

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Goran PANDOL

**PRIPRAVA RASTLINSKE TKIVNE KULTURE  
*Mandragora officinarum* V CELIČNI SUSPENZIJI  
ZA PRODUKCIJO SEKUNDARNIH  
METABOLITOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Goran PANDOL

**PRIPRAVA RASTLINSKE TKIVNE KULTURE *Mandragora officinarum* V CELIČNI SUSPENZIJI ZA PRODUKCIJO SEKUNDARNIH METABOLITOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**PLANT TISSUE CULTURE *Mandragora officinarum*  
PREPARATION IN FORM OF CELL SUSPENSION FOR  
PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2013

POPRAVKI:

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Analiza vzorcev z visokotlačno tekočinsko kromatografijo je bila opravljena na Katedri za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Janez Hribar, prof. dr. Borut Bohanec za somentorja ter za recenzentko prof. dr. Polona Jamnik.

Mentor: prof. dr. Janez Hribar

Somentor: prof. dr. Borut Bohanec

Recenzentka: prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: prof. dr. Janez Hribar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Član: prof. dr. Polona Jamnik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo diplomskega dela na spletni strani digitalne knjižnjice BF in izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Goran Pandol

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 57.086.83:582.926.2:604.6(043)=163.6
KG	<i>Mandragora officinarum</i> / mikropropagacija / tkivne kulture / celična suspenzija / elicitorji / sekundarni metaboliti / atropin
AV	PANDOL, Goran
SA	HRIBAR, Janez (mentor)/ BOHANEK, Borut (somentor)/ JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2013
IN	PRIPRAVA RASTLINSKE TKIVNE KULTURE <i>Mandragora officinarum</i> V CELIČNI SUSPENZIJI ZA PRODUKCIJO SEKUNDARNIH METABOLITOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 75 str., 29 pregl., 18 sl., 8 pril., 57 vir.
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Namen naše naloge je bil s tehnikami tkivne kulture inducirati in optimizirati rast mandragore ( <i>Mandragora officinarum</i> ). Prvi del je vključeval <i>in vitro</i> vzgojo rastline, <i>in vitro</i> mikropropagacijo vršička s kotiledoni in vzpostavitev kalusne kulture. Iz pridobljenega kalusa smo v drugem delu pripravili celično suspenzijsko kulturo, določili optimalne pogoje za njeno rast, določili vpliv elicitorjev na masni prirast celične kulture in določili vsebnost atropina v biomasi. V gojišču za mikropropagacijo rastlin smo uspešno vzgojili rastline <i>Mandragora officinarum</i> , pridobljene neposredno iz semen, prenesenih iz gojišča za kalitev semen. Organizmi iz gojišča za mikropropagacijo vršička s kotiledoni niso razvili rastlinskih organov, da bi razvili korenine bi jih bilo potrebno prenesti v gojišče namenjeno ukoreninjanju. S prvo kultivacijo semena na gojišče za neposredno indukcijo kalusa smo dobili tkivo, ki je bilo drobljive konsistence. Povprečna subkultivacija je trajala 21 dni. V tem času je kalus pridobil približno 500 % mase. Vpliv hormonov na prirast kalusnega tkiva je bil največji v prvem 14-dnevнем obdobju, saj se je celokupna biomasa v gojišču brez hormonov povečala za faktor 2,4, v gojišču z 2 mg/L hormona 6-benzilamino purina (BAP) za faktor 3,1, v gojišču z 2 mg/L hormona 2,4 diklorofenoksi ocetne kisline (2,4-D) za faktor 2,3 in v gojišču z 2 mg/L hormona BAP in 2 mg/L hormona 2,4-D za 3,1. Kalus drobljive konsistence smo dobili na gojišču s hormonom 2,4-D in BAP. Največji prirast suspendirane biomase smo določili v tekočem gojišču z 2 mg/L 2,4-D in z 2 mg/L BAP. Najboljši vir ogljika in energije za rast kulture suspendiranih celic je bila glukoza s koncentracijo 40 g/L. V tem gojišču so bile celice dobro suspendirane. Dodatek elicitorjev je vplival na rast celične suspenzijske kulture v primeru, ko smo dodali gojišču metiljasmonat (MeJ) in ko smo ga dodali v kombinaciji s salicilno kislino (SK). Dodatek samega polietilen glikola (PEG) ali same SK, ni imel vpliva na prirast biomase. Največjo vsebnost sekundarnega metabolita atropina v biomasi smo zaznali ob koncu lag faze rasti. Zaznali smo sinergističen učinek dodatka elicitorjev MeJ in SK, ki je na 9. dan najbolj povišal vsebnost atropina v biomasi. Ob dodatku PEG in SK se je koncentracija sekundarnega metabolita zmanjšala, ob dodatku MeJ pa je ostala nespremenjena. Rezultati povezani s koncentracijo atropina so statistično neznačilni in kot taki le nakazujejo trend, za potrditev so potrebne nadaljne raziskave.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 57.086.83:582.926.2:604.6(043)=163.6  
CX *Mandragora officinarum* / micropropagation / tissue cultures / cell suspensions / elicitors / secondary metabolites / atropin  
AU PANDOL, Goran  
AA HRIBAR, Janez (supervisor)/ BOHANEC, Borut (co-advisor)/ JAMNIK, Polona (reviewer)  
PP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2013  
TI PLANT TISSUE CULTURE *Mandragora officinarum* PREPARATION IN FORM OF CELL SUSPENSION FOR PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XII, 75 p., 29 tab., 18 fig., 8 ann., 57 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of our study was to induce and optimize growth of plant cell and tissue culture of mandrake (*Mandragora officinarum*) by using tissue culture techniques. First part of our work consisted of raising plants *in vitro*, *in vitro* micropropagation of shoots with cotyledons and the establishment of callus culture. Callus obtained in the first part was used in the second part of research to prepare cell suspension culture, determine the optimal conditions for its growth, investigate the influence of elicitors on cell culture biomass increment and to determine atropine content in the biomass. On medium for micropropagation of plants we have successfully raised mandrake plants obtained directly from seed transferred from the medium for seed germination. Organisms grown on medium for micropropagation of shoot with cotyledons, did not develop plant organs. In order to develop roots they should be transferred to a medium intended for root development. With first cultivation of seeds on medium for direct induction of callus tissue with friable consistency was obtained. The average subcultivation lasted 21 days. During this time callus gained about 500 % of its original weight. The effect of hormones on callus tissue increment was the highest in the first 14-day period, where the overall biomass weight in the medium without hormones increased by 2.4-fold, in the medium with 2 mg/L hormone 6-benzylaminopurine (BAP) by 3.1-fold, in the medium with 2 mg/L hormone 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by 2.3-fold and in the medium with 2 mg/L BAP hormone and 2 mg/L 2,4-D hormone the increment was 3.1-fold. Callus of friable consistency was obtained on a medium containing 2,4-D and BAP. The highest increment of suspended biomass was determined in a medium containing 2 mg/L 2,4-D and 2 mg/L BAP. The best source of carbon and energy for the growth of cell suspension culture was glucose in concentration of 40 g/L, where the cells were well suspended. The addition of elicitors influenced the cell suspension culture growth in the cases of adding metiljasmonat (MeJ) or combination (MeJ and salicylic acid (SK)) to the medium. Adding only polyethylene glycol (PEG) or only SK, had no effect on the growth. The highest content of secondary metabolite atropine in biomass was observed at the end of the lag growth phase of.. A synergistic effect in the sense of increased atropine content in biomass was detected for combination of MeJ and SK, which was added to the growth medium on 9th day of cultivation. Addition of PEG or SK decreased the concentration of secondary metabolite, while in the case of MeJ addition it was unchanged. The results related to the atropine concentration are not statistically significant and as such suggest only a trend. To confirm it, further research has to be done.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>X</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 <i>MANDRAGORA OFFICINARUM</i> L .....	2
2.2 VIŠJE RASTLINE IN NOVA ZDRAVILA.....	4
2.3 SEKUNDARNI METABOLITI IN ALKALOIDI .....	5
2.4 RASTLINSKE CELIČNE KULTURE KOT ALTERNATIVNI SISTEM ZA PRODUKCIJO SEKUNDARNIH METABOLITOVI.....	6
2.4.1 Kultura kalusa.....	7
2.4.2 Celična kultura.....	7
2.5 ELICITACIJA.....	8
2.5.1 Obramba .....	9
2.5.2 Signalizacija.....	9
2.5.3 Zgodnji dogodki signalizacije .....	10
2.5.3.1 Tok ionov .....	10
2.5.3.2 Signalizacija, ki vključuje kalcij .....	10
2.5.3.3 Reaktivne kisikove zvrsti .....	11
2.5.3.4 Fosforilizacija proteinov .....	11
2.5.4 Elicitorji .....	12
2.5.4.1 Jasmonska kislina.....	12
2.5.4.2 Etilen .....	14
2.5.4.3 Salicilna kislina .....	15
2.5.4.4 Polietilen glikol .....	15
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>17</b>
3.1 POTEK DELA .....	17
3.2 MATERIALI.....	18
3.2.1 Organizem .....	18
3.2.2 Sterilizacija semen .....	18
3.2.3 Gojišča.....	18
3.2.3.1 Priprava raztopin hormonov .....	18
3.2.3.1.1 Priprava raztopine 6-benzilamino purina (oznaka: BAP).....	18
3.2.3.1.2 Priprava raztopine 2,4-diklorofenoksicotne kisline (oznaka: 2,4-D) .....	18
3.2.3.1.3 Priprava raztopine indol-ocetne kisline (oznaka: IAA) .....	18
3.2.3.1.4 Priprava raztopine giberelinske kisline (oznaka: GA3) .....	19
3.2.3.1.5 Priprava raztopine 6-furfurilaminopurina (oznaka: kinetin).....	19
3.2.3.2 Priprava raztopine vitaminov .....	19
3.2.3.3 Sestava in priprava trdnih in tekočih gojišč .....	19
3.2.3.3.1 Gojišče za kalitev semena .....	19
3.2.3.3.2 Gojišče za mikropropagacijo rastline.....	20
3.2.3.3.3 Gojišče za mikropropagacijo vršička s kotiledoni .....	20
3.2.3.3.4 Gojišče za neposredno indukcijo kalusa .....	21

