/15 Maja	MeOH	/	HP β CD	/
BFL 21-004/05	MeOH	/	HP β CD	/
6/4 BF LP 2006	MeOH	/	HP β CD	/
Prostoživeča populacija	MeOH	/	HP β CD	/
'Topas'	MeOH	/	HP β CD	/
'Maja'	MeOH	/	HP β CD	/
'Gemo'	MeOH	/	HP β CD	/
'Anthos'	MeOH	0,280	HP β CD	0,284
'Taubertal'	MeOH	/	HP β CD	/
Stamm 710	MeOH	/	HP β CD	/
Stamm 715	MeOH	/	HP β CD	/
Stamm 21	MeOH	/	HP β CD	/

¹ ekstrakcijska raztopina (MeOH in bidestilirana voda (80 : 20, V : V)).

² ekstrakcijska raztopina (MeOH in bidestilirana voda (80 : 20, V : V)) ob dodatku 5% HP β CD.



Slika 24: Vsebnost hiperforina pri vzorcih celičnih suspenzij šentjanževke ob dodatku HP β CD ($\mu\text{g/g}$)
Figure 24: Hyperforin content in selected St. John's wort (cell suspension) with additional HP β CD ($\mu\text{g/g}$)



Slika 25: Vsebnost hiperforina pri vzorcih celičnih suspenzij šentjanževke ($\mu\text{g/g}$)
Figure 25: Hyperforin content in selected St. John's wort (cell suspension) ($\mu\text{g/g}$)

Iz zgornjih preglednic (preglednica 13-14) je razvidno, da ni bistvenih razlik med slovenskimi in svetovnimi sortami, populacijami in linijami *H. perforatum* L.

Najbolj produktivne so 6/2 BF LP 2006 in BFL 18-002/05 med slovenskimi ter 'Anthos' in 'Gemo' med svetovnimi akcesijami šentjanževke, slednje so tudi najbolj pogosto uporabljene v raziskavah s tega področja (preglednica 15).

Preglednica 15: Vsebnost hiperforina pri najbolj produktivnih akcesijah šentjanževke v raziskavi ($\mu\text{g/g}$)
 Table 15: Hyperforin content at the most productive St. John's wort in research ($\mu\text{g/g}$)

Sorte, populacije in linije šentjanževke	Rastlinski vzorci MeOH ¹	Vzorci suspenzij MeOH ¹	Rastlinski vzorci HP β CD ²	Vzorci suspenzij HP β CD ²	Velikost genoma vzorca
6/2 BF LP 2006	1,621	0,279	29,733	0,284	tetraploid
BFL 18-002/05	1,827	/	10,888	0,282	tetraploid
Prostoživeča populacija	1,264	/	20,214	/	heksaploid
'Gemo'	1,877	/	30,726	/	diploid
'Anthos'	1,981	0,280	29,823	0,284	tetraploid
Stamm 710	1,768	/	25,847	/	heksaploid

¹ ekstrakcijska raztopina (MeOH in bidestilirana voda (80 : 20, V : V)).

² ekstrakcijska raztopina (MeOH in bidestilirana voda (80 : 20, V : V)) ob dodatku 5% HP β CD.

Statistična analiza po LSD je pokazala da pri obravnavanih akcesijah ni bilo zaznanih razlik pri produkciji sekundarnega metabolita (hiperforina) glede na skupino akcesije (sorta, populacija ali linija) ali glede na ploidnost (preglednica 16-17).

Preglednica 16: Vsebnost hiperforina pri sortah, populacijah in linijah šentjanževke (rastlinski vzorci) ($\mu\text{g/g}$)
 Table 16: Content of hyperforin in cultivars, populations and lineage of St. John's wort (plant material) ($\mu\text{g/g}$)

Tip akcesije	Vsebnost hiperforina MeOH ¹	Vsebnost hiperforina HP β CD ²
Sorte šentjanževke	1,314±0,644a	25,915±6,048a
Populacije šentjanževke	1,132±0,478a	18,379±6,976a
Linije šentjanževke	1,181±0,575a	20,784±8,728a
	\bar{x} ± SD	\bar{x} ± SD

¹ ekstrakcijska raztopina (MeOH in bidestilirana voda (80 : 20, V : V)).

² ekstrakcijska raztopina (MeOH in bidestilirana voda (80 : 20, V : V)) ob dodatku 5% HP β CD.

Preglednica 17: Vsebnost hiperforina glede na ploidnost šentjanževke (rastlinski vzorci) ($\mu\text{g/g}$)
 Table 17: Content of hyperforin regarding the ploidy of St. John's wort (plant material) ($\mu\text{g/g}$)

Ploidnost akcesije	Vsebnost hiperforina
Diploidne	10,622±4,518a
Tetraploidne	13,243±2,901a
Heksaploidne	10,935±2,243a
	\bar{x} ± SD

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Prirast biomase

Iz dobljenih rezultatov pri analizi prirasta biomase je razvidno, da je v rastni krivulji preučevanih vzorcev šentjanževke možno zaslediti zametek rastne krivulje - sigmoidne oblike, iz katere je možno razločiti vse značilne ključne faze rastne krivulje: lag fazo, eksponentno in stacionarno fazo. Zadnje faze v naši raziskavi nismo določili zaradi prekratkega obdobja med dvema subkultivacijama. V tem leži poglaviti vzrok, da se ni razvila tipična oblika rastne krivulje. Najbljižje detekciji stacionarne faze smo bili pri prostoživeči populaciji šentjanževke, pri populaciji 6/9 BF LP 2006 in 'Topas' ter liniji Stamm 715. Da bi bila sigmoidna krivulja preučevanih vzorcev značilna, bi bilo potrebno podaljšati čas merjenja prirasta biomase. Čim pogosteje bi opravili meritve prirasta biomase, več točk bi lahko analizirali, in tem bolj sigmoidno obliko bi imela rastna krivulja. S tem bi rastna krivulja imela še bolj jasno razvidne prevoje, ki so značilni za prehode med posameznimi fazami rasti.

Prirast suspenzije po dnevih je pri statistični analizi – 16. dan pokazala statistično značilne razlike med populacijami, sortami in linijami (tip akcесije). Prirast celične biomase je bil večji pri preučevanih sortah in linijah šentjanževke napram preučevanim populacijam (kamor sodijo tudi vsi slovenski vzorci) (preglednica 9). S tem je potrjeno, da endogeni in eksogeni dejavniki vplivajo na analizirane rezultate, v tem primeru na prirast biomase. Tudi nadaljnja statistična analiza v prirastu celične biomase, v odvisnosti od ploidnosti akcесije šentjanževke, pokaže, da obstajajo statistično značilne razlike (preglednica 10). Od 8. do 12. dne je prirast biomase pri diploidnih akcесijah šentjanževke večji kot pri heksaploidnih.

Pri posameznih akcесijah šentjanževke je obdobje, ko kultura vstopi v določeno fazo, različno dolgo. V obstoječi literaturi smo zasledili, da v povprečju akcесije *H. perforatum* L. dosežejo stacionarno fazo po 14-dnevnom ciklu, kar pomeni, da je po tem obdobju potrebno kulturo subkultivirati, če jo želimo obdržati (Walker in sod., 2002; Klingauf in sod., 2005). Na podlagi objavljenih podatkov smo subkultivacijo izvajali v 16-dnevnom intervalu, ko naj bi kulture že bile v stacionarni fazi rasti in bi bili s tem izpolnjeni pogoji za maksimalno proizvodnjo sekundarnih metabolitov. Izkazalo se je, da so bile celične kulture večine akcесij 16 dni po iniciacijski fazi, vedno v eksponentni fazici, medtem ko so v tem obdobju v stacionarno fazo prešli le genotipi 6/9 BF LP 2006, prostoživeča populacija šentjanževke, 'Topas' in Stamm 715. V stacionarni fazi je sekundarni metabolizem na višku. Glede na literturne vire predvidevamo, da vse ostale akcесije, ki so po 16 dneh še vedno v eksponentni fazici rasti, nimajo optimalne produkcijske sposobnosti sekundarnih metabolitov (Walker in sod., 2002).

5.1.2 Velikost genoma

Med 16 analiziranimi akcесijami vrste *H. perforatum* L. imamo 18,75 % diploidnih, 56,25 % tetraploidnih in 25 % heksaploidnih akcесij. To kaže na zelo veliko variabilnost znotraj

iste vrste in na zmožnost pestrega prenosa genetskega materiala na potomce – spolno in apomiksis razmnoževanje.

Couceiro in sod. (2006), navajajo, da lahko razlike v velikosti genoma med sortami, populacijami in linijami *H. perforatum* L. pogojujejo tudi razlike v vsebnosti sekundarnih metabolitov v rastlini. Tudi druge objave v znanstveni literaturi na področju genetskih analiz trdijo, da imajo na količino prisotnih sekundarnih metabolitov v rastlinah pomemben vpliv genetski dejavniki (Košuth in sod., 2003), kot tudi okoljski dejavniki (Briskin in Gawienowski, 2001; Sirvent in Gibson, 2002; Zobayed in sod., 2004; Mosaleeyanon in sod., 2005). Tega ne potrjuje naša raziskava, saj rezultati kažejo, da je vsebnost sekundarnih metabolitov (hiperforina) med akcesijami različnih ploidnosti enaka (preglednica 17).

Iz razpoložljive literature je moč zaslediti, da je šentjanževka pretežno tetraploid ($2n = 4x = 32$) (Martonfi in sod., 1996, Navarini in sod., 2008, Corral in sod., 2011). Tudi v naši raziskavi se je izkazalo, da prevladuje delež tetraploidnih akcessij (56,25 %), medtem ko je diploidnih najmanj. Statistična analiza, po LSD, vsebnosti hiperforina glede na velikost genoma pokaže, da se vsebnosti hiperforina pri diploidnih in tetraploidnih in heksaploidnih rastlinah medsebojno ne razlikuje, kljub temu pa je povprečna vsebnost hipreforina pri tetraploidnih rastlinah največja. Pri primerjavi posameznih akcessij pa je bila ugotovljena največja produkcija pri akciji 'Gemo' (diploid; rastlinski vzorec: 30,726 µg/g).

V hipotezi smo predpostavili, da imajo rastline z večjo velikostjo genoma tudi večjo vsebnost sekundarnih metabolitov. Bolj poglobljena analiza pokaže, da temu ni tako, saj imajo na izplen sekundarnih metabolitov, poleg genetskih dejavnikov, vpliv tudi ostali prej omenjeni eksogeni dejavniki (osvetljenost, voda, biotski in abiotski kontaminanti) (Briskin in Gawienowski, 2001; Southwell in Bourke, 2001; Walker in sod., 2002; Sirvent in Gibson, 2002; Gray in sod., 2003; Murch in sod., 2003; Bruni in sod., 2005; Zobayed in sod., 2005; Mosaleeyanon in sod., 2005; Couceiro in sod., 2006; Tirillini in sod., 2006; Zobayed in sod., 2007; Germ in sod., 2010). V našem primeru vsebnost hiperforina v rastlini ni odvisna od velikosti genoma, ampak je rezultat drugih dejavnikov, ki kumulativno vplivajo na količino metabolita v rastlini ali suspenziji. Na podlagi objavljene literature lahko sklenemo, da so bolj produktivne diploidne akcesije šentjanževke.

5.1.3 Rezultati kromatografije

Vsebnost analiziranega metabolita (hiperforina) v naši raziskavi nekoliko odstopa od rezultatov predstavljenih v dostopni literaturi s tega področja, ampak kljub vsemu je moč najti tudi podobne točke z razpoložljivo strokovno literaturo. Preučevali smo vsebnost metabolita *in vivo* (v zeleni rastlini) in iz sistema *in vitro* celične kulture. Slednji se je razvil z namenom zagotoviti komercialne potrebe farmacevtske industrije po metabolitih, kot tudi omogočiti manjšo variabilnost pri prodrobivanju sekundarnih metabolitov v kontroliranih pogojih. Kljub temu je glavni omejujoči dejavnik ta, da tkivne kulture ne dosežejo svojega potenciala zaradi neoptimalnega »posnemanja« pogojev iz naravnega okolja rastline in pogojev rasti v tkivni kulturi – gledano z vidika sončnega obsevanja (v naravi je osvetlitev 1500 Lux, medtem ko v rastlinjaku le 400 Lux), prisotnosti biotskih in abiotskih kontaminantov, dostopnosti vode ... Naravno okolje ima spremenljive pogoje, kar

lahko v veliki meri vpliva na količino sintetiziranih metabolitov. Temu primerne so tudi razlike med rezultati *in vivo* ter *in vitro* kultur. Sicer med posameznimi akcesijami prihaja do odstopanja v produkciji metabolita, vendar ni možno narediti statistične analize, ker bi morala biti vsaka akcesija analizirana vsaj v treh ponovitvah, kar pa je bilo zaradi obsega poskusa neizvedljivo. Vsebnost hiperforina je največja pri 'Gemo'. Soelberg in sod. (2007) so v svoji raziskavi detektirali nekje okrog 3 mg/g hiperforina, avtorji Zobayed in sod. (2005) pa 1-1,5 mg/g hiperforina v sveži snovi rastline šentjanževke. Naši rezultati so pokazali, da se vsebnost hiperforina v sveži snovi rastlin giblje za MeOH med 0,408 in 1,981 µg/g in za HPβCD med 6,933 in 30,726 µg/g (preglednica 13) (povprečje vrednosti metabolita pri MeOH 1,198 µg/g; povprečje vrednosti metabolita pri HPβCD 21,185 µg/g). To je 100-krat nižje, kot je predstavljeno v raziskavi Soelberga in sod. (2007). Takšen rezultat je bil delno tudi pričakovani, saj smo vzeli material vzgojen v rastlinjaku, medtem ko so v predstavljenem članku material vzeli iz naravnega okolja.

Pri vrednotenju rezultatov moramo biti pozorni na kar nekaj elementov, na izbiro rastlinskega materiala, predvsem pa na čas žetve oziroma na čas pobiranja vzorcev, ki smo jih analitsko obravnavali, saj so od tega v veliki meri odvisni dobljeni rezultati. Vpliva lahko razvojna faza (letni čas), v kateri se rastlina nahaja, in tudi že del dneva, v katerem so vzorci pobrani. To velja v glavnem za rastlinske vzorce, medtem ko je za vzorce tkivnih kultur pomembno predvsem to, da se upošteva razvojni cikel tkivne kulture.