3.2.3.3.5 Brezhormonsko gojišče .....	21
3.2.3.3.6 Tekoče gojišče z 2,4-D in BAP .....	21
3.2.3.3.7 Brezhormonsko tekoče gojišče .....	23
3.2.3.4 Priprava elicitorjev .....	23
3.2.3.4.1 Metil jasmonat .....	23
3.2.3.4.2 Salicilna kislina .....	23
3.2.3.4.3 Polietilen glikol .....	23
<b>3.2.4 Reagenti za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.5 Oprema .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 METODE .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.1 In vitro tehnika celične kulture .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.1 Sterilizacija semen .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3.2 Kalitev semen in razvoj rastline za ohranjanje biomateriala .....</b>	<b>26</b>
3.3.2.1 Kalitev semen <i>in vitro</i> .....	26
3.3.2.2 <i>In vitro</i> razvoj cele rastline in presaditev v zemljo .....	26
3.3.2.3 <i>In vitro</i> mikropropagacija rastlin .....	26
<b>3.3.3 Kultura kalusa .....</b>	<b>27</b>
3.3.3.1 Indukcija kalusa .....	27
3.3.3.2 Habituiran kalus .....	27
3.3.3.3 Vpliv hormonske sestave trdnih gojišč na rast mase kalusnega tkiva .....	27
<b>3.3.4 Celična kultura .....</b>	<b>27</b>
3.3.4.1 Priprava celične suspenzije .....	27
3.3.4.2 Filtracija celične suspenzije .....	28
3.3.4.3 Prirast suspendirane biomase pri različnih koncentracijah in virih energije ter ogljika .....	28
3.3.4.4 Prirast suspendirane biomase, v tekočem gojišču z 2,4-D, BAP in 40 g/L glukoze .....	28
3.3.4.5 Vpliv elicitorjev na prirast suspendirane biomase, v tekočem gojišču z 2,4-D, BAP in 40 g/L glukoze .....	29
3.3.4.6 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti .....	29
3.3.4.6.1 Priprava standarda atropina, skopolamina in mešanega standarda .....	29
3.3.4.6.2 Ekstrakcija .....	30
3.3.4.6.3 Priprava vzorca za HPCL analizo .....	30
3.3.4.6.4 Priprava mobilne faze za HPLC .....	30
3.3.4.6.5 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – (HPLC) .....	30
<b>3.3.5 Statistična obdelava rezultatov .....</b>	<b>30</b>
3.3.5.1 Povprečna vrednost .....	30
3.3.5.2 Standardni odklon in koeficient variabilnosti .....	31
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 TKIVNA KULTURA .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.1 Kaljenje semen .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.2 Mikropropagacija .....</b>	<b>34</b>
4.1.2.1 Gojišče za mikropropagacijo rastline z oznako 1m .....	34
4.1.2.2 Gojišče za mikropropagacijo vršička s kotiledoni z oznako 2m .....	36
<b>4.1.3 Kalusna kultura .....</b>	<b>40</b>
4.1.3.1 Neposredna indukcija kalusa .....	40
4.1.3.2 Habituiran kalus .....	42
4.1.3.3 Vpliv hormonske sestave trdnih gojišč na prirast mase kalusnega tkiva .....	43
<b>4.2 CELIČNA KULTURA .....</b>	<b>46</b>

<b>4.2.1 Vzpostavitev celične suspenzije .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.2 Prirast suspendirane biomase pri različnih koncentracijah in virih energije ter ogljika .....</b>	<b>47</b>
4.2.2.1 Določanje mase biomase v celični suspenziji odvzeti s pipeto.....	50
4.2.2.2 Subkultivacija celične suspenzije .....	52
4.2.2.3 Subkultivacija celične suspenzije v tekoča gojišča z različnimi sestavami hormonov .....	54
<b>4.2.3 Prirast mase suspendirane biomase .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.4 Vpliv elicitorjev na prirast mase suspendirane biomase.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.5 Vpliv elicitorjev na koncentracijo sekundarnega metabolita atropina in na prirast suspendirane biomase.....</b>	<b>62</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>66</b>
5.1 RAZPRAVA .....	66
<b>5.1.1 Tkvna kultura .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1.2 Celična kultura.....</b>	<b>67</b>
5.2 SKLEPI .....	68
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>70</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>71</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Število novih entitet učinkovin, ki spadajo v štiri najpomembnejša področja zdravil, odkritih med 1981 in 2002 .....	5
Preglednica 2: Strategije za povečanje produktivnosti rastlinskih celičnih kultur.....	8
Preglednica 3: Sestava gojišča za kalitev semen .....	20
Preglednica 4: Sestava gojišča za mikropromulgacijo rastlin.....	20
Preglednica 5: Sestava gojišča za mikropromulgacijo vršička s kotiledoni .....	20
Preglednica 6: Sestava gojišča za indukcijo kalusa.....	21
Preglednica 7: Sestava brezhormonskega gojišča za kultivacijo habituiranega kalusa .....	21
Preglednica 8: Sestava tekočega gojišča z 2,4-D in BAP za celično suspenzijo.....	21
Preglednica 9: Sestava tekočega gojišča (brez hormonov), za celično suspenzijo .....	23
Preglednica 10: Odziv tkiva na gojišču za kalitev semen z oznako 1 .....	33
Preglednica 11: Časovni potek dogodkov in pregled odziva tkiva in organov na gojišču za mikropromulgacijo vršička s kotiledoni, skozi 346 dnevno obdobje subkultivacij .....	37
Preglednica 12: Pregled stanja tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa, število uspešnih in neuspešnih kalitev semen, .....	40
Preglednica 13: Opis rasti tkiva, na gojišču za neposredno indukcijo kalusa iz predhodno steriliziranih semen, po 38 dneh kultivacije v petrijevkah .....	41
Preglednica 14: Pregled odziva tkiva na gojišču za neposredno indukcija kalusa z oznako 2, 32. dan po subkultivaciji v petrijevkah .....	41
Preglednica 15: Pregled rasti in stanja kalusa na brez-hormonskem gojišču, po 47 dneh subkultivacije pri .....	43
Preglednica 16: Vpliv hormonske sestave trdnih gojišč:.....	45
Preglednica 17: Pregled stanja kalusa, ki smo ga suspendirali v tekoča gojišča (20 g/L saharoze (1); 40 g/L saharoze (2), 40 g/L glukoze (3)) z 2 mg/L BAP in 2 mg/L 2,4 D.....	46
Preglednica 18: Primerjava rasti z meritvijo mase mokre biomase v tekočih gojiščih z 2,4-D in BAP z različnimi koncentracijami in vrstami sladkorjev .....	48
Preglednica 19: Primerjava rasti z meritvijo mase suhe biomase v tekočih gojiščih z 2,4-D in BAP, z različnimi koncentracijami in vrstami sladkorjev; 1 – 20 g/L saharoze, 2 - 40 g/L saharoze, 3 - 40 g/L glukoze .....	50
Preglednica 20: Tehtanje biomase v tekočem gojišču v 10 mL suspenzije odvzete s pipeto .....	51
Preglednica 21: Subkultivacije celične suspenzije z dodatkom svežega tekočega gojišča (20 g/L saharoze (1); 40 g/L saharoze (2), 40 g/L glukoze (3)) .....	53
Preglednica 22: Pregled stanja suspendiranih celic v tekočih gojiščih (20 g/L saharoze (1); 40 g/L saharoze (2), 40 g/L glukoze (3)).	53
Preglednica 23: Tehtanje biomase v tekočih gojiščih po sušenju s pomočjo podtlaka(40 g/L saharoze (2), 40 g/L glukoze (3)) .....	54
Preglednica 24: Pregled stanja suspendiranih celic v tekočih gojiščih (40 g/L glukoze (3), 40 g/L saharoze (2)).	54
Preglednica 25: Odziv celične suspenzije po 33dneh subkultivacije v tekočih gojiščih s 40 g/L glukoze in: 1. brez dodanih hormonov; 2. z dodatkom 2 mg/L BAP; 3. z dodatkom 2 mg/L 2,4 D in 4. z dodatkom 2 mg/L BAP ter 2 mg/L 2,4-D .....	55

Preglednica 26: Prirast suhe biomase.....	57
Preglednica 27: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem mokre biomase.....	59
Preglednica 28: Prirast biomase v tekočem gojišču z 2,4-D in BAP in s 40 g/L glukoze.....	60
Preglednica 29: Vpliv elicitorjev na koncentracijo atropina v masi suspendiranih celic .....	64

## KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Mandragora officinarum</i> (Günter Gassen in Minol 2006).....	1
Slika 2: Predstavitev izkopavanja mandragore (Günter Gassen in Minol, 2006).....	3
Slika 3: Dve različni kulturi kalusa 7 dni po tretji subkultivaciji .....	7
Slika 4: Sinteza jasmonske kisline; t.i. oktadekanoidna pot (Matthews in Alkharouf, 2005) .....	13
Slika 5: Sinteza etilena (Matthews in Alkharouf, 2005).....	14
Slika 6: Sinteza salicilne kisline po Klessingu in Wildermuntu (Matthews in Alkharouf, 2005). ....	15
Slika 7: Hodogram vzpostavitev kulture kalusa, celične suspenzije, mikropropagacija in prirast suspendirane biomase ter analize prisotnosti sekundarnih metabolitov.....	18
Slika 8: Slika semena mandragore na brezhormonskem gojišču.....	34
Slika 9: Slika mandragore; rastlina je vzklila iz prerezanega semena na brezhormonskem gojišču.....	35
Slika 10: Vršiček s kotiledoni na 65. dan kultivacije.....	36
Slika 11: Vpliv hormonske sestave trdih gojišč na prirast mase kalusnega tkiva. ....	1
Slika 12: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem mokre biomase.....	47
Slika 13: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem suhe biomase.....	49
Slika 14: Mikroskopska slika celične suspenzije,.....	52
Slika 15: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem suhe biomase.....	56
Slika 16: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem mokre biomase.....	58
Slika 17: Prirast biomase v tekočem gojišču z 2,4-D in BAP in s 40 g/L glukoze.....	60
Slika 18: Vpliv elicitorjev na prirast suspendirane biomase v tekočem gojišču z 2,4-D in BAP ter 40 g/L glukoze, brez dodanih elicitorjev, ali z dodatkom polietilen glikola, salicilne kisline, metil jasmonata in kombinacijo slednjega ter salicilne kisline.....	63

## KAZALO PRILOG

Priloga A1: Nadaljnji dogodki in aktivnosti, ki smo jih izvedli na gojiščih za neposredno indukcijo kalusa

Priloga A2: Pregled odziva tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z oznako 2, 27. dan po subkultivaciji

Priloga A3: Določanje ustreznosti posamičnega kalusnega tkiva, po 51 dneh kultivacije, za poskus: vpliv hormonov iz trdih gojišč na prirast mase kalusnega tkiva.

Priloga A4: Pregled odziva tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z manjšo koncentracijo hormonov po 16 dneh subkultivacije

Priloga A5: Pregled rasti na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z manjšo koncentracijo hormonov

Priloga A6: Pregled rasti na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z manjšo koncentracijo hormonov po 47 dneh subkultivacije

Priloga B1: Potez dogodkov in aktivnosti povezanih z celično suspenzijo, zaporedna številka subkultivacije in čas trajanja subkultivacije. Vsa tkiva smo inkubirali v rastni komori na stresalniku pri 100 obratih na minuto

Priloga C1: Umeritvena krivulja za visokotlačno tekočinsko kromatografijo

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BAP	sintetičen citokinin (6-benzilamino purin)
ET	etilen
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IAA	hormon - avksin (indol acetna kislina)
JK	jasmonsko kislina
KV(%)	koeficient variabilnosti v odstotkih
MeJ	metiljasmonat
MS	mešanica osnovnih makro in mikro elementov za rast, brez vitaminov (basal salt mixture) (Murashige in Skoog, 1962)
NEU	nove entitete učinkovin
PEG	poli etilenglikol
RCK	rastlinskih celičnih kulturah
SD	standardna deviacija
sek. mt.	sekundarni metaboliti
SK	salicilna kislina
V	volumen oz. prostornina
Φ	premer
2,4-D	avksin (2,4 diklorofenoksi acetna kislina)

## 1 UVOD

Vse večja potreba ljudi po hrani ima za posledico vse manj razpoložljive zemlje za pridelavo rastlin, ki niso namenjene prehranjevanju. Poleg tega se trendi prehranjevanja obračajo k naravnim aromam, barvilom, sladilom itd.. To so razlogi, zaradi katerih se bo vse več produkcije naravnih rastlinskih snovi vršilo v bioreaktorjih, saj je takšna proizvodnja neodvisna od okoljskih in družbenih dejavnikov ter jo je možno zelo dobro nadzorovati in upravljeni. Rastlinske celične kulture so obetavni, potencialni viri visoko cenovnih, sekundarnih metabolitov, ki so lahko velikega industrijskega pomena (Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002). Optimizacija biotehnoloških postopkov pridobivanja teh snovi bo v prihodnosti prednjačila pred drago in zapleteno kemijsko sintezo le-teh (Oksman-Caltansey in Inzé, 2004). Nizka vsebnost sekundarnih metabolitov v biomasi je osnovni problem produkcije v celični kulturi, zato tej dodajamo snovi, imenovane elicitorji, ki spodbujajo njihovo produkcijo.

Propagacija rastlin preko tkivnih kultur je sodoben način razmnoževanja rastlin. Indukcija in optimizacija rasti kulture kalusa, priprava suspenzije rastlinskih celic, določitev optimalnih pogojev rasti celične suspenzijske kulture, odzivnost na elicitorje in določitev vsebnosti sekundarnih metabolitov v kulturi so ključni koraki, ki jih je potrebno postaviti, ko želimo rastlinske celične kulture uporabiti kot vir sekundarnih metabolitov.

V nalogi smo kot modelni sistem uporabili rastlino *Mandragora officinarum*, ki proizvaja sekundarni metabolit atropin.

Postavili smo hipotezo, v kateri smo predvidevali, da bomo uspeli pripraviti rastlino *Mandragora officinarum* v celični suspenzijski kulturi, ki bo osnova za pripravo celičnih kultur sorodnih rastlin iz družine razhudnikov za produkcijo sekundarnih metabolitov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 *MANDRAGORA OFFICINARUM* L.

kraljestvo: Plantae (rastline)  
deblo: Spermatophyta  
(semenke)  
poddeblo: Magnoliophytina  
(Angiospermae)  
(krito-semenke)  
razred: Rosopsida  
podrazred: Asteridae  
red: Solanales  
(razhudnikovci)  
družina: Solanaceae  
(razhudnikovke)  
rod: *Mandragora*  
vrsta: *officinarum* L.



Med krito-semenkami so rastline iz družine razhudnikov med najpomembnejšimi za človeštvo. Družine iz te vrste uporabljamo: za prehrano (npr. krompir, paradižnik,...), kot droge in zdravila (tobak, volčja češnja, mandragora; vir komercialnih alkaloidov,...) in kot okrasne rastline (petunija,...).

Slika 1: *Mandragora officinarum* ima do 40 cm dolge, temno zelene in nagubane liste. Iz osrednjega dela zrastejo 3-5 cm dolgi cvetovi, ki so vijolične ali bele barve (Günter Gassen in Minol, 2006).

To je srednje velika družina, katera obsega približno 90 rodov in 3000 do 4000 vrst, ki so zelo raznolike. Naseljujejo puščavske habitate, kot tudi najbolj vlažne predele tropskih gozdov. Rastejo v oblikah manjših dreves, grmovnic vse do majhnih enoletnih zelišč, z mnogimi oblikami cvetov ter plodov. Uporaba različnih naborov podatkov, ki so bili, v zadnjem času, pridobljeni iz plazmidne DNA, je pokazala zanimive filogenetske vzorce pri razhudnikovkah (Olmstead in sod., 1999).

Na evroazijskem področju najdemo šest vrst *Mandragora* (Schultes, 1970). To so: *M. acaulis*, *M. autumnalis*, *M. caulescens*, *M. officinarum*, *M. turcomanica*, in *M. vernalis*. Kemična sestava je podrobno določena samo pri dveh vrstah (*M. officinarum* in *M. turcomanica*), nadaljnji dve vrsti sta le delno kemično analizirani (*M. vernalis* in *M. autumnalis*) in zadnji dve sploh ne (*M. acaulis* in *M. caulescens*).