Pri določitvi trenutka žetve rastlinskega materiala z namenom pridobitve sekundarnih metabolitov je zelo pomembno poznавanje rastne krivulje celične suspenzijske kulture. Pri tem je potrebno upoštevati, da je največja produkcija sekundarnih metabolitov v stacionarni fazi (Ramawat in Merillon, 2007). Zatorej je potrebno podaljševati stacionarno fazo rastne krivulje preučevane akcesije, saj tako lahko pričakujemo večjo (povečano) produkcijo sekundarnih metabolitov. V naši raziskavi smo celično kulturo kultivirali 16 dni. V tem času po iniciaciji so suspenzijske kulture pri akcesiji 6/9 BF LP 2006, prostoživeči populaciji šentjanževke, 'Topas' in Stamm 715 prešle v stacionarno fazo (preglednica 11). Ostale so bile še vedno v eksponentni fazi ali na prevoju v stacionarno fazo rastne krivulje, in tako niso preusmerile primarnega metabolizma v sekundarni metabolizem v popolnosti (priloga B1-B16). Za boljše rezultate bi morali še dodatno podaljšati periodo kultivacije, ki pa smo jo za razliko od nekaterih raziskav, ki smo jih zasledili v literaturi (Klingauf in sod., 2005), podaljšali že za 2 dni.

Ugotovljeno je bilo, da vsebnost sekundarnih metabolitov raste po naslednjih korakih: tkivne kultura – rastlinjak – rastlina iz narave. V našo raziskavo smo vključili zgolj tkivne kulture in rastline vzgojene v rastlinjaku, pri katerih je trend takšen, kot je zapisano (preglednici 14 in 13).

Pridobljeni podatki potrjujejo, da je sinteza tipičnih *in vivo* bioaktivnih substanc (hiperforina) pri *H. perforatum* L. soodvisna od stopnje diferenciranosti tkiv. V nediferenciranih kulturah, kot sta celična suspenzija ali kalus, je koncentracija nižja kot v analizi, opravljeni iz zelenih delov rastlin (preglednici 14 in 13). Dobljeni rezultati kažejo na vsebnost metabolita hiperforina v tkivnih kulturah šentjanževke med 0,279 in 0,284 µg/g (povprečje vrednosti metabolita 0,282 µg/g; povprečje vrednosti metabolita pri

MeOH 0,280 µg/g; povprečje vrednosti metabolita pri HPβCD 0,283 µg/g), saj so nekajkrat nižji kot pri vzorcih rastlin iz *in vivo* pogojev.

Poleg tega je potrebno tudi, da rastlinice dosežejo določeno starost, preden razvijejo sposobnost sinetiziranja vseh učinkovin. Tako je iz strokovne literature moč zaslediti ugotovitve (Croteau, 1987), da je sinteza hiperforina pogojena s sintezo v kloroplastih, predvsem to velja za njegov izoprenoidni del molekule, ki se sintetizira v tem organelu. Kloroplasti se nahajajo v transluscentnih žlezah in njihovi robnih celicah (Ciccarelli in sod., 2001b; Adam in sod., 2002). Tako se lahko sklepa, da so te celice pomembno mesto sinteze (izoprenoidnega dela) molekule hiperforina. To specifično mesto sinteze hiperforina je morebiti odgovor na njegovo izredno nagnjenost k razgranji pod vplivom okoljskih dejavnikov (Schmitt in sod., 2006).

Tkvne kulture smo gojili v temi. S tem smo želeli povečati produkcijo sekundarnih metabolitov, saj smo tako načrtovali izpostaviti tkivno kulturo stresnemu dejavniku. Sekundarni metabolizem je evolucijski odgovor rastline na stresne dejavnike, katerim je izpostavljena, in ima obrambno nalogu pred temi dejavniki (škodljivci, suša ...). Ugotovili smo, da je ravno obratno. Za gojenje celične kulture v temi smo se odločili tudi zaradi občutljivosti hiperforina na zunanje dejavnike, količino osvetlitve, saj hiperforin degradira ob izpostavljenosti na svetlobi (Schmitt in sod., 2006). Izpostavitev temi ni potrebna, kajti čim večja je osvetlitev, tem bolje je za kulturo, in tako tudi za proizvodnjo sekundarnih metabolitov. Prilagoditev osvetlitve se izvede tako, da je čim večja, saj odločilno vpliva na nastajanje količine sekundarnih metabolitov tako v rastlini, kot tudi v tkivni kulturi. Z drugimi besedami, čim večja je osvetlitev rastline ali tkivne kulture, tem večja je produkcija sekundarnih metabolitov. To je moč sklepati tudi iz časovnega okvira žetve rastline šentjanževke, to je mesec julij v času cvetenja, ko je intenziteta osvetljenosti v naravnem okolu največja.

Çirak in sod., 2008, navajajo, da so razlike med koncentracijo hiperforina v pecljih, listih in reproduktivnih tkivih statistično značilne ($P < 0.01$) za obe vrsti. Večinoma se višje količine učinkovin zabeležijo v cvetni fazi rastline na vseh njenih delih, medtem ko produkcijo metabolitov zavre nastanek plodov. Največji delež metabolitov je v polno odprtih cvetovih (hiperforin (4,36 mg/g)). Še več pa je zaslediti hiperforina v cvetnih brstih zelenih rastlin. Mi smo analizirali vsebnost iz vrhnjih delov rastline in cvetov, ki smo jih nabrali v času cvetenja.

Hiperforinov še niso odkrili v koreninah *H. perforatum* L. Prisotni so v listih, s čimer ponazarjajo obrambno vlogo proti škodljivcem (insektom). Dokazano je, da se insekti hranijo samo z deli listov, kjer ni temnih žlez (Pasqua in sod., 2003).

Na zmanjšanje vsebnosti sekundarnih metabolitov v naših vzorcih (glede na podatke iz literature) je lahko vplivala morebitna oksidacija vzorcev, do katere je morebiti prišlo pri prenosu vzorcev na homogenizacijo materiala. Z oksidacijo je prišlo do razpada predmetnega sekundarnega metabolita, in tako do zmanjšanja njegove koncentracije. Pri analizah vsebnosti hiperforina pri vzorcih ekstrahiranih iz rastlinskega materiala je moč opaziti, da je večja pri diploidnih akcесijah šentjanževke. Pri izračunu povprečja med dobljenimi rezultati pri analizi iz sveže snovi smo ugotovili, da je višja koncentracija pri

diploidnih ($1,489 \mu\text{g/g}$ pri MeOH in $24,996 \mu\text{g/g}$ pri HP β CD) in najnižja pri tetraploidnih akcesijah ($1,126 \mu\text{g/g}$ pri MeOH in $20,118 \mu\text{g/g}$ pri HP β CD), medtem ko je pri heksaploidnih akcesijah vrednostno med obema skupinama ($1,142 \mu\text{g/g}$ pri MeOH in $20,727 \mu\text{g/g}$ pri HP β CD). Tega ne moremo podpreti s statistično analizo, ker ta ne pokaže nobenih razlik v vsebnosti metabolita, tako glede na tip akcesije (sorta, populacija ali linija), kot tudi glede na ploidnost preučevane šentjanževke (preglednici 16 in 17). Tako naši rezultati ne sovpadajo z ugotovitvami, ki jih navajajo Koperdáková in sod. (2007), ki ugotavljajo, da je najvišja vsebnost sekundarnega metabolita pri diploidnih rastlinah šentjanževke. Najboljši analizirani rezultat izmed slovenskih populacij je imela akcesija 6/2 BF LP 2006, ki je tetraploid. Med ostalimi obravnavanimi sta imeli izmed vseh preučevanih akcesij največji delež metabolita sorta Gemo in sorta Anthos (diploid in tetraploid). Rezultati iz tkivnih kultur so bili detektirani samo pri tetraploidnih, medtem ko so bili pri ostalih pod mejo detekcije.

Pokazalo se je tudi, da HP β CD opravi svojo funkcijo in obvaruje sekundarne metabolite pred zunanjimi dejavniki. Vsebnosti hiperforina pri HPLC analizi ob dodatku HP β CD v ekstrakcijski raztopini so neprimerno večje.

5.2 SKLEPI

V raziskavi smo ovrednotili variabilnosti med izbranimi sortami, populacijami in linijami šentjanževke v povezavi z vsebnostjo floroglucinolnega derivata (hiperforina) v *in vivo* ter v *in vitro*. Prikazali smo tudi genetske raznolikosti v velikosti genoma med obravnavanimi akcesijami *H. perforatum* L. Ovrednotili smo kalivost semen, pridobivanje kalusa in celičnih suspenzij iz *in vitro* gojenih rastlin. Opravili smo statistične analize glede vsebnosti sekundarnega metabolita pri rastlinah šentjanževke pri izbranih sortah, populacijah in linijah šentjanževke v odvisnosti od tipa akcesije in ploidnosti preučevane šentjanževke.

Da smo lahko odgovorili na zastavljene hipoteze, smo izvedli številne poskuse, s katerimi smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- ne glede na vrsto gojišča je bil pri vseh akcesijah obravnavanih rastlin šentjanževke izredno visok delež kalitve, tako *in vitro* kot tudi *in vivo*,
- v preliminarnem poskusu se je pokazalo, da je za gojenje kalusa boljše gojišče s kinetinom, iz tega razloga smo slednjega tudi uporabili v raziskavi. Dobljeni kalus je bolj rahel in drobljiv, tako bolj primeren za nadaljno uporabnost v raziskavi,
- prirast biomase v celičnih suspenzijah akcesij je potekal v skladu s pravilom sigmoidne rastne krivulje, z eno razliko: rastna krivulja ni bila tako izrazita, kot to navaja literatura. Iz pridobljenih rezultatov smo zaključili, da je prirast celične mase pri populacijah statistično značilno manjša v primerjavi s sortami in linijami šentjanževke. S tem smo potrdili zastavljeno hipotezo,
- kromatografski del raziskave smo opravili tako na zelenih rastlinah *in vivo*, kot tudi na vzorcih ektrahiranih iz *in vitro* celičnih kultur. Pokazalo se je, da je vsebnost hiperforina v zelenih rastlinah nekajkrat višja, kot je to v ekstrahiranem materialu celičnih suspenzij obravnavanih akcesij šentjanževke. S tem smo potrdili zastavljeno hipotezo, da bo vsebnost metabolita *in vivo* višja kot *in vitro*,

- analiza velikosti genoma je potrdila hipotezo, da bo stopnja ploidnosti med sortami in populacijami ter linijami šentjanževke različna. Ugotovili smo prisotnost diploidov, tetraploidov, kot tudi heksaploidov. Najbolj je bila produktivna sorta Gemo (diploid) in gledano v celoti je večja vsebnost sekundarnega metabolita pri tetraploidnih rastlinah šentjanževke. Prvi del slednje trditve ni moč podpreti s statistično značilnimi razlikami napram drugim vrstam akcesij. Prav tako trditve ne moremo razširiti na ostale akcesije enake ploidnosti, saj statistična analiza tega ne potrjuje. Ugotovili smo, da med slovenskimi genotipi prevladujejo tetraploidi (6/4 BF LP 2006, 6/2 BF LP 2006, 6/8 BF LP 2006, BFL 18-002/05, 6/9 BF LP 2006), medtem ko sta 6/15 Maja diploid in BFL 21-004/05 heksaploid. Iz tega lahko zaključimo, da slovenske populacije ne odstopajo od svetovnega povprečja, namreč tudi svetovno znane šentjanževke so po večini tetraploidne,
- med skupinami akcesij (delitev na sorto, populacijo in linijo) in glede na ploidnost s statistično analizo nismo potrdili razlik. S tem smo ovrgli zastavljeni hipotezo. Analiza pokaže dejansko največjo vsebnost sekundarnega metabolita pri izbranih sortah šentjanževke, vendar kot smo zapisali tega ni moč trditi saj ni statistično značilnih razlik. Vzporedno smo pri analizi sekundarnih metabolitov preizkusili tudi vpliv HP β CD na hiperforin. Izkazalo se je, da so dobljeni podatki pri ekstrakcijski raztopini brez dodatka HP β CD imeli manjše koncentracije hiperforina v vzorcu. Sklepati je mogoče, da HP β CD uspešno »stabilizira« sekundarne metabolite na zunanje dejavnike. Rezultati slovenskih populacij niso v ničemer odstopali od svetovno priznanih sort, populacij in linij šentjanževke. Prav v tem leži njihova uporabnost, morebiti bi jih lahko z nekaterimi biotehnološkimi orodji naredili vsaj enakovredne, če ne celo boljše kot svetovno znane sorte. S tem bi postale tržno zanimive za uporabo pri proizvodnji sekundarnih metabolitov in za komercialne namene.

Kot morebitne možnosti za nadaljnje raziskave na našem področju vidimo možnost uporabe elicitorja pri *in vitro* tkivnih kulturah, s katerim bi tkivno kulturo izpostavili stresnemu dejavniku. Ta bi okreplil produkcijo sekundarnega metabolita, in tako povečal njegovo koncentracijo. Istočasno se nam zdi pomembno omeniti, da tkivne kulture ne bi v nadaljevanju gojili v temi, ampak bi jo izpostavili svetlobi, saj slednja sodeluje pri nastanku floroglucinolnih derivatov. Nazadnje predlagamo podaljševanje obdobja od iniciacije kulture do zadnje subkultivacije, v smislu podaljševanja obdoba med subkultivacijo in žetvijo rastlinskega materiala, saj bi tako optimizirali čas za maksimalno akumulacijo sekundarnega metabolita v tkivni kulturi – v stacionarni fazni rasti.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Šentjanževka (*H. perforatum* L.) je dobila svoje ime po svetniku, sv. Janezu, ki goduje 24. junija, saj takrat cvete. O njeni uporabnosti obstajajo zapisi iz daljne zgodovine, iz časa Hipokrata, Plinija, Dioskurida, Galena. Njeno pomembnost potrjuje tudi dejstvo, da je zadnje čase šentjanževka predmet številnih raziskav, predvsem zato, ker vsebuje nekatere vse bolj pomembne učinkovine (Ivanovič, 2000). Zaradi vsebnosti zdravilnih snovi (tudi snovi z antidepresivnim delovanjem) je posebno zanimiva za farmacevtsko industrijo in široko znana ter uporabljena tudi v ljudskem zdravilstvu. Obstajajo številne študije, ki nakazujejo na to, da so ekstrakti šentjanževke enako uspešni kot konvencionalni sintetični antidepresivi, še več: imajo manj stranskih učinkov (Nathan, 2001; Agostinis in sod., 2002; Bilia in sod., 2002; Lawvere in Mahoney, 2005; Linde in sod., 2008). V zadnjem času je vse pomembnejša tudi zaradi svojega protivnetnega, protivirusnega, protibakterijskega in tudi protikancerogenega učinkovanja (Schempp in sod., 2000; Kubit in sod., 2005; Medina in sod., 2006). Uporablja se za zdravljenje odvisnosti od zdravil oziroma nedovoljenih substanc (Uzbay, 2008). Pripisujejo ji zdravilne lastnosti in sposobnost celjenja ran, prav tako deluje kot diuretik in sredstvo proti malariji. Sveža rastlina je za živino škodljiva, saj povzroča hipericizem – preobčutljivost na svetlobo. Podobno je tudi pri ljudeh, ko so izpostavljeni terapiji s šentjanževko (Galle Toplak, 2000).

V raziskavo smo vključili 16 različnih sort, populacij in linij rastlinske vrste *H. perforatum* L. Pri njih smo ovrednotili variabilnosti med izbranimi sortami, populacijami in linijami v povezavi z vsebnostjo floroglucinolnih derivatov, pridobljenih v *in vivo* ter v *in vitro* (celičnih suspenzijskih kulturah) pogojih. Poseben poudarek smo namenili primerjavi rezultatov slovenskih populacij (6/4 BF LP 2006, 6/2 BF LP 2006, 6/8 BF LP 2006, 6/15 Maja, BFL 18 – 002/05, BFL 21 – 004/05, 6/9 BF LP 2006) v primerjavi z znanimi »svetovnimi« sortami, populacijo in linijami ('Anthos', 'Topas', 'Maja', 'Taubertal', 'Gemo', prostoživeča populacija, linija Stamm 710, linija Stamm 715, linija Stamm 21). Z analizo velikosti genoma s pretočno citometrijo smo prikazali morebitno genetsko raznolikost preučevanih sort, populacij in linij ter določili velikost genoma posameznih vzorcev.

Ovrednotili smo kalivost semen sort, populacij in linij šentjanževke, gojitev starševskih rastlin v *in vitro* pogojih in pridobivanje kalusa iz *in vitro* gojenih rastlin. Za iniciacijo kulture kalusa smo uporabili mlade listke *in vitro* vzkaljenih rastlinic *H. perforatum* L. Ugotovili smo, da so po izbrani metodi vse akcesije uspešno iniciirale kulturo kalusa ter celično suspenzijsko kulturo. Pri tem ni bilo bistvenih razlik med vzpostavitvijo kultur, bile pa so razlike (v prirastu biomase, ploidnosti in vsebnosti sekundarnega metabolita) med samimi kulturami na ravni sort, populacij in linij šentjanževke.

Določili smo velikost genoma oz. vsebnost jedrne DNA posameznih sort, populacij in linij šentjanževke, saj glede na literaturo pričakujemo, da so različni genotipi različno ploidni, in sicer diploidni, tetraploidni in tudi heksaploidni. Primerjali smo vsebnost floroglucinolnih spojin (hiperforina) pri *in vivo* rastlinah ter pri *in vitro* suspenzijskih kulturah izbranih akcesij šentjanževke.

Prirast celične biomase v suspenzijskih kulturah je statistično značilno manjša za populacije (kamor sodijo tudi vsi slovenski vzorci) v primerjavi s preučevanimi sortami in linijami šentjanževke – 16. dan.

Pri HPLC analizi se je potrdilo pričakovanje, da bo vsebnost derivatov v suspenzijskih kulturah nižja kot v zelenih rastlinah. Vsebnost sekundarnega metabolita v vzorcih rastlin in tkivnih kultur smo analizirali z metodo HPLC (Surveyor HPLC sistem (Thermo Finnigan, San Jose, USA) z vključenim DA (diode array – UV 273 nm) detektorjem, katere smo vzpostavili iz kulture kalusa na gojišču enake sestave z eno izjemo, da je bilo to tekoče (ni bilo dodanega strjevalca). Vsebnost sekundarnih metabolitov pri tkivnih kulturah je nižja kot pri zelenih rastlinah, saj pri prvih nikakor v celoti ne moremo posnemati pogojev, kot so v naravi. Razlike med samimi akcesijami pa se pojavijo zaradi genetskih preddispozicij za akumulacijo sekundarnega metabolita. Statistična analiza vsebnosti metabolita ni pokazala razlik med preučevanimi akcesijami šentjanževke. Ugotovitve v naši raziskavi sovpadajo z ugotovitvami objavljenimi v ostali strokovni literaturi, ki ugotavljajo, da je vsebnost sekundarnega metabolita najvišja pri diploidnih rastlinah (Koperdáková in sod., 2007). V naši raziskavi je največja vsebnost hiperforina pri diploidni akcesiji šentjanževke ('Gemo'), ki smo jih preučevali v naši raziskavi. Kot že rečeno, tega ne moremo opreti na statistično analizo, saj ta ne pokaže statistično značilnih razlik.

Na podlagi opravljenih statističnih analiz lahko zapišemo, da tip akcesije in ploidnost preučevane šentjanževke ne vpliva na produkcijo sekundarnih metabolitov pri rastlinah šentjanževke. Velja pa načelo, ko je produkcija sekundarnega metabolita na optimumu, je potrebno počakati, da se rastna krivulja previje iz eksponentne v stacionarno fazo (primarni v sekundarni metabolism).

Tak zaključek lahko tudi sklenemo iz rezultatov analize sekundarnih metabolitov rastlin in tkivnih kultur ter analize prirasta biomase. HPLC analiza je pri zelenih rastlinah pokazala primerljive rezultate z rezultati iz obstoječe strokovne literature. Rezultati pri tkivnih kulturah so bili nižji kot v strokovni literaturi. Rastna krivulja pri preučevanih akcesijah šentjanževke ni v popolnosti prešla v zaključno stacionarno fazo rasti, v kateri se primarni prevesi v sekundarni metabolism.

Večina akcesij je bila še vedno v eksponentni fazi svoje rastne krivulje. Samo pri nekaterih obravnavanih akcesijah šentjanževke je bil opazen začetek stacionarne faze rasti. Statistična analiza prirasta suspenzije je pokazala razlike med populacijami šentjanževke in ostalimi akcesijami (sorte, linije) šentjanževke. Rezultati so pokazali, da so preučevane slovenske populacije po proizvodnji sekundarnih metabolitov enakovredne šentjanževkam iz ostalih delov sveta. V primerjavi z nekaterimi so tudi bolj produktivne. Tukaj leži njihov velik potencial za raziskovalno ali industrijsko uporabo.

Pri nadalnjih raziskavah bi bilo potrebno upoštevati dolžino eksponentne faze rasti, v smislu podaljševanja obdoba med subkultivacijo in žetvijo rastlinskega materiala, saj tako dosežemo pravi trenutek za maksimalno akumulacijo sekundarnega metabolita v tkivni kulti. Istočasno bi lahko preučili vpliv elicitorja (stresnega dejavnika) na produkcijo sekundarnega metabolita. Pričakovati bi bilo večjo produkcijo sekundarnih metabolitov v tkivnih kulturah.

6.2 SUMMARY

St. John's wort (*H. perforatum* L.) has gotten its name after a saint around which it blossoms, that is st. John, which is celebrated on 24th of Juny. Its usage is well known throughout its history, records about it exist from time of Hipocrates, Pliny, Dioskouroi, Galen. Its value is also confirming a fact, that St. John's wort is subject of many research, most likely because it contains very important integrants (Ivanovič, 2000). Because it contains healing integrants (also substances with antidepressive effect) is especially interesting for pharmaceutical industry in wide known and used in folk medicine. Several studies implies, that the extract of St. John's wort is as successful as other conventional sintetical antidepressants. Even more, the extract has less side effects (Nathan, 2001; Agostinis et al., 2002; Bilia et al., 2002; Lawvere and Mahoney, 2005; Linde et al., 2008). Lately it has more value because of its antiinflamed, antiviral, antibacterial and also anticancerous effects (Schempp et al., 2000; Kubin et al., 2005; Medina et al., 2006). It is also use for treatment of addiction habits (Uzbay, 2008). They also attribute to it the ability to heal wounds, it also works as laxative and also as medicine for malaria. Fresh herb is harmful for cattel because it causes hypericism – over sensitivity to light, similar to people, who are exposed to treatment with St. John's wort (Galle Toplak, 2000).

We have included 16 different types of cultivars, populations and lineages of herbal specimen *H. perforatum* L. into research. We have evaluated the variability between chosen cultivars, populations and lineages in connection to content of floroglucinol derivate in *in vivo* and *in vitro* (cell suspension culture) of chosen cultivars, populations and lines of St. John's wort. We specifically emphasise the result comparison of slovenian population (6/4 BF LP 2006, 6/2 BF LP 2006, 6/8 BF LP 2006, 6/15 Maja, BFL 18 – 002/05, BFL 21 – 004/05, 6/9 BF LP 2006) regarding to other world cultivars, lineages and populations ('Anthos', 'Topas', 'Maja', 'Taubertal', 'Gemo', »prostoživeča populacija«, lineage Stamm 710, lineage Stamm 715, lineage Stamm 21). With genome size analysis with flow cytometer we demonstrated possible genetic varibility of studied cultivars, populations and lines and defined the genome size of seperate samples.

We evaluated the germanitive faculty of cultivars, populations and lineages of St. John's wort, cultivation of parental herbs in *in vitro* conditions and aquirement of callus from *in vitro* cultivated herbs. For initiation callus culture we used young leaves from *in vitro* germanitived herbs of *H. perforatum* L. We found out, that using this method all accessions successfully initiated callus culture and cell suspension culture. There were no significal differences between restoration of cultures, but there were differences between cultures on level of cultivars, populations and lineages of St. John's wort.

We defined the genome size or content of DNA core of specifical species, populations and lineages of St. John's wort, because according to literature sources we are expecting, that different genotypes are differently ploid: diploid, tetraploid and hexaploid. We compared the contend of florogucinol derivate (hyperforin) in *in vivo* herbs and in *in vitro* suspension cultures of chosen accession St. John's wort. Analyzed slovenian population don't deviate of others world cultivars of *H. perforatum* L.

Growth of fresh biomass in suspension cultures is statistical lower for populations according to other cultivars in lineages of chosen accession St. John's wort – 16th day.

At HPLC analysis we confirmed our expectations, that the content of derivates in suspension cultures is lower than in green plants. We analyzed the content of secondary metabolite and tissue culture with method HPLC (Surveyor HPLC sistem (Thermo Finnigan, San Jose, USA) with DA detector included (diode array – UV 273 nm), which we initiated from callus culture on nutrient medius same composition, with only one exception – it was fluid (there was no agar added). The content of secondary metabolites in tissue cultures was lower as in green plants, because in tissue cultures we cannot immitate the conditions that occur in nature. Statistical analysis of metabolite content shows no differences in chosen accession St. John's wort. Differences between accessions occur because of genetic disposition for accumulation of secondary metabolite. Findings in our research correspond with findings in other literature – that the highest content of secondary metabolite at diploid plants are grown from seed of somaclones (Koperdáková et al., 2007). In our research the highest content of hyperforin is in diploid accession of tissue culture of St. John's wort ('Gemo'), which was studied in research. This statement could not be submit to our statistical analysis. On the contrary statistical analysis shows no differences.

In complex of that we studied the possible correlation between cell biomass growth and content of secondary metabolite at chosen species, population and lineages of *H. perforatum* L. We can say, that cell biomass growth do not influences onto production of secondary metabolite in herbs of St. John's wort. Generally, the bigger the production of biomass of plant material, the smaller is the production of secondary methabolite. When the production of secondary metabolite is optimal, one should wait, so the growth curve changes from exponential to stacionary phase (primary to secondary metabolite).

We can get same conslusion from the results of analysis of secondary metabolites in plants and tissue cultures and analysis of biomass growth. From the examination of all results we can conclude that HPLC analysis in green plants showed equal results as in results in other literature. So we could also expected similar results at tissue cultures, which were opposite of other literature lower. Growth curve at analized akcesions of St. John's wort was not completely passed into final stationary growth phase where is primary switched to secondary metabolism.

The most of St. John's wort were still at exponential phase of their growth curve. Plant material did not finish exponential phase, which comes in secondary metabolism with stacionary growth phase. Only in few accessions of St. John's wort was noticeable beginning of stacionary growth phase. Statistical analysis for growth of fresh suspension biomass shows that there are differences between the populations and other of chosen accession (cultivars, lineages) St. John's wort. Results showed, that studied slovenian population is equal to *H. perforatum* L. from other parts of the world by production of secondary metabolite. In oposite to others they are even more productive. Here lies their great potencial – for reseach or industrial usage.

In future research, we should consider the length of exponential growth phase – meaning extending period between subcultivation and harvesting plant material, because that way we achieve the right moment for maximum accumulation of secondary metabolite in tissue culture. At the same time we could study the influence of elicitor (stress factor) onto production of secondary metabolite. We could be expecting bigger production of secondary metabolite in tissue culture.

7 VIRI

- Adam P., Arigoni D., Bacher A., Eisenreich W. 2002. Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*. Journal of Medicinal Chemistry, 45, 21: 4786-4793
- Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W., De Witte P. A. M. 2002. Hypericin in cancer treatment: More light on the way. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 34, 3: 221-241
- Arumuganathan K., Earle E. D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter, 9, 3: 208-218
- Ayan A. K., Çirak C. 2008. Hypericin and pseudohypericin contents in some *Hypericum* species growing in Turkey. Pharmaceutical Biology, 46, 4: 288-291
- Bais H. P., Walker T. S., McGrew J. J., Vivanco J. M. 2002. Factors affecting growth of cell suspension cultures of *H. perforatum* L. (St. John's wort) and production of hypericin. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant, 38, 1: 58-65
- Beerhues L. 2006. Molecules of interest-hyperforin. Phytochemistry, 67: 2201-2207
- Bilia A. R., Gallori S., Vincieri F. F. 2002. St. John's wort and depression: Efficacy, safety and tolerability-an update. Life Sciences, 70, 26: 3077-3096
- Bohanec B. 1989. Studies of callus growth, shoot regeneration and establishment of cell suspension in buckwheat – *Fagopyrum esculentum* Moench. V: International congress on genetic manipulation in plant breeding, Helsingør. Book of abstracts: 5-32
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. BF, Oddelek za Agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnenje: 168 str.
- Bohanec B. 2003. Ploidy determination using flow cytometry. V: Doubled haploid production in crop plants, a manual. Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B. P., Szarejko I. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 397-403
- Bohinc P. 1985. Slovenske zdravilne rastline: vodnik za nabiranje in pripravo zdravilnih zelišč. 2. dopolnjen ponatis. Ljubljana, Mladinska knjiga: 327 str.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. Plant Science, 161, 5: 839-851
- Briskin D. P., Gawienowski M. C. 2001. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. Plant Physiology and Biochemistry, 39, 12: 1075-1081