*Mandragora officinarum* je eno najstarejših zelišč, ki jih pozna človeštvo in hkrati ena najbolj napačno razumljenih rastlin na svetu (Vidal, 1982). To nenavadna rastlino povezujemo z različnimi miti in legendami, ki zbujajo nekaj skrivnostnega, mračnega in celo grozljivega (Carter, 2003). Najverjetnejše je najvidnejša predstavnica med mnogimi »čarovniškimi rastlinami« in zato najbolj pooseblja čarovniško moč.

Opojna moč in zgodovina uporabe mandragore sega daleč nazaj v zgodovino. Vse evropske kulture jo poznajo. Omembe segajo v Biblijo (Stara Zaveza) in v starodavne spise vzhodnih ljudstev. V grškem in rimskem obdobju so jo veliko uporabljali, prav tako v srednjem veku in renesansi. Rastlina je bila znana po svojih magičnih, ljubezenskih (afrodiziak), zdravilnih, halucinogenih in strupenih lastnostih. Sadeže rastline so imenovali »jabolka ljubezni«, ker so verjeli, da povečajo rodnost. V Bibliji je omenjena v Genezi 30:14-17 in v pesmih Salamona 7:12-14, kot afrodiziak in pomoč pri zanositvi, vendar nekateri avtorji v to dvomijo (Zohary, 1982).



Slika 2: Predstavitev izkopavanja mandragore (Günter Gassen in Minol, 2006).

Ime *Mandragora* izhaja iz dveh grških besed, ki jih prevedemo: »škodi živini«. Arabci ji pravijo »Satanova jabolka«. V stari Grčiji in Rimu so jo cenili zaradi njenih opojnih in uspavalnih lastnosti in jo uporabljali kot anestetik pri operacijah. Leta 93 n. št. je zgodovinar Josephus Flavius, opisal postopek nabiranja korenin, kar je veljalo za nevarno opravilo. Korenina lahko ima falično obliko ali spominja na človeško telo, zato naj bi imela okultne moči. V srednjem veku so iz nje izrezovali človeške podobe, predvsem iz rastlin ženskega spola, ker so verjeli da prinašajo srečo in bogastvo. Srednjeveške čarownice naj bi jo, ob polnoči, nabirale pod vislicami. Prah pripravljen iz korenin naj bi povzročil halucinacije in pozneje trans, podoben stanju smrti ali globokemu spancu, kar opiše Shakespeare v delu Romeo in Julia. Prav tako naj bi korenina povzročala blaznost in naj bi se uporabljala pri pripravi napitkov za letenje, kot to opisuje Bulgakov v Mojstru in Margareti. Priljubljenost te rastline v Evropi je začela upadati v 16. stoletju (Hanuš, 2005).

Codex Neapolitanus je eden najstarejših spisov v okvirju tradicije Materia Medica, vodilnega farmakološkega dela iz grško-rimskega obdobja, ki ga je napisal grški kirurg Pedanius Dioscorides v 1. stoletju našega štetja (Peduto, 2001; Barbaud, 1994). Dioscorides je podal natančen opis mandragor v knjigi »Knjiga o zeliščih Grčije (Greek Herbal)« in z njo v zvezi prvič uporabil besedo anestezija (odsotnost čutnih zaznav), kot jo razumemo danes (Müller-Kuhrt, 2003).

## 2.2 VIŠJE RASTLINE IN NOVA ZDRAVILA

Ocenujemo, da je na svetu 400 000 vrst višjih rastlin, od katerih so jih delno kemično preiskali le 10 %. Kljub temu so odkrili nekatera pomembna zdravila prav v rastlinah, njihove učinke pa proučujemo že 200 let. Mnoga od teh še danes uporabljamo. Za njih ni ustreznega sintetičnega nadomestka z enako učinkovitostjo in specifičnostjo za določeno težavo npr. bolezen. V industrializiranih državah, ena četrtina vseh zdravil izdanih na recept, vsebuje sestavine, ki so posredno (preko semi-sinteze) ali neposredno pridobljene iz rastlin. 11 % od 252 – tih, ki so spoznana kot osnovna, s strani svetovne zdravstvene organizacije, izvira izključno iz rastlin (Oksman-Caldentey in Inzé, 2004) in predstavljajo velik tržni delež na zahodu. Vrednost izdanih zdravil na recept, ki vsebujejo fitofarmaceutike, je bila leta 2002, samo v ZDA, ocenjena na 30 milijard dolarjev (Raskin in sod., 2002). Omenimo le nekaj substanc, ki ponazarjajo zgoraj navedena dejstva: vinblastin (angl. vinblastine) in vinkrestin (angl. vincristin) sta bila izolirana iz *Catharanthus roseus*, uporabljamo ju pri zdravljenju raka, prav tako kot podofilotsin (angl. podophyllotoxin) in camphotecin (angl. camptothecin), tu so še morfin – analgetik in pol-sintetični steroidni hormoni, ki jih pridobivajo iz diosgenina.

Kemična raznolikost rastlin je brez dvoma mnogo večja kot katera koli kemična knjižnica, ki jo je ustvaril človek. Rastlinsko kraljestvo predstavlja veliko skladovnico pomembnih farmakoloških učinkovin, ki čakajo, da jih odkrijemo. Sedaj imamo na voljo orodja sistemsko biologije, ki so odprla čisto nove možnosti preučevanja rastlinskih vrst. Zanimanje za rastline, kot izvor novih zdravil, je ponovno začelo naraščati s strani velikih farmacevtskih podjetij. Eden od razlogov za ponovno oživitev rastlinskih sekundarnih metabolitov, kot vodilnih struktur pri tovrstnih raziskavah, je le delni uspeh pri odkrivanju novih učinkovin z metodami kombinatorne kemije ali računalniško podprtne konstrukcije. Tehnike kombinatorne kemije so odkrili pred 20 leti in temeljijo na kreiranju organskih molekul, z optimiziranjem njihove kemijske strukture. Te tehnike igrajo pomembno vlogo pri procesu razvijanja novih zdravil in pričakovali so, da bodo zamenjale naravne vire pri odkrivanju novih učinkovin. Kombinatorična kemija nam je do sedaj nakazala le malo smernic za razvoj zdravil, s katerimi bi zdravili človeške bolezni. Nasprotno, pa je bilo med leti 1981 in 2002, od 1031 novih entitet učinkovin (NEU), 28 % naravnih produktov, ali pol-sintetičnih izdelkov pridobljenih iz naravnih virov (Newman in sod., 2003). Nadaljnjih 24 % učinkovin so najprej odkrili v naravnih virih in jih nato umetno sintetizirali. Preglednica 1 prikazuje poreklo 351 NEU, ki spadajo v štiri glavne skupine zdravil za zdravljenje: mikrobnih obolenj (virusi, bakterije in glice); raka; visokega krvnega tlaka in vnetij; odkritih med letoma 1981 in 2002.

Preglednica 1: Število novih entitet učinkovin, ki spadajo v štiri najpomembnejša področja zdravil, odkritih med 1981 in 2002 (Oksman-Caldentey in Inzé, 2004).

	N	PS	NS	B	S	SkupnoΣ	N+PS+NS (%)
protimikrobo	9	64	25	3	48	149	66
protibakterijsko	9	61	1	-	19	90	79
protiglivno	-	2	-	1	21	24	8
protivirusno	-	1	24	2	8	35	71
proti raku	9	21	10	12	25	77	52
protihipertonično	-	1	34	-	40	75	47
protivnetno	-	13	-	1	36	50	26
Skupno Σ	18	99	69	16	149	351	53

Okrajšave: N, naravni produkt; PS, pol-sintetične učinkovine pridobljene iz naravnih virov; NS sintetične učinkovine, katerih farmakofor je naravnega izvora: običajno velik protein ali peptid, ki je izoliran iz organizma oz. celične linije ali proizveden z biotehnološkimi postopki v gostitelju; B, biološkega izvora; S popolnoma kemično sintetiziran; -(minus) pomeni 0.

Presenetljivo je, da kar 66 % od vseh antibiotikov in 52 % vseh zdravil proti raku, posredno ali neposredno pridobivamo iz naravnih virov (preglednica 1). Naravni viri bodo še naprej igrali pomembno vlogo pri odkrivanju farmacevtskih učinkovin (Oksman-Caldentey in Inzé, 2004).

## 2.3 SEKUNDARNI METABOLITI IN ALKALOIDI

Rastline so pomembni del vsakodnevne prehrane. Že desetletja raziskujemo njihovo sestavo in hranilno vrednost. Poleg esencialnih, primarnih metabolitov proizvajajo višje rastline še veliko vrst komponent z nizko molekulsko maso - sekundarne metabolite. Sekundarne metabolite bi lahko definirali kot sestavine, ki nimajo prepoznavne vloge pri vzdrževanju osnovnih življenskih procesov rastlin proizvajalk; imajo pa pomembno vlogo pri sobivanju rastlin z okoljem. Proizvedejo jih malo, okoli 1 % suhe mase. Količina je odvisna fiziološkega stanja in razvojnega stadija rastline. Mnogi sekundarni metaboliti so kompleksne in edinstvene spojine, katerih nastanek je spodbujen z biotskimi in abiotskimi pogoji stresa (Dixon, 2001). Skladiščeni so v posebnih celicah in/ali organih rastline, običajno jih najdemo v vakuolah.