- Brockmoeller J., Reum T., Bauer S., Kerb R., Hübner W. D., Roots I. 1997. Hypericin and pseudohypericin: Pharmakinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry*, 30, 2: 94-101
- Brolis M., Gabetta B., Fuzzati N., Pace R., Panzeri F., Peterlongo F. 1998. Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Chromatography A*, 825, 1: 9-16
- Bruneton J. 1999. Toxic Plants. Paris Lavoisier Publishing: 365 str.
- Bruni R., Pellati F., Bellardi M. G., Benvenuti S., Paltrinieri S., Bertaccini A., Bianchi A. 2005. Herbal drug quality and phytochemical composition of *H. perforatum* L. affected by ash yellows phytoplasma infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 964-968
- Bruni R., Sacchetti G. 2009. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's wort (*H. perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules*, 14, 2: 682-725
- Brutovská R., Čellárová E., Schubert I. 2000a. Cytogenetic characterization of three *Hypericum* species by *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 1-2: 46-50
- Butterweck V. 2003. Mechanism of action of St John's wort in depression: What is known? *CNS Drugs*, 17, 8: 539-562
- Butterweck V., Christoffel V., Nahrstedt A., Petereit F., Spengler B., Winterhoff H. 2003. Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. *Life Sciences*, 73, 5: 627-639
- Catchpole O. J., Perry N. B., da Silva B. M. T., Grey J. B., Smallfield B. M. 2002. Supercritical extraction of herbs I: Saw Palmetto, St John's wort, Kava Root, and Echinacea. *The Journal of Supercritical Fluids*, 22, 2: 129-138
- Charchoglyan A., Abrahamyan A., Fujii I., Boubakir Z., Gulder T. A. M., Kutchan T. M., Vardapetyan H., Bringmann G., Ebizuka Y., Beerhues L. 2007. Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissue cultures. *Phytochemistry*, 68, 21: 2670-2677
- Ciccarelli D., Andreucci A. C., Pagni A. M. 2001b. Translucent glands and secretory canals in *H. perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany*, 88, 4: 637-644

- Çirak C., Ayan A. K., Kevseroğlu K. 2007. Direct and indirect regeneration of plants from internodal and leaf explants of *Hypericum bupleuroides* Gris. Journal of Plant Biology, 50, 1: 24-28
- Çirak C., Radušienė J., Çamas N. 2008. Pseudohypericin and hyperforin in two Turkish Hypericum species: Variation among plant parts and phenological stages. Biochemical Systematics and Ecology, 36, 5-6, 377-382
- Corral J. M., Molins M. P., Aliyu O. M., Sharbel T.F. 2011. Isolation and characterization of microsatellite loci from apomictic *Hypericum perforatum* (Hypericaceae). American Journal of Botany, 98, 7. 167-169
- Couceiro M. A., Afreen F., Zobayed S. M. A., Kozai T. 2006. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effects of harvesting time, temperature and germplasm. Plant Science, 170, 1: 128-134
- Crockett S. L., Schaneberg B., Khan I. A. 2005. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's wort) species. Phytochemical Analysis, 16, 6: 479-485
- Croteau R. 1987. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. Chemical Review, 87: 929-954
- Cui X-H, Chakrabarty D., Lee E-J, Paek K-Y. 2010. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *H. perforatum* L. in a bioreactor. Bioresource Technology, 101, 12: 4708-4716
- Curtis J. D., Lersten N. R. 1990. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. New Phytologist, 114, 4: 571-580
- Czygan F. C. 1993. Kulturgeschichte und mystik des Johanniskrautes. Z Phytother, 14: 276-281
- Čellárová E., Kimáková K., Brutovská R. 1992. Multiple shoot formation and phenotypic changes of R0 regenerants in *H. perforatum* L. Acta Biotechnologica, 12, 6: 445-452
- Čellárová E., Daxnerová Z., Kimáková K., Halušková J. 1994. The variability of the hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum*. Acta Biotechnol, 14: 267 – 274
- Čellárová E., Brutovská R., Bruňáková K., Daxnerová Z., Weigel R. C. 1997. Correlation between hypericin content and the ploidy of somaclones of *H. perforatum* L. Acta Biotechnologica, 17, 1: 83-90
- Čellárová E., Kimáková K. 1999. Morphoregulatory effect of plant growth regulators on *H. perforatum* L. seedlings. Acta Biotechnol, 19, 2: 163 – 169

- Dall'Agnol R., Ferraz A., Bernardi A. P., Albring D., Nör C., Schapoval E. E. S., von Poser G. L. 2005. Bioassay-guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. *Phytotherapy Research*, 19, 4: 291 – 293
- Debergh P. C. A. 1987. Recent trends in the application of tissue culture to ornamentals. V: Plant tissue and cell culture. Green C. E., Sommers D. A., Hacket W. P., Biesboer D. D. (ur.), New York, Alan R. Liss: 27-37
- de los Reyes G. C., Koda R. T. 2001. Development of a simple, rapid and reproducible HPLC assay for the simultaneous determination of hypericins and stabilized hyperforin in commercial St. John's wort preparations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 26, (5-6): 959-965
- Dermastia M. 2006. Sekundarni metaboliti. Zbornik projektov problemsko orientiranega učenja študentov prvega letnika študija Biologija 2005/2006. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 85 str.
- Di Guardo A., Čellárová E., Koperdáková J., Pistelli L., Ruffoni B., Allavena A., Giovannini A. 2003. Hairy root induction and plant regeneration in *H. perforatum* L. *Journal of Genetics and Breeding*, 57: 269-278
- Dias A. C. P., Tomás-Barberán F. A., Fernandes-Ferreira M., Ferreres F. 1998. Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 48, 7: 1165-1168
- Doležel J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2: 143-154
- Donà M., Dell'Aica I., Pezzato E., Sartor L., Calabrese F., Barbera M. D., Donella-Deana A., Appendino G., Borsarini A., Caniato R., Garbisu S. 2004. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Research*, 64: 6225-6232
- Fornasiero R. B., Bianchi A., Pinetti A. 1998. Anatomical and ultrastructural observations in *H. perforatum* L. leaves. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 5, 4: 21-33
- Franklin G., Dias A. C. P. 2006. Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 42, 4: 324-330
- Franklin G., Oliveira M., Dias A. C. P. 2007. Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. *Plant Science*, 172: 1193-1203
- Gadzovska S., Maury S., Ounnar S., Righezza M., Kascakova S., Refregiers M., Spasenoski M., Joseph C., Hagège D. 2005. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *H. perforatum* L. *in vitro* cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 6: 591-601

- Gadzovska S., Maury S., Delaunay A., Spasenoski M., Joseph C., Hagège D. 2007. Jasmonic acid elicitation of *H. perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrone. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89, 1: 1-13
- Galle Toplak K. 2000. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 312 str.
- Germ M., Stibilj V., Kreft S., Gaberščik A., Kreft I. 2010. Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (*H. perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels. *Food Chemistry*, 122, 3: 471-474
- Gorenjske lekarne. Šentjanževka-zunanja uporaba (avgust 2004).
http://www.gorenjske-lekarne.si/si/zdravilne-rastline_3/sentjanzevka-zunanja-uporaba
(10. 06. 2012)
- Gray D. E., Pallardy S. G., Garrett H. E., Rottinghaus G. E. 2003. Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of St. John's wort leaves and flowers. *Planta Medica*, 69, 11: 1024-1030
- Greeson J. M., Sanford B., Monti D. A. 2001. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, 153: 402-414
- Hölscher D., Shroff R., Knop K., Gottschaldt M., Crecelius A., Schneider B., Heckel D. G., Schubert U. S., Svatoš A. 2009. Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: Distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *The Plant Journal*, 60: 907-918
- Hostanska K., Reichling J., Bommer S., Weber M., Saller R. 2003. Hyperforin a constituent of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56, 1: 121-132
- Huck C. W., Abel G., Popp M., Bonn G. K. 2006. Comparative analysis of naphthodianthrone and phloroglucine derivatives in St. John's wort extracts by near infrared spectroscopy, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 580(2): 223-230
- Introduction – Flow cytometry (06. 08. 2013).
http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html
(06. 08. 2013)

- Ivanovič S. 2000. Rutinska mikropropagacija arnikе (*Arnica montana* L.), citronke (*Lippia citriodora* Kunth.), košutnika (*Gentiana lutea* L.), pehtrana (*Artemisia dracunculus* L.) in šentjanževke (*H. perforatum* L.). Mag. delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 109 str.
- Jensen A. G., Hansen S. H., Nielsen E.O. 2001. Adhyperforin as a contributor to the effect of *H. perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. Life Sciences, 68, 14: 1593-1605
- Jerman I. 2005. Izolacija hipericina iz šentjanževke. Diplomsko delo. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta: 86 str.
- Karioti A., Bilia A. R. 2010. Hypericins as potential leads for new therapeutics. International Journal of Molecular Sciences, 11, 2: 562-594
- Karppinen K., György Z., Kauppinen M., Tolonen A., Jalonens J., Neubauer P., Hohtola A., Häggman H. 2006a. *In Vitro* propagation of *H. perforatum* L. and accumulation of hypericins, pseudohypericins and phloroglucinols. Propagation of Ornamental Plants, 6, 4: 170-179
- Karppinen K., Hohtola A., Tolonen A., Jalonens J., György Z., Neubauer P. 2006b. Comparison of growth and secondary metabolite accumulation in cultures of compact callus aggregates and shoots of *H. perforatum* L. in shake flasks and in a bubble column bioreactor. V: Proceedings of the fifth international symposium on *in vitro* culture and horticultural breeding. In Fári M.G., Holb I. and Bisztray G. D. (ur.). Acta Horticulturae, 725: 605-612
- Karppinen K., György Z., Tolonen A., Neubauer P., Jalonens J., Hohtola A. 2006c. Comparison of various culture systems on growth and accumulation of hypericins in *Hypericum perforatum* shoot cultures. V: Proceedings of the second international conference on bioreactor technology in cell. In Sorvari S. and Toldi O. (ur.). Tissue Culture and Biomedical Applications. Turku, Karhukopio Oy: 96-101
- Karppinen K. 2010. Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort)-precursors and genes involved. University of Oulu, Faculty of Science, Department of Biology ed. Anja Hohtola, Hely Häggman: 72 str.
- Kartnig T., Goebel I., Heydel B. 1996. Production of hypericin, pseudohypericin and flavonoids in cell cultures of various *Hypericum* species and their chemotypes. Planta Medicaica, 62, 1: 51-53
- Karuppusamy S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research, 3, 13: 1222-1239

- Kirakosyan A., Hayashi H., Inoue K., Charchoglyan A., Vardapetyan H. 2000. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry*, 53: 345-348
- Kirakosyan A., Sirvent T. M., Gibson D. M., Kaufman P. B. 2004. The production of hypericins and hyperforin by *in vitro* cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39, 1: 71-81
- Klingauf P., Beuerle T., Mellenthin A., El-Moghazy S. A. M., Boubakir Z., Beerhues L. 2005. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry*, 66, 2: 139-145
- Komarovská H., Giovannini A., Košuth J., Čellárová E. 2009. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Hypericum tomentosum* L. and *Hypericum tetrapterum* Fries. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64, 11-12: 864-868
- Koperdáková J., Košuth J., Čellárová E. 2007. Variation in the content of hypericins in four generations of seed progeny of *Hypericum perforatum* somaclones. *Journal of Plant Research*, 120, 1: 123-128
- Košuth J., Koperdáková J., Tolonen A., Hohtola A., Čellárová E. 2003. The content of hypericins and phloroglucinols in *H. perforatum* L. seedlings at early stage of development. *Plant Science*, 165, 3: 515-521
- Kubin A., Wierrani, F., Burner, U., Alth G., Grunberger W. 2005. Hypericin - the facts about a controversial agent. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 233-253
- Lawvere S., Mahoney M. C. 2005. St. John's wort. *American Family Physician*, 72, 11: 2249-2254
- Linde K., Berner M. M., Kriston L. 2008. St. John's wort for major depression. Cochrane database of systematic review, 4: CD000448
- Liu X-N, Zhang X-Q, Sun J-S. 2007a. Effects of cytokinins and elicitors on the production of hypericins and hyperforin metabolites in *Hypericum sampsonii* and *Hypericum perforatum*. *Plant Growth Regulation*, 53: 207-214
- Liu X-N, Zhang X-Q, Zhang S-X, Sun J-S. 2007b. Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91: 1-7
- Mannonen L., Toivonen L., Kauppinen V. 1990. Effects of long-term preservation on growth and productivity of *Panax ginseng* and *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Cell Reports*, 9: 173-177
- Marie D., Brown S. C. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78: 41-51

- Martinčič A., Sušnik F. 1969. Mala flora Slovenije: ključ za določanje cvetnic in praprotnic Slovenije. Ljubljana, Cankarjeva založba: 515 str.
- Martonfi P., Brutovská R., Cellárová E., Repcák M. 1996. Apomixis and hybridity in *Hypericum perforatum*. Folia Geobotanica and Phytotaxonomica, 31: 389-196
- McCoy J. A., Camper N. D. 2002. Development of a micropropagation protocol for St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). HortScience, 37, 6: 978-980
- Medina M. A., Martínez-Poveda B., Amores-Sánchez M. I., Quesada A. R. 2006. Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound? Life Science, 79, 2: 105-111
- Mlinarič A. 2000. Šentjanževka – *Hypericum perforatum*. Antidepresivno delovanje hiperforina. Herbika, 7/8: 10-13
- Mosaleeyanon K., Zobayed S. M. A., Afreen F., Kozai T. 2005. Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John's wort. Plant Science, 169, 3: 523-531
- Müller W. E. 2003. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. Pharmacological Research, 47, 2: 101-109
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco cultures. Plant Physiology, 15: 473-497
- Murch S. J., Choffe K. L., Victor J. M. R., Slimmon T. Y., KrishnaRaj S., Saxena P. K. 2000. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum* cv. Anthos). Plant Cell Reports, 19, 6: 576-581
- Murch S. J., Haq K., Vasantha Rupasinghe H. P., Saxena P. K. 2003. Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*H. perforatum* L.). Environmental and Experimental Botany, 49, 3: 251-257
- Muruganandam A. V., Ghosal S., Bhattacharya S. K. 2000. The role of xanthones in the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* involving dopaminergic and serotonergic systems. Biogenic Amines, 15, 5: 553-567
- Nahrstedt A., Butterweck V. 1997. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *H. perforatum* L. Pharmacopsychiatry, 30, 2: 129-134
- Nathan P. J. 2001. *Hypericum perforatum* (St. John's wort): A non-selective reuptake inhibitor? A review of the recent advances in its pharmacology. Journal of Psychopharmacology, 15, 1: 47-54

Navarini A. P. G., Schifino-Wittmann M. T., de Barros I. B. I., Almeida D. 2008. Cytogenetics of *Hypericum caprifoliatum* cham and schltdl populations and other species of the genus. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4: 330-338

News medical – Flow cytometry – What is flow cytometry? (06. 08. 2013).
<http://www.news-medical.net/health/Flow-Cytometry-What-is-Flow-Cytometry.aspx>
(06. 08. 2013)

Yamaner Ö., Erdağ B., Gökbüyük C. 2013. Stimulation of the production of hypericins in *in vitro* seedlings of *Hypericum adenotrichum* by some biotic elicitors. *Turkish Journal of Botany*, 37: 153-159

Ormerod M. G. 2008. Flow cytometry: a basic introduction. Los Angeles, Copyright Agent: <http://flowbook.denovosoftwre.com/> (11. 08 2012)

Onelli E., Rivetta A., Giorgi A., Bignami M., Cocucci M., Patrignani G. 2002. Ultrastructural studies on the developing secretory nodules of *Hypericum perforatum*. *Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 197, 2: 92-102

Orth H. C. J., Rentel C., Schmidt P. C. 1999. Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51: 193-200

Orth H. C., Schmidt P. C. 2000. Stability and stabilization of hyperforin. *Pharmaceutical Industries*, 62: 60-63

Otto F. J., Oldiges H., Göhde W., Jain V. K. 1981. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content variations as a potential *in vivo* mutagenicity test. *Cytometry*, 2, 3: 189-191.

Pages G., Delaurent C., Phan-Tan-Luu R., Sergent M., 2007. Different chemometric approaches to optimize the assay of St. John's wort active ingredients. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 86: 159-167

Pasqua G., Avato P., Monacelli B., Santamaria A. R., Argentieri M. P. 2003. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science*, 165, 5: 977-982

Patočka J. 2003. The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *H. perforatum* L. *Journal of Applied Biomedicine*, 1: 61-70

Pavlík M., Vacek J., Klejdus B., Kubáň V. 2007. Hypericin and hyperforin production in St. John's wort *in vitro* culture: influence of saccharose, polyethylene glycol, methyl jasmonate, and *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6147-6153

Pečavar A. 1998. Osnove tekočinske kromatografije. Ljubljana, Kemijski inštitut: 30 str.

- Pellati F., Benvenuti S., Melegari M. 2005. Chromatographic performance of a new polar poly(ethylene glycol) bonded phase for the phytochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. Journal of Chromatography A, 1088, 1-2: 205-217
- Pérez-García F., Huertas M., Mora E., Peña B., Varela F., González-Benito M. E. 2006. *H. perforatum* L. seed germination: Interpopulation variationand effect of light, temperature, presowing treatments and seed desiccation. Genetic Resources And Crop Evolution, 53: 1187-1198
- Phillipson J. D. 1990. Possibilities of finding new products from plant cell cultures. V: Progress in plant cellular and molecular biology. Nijkamp H. J. J., Van Der Plas L. H. W., Van Aartrijk J. (ur.). Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic publishers: 131-141
- Pierik R. L. M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Boston, Martinus Hijhoff: 747 str.
- Ramachandra Rao S., Ravishankar G. A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20, 2: 101-153
- Ramawat K. G., Merillon J. M. 2007. Biotehnology, secondary metabolites, plant and microbes. 2nd edition. Enfield (NH), Jersey Plymouth, Science Publishers: 565 str.
- Reichling J., Weseler A., Saller R. 2001. A current review of the antimicrobial activity of *H. perforatum* L. Pharmacopsychiatry, 34,1: 116-118
- Repčák M., Mártonfű P. 1997. The localization of secondary substances in *Hypericum perforatum* flower. Biologia (Bratislava), 52: 91-94
- Ross I. A. 2010. Medical plants of the world: Chemical constituents, traditional and modern uses, Humana Press Inc., 1: 241-259
- Schempp C. M., Winkhofer B., Lüdtke R., Simon-Haarhaus B., Schöpf E., Simon J. C. 2000. Topical application of St John's wort (*H. perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. British Journal of Dermatology, 142, 5: 979-984
- Schempp C. M., Winkhofer B., Müller K., Schulte-Mönting J., Mannel M., Schöpf E., Simon J. C. 2003. Effect of oral administration of *Hypericum perforatum* extract (St. John's wort) on skin erythema and pigmentation induced by UVB, UVA, visible light and solar simulated radiation. Phytotherapy Research, 17, 2: 141-146
- Schmitt L. A., Lin Y., Murphy P. A., Petrich J. W., Dixon P. M., Birt D. F. 2006. Reduction in hypericin-induced phototoxicity by *Hypericum perforatum* extracts and pure compounds. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 85, 2: 118-130
- Schulz V., Hansel R., Tyler V. E. 1998. Rational Phytotherapy. A physician's guide to herbal medicine. Springer Berlin-Heidelberg: 252 str.

- Seliškar A., Wraber T. 1996. Travniške rastline na Slovenskem: Sto pogostih vrst. 3. izdaja. Ljubljana, Prešernova družba, Vrba: 229 str.
- Sirvent T., Gibson D. 2002. Induction of hypericins and hyperforin in *H. perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60, 6: 311-320
- Sirvent T. M., Krasnoff S. B., Gibson D. M. 2003. Induction of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* in response to damage by herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 12: 2667-2681
- Soelberg J., Jørgensen L. B., Jäger A. K. 2007. Hyperforin accumulates in the translucent glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany*, 99, 6: 1097-1100
- Southwell I. A., Bourke C. A. 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, 56, 5: 437-441
- Tatsis E. C., Boeren S., Exarchou V., Troganis A. N., Vervoort J., Gerothanassis I. P. 2007. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*, 68, 3: 383-393
- Tekel'ová D., Repcák M., Zemková E., Tóth J. 2000. Quantitative changes of dianthrones, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Med*, 66, 8: 778 – 780
- Thorpe T. A. 1983. Morphogenesis and regeneration in tissue culture. V: Genetic engineering—applications to agriculture (Beltsville symposium 7). Owens D. L. (ur.). Totowa, Rowman and Allanheld: 285-303
- Tirillini B., Ricci A., Pintore G., Chessa M., Sighinolfi S. 2006. Induction of hypericins in *Hypericum perforatum* in response to chromium. *Fitoterapia*, 77, 3: 164-170
- Trifunović S., Vajs V., Macura S., Juranić N., Djarmati Z., Jankov R., Milosavljević S. 1998. Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 49, 5: 1305-1310
- Turk N. 2012. Pretočna citometrija. Ljubljana, Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani: 12 str.
- United States Department of Agriculture – Natural Resources Conservation Services (27. 06. 2012).
<http://plants.usda.gov/> (27. 06. 2012)
- Uzbay T. I. 2008. *Hypericum perforatum* and substance dependence: A review. *Phytotherapy Research*, 22, 5: 578-582

- Verotta L., Appendino G., Belloro E., Jakupovic J., Bombardelli E. 1999. Furohyperforin, a prenylated phloroglucinol from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Journal of Natural Products*, 62, 5: 770-772.
- Verotta L., Appendino G., Jakupovic J., Bombardelli E. 2000. Hyperforin analogues from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Journal of Natural Products*, 63, 3: 412-415.
- Verotta L., Appendino G., Bombardelli E., Brun R. 2007. *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure–activity study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17, 6: 1544-1548
- Verpoorte R., Contin A., Memelink J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1, 1: 13-25
- Vinterhalter B., Ninković S., Cingel A., Vinterhalter D. 2006. Shoot and root culture of *H. perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. *Biologia Plantarum*, 50: 767–770
- Volz H. P. 1997. Controlled clinical trials of *Hypericum* extracts in depressed patients—an overview. *Pharmacopsychiatry*, 30, 2: 72-76
- Walker L., Sirvent T., Gibson D., Vance N. 2001. Regional differences in hypericin and pseudohypericin concentrations and five morphological traits among *Hypericum perforatum* plants in the northwestern United States. *Canadian Journal of Botany*, 79, 10: 1248-1255
- Walker T. S., Bais H. P., Vivanco J. M. 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *H. perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, 60: 289-293
- Wheatley D. 1997. LI 160, an extract of St. John's wort versus amitriptyline in mildly to moderately depressed outpatients-a controlled 6-week clinical trial. *Pharmacopsychiatry*, 30, 2: 77-80
- Willfort R. 1971. Zdravilne rastline in njih uporaba. Maribor, Založba obzorja: 508 str.
- Wójcik A., Podstolski A. 2007. Leaf explant response in *in vitro* culture of St. John's wort (*H. perforatum* L.). *Acta Physiologae Plantarum*, 29, 2: 151 – 156
- Wurglitsch M., Schubert-Zsilavecz M. 2006. *Hypericum Perforatum*: A "modern" herbal antidepressant: Pharmacokinetics of active ingredients. *Clinical Pharmacokinetics*, 45, 5: 449-468
- Zdunek R., Alfermann W. 1992. Initiation of shoot organ cultures of *Hypericum perforatum* and formation of hypericin derivatives. *Planta Medica*, 58: 621-622

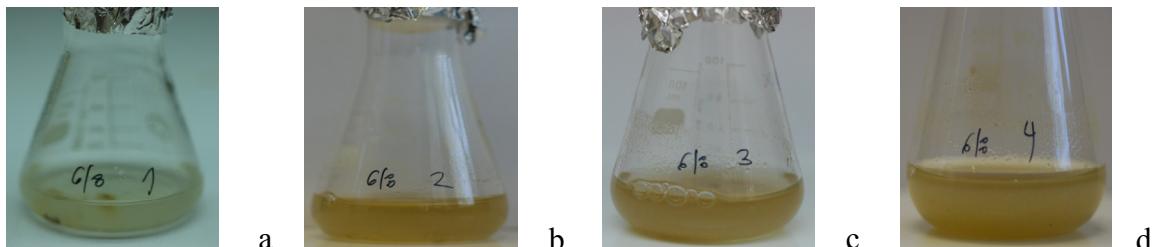
- Zhou L. G., Wu J. Y. 2006. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural Product Reports*, 23, 5: 789-810
- Zobayed S. M. A., Murch S. J., Rupasinghe H. P. V., Saxena P. K. 2003. Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*H. perforatum* L. cv. New Stem) grown in bioreactors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75, 2: 143-149
- Zobayed S. M. A., Saxena P. K. 2003. *In vitro*-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*H. perforatum* L. cv. New Stem) in a temporary immersion bioreactor. *Plant Science*, 165, 3: 463-470
- Zobayed S. M. A., Murch S. J., Rupasinghe H. P. V., Saxena P. K. 2004. *In vitro* production and chemical characterization of St. John's wort (*H. perforatum* L. cv. New Stem). *Plant Science*, 166, 2: 333-340
- Zobayed S. M. A., Afreen F., Kozai T. 2005. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 10–11: 977-984
- Zobayed S. M. A., Afreen F., Goto E., Kozai T. 2006. Plant–environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany*, 98, 4: 793-804
- Zobayed S. M. A., Afreen F., Kozai T. 2007. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 2: 109-116

ZAHVALA

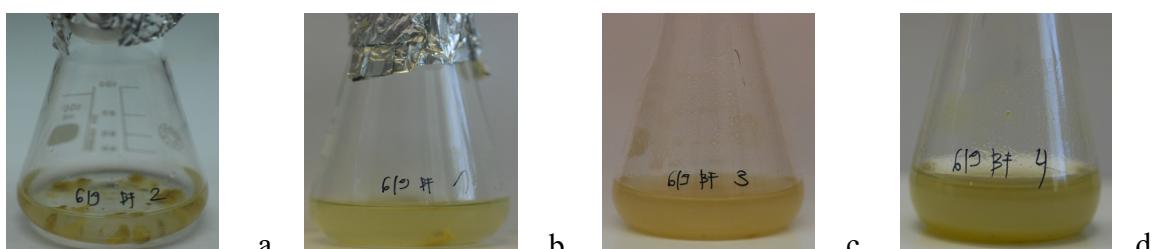
Zahvaljujem se vsem, ki ste mi na kakršen koli način pomagali na moji življenjski poti, najbolj iz vsega srca mami Slavici.

Priloga A

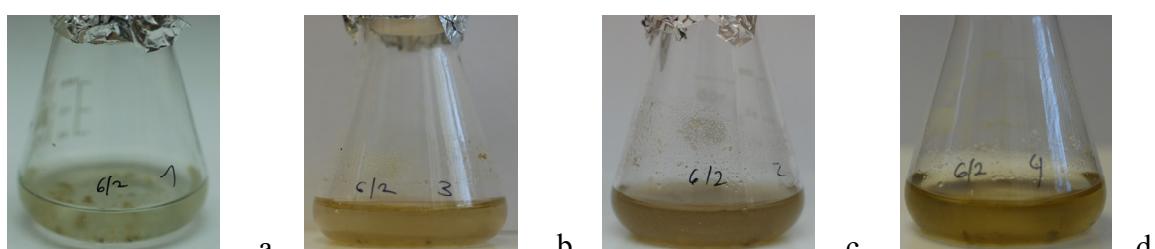
Suspenzijske kulture po akcесijah



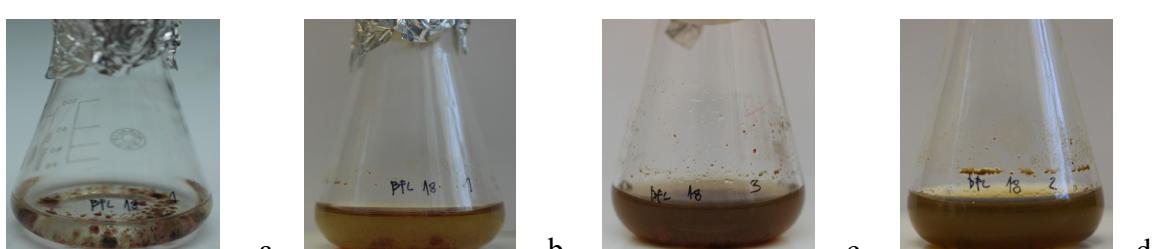
Priloga A1: Suspenzijska kultura akcесije 6/8 BF LP 2006. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



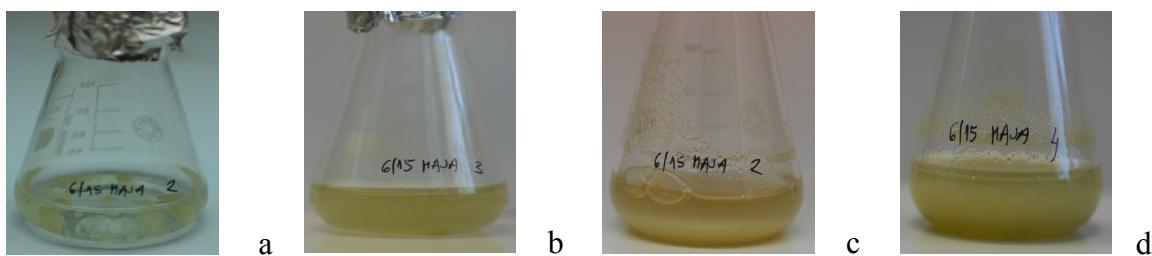
Priloga A2: Suspenzijska kultura akcесije 6/9 BF LP 2006. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