Čez 100 000 jih je bilo odkritih iz kraljestva rastlin, vendar ima le polovica popolnoma pojasnjeno strukturo (Valport, 1998; De Luca, 2000). Sekundarne metabolite opredeljuje velika kemična raznolikost in vsaka rastlina vsebuje svojstven nabor le-teh. Na osnovi biosintetskega porekla lahko ločimo po strukturi pet glavnih vrst sekundarnih metabolitov: poliketide, izoprenoide (terpenoide), fenilpropanoide, flavonoide in alkaloide. Poliketidi so proizvedeni po acetat-mevalonatni poti; izoprenoidi (terpenoidi in steroidi) so derivati prekurzorja s petimi ogljikovimi atomi, izopenenil pirofosfata (IPP), ki nastane po klasični mevalonatni poti ali po novi (ne-mevalonatna) oz. Rohmer-jevi poti; fenilpropanoidi imajo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> povezavo in nastanejo iz aromatičnih aminokislin, kot sta fenilalanin in tirozin; flavonoidi se sintetizirajo s kombinacijami med fenilpropanoidi in poliketidi; alkaloidi so proizvedeni iz različnih aminokislin (Oksman-Caldentey in Inzé, 2004).

Biosinteze poti sekundarnih metabolitov so pogosto dolge, zapletene, sestavljene iz več korakov in so katalizirane z različni encimi, veliko pa jih je še neraziskanih. Najbolje proučen razred sekundarnih metabolitov so alkaloidi; poznanih je več kot 12 000 struktur (Facchini in sod., 2004). Določene družine rastlin proizvajajo alkaloide, nasprotno pa flavonoide najdemo pri mnogih vrstah.

Naše trenutno razumevanje vloge sekundarnih metabolitov je omejeno. Večinoma se strinjam, da so ti pomembni za preživetje rastline v danem ekosistemu. Delujejo protimikrobsko, proti insektom, odganjajo morebitne plenilce, odvračajo rivalske rastline, privabljajo opaševalce in simbionte ali pomagajo rastlinam na kakšen drug način (Dixon, 2001). Poleg prednosti, ki jih prinašajo rastlinam, so te snovi že stoletja zanimive za ljudi, saj iz njih pridobivamo aromatične snovi, dišave, barvila, pesticide ter farmacevtske učinkovine.

## 2.4 RASTLINSKE CELIČNE KULTURE KOT ALTERNATIVNI SISTEM ZA PRODUKCIJO SEKUNDARNIH METABOLITOV

Rastlinska tkivna kultura v širšem pomenu besede je tehnika, pri kateri gojimo rastline, organe, tkiva ali posamezne celice na definiranih trdnih ali v tekočih hranilnih podlagah ali gojiščih, v laboratorijskih, sterilnih razmerah *-in vitro* (Ravnikar, 1996).

Mnoge od rastlin, ki vsebujejo cenovno ugodne komponente, težko gojimo ali pa jim grozi izumrtje zaradi pretirane izrabe (Raskin in sod., 2002). Spojine pridobljene iz rastlin pogosto ne sintetiziramo kemično, ker to ni ekonomsko opravičljivo, ker imajo zahtevno strukturo ali specifično stereoizomerijo. Pridobivanje dragocenih sekundarnih metabolitov z metodami celičnih kultur ali kultur organov predstavlja zelo privlačno alternativo, saj se izognemo ekstrakciji materiala cele rastline. Z uporabo tehnik celičnih kultur ali kultur organov so bili na trgu do danes le delno uspešni. To si razlagamo z omejitvami empirične selekcije visoko-izkoristljivih stabilnih kultur in s pomanjkanjem razumevanja procesov nastanka sekundarnih metabolitov ter pripadajočih regulacijskih procesov (Verpoortein sod., 2000).

Celične kulture so vzpostavili pri mnogih rastlinah, vendar te običajno ne proizvedejo zadostnih količin sekundarnih metabolitov (Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002). V mnogih primerih lahko povečamo produkcijo sekundarnih metabolitov v nediferenciranih celicah, z uporabo različnih elicitorjev, kot npr.: metil-jasmonata (metilni ester jasmonske kisline), salicilne kisline, citozanov in težkih kovin (Poulev in sod., 2003). V nekaterih primerih so sekundarni metaboliti proizvedeni samo v določenih kulturah organov, kot so kulture lasastih korenin, tumorjem podobni kalus ali kultura vršičkov. Na primer, lasaste korenine proizvedejo veliko alkaloidov, medtem ko kultura vršičkov proizvajajo monoterpene.

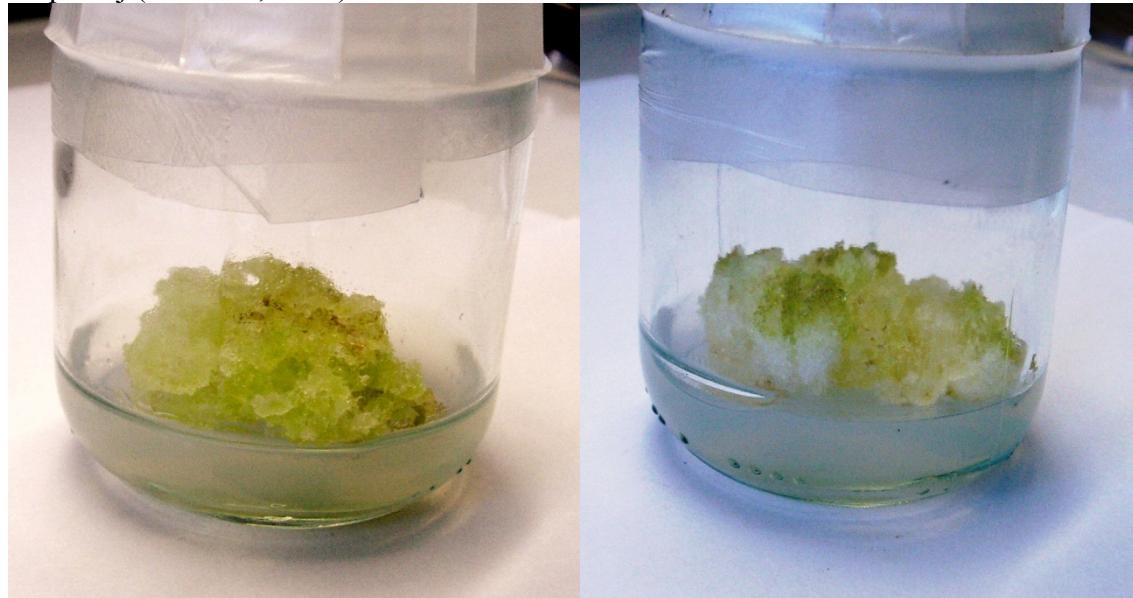
Poznamo nekaj uspešnih primerov uporabe rastlinskih celic: produkcija šikonina iz celične suspenzije *Lithospermum erythrorhizon*, pridobivanje berberina iz celične kulture *Coptis japonica*, dosegli so proizvodnjo velikega obsega rožmarinske kisline s celično kulturo *Coleus blumeii*, prav tako lahko proizvedemo »sanguinarin« s pomočjo celične kulture *Papaver somniferum*, ki ima velik prodajni potencial v pripravkih za ustno higieno, primer snovi z visoko tržno vrednostjo je »paktitaxel«, ki ga pridobivamo izključno s tehnikami rastlinskih tkivnih kultur, sicer so ga ekstrahirali iz lubja 50 do 60 let starih dreves vrste *Taxus brevifolia* (tisa). Kljub tem uspešnim primerom je produkcija sekundarnih metabolitov s tehnikami rastlinskih tkivnih kultur daleč od trivialne, saj je potrebno odpraviti nekatere tehničnih ovire kot so: nizka produktivnost in pomanjkljivosti procesne tehnike (npr.

bioreaktor in pogoji kultivacije). Najmodernejša orodja funkcionalne genomike omogočajo mnogo možnosti uporabe rastlinskih celičnih kultur, pri proizvajajanju znanih in neznanih snovi. Med tem pa je pomembno, da ohranimo globalno raznolikost bioloških vrst in s tem neprecenljive vire, ki lahko zelo koristijo človeštvu (Oksman-Caldenty in Inzé, 2004).

#### 2.4.1 Kultura kalusa

Kalus definiramo kot neorganizirano rastlinsko tkivo, različnih barv in različne sestave. Pri rastlinah nastaja v različnih razmerah. Izzovemo ga z inokulacijo tkiv na gojišče z veliko rastlinskih hormonov. Pri večini rastlin so to avksini ali tudi citokinini. Nastali kalus je kompaktne ali rahle strukture, ki po določenem času lahko postane habituiran, kar pomeni, da je njegova rast neodvisna od dodatka hormonov in se ohranja na brezhormonskem gojišču (Bohanec, 1992).