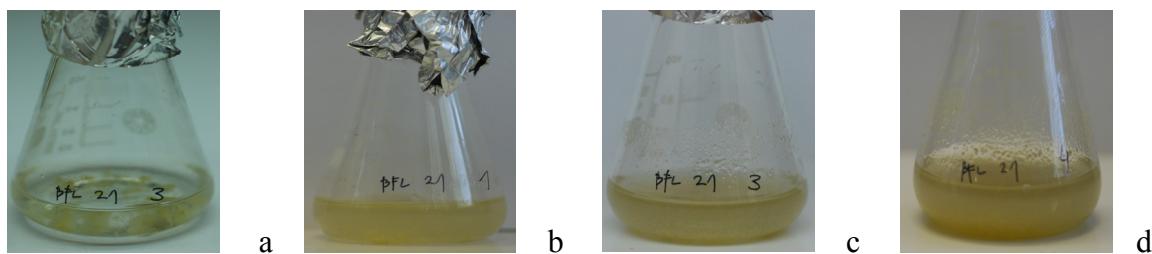
Priloga A3: Suspenzijska kultura akcесije 6/2 BF LP 2006. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



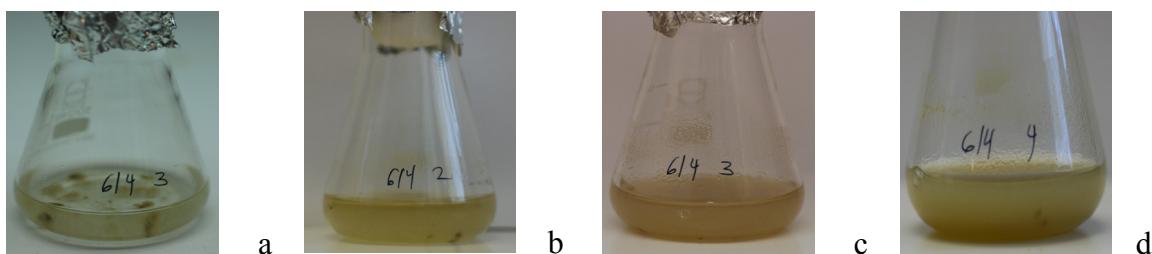
Priloga A4: Suspenzijska kultura akcесije BFL 18-002/05. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



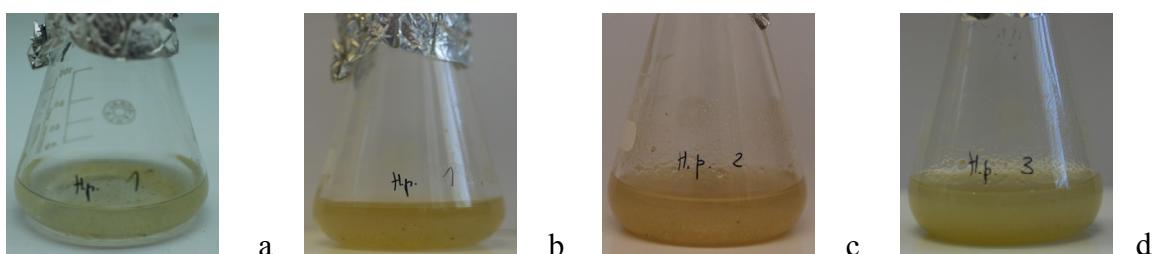
Priloga A5: Suspenzijska kultura akcесije 6/15 Maja. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



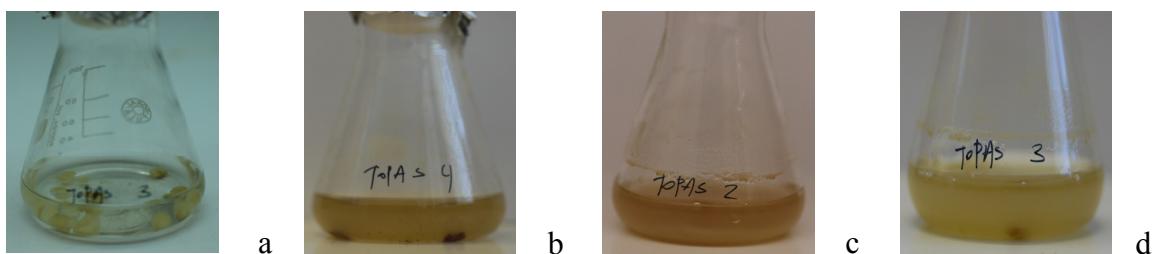
Priloga A6: Suspenzijska kultura akcесije BFL 21-004/05. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



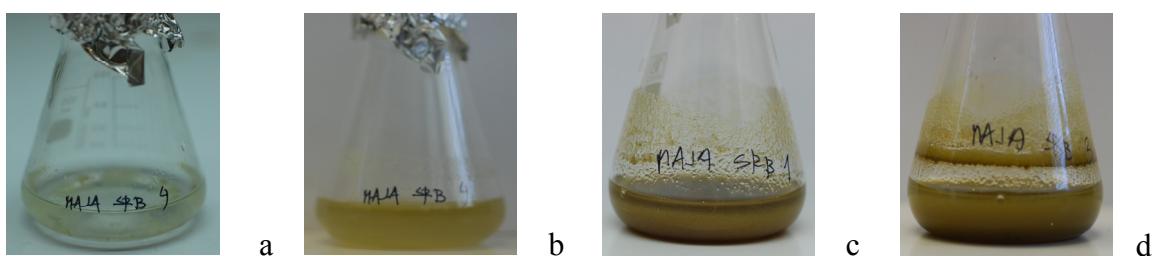
Priloga A7: Suspenzijska kultura akcесije 6/4 BF LP 2006. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



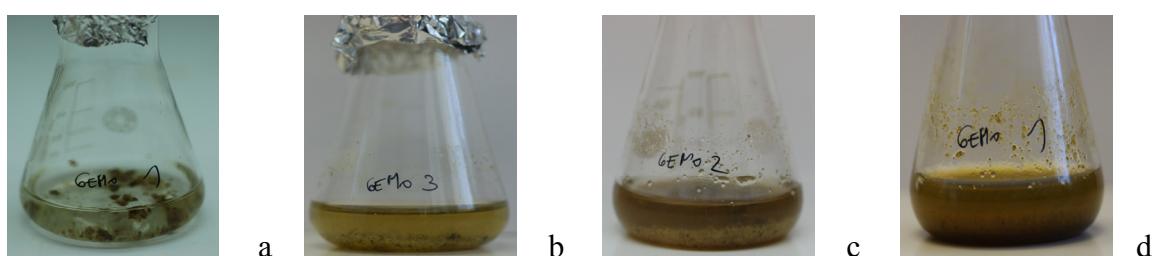
Priloga A8: Suspenzijska kultura akcесije prostoživeča populacija (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



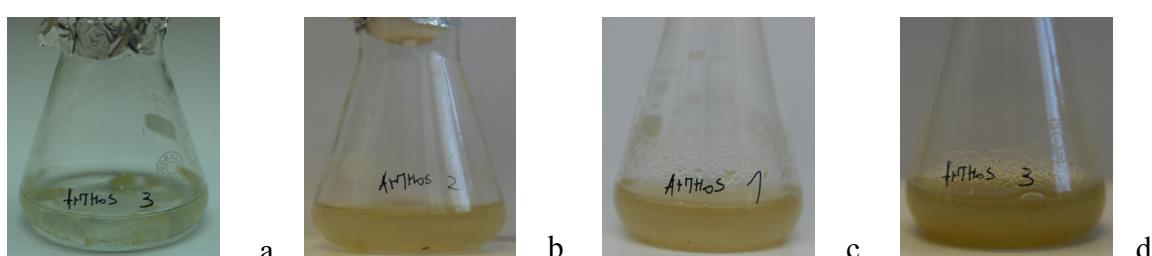
Priloga A9: Suspenzijska kultura akcесije 'Topas'. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



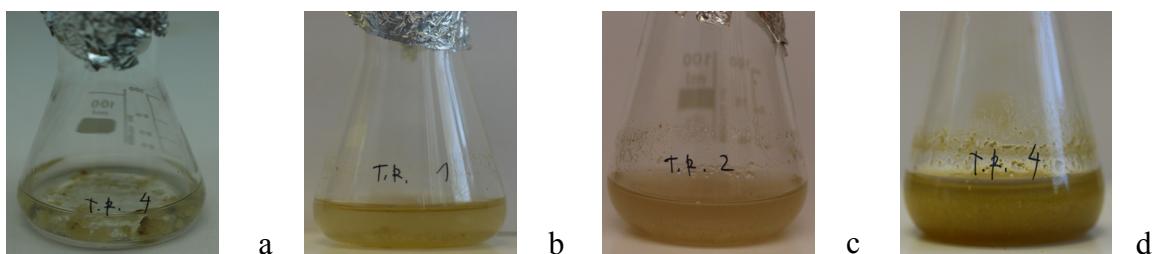
Priloga A10: Suspenzijska kultura akcесije 'Maja'. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



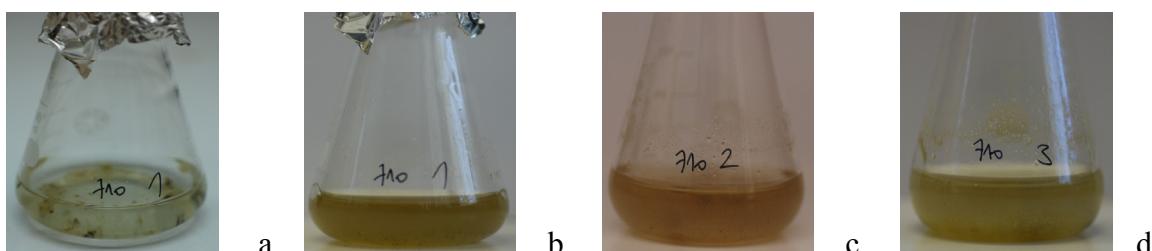
Priloga A11: Suspenzijska kultura akcесije 'Gemo'. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



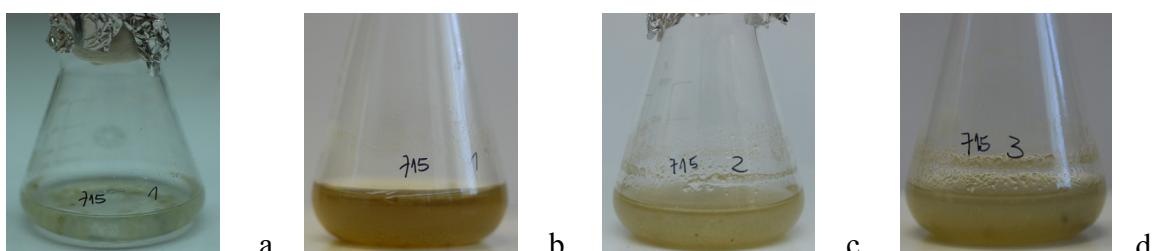
Priloga A12: Suspenzijska kultura akcесije 'Anthos'. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



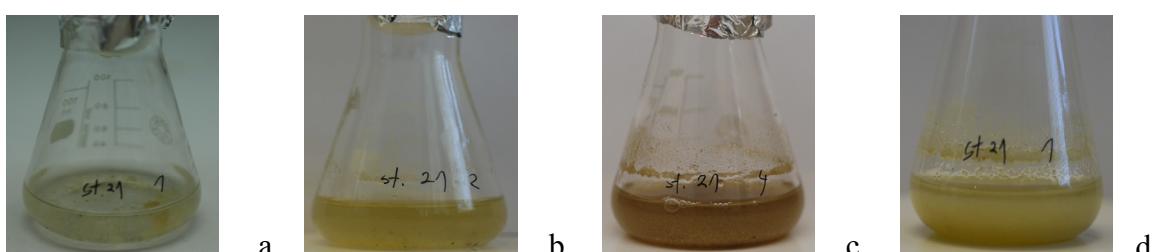
Priloga A13: Suspenzijska kultura akcесije 'Taubertal'. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



Priloga A14: Suspenzijska kultura akcесije Stamm 710. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



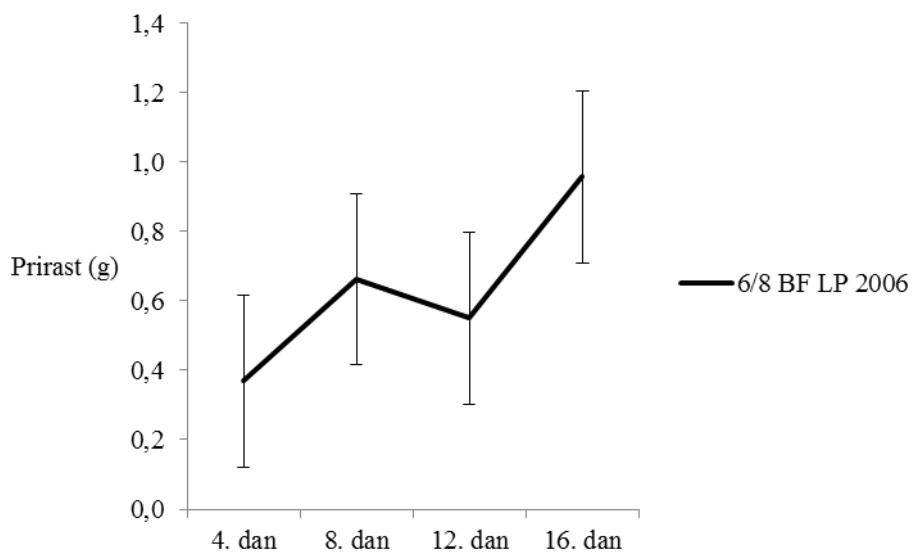
Priloga A15: Suspenzijska kultura akcесije Stamm 715. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji



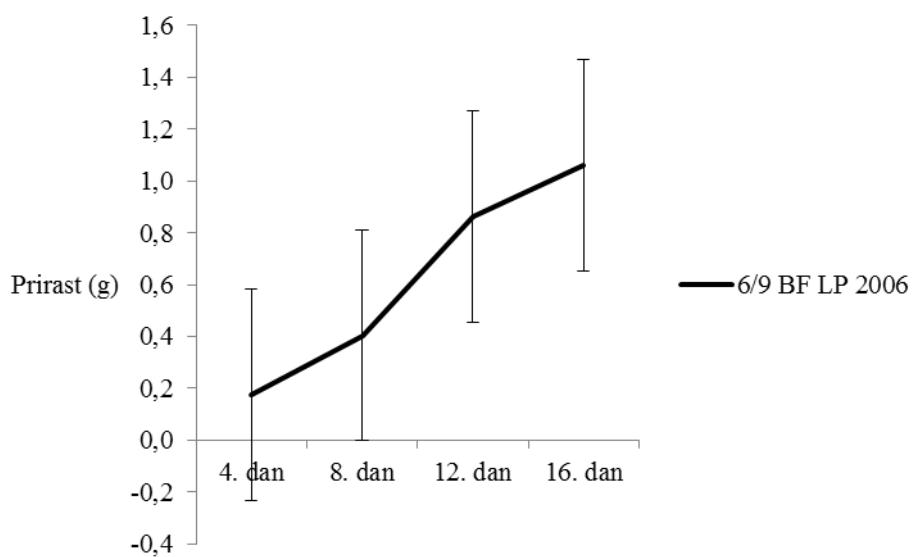
Priloga A16: Suspenzijska kultura akcесije Stamm 21. (a) iniciacija suspenzijske kulture, (b) prva subkultivacija – po 14 dneh, (c) kontrola po 21 dneh, (d) žetev suspenzijske kulture po 28 dneh po začetni iniciaciji

Priloga B

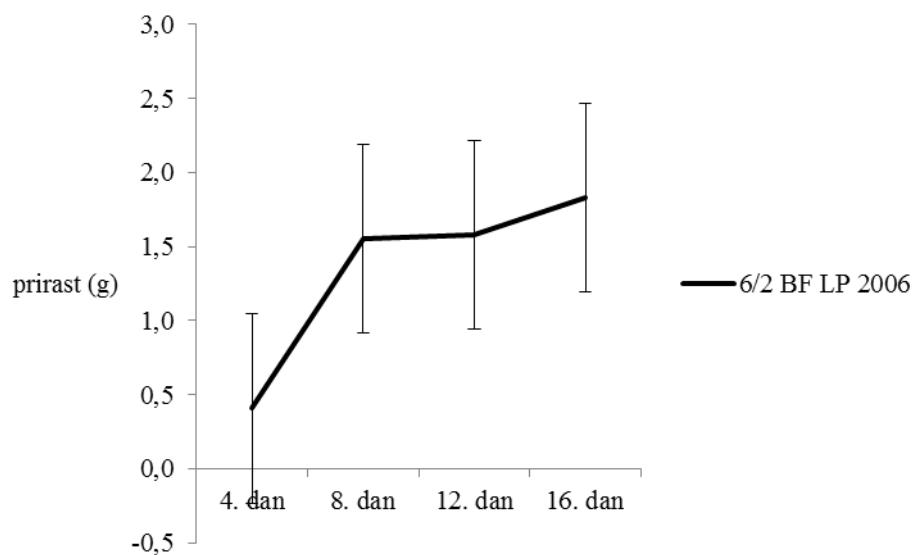
Prirast biomase po posamezni akcesiji na 4-dnevni interval (g)



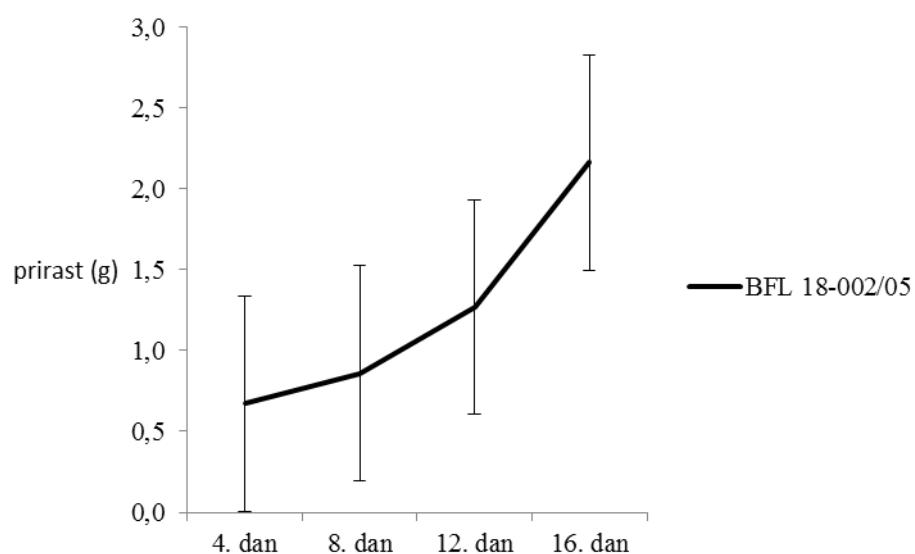
Priloga B1: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije 6/8 BF LP 2006 (g)



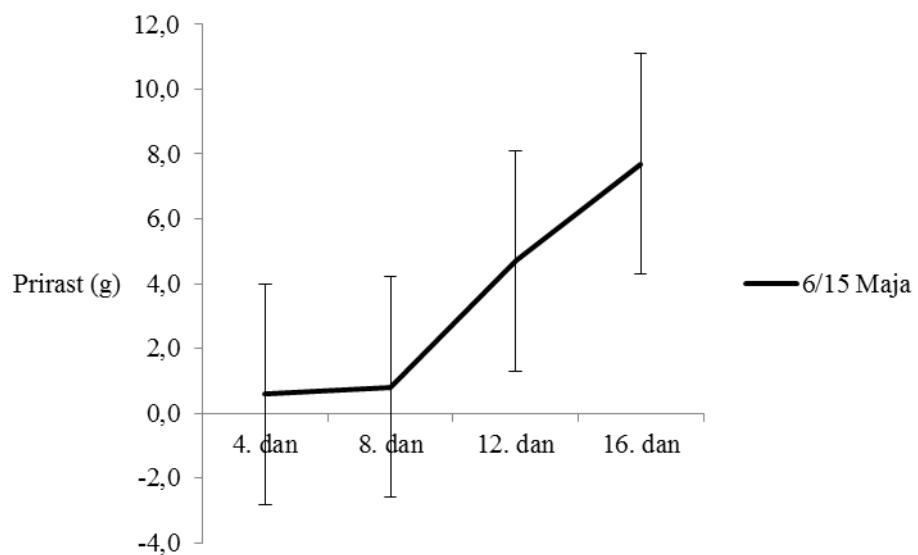
Priloga B2: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije 6/9 BF LP 2006 (g)



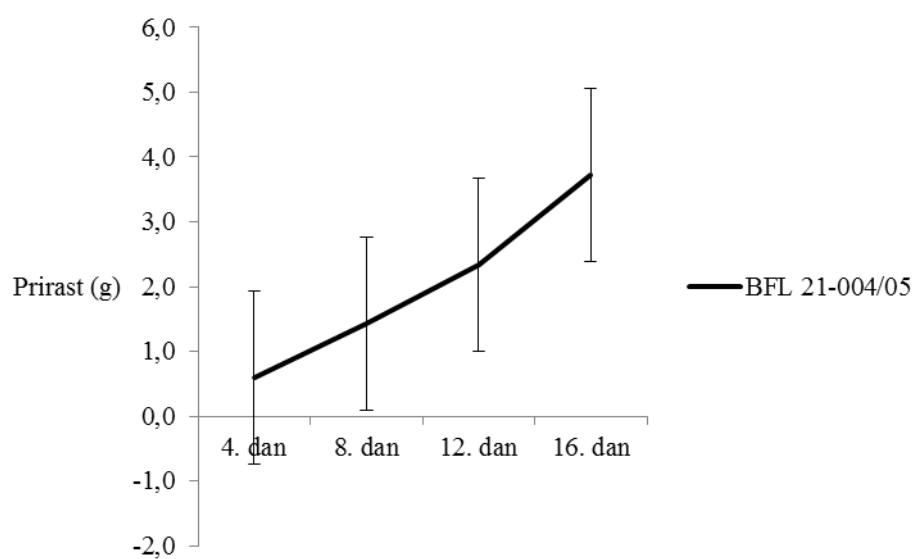
Priloga B3: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije 6/2 BF LP 2006 (g)



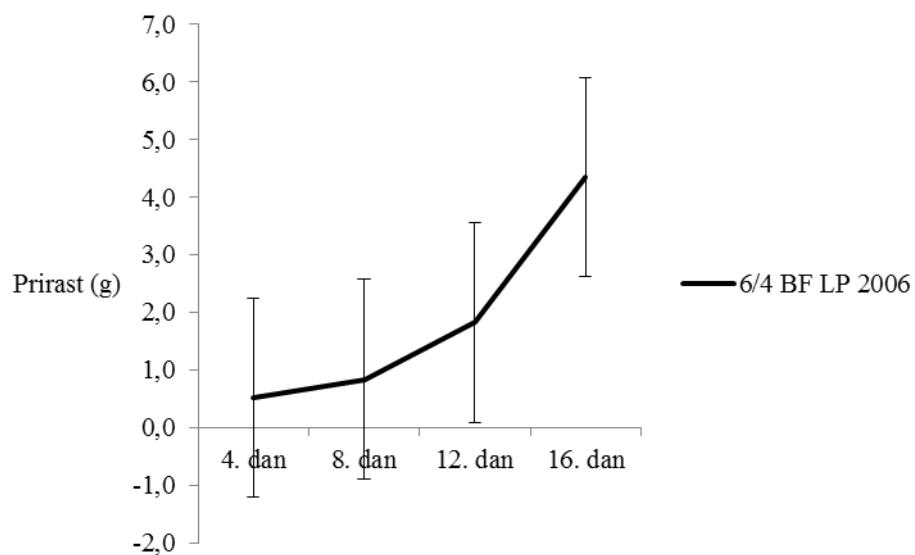
Priloga B4: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije BFL 18-002/05 (g)



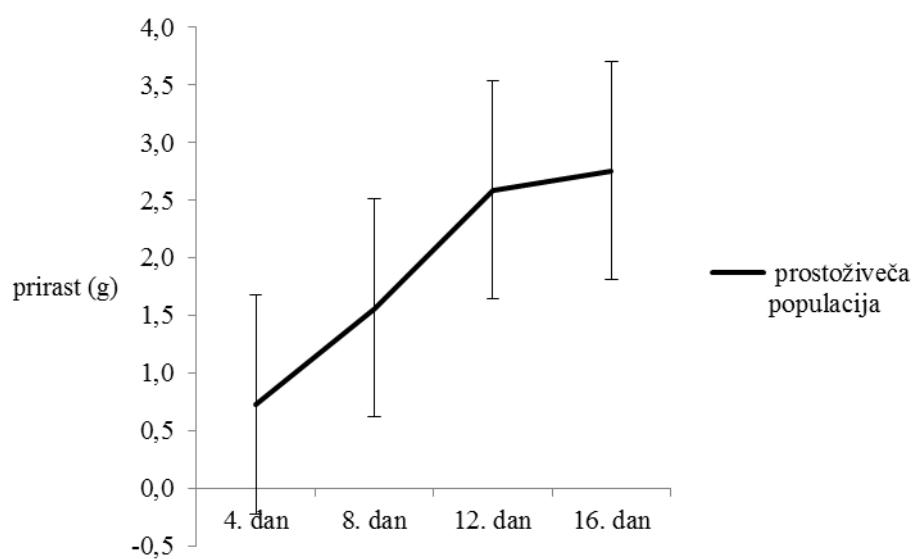
Priloga B5: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval 6/15 Maja (g)



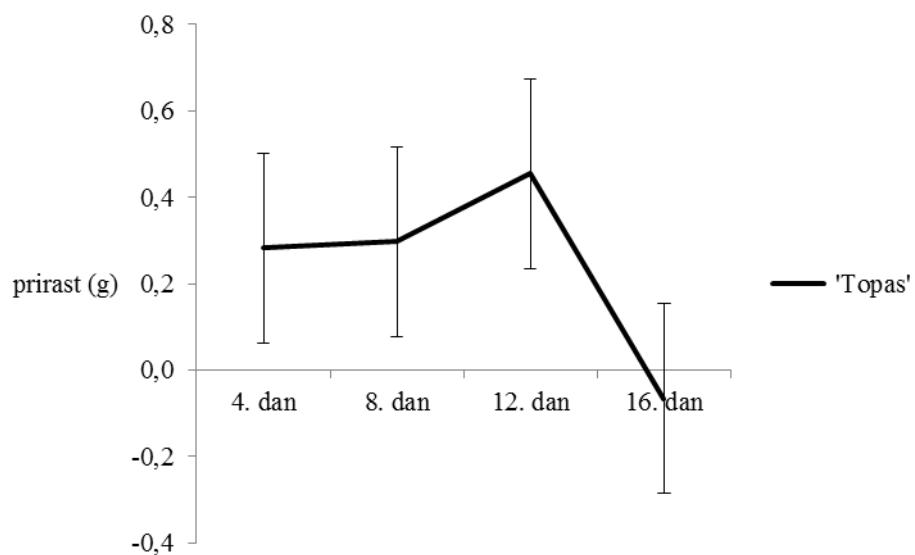
Priloga B6: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije BFL 21-004/05 (g)



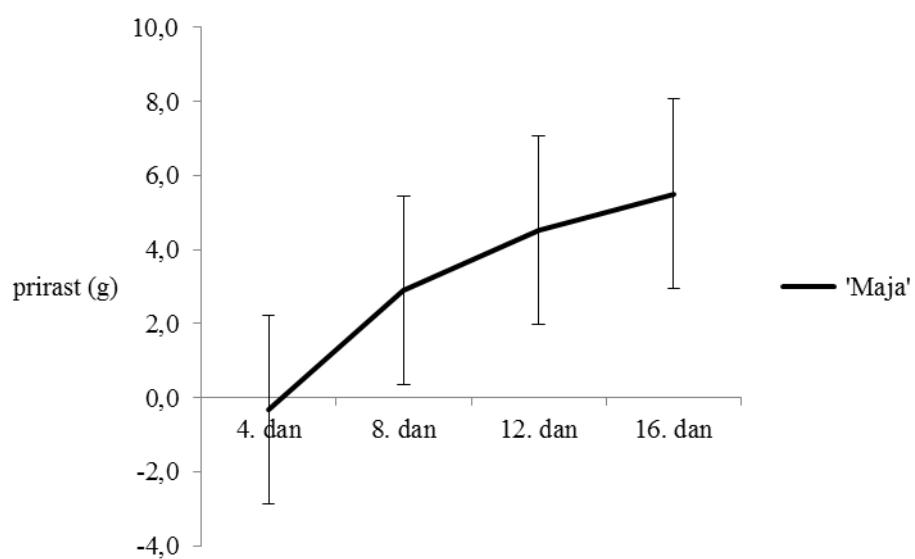
Priloga B7: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije 6/4 BF LP 2006 (g)