V ožjem pomenu besede je edini tip rastlinske tkivne kulture kultura kalusa (Raspor in sod., 1996). Gojimo jo z več nameni: rast na gojiščih z različnimi sestavami omogoča proučevanje odziva tkiva na posamezne komponente teh gojišč, izzivanje mutacij, ali proizvodnja sekundarnih metabolitov. Oblikovanje kalusa je izhodiščna točka za pripravo celičnih suspenzij (Bohanec, 1992).



Slika 3: Dve različni kulti kalusa 7 dni po tretji subkultivaciji: sta dobro razvita, imata malo porjavelosti, svetlejši deli so drobljive in mehke strukture. Ti drobljivi deli so zelo primerni za pripravo celičnih suspenzij

#### 2.4.2 Celična kultura

Totipotentnost je potencial vsake posamezne rastlinske celice, da se na podlagi svoje enovite genske informacije razvije v celovito rastlino (Raspor in sod., 1996). Iz tega sledi, da lahko vsaka celica proizvaja cel spekter snovi, ki so kodirane v starševski rastlini. To nam omogoča pridobivanje učinkovin s pomočjo celične suspenzije (Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002), ki jo dobimo, če drobljiv kalus prenesemo na tekoče gojišče in ga stresamo (najbolje na orbitalnem stresalniku). Kalus razпадa na manjše dele in posamezne celice. Z odstranitvijo

večjih skupkov kalusa pripravimo celično suspenzijo (suspenzije so skoraj vedno sestavljene iz posamičnih celic in skupkov več celic). Pomembno je, da zagotovimo zadostno število celic ali skupkov v suspenziji (Bohanec, 1992). Prednosti pridobivanja učinkovin z metodami celičnih kultur pred običajnim gojenjem rastlin, so:

- neodvisnost od geografskih in sezonskih dejavnikov in različnih vplivov zunanjega okolja,
- ponuja nam definiran produkcijski sistem, ki nam zagotavlja redno dobit produkta, konstantne kakovosti,
- omogoča nam ustvarjanje in proizvodnjo produktov, ki niso rastlinskega porekla,
- neodvisnost od politike (posameznih držav)
- učinkovito sotočno odvajanje produkta
- hitrost pridobivanja produkta
- rastlinska celica nam omogoča stereo- in položajno-specifične biotransformacije cenениh prekurzorjev, za izdelavo novih produktov.

Veliko rastlinskih celičnih kultur proizvaja več sekundarnih metabolitov, kot rastline iz katerih so bile le te izolirane. Še vedno pa obstajajo ovire pri tovrstni produkciji, saj so celične linije nestabilne, dobit je nizka, rast počasna in problemi pri povečevanju obsega bioreaktorjev »scale-up«. Razvili so nekaj strategij, za povečevanje učinkovitosti pridobivanja metabolitov (Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002).

Preglednica 2: Strategije za povečanje produktivnosti rastlinskih celičnih kultur (Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002).

Strategije za povečanje produktivnosti rastlinskih celičnih kultur.	
1.	pridobivanje dobro rastočih cel. linij,
2.	iskanje dobro rastočih cel. linij, ki proizvajajo želeni metabolit, <ul style="list-style-type: none"><li>• mutacija celic,</li><li>• dovzetnost za spremembe v mediju, ki zagotavljajo višjo dobit,</li></ul>
3.	povečanje pridelave z uporabo elicitorjev,
4.	pronicanje produkta za lajšanje sotočnega odvajanja le-tega
5.	adsorpcija metabolitov ter produktov v gojišču, z namenom preprečevanja povratne inhibicije,
6.	povečevanje obsega bioreaktorske tehnike.

## 2.5 ELICITACIJA

Do fizičnih poškodb rastlin lahko pride na več načinov, prav gotovo pa je pogost vzrok hranjenje herbivorov. Ker lahko na poškodovanih mestih napadejo tudi patogeni in ne samo herbivori, so rastline razvile zapletene sisteme obrambe pred tovrstnimi grožnjami, ki so inducibilni (sproženi z vzbuditvijo) in se aktivirajo specifično. Poškodbe tkiva sprožijo serijo notranje povezanih odgovorov, ki se širijo v ranjeni rastlini. Sem prištevamo: lokalizirane dogodke, ki zaprejo ranjeno mesto in ščitijo pred oportunističnimi invazijami patogenov, izdelovanje obrambnih proteinov ali sekundarnih metabolitov v poškodovanih listih in listih, ki so na oddaljenih mestih iste rastline ter produkcijo hlapnih signalov, ki so vključeni v

komunikacijo z drugimi organizmi (Bruxelles in Roberts, 2001). Vpogled v kompleksnost dogodkov, povezanih z obrambnimi mehanizmi, nam daje analiza genoma *Arabidopsis thaliana*, kjer ocenjujemo, da je 2005 genov (11,5 % celotnega števila genov) vključenih v obrambo, poleg tega pa je še 1855 (10,4 %) genov vključenih v signaliziranje (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Z leti so razvili mnogo modelnih sistemov, ki pojasnjujejo kako poteka signalizacija ranjenih rastlin in pojavilo se je mnogo splošnih principov. Očitno je postalo tudi, da so različne rastline razvile različne obrambne strategije, ter da se obči signali uporablajo na različnih mestih, za različne namene. Dodajmo še, da narašča nabor podatkov, ki ilustrira pomembnost prepleta povezav med biokemičnimi potmi značilnimi za kontrolo napadov patogenov in tistimi, ki posredujejo pri poškodbah rastline.

### 2.5.1 Obramba

Ko obravnavamo rano na rastlini, ki je povzročena mehansko ali je posledica hranjenja rastlinojedcev, se moramo zavedati, da so poškodovane različne plasti rastline, ki jih sestavljajo značilne populacije celic. Najprej najdemo plast celic, ki so poškodovane in ne celijo, ampak so kljub temu sposobne oddajati različne molekule (te lahko delujejo kot elicitorji odziva v sosednjih, intaktnih celicah ali kot obrambni toksini). Na meji slednjih najdemo nepoškodovane celice, ki so najverjetneje pod velikim stresom in proizvajajo obrambne signale. Stran od teh so zdrave, nepoškodovane celice, ki so cilj poškodbenih signalov. Vemo tudi, da tkiva oddaljena od poškodbe, reagirajo na te dražljaje.

Ker je skozi ranjeno mesto omogočen dostop mnogim oportunističnim patogenom, je primarna naloga celic v neposredni bližini, da s fizično pregrado ustavijo udor. Procesi, ki to omogočajo so: utrjevanje celične stene in fizična izolacija celice od njenih sosed. To celica doseže z: oksidativnim, križnim povezovanjem obstoječih proteinov celične stene (Bradley in sod., 1992); sintezo *de novo* glikoproteinov bogatih z hidroksiprolinom (Showalter, 1993); izdelovanjem polimernih derivatov fenola, kot sta lignin in suberin, ki zapreta rano pred infekcijo in preprečita izgubo vode; sintezo kaloze (polimer  $\beta$ -1,3-glukana), katere nastanek naj bi bil reguliran s kalcijevimi ioni, sama sinteza pa je posebno izrazita v porah plazmodezem, kar posledično zmanjša transport med celicami (Thomson in sod., 1995).

Kemična obramba pred patogeni in herbivori, v ranjenem delu, kot tudi sistemskih delih rastline, je prav tako odziv na poškodbo. Tovrstno obrambo lahko razdelimo v dve poglavitni kategoriji – sekundarni metaboliti in proteini. Čeprav se lahko sekundarni metaboliti nahajajo v rastlini kot konstitutivni deli, jih je večina izzvanih, ko je rastlina ranjena ali napadena s strani patogenov (Dixon in Paiva, 1995).

### 2.5.2 Signalizacija

Obstaja veliko genov brez neposredne obrambne funkcije, ki se sprožijo, ko je rastlina ranjena. Ti so odgovorni za generiranje in zaznavo signalov, ki regulirajo odgovore organizma, kadar je ta ranjen. Seveda so za indukcijo teh genov (receptorjev primarnih signalov) potrebni predhodni signali, ki jih regulirajo. Najzgodnejši dogodki ob poškodbi vključujejo: tok ionov po plazemski membrani, spremembe koncentracije kalcija v citoplazmi, generiranje aktivnih kisikovih spojin in spremembe vzorcev fosforilizacije proteinov. Te fenomene so opazili v vseh testiranih rastlinah in vsi so povezani z generiranjem intracelularnih signalov v mnogih rastlinskih in živalskih vrstah. Ti zgodnji

odzivi se pojavi v prvih nekaj minutah po povzročeni poškodbi in najverjetnejše niso neposredno povezani s signali, odgovornimi za indukcijo ekspresije obrambnih genov. Kot nam kaže velika količina nedavno pridobljenih podatkov, je izražanje obrambnih genov primarno posredovano s sintezo in aktivnim delovanjem fitohormona - jasmonske kislino (JK). Druga hormona, ki imata pomembne funkcije pri izražanju genov, značilnih za poškodbe, sta etilen in abscizinska kislina. Sinteza JK in etilena je dobro proučena, vključno z mnogimi geni, ki kodirajo potrebne biosintetske encime. Slednji so v 30-60 minutah po poškodbi lista uravnani v smeri povečanja koncentracije in dosežejo vrh sinteze hormonov v 1-2 urah. Identificirali so tudi druge elicitorje, ki izzovejo odgovor na rane. Najpomembnejši od teh vključujejo glikane celičnih sten – oligogalakturonoid (OGA) in vsaj v družini razhudnikovk (*Solanaceae*), peptidni hormon imenovan sistem (angl. systemin). Ti elicitorji so lahko: ali začetni signali, ki se sprostijo kot odgovor na poškodbo celice, ali delujejo kot ojačevalci odgovora na novonastali stres. Najverjetnejše imajo ključni vlogo pri sistemski signalizaciji (signal, ki ga zazna celotna rastlina). Mehanizmi, ki so jih predpostavili, kot ključne pri posredovanju signalov do neranjenih delov vključujejo: električno aktivnost, aktivni transport elicitorjev v floem in njihov pasivni transport s pomočjo hidravličnega masnega toka v ksilem. Napadene rastline lahko proizvajajo karakteristične zmesi hlapnih komponent, ki privabljajo plenilce in parazite, katerih hrana so rastlinojedci – napadalci (Bruxelles in Roberts, 2001).

### 2.5.3 Zgodnji dogodki signalizacije

#### 2.5.3.1 Tok ionov

Eden najhitrejših dogodkov pri poškodbi tkiva ali ob dodatku elicitorjev (ali celo patogenov), je serija ionskih tokov na membrani plazme. Hitra depolarizacija električnega potenciala plazemske membrane je skupna posledica delovanja elicitorjev patogenega izvora, poškodbe rastline, glikanov in paradižnikovega peptida sistemin. Depolarizacija je povezana z iztokom K<sup>+</sup> ionov, sočasnim pritokom protonov in alkalizacijo zunajceličnega medija. Z dodatkom kemičnih snovi, ki prekinejo tok ionov, so potrdili vpliv na izražanje obrambnih genov (Bruxelles in Roberts, 2001).

#### 2.5.3.2 Signalizacija, ki vključuje kalcij

Kalcijev ion prav tako vključujemo v signalizacijski model, saj je vseprisoten in pomemben sekundarni sporočevalec evkariontov. Veliko je objav v katerih ugotavljamo, da prihaja ob poškodbah do povečanja koncentracij Ca<sup>2+</sup> ionov v citoplazmi. Zaviralci kalcijevih kanalov, kalcijevi ionofori in snovi, ki mobilizirajo celične rezerve kalcija, uravnavajo elicitorsko-inducirano izražanje genov (Felix in Boller, 1995). Identificirali so vrsto sprožilnih (inducibilnih) genov, ki kodirajo proteine regulirane s strani Ca<sup>2+</sup> ionov. Kalmodulin je primarna tarča za Ca<sup>2+</sup> v mnogih signalnih sistemih. Odkrili so mnogo genov, ki kodirajo kalmodulin in so inducirani ob dotiku ali fizični poškodbi (Berger in sod., 1999). Eksperimenti z različnimi farmakološkimi učinkovinami in rastlino *Arabidopsis* nam nakazujejo, da sta lahko sprostitev notranjih zalog Ca<sup>2+</sup> ionov celice in kalmodulin, vključena v diferencialno regulacijo ločenih JK-odvisnih in JK-neodvisnih biokemijskih poti (Leon in sod., 1998). Na podlagi teh eksperimentov sklepamo, da biosinteza in zaznavanje JK prednjači pred vlogo Ca<sup>2+</sup>. Nasprotno pa primer povečanja citoplazmatskega Ca<sup>2+</sup> s

sisteminom, pri celicah paradižnika kaže, da sta v proces vključena zunajcelični in notranji vir kalcija. Ker JK ni spodbudila nastanka  $\text{Ca}^{2+}$  toka domnevamo, da je kalcijeva signalizacija nadrejena signalizaciji JK. Iz teh poskusov lahko sklepamo na mnogostransko vlogo kalcija v signalizaciji pri poškodbah (Moyen in sod., 1998).

#### 2.5.3.3 Reaktivne kisikove zvrsti

Kot odgovor na poškodbe in druge biotske in abiotische strese, rastlina proizvede reaktivne kisikove zvrsti: superoksidni radikal ( $\text{O}_2^\cdot$ ) in vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ki predstavlja zgodnji odziv na novonastale razmere (Bi in Felton, 1995). Funkcijo in naravo procesa kisikovega izbruha v odvisnosti do poškodb ali napada rastlinojedov razumemo mnogo slabše kot njegovo vlogo pri napadih patogenov (Orozco-Cardenas in Ryan, 1999).

V obstoječi literaturi najdemo dve glavni stopnji nastanka teh zvrsti, ki se pojavljajo kot odgovor rastline na poškodbo. Za prvo stopnjo je značilen zelo hiter izbruh  $\text{O}_2^\cdot$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ki je maksimalen v prvih nekaj minutah po poškodbi mezokarpa zimskih buč (Watanabe in Sakai, 1998), ali ob dodatku oligogalakturonoidov (OGA) celicam tobaka (Chandra in sod., 1997). Podoben hitri oksidativni odziv opazimo pri prečni vezavi (cross-linking) proteinov celične stene sadik fižola (Bradley in sod., 1992).

V nasprotju z zelo hitro produkcijo superoksidnega radikala ( $\text{O}_2^\cdot$ ), nastaja  $\text{H}_2\text{O}_2$  počasneje, nekaj ur pri paradižniku in nekaterih drugih testiranih vrstah (Orozco-Cardenas in Rian, 1999). Ta druga faza produkcije  $\text{H}_2\text{O}_2$  sovpada z aktivnostjo poligalakturonaze, ki jo inducira poškodba in je vsaj pri paradižniku pogojena z nastankom JK. Nekateri avtorji predlagajo, da lahko regulirana aktivnost poligalakturonaz sprosti endogene OGA, ki po tem delujejo, kot elicitorji  $\text{H}_2\text{O}_2$  v lokalnih in sistemskih tkivih. Ta predpostavka postavi nastanek  $\text{H}_2\text{O}_2$  nekaj stopenj nižje v verigi dogodkov, ki povezujejo poškodbe, z izražanjem obrambnih genov. Prva stopnja pa naj bi ustrezala kisikovemu izbruhu, spodbujenemu s strani patogenov in naj bi bila zato pomembna pri signalizaciji odziva na patogene (Bruxelles in Roberts, 2001).

Reaktivnim kisikovim spojinam pripisujemo več funkcij. Te vključujejo prečno vezavo delov celične stene, neposredno delovanje proti insektom in patogenom na mestih okužbe ter pomembno vlogo v sistemu signalizacije (Bradley in sod., 1992; Bi in Felton, 1995).

#### 2.5.3.4 Fosforilizacija proteinov

Reverzibilna fosforilizacija je vseprisoten mehanizem za kontrolo aktivnosti proteinov. Je eden tistih, ki so pogosto vsebovani v biokemičnih poteh prenosa in pretvorbe signalov ter kot tak, vključuje tudi signale pri poškodbah (Rojo in sod., 1998). Z zaznavo povečane aktivnosti proteinov ali povečanega izražanja genov za kinaze proteinov, ki jih inducira abscizinska kislina in glikogen sintaza kinaza 3 homolog, so odkrili nekaj kinaz proteinov, ki jih inducirajo poškodbe (Lee in sod., 1998). Funkcije teh trenutno ne poznamo. Največ so raziskovali družino proteinov, imenovano mitogen aktivirane proteinske kinaze (MAPK). MAPK so poimenovali po njihovih dvojnikih živalskega izvora, ki regulirajo delitev celic in odgovore na stres. Prvič so jih zaznali pri tobaku, kateremu so inducirali poškodbo (Usami in sod., 1995). Pozneje so odkrili podobne MAPK pri *Arabidopsis*, lucerni in paradižniku. Pri paradižniku in tobaku so tovrstno encimsko aktivnost odkrili tudi v dislociranih listih ranjene rastline (Seo in sod., 1995).

Poskusi, da bi odkrili vlogo MAPK v odgovoru obrambnega mehanizma so osredotočeni predvsem na tobak. V njem se poleg, s poškodbo vzbujeni MAPK (Seo in sod., 1995; Zhang in Klessing, 1997), pojavljajo tudi MAPK inducirani s salicilno kislino (SAPK), za katere domnevamo, da so primarno vključeni v obrambni odziv pri napadu patogenov. Transgene rastline tobaka, v katerih so zavrli WAPK, niso kopičile JA in inhibitorjev proteinaz, ko so bile izpostavljene stresu. Namesto tega so kopičile salicilno kislino in izrazile gene, ki so značilni za odgovor na napad patogenov (Seo in sod., 1995).

Predlagali so modele, v katerih naj bi z rano vzbujeni MAPK aktivirali fosfolipaze A2, ki sproščajo linolensko kislino iz membrane plazme. Linolenska kislina je nato substrat za sintezo JK (Narvaez-Vasquez in sod., 1999), ki je hkrati močan inhibitor proteina fosfataze 2C. Slednji encim je odgovoren za inaktivacijo MAPK biosintetske poti (Baudouin in sod., 1999). Ta opažanja nam nakazujejo potencialni mehanizem, s katerim aktivacija biosintetske poti JK lahko deluje kot pozitivna povratna regulacija aktivnosti MAPK, induciranih ob poškodbi.

## 2.5.4 Elicitorji

Odkrili so, da napadene rastline same izzovejo isti odgovor, kot patogeni, kadar so izpostavljene kemičnim komponentam patogenega značaja (elicitorjem). Kemični signali, ki sprožijo nastajanje sekundarnih metabolitov so elicitorji. Sekundarne metabolne poti se sprožijo, kot odgovor na stres. Z uporabo biotičnih in abiotičnih elicitorjev poizkušamo spodbuditi nastanek sekundarnih metabolitov, s tem skrajšati čas nastanka in povečati količino le teh. Elicitorje lahko pridobimo iz kvasovk, gliv, bakterij ali pa so to soli različnih težkih kovin (polisaharidi, glikoproteini, neaktivni encimi, prečiščen kurdlan (curdlan), ksantan, citozan, bakrove in kalijeve soli) (Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002).

Dogodki opisani v prejšnjem poglavju, se običajno pojavijo v nekaj minutah po poškodbi rastline. Zelo verjetno je, da ti sprožijo vrsto nadaljnjih odgovorov, vključujuč utrditev celične stene na mestu poškodbe, spremembe metabolizma in generiranje signalov, lokalnih ter sistemskih, ki nato regulirajo izražanje obrambnih genov. Poznamo številne hormone, ki lahko inducirajo obrambne gene direktno, ali so potrebni za celovit obrambni odziv. Odkrili so tudi skupine molekul, ki jih obče ne pojmujejo kot običajne rastlinske hormone, vendar spodbudijo izražanje obrambnih genov (Bruxelles in Roberts, 2001).

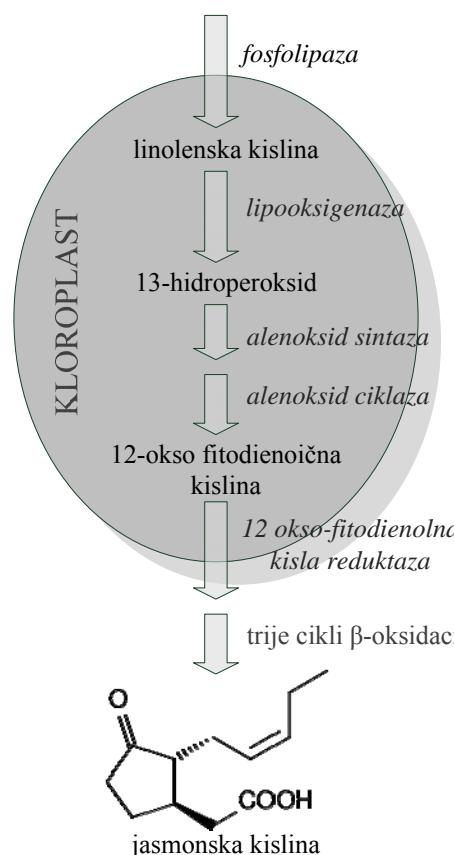
V naravi proizvajajo rastline sekundarne metabolite, kot obrambo pred napadi mikrobnih patogenov in rastlinojedov. Ta odziv je odvisen od indukcije obrambnih proteinov in antibiotikov z nizko molekulsko maso (Blechert in sod., 1995).

### 2.5.4.1 Jasmonska kislina

Pri napadu insekta na užitno rastlino ali ob dodatku mikrobnega (biotičnega) elicitorja v kulturo celične suspenzije, so odkrili hitro, a kratkočasno sintezo *cis*-jasmonske kisline, v prizadetih celicah. Ta učinek je zelo specifičen in ga ne moremo povzročiti s stresi zunanjega okolja, kot so sprememba svetlobe, dodatek težkih kovin ali temperturni šok (Blechert in sod., 1995). Jasmonska kislina (JK) so prepoznali kot potencialen signal pri poškodbi, ko so odkrili njen hlapen derivat metil jasmonat, ki inducira nastanek inhibitorjev proteinaz v paradižniku (Farmer in Ryan, 1990). Hlapni metil jasmonat je povzročil nastanek proteinaz tudi v sosednjih rastlinah, izpostavljenih dovolj veliki koncentraciji te snovi v okolini. JK

nastaja endogeno in so jo, na podlagi številnih poskusov, prepoznali za enega ključnih medceličnih signalov pri prevajanju odzivov rastline na napade insektov, pri poškodbah in pri dodajanju elicitorjev kot sta OGA in sistemin (Bruxelles in Roberts, 2001).

Biosintetska pot JK je katabolizirana s pomočjo številnih encimov, ki se nahajajo v različnih organelih celice. Poznamo jo pod imenom oktadekanoidna pot (octadecanoid pathway). Začne se, ko se lipidni prekurzorji sprostijo iz celičnih membran, najverjetneje iz plazmatske ali membrane kloroplastov (Leon in sod., 1999). Odkrili so, da pri repnjakovcu (*Arabidopsis*) igrata ključno vlogo pri sintezi encima fosfolipaza A<sub>2</sub> in fosfolipaza D (Wang in sod., 2000). Fosfolipaza D najbrž proizvaja substrate za fosfolipazo A<sub>2</sub>, ali direktno aktivira lipooksigenaze, ki so vključene v sintezo JA. Naslednji koraki sinteze se odvijajo v kloroplastu.



Slika 4: Sinteza jasmonske kisline; t.i. oktadekanoidna pot (Matthews in Alkharouf, 2005)

Pri tej sintezi nastajajo poleg metil jasmonata tudi drugi konjugati vključno z amino kislinskimi, ki so bioaktivni (Krumm in sod., 1995). Mnogi od genov, ki kodirajo encime za nastanek JK, so inducirani ob poškodbi in pogosto tudi z JK, kar omogoča sistemsko povratno regulacijo količine JK v rastlini (Leon insod., 1999). Kinetične študije sinteze nam kažejo, da je nastajanje te kisline dvofazno. Začetna faza je neobčutljiva na etilen, ki ji sledi od etilena odvisen vrhunec sinteze. Opozorimo na dejstvo, da je akumulacija JK v ranjenih celicah velika, medtem ko v sistemu zaznamo le majhen porast koncentracija (Rojo in sod., 1999).

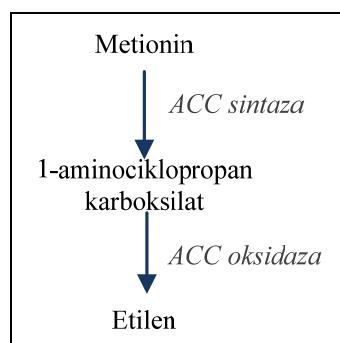
Mesto biosinteze in delovanja tega elicitorja je kritičnega pomena, če želimo doseči primeren odziv. Zunanja aplikacija JK in metil-jasmonata rastlinam, spodbudi izražanje obrambnih genov in je učinkovita pri zagotavljanju obrambe pred nekaterimi insekti (Farmer in sod.,

1992). Mutanti paradižnika in *Arabidopsis*, ki niso sposobni sistemskega odziva in konverzije hidroperoksidov v 12 okso-fitodienolno kislino (OFDK), so dosti bolj doveztni za herbivore, kot divji tipi (Howe in sod., 1996). To dejstvo nakazuje, da je JK esencialna za obrambo pred insekti. Ker je ta elicitor sposoben vzбудiti rezistenco proti raznim insektom, pri tem pa se ne aktivirajo vsi geni, ki so značilni za poškodbe, se zdi: da je JK predvsem odgovorna za regulacijo genov, kateri kodirajo proteine z obrambno funkcijo (McConn in sod., 1997).

#### 2.5.4.2 Etilen

Hormon etilen je vključen v razvoj rastline in ta ga proizvaja kot odgovor na mnoge strese. Pri poškodbah ga sintetizirata encima 1-aminociklopropan-1-karboksilat sintaza (ACC sintaza) in 1-aminociklopropan-1-karboksilat oksidaza (ACC oksidaza). Veliko poročil nakazuje, da poškodbe spodbudijo k transkripciji gene, ki kodirajo specifične izomere teh dveh encimov. Poglavitne izoforme proteinov, značilnih za odgovor na napad patogenov, kodirajo geni, inducirani z dodatkom etilena ali s poškodbo, iz česar sklepamo, da je lahko etilen odgovoren za njihovo aktivacijo ob poškodbi. Hkratno ob neposredni vlogi etilena na izražanje genov, je njegova druga pomembna vloga, koordinacija ekspresije genov skupaj z JK. Pri paradižniku