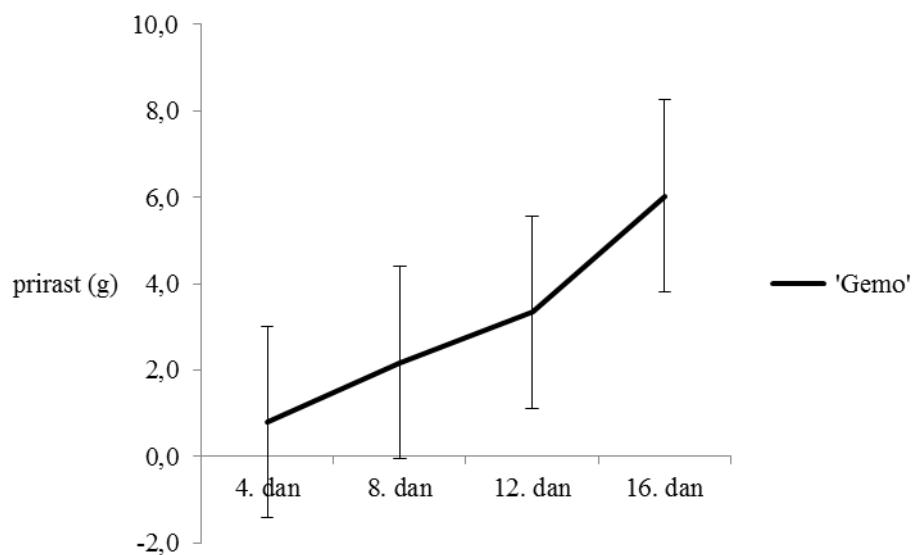
Priloga B8: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije prostoživeča populacija (g)



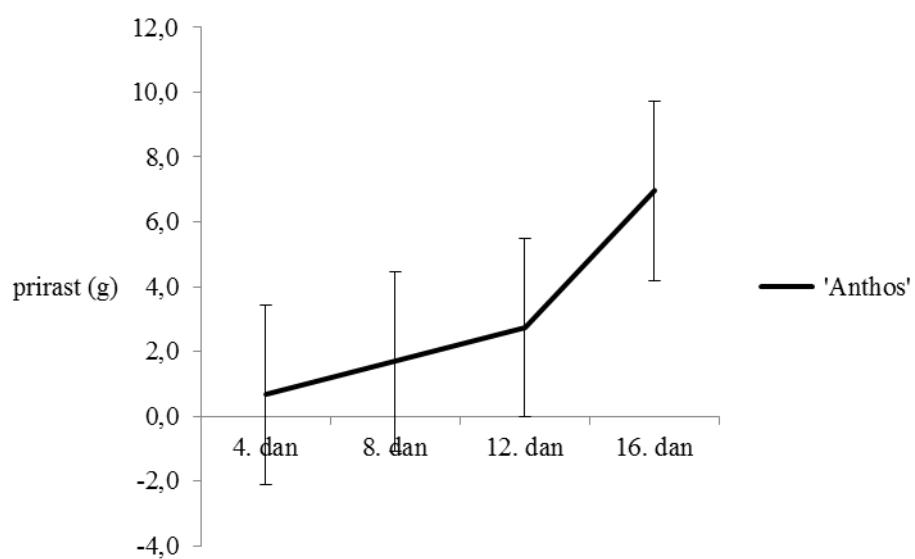
Priloga B9: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije 'Topas' (g)



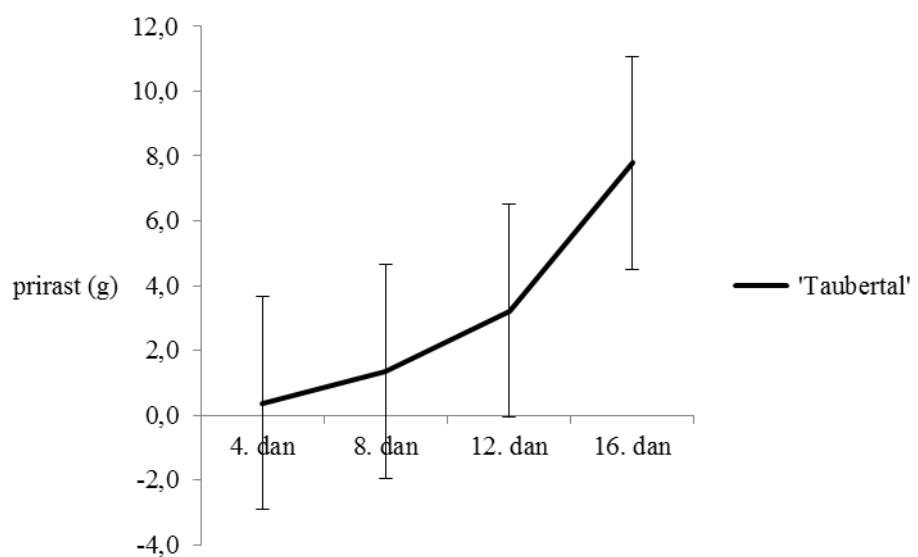
Priloga B10: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije 'Maja' (g)



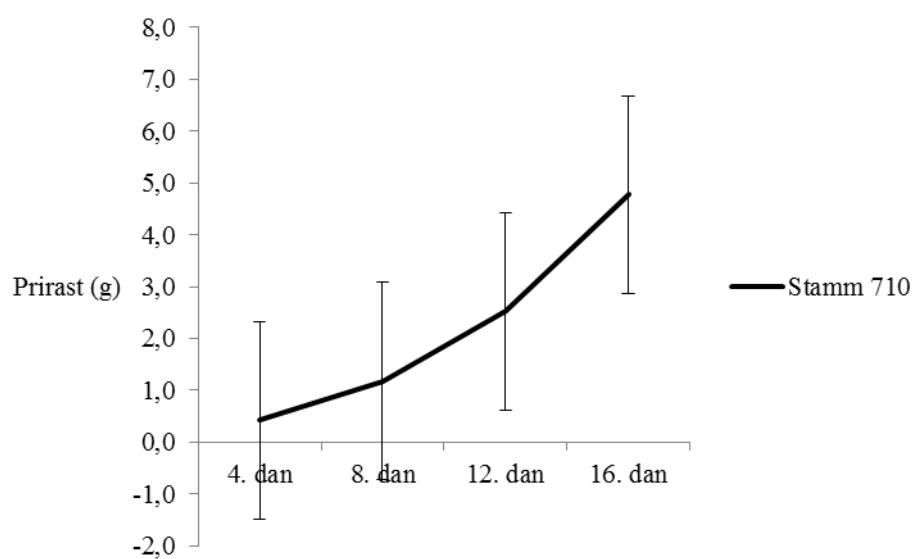
Priloga B11: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije 'Gemo' (g)



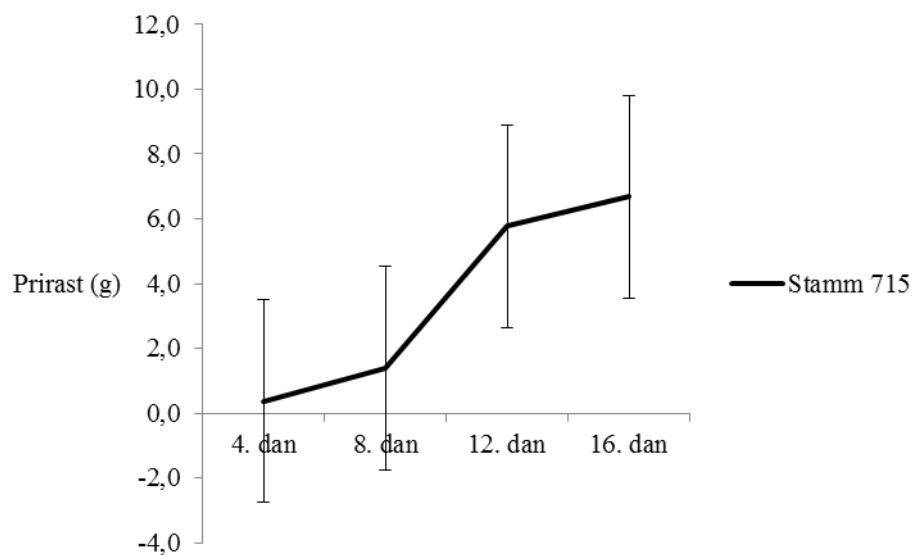
Priloga B12: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije 'Anthos' (g)



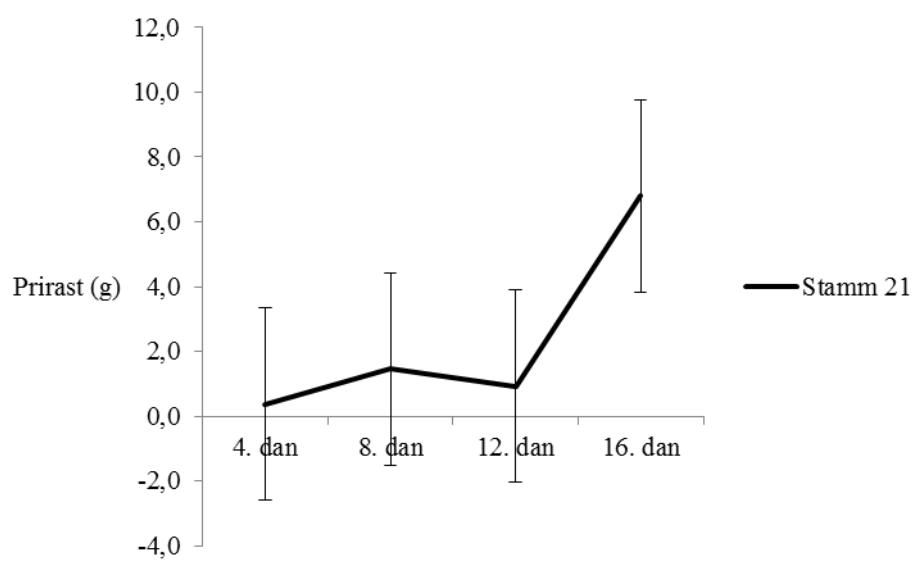
Priloga B13: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije 'Taubertal' (g)



Priloga B14: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije Stamm 710 (g)



Priloga B15: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije Stamm 715 (g)



Priloga B16: Prirast sveže snovi na 4-dnevni interval akcesije Stamm 21 (g)

Priloga C

Izhodiščni podatki za prirast biomase (g)

Akcесija/ponovitev, tehtanje	1 sveže (merska enota gram (g))					2 sveže (merska enota gram (g))				
	zatehta	tehtanje	filter	masa sus.	priLAST	zatehta	tehtanje	filter	masa sus.	priLAST
BFL 18-002/05	1,085	2,384	0,628	1,756	0,671	1,080	2,572	0,632	1,940	0,860
'Taubertal'	1,098	2,093	0,620	1,473	0,375	1,033	3,009	0,631	2,378	1,345
Prostoživeča populacija	1,036	2,987	1,226	1,761	0,725	0,946	3,152	0,641	2,511	1,565
6/15 Maja	1,042	2,259	0,626	1,633	0,591	1,086	2,525	0,631	1,894	0,808
'Gemo'	1,038	2,457	0,622	1,835	0,797	1,021	3,821	0,632	3,189	2,168
Stamm 21	0,971	1,934	0,593	1,341	0,370	0,960	3,049	0,630	2,419	1,459
BFL 21 -004/05	1,076	2,279	0,613	1,666	0,590	1,023	3,096	0,647	2,449	1,426
Stamm 715	1,078	2,059	0,608	1,451	0,373	1,072	3,083	0,618	2,465	1,393
6/2 BF LP 2006	1,000	2,019	0,613	1,406	0,406	1,010	3,195	0,631	2,564	1,554
'Anthos'	0,990	2,234	0,585	1,649	0,659	1,050	3,377	0,641	2,736	1,686
6/8 BF LP 2006	1,050	2,012	0,593	1,419	0,369	1,011	2,316	0,642	1,674	0,663
6/4 BF LP 2006	1,009	2,130	0,602	1,528	0,519	1,025	2,511	0,645	1,866	0,841
'Topas'	1,044	1,914	0,588	1,326	0,282	1,055	1,998	0,646	1,352	0,297
'Maja'	0,987	1,027	0,369	0,658	-0,329	1,008	4,553	0,648	3,905	2,897
6/9 BF LP 2006	0,991	1,785	0,618	1,167	0,176	1,010	2,046	0,632	1,414	0,404
Stamm 710	1,073	2,102	0,606	1,496	0,423	1,039	2,847	0,631	2,216	1,177
Akcесija/ponovitev, tehtanje	3 sveže (merska enota gram (g))					4 sveže (merska enota gram (g))				
	zatehta	tehtanje	filter	masa sus.	priLAST	zatehta	tehtanje	filter	masa sus.	priLAST
BFL 18-002/05	1,132	3,015	0,613	2,402	1,270	1,090	3,883	0,630	3,253	2,163
'Taubertal'	1,048	4,889	0,625	4,264	3,216	1,140	9,540	0,610	8,930	7,790
Prostoživeča populacija	0,940	4,155	0,629	3,526	2,586	1,028	4,398	0,617	3,781	2,753
6/15 Maja	1,210	6,545	0,635	5,910	4,700	1,105	9,439	0,634	8,805	7,700
'Gemo'	1,058	4,998	0,606	4,392	3,334	1,086	7,741	0,629	7,112	6,026
Stamm 21	1,187	2,742	0,635	2,107	0,920	0,981	8,412	0,630	7,782	6,801
BFL 21 -004/05	1,120	4,094	0,636	3,458	2,338	1,088	5,448	0,639	4,809	3,721
Stamm 715	1,003	7,404	0,630	6,774	5,771	1,055	8,375	0,638	7,737	6,682
6/2 BF LP 2006	1,140	3,359	0,639	2,720	1,580	1,040	3,478	0,606	2,872	1,832
'Anthos'	1,092	4,444	0,615	3,829	2,737	1,060	8,595	0,582	8,013	6,953
6/8 BF LP 2006	1,053	2,236	0,633	1,603	0,550	1,159	2,750	0,633	2,117	0,958
6/4 BF LP 2006	1,043	3,500	0,630	2,870	1,827	1,049	6,009	0,616	5,393	4,344
'Topas'	1,044	2,130	0,632	1,498	0,454	1,041	1,609	0,634	0,975	-0,066
'Maja'	1,067	6,222	0,630	5,592	4,525	1,080	7,220	0,631	6,589	5,509
6/9 BF LP 2006	1,100	2,612	0,648	1,964	0,864	1,024	2,668	0,582	2,086	1,062
Stamm 710	1,150	4,307	0,634	3,673	2,523	1,091	6,487	0,623	5,864	4,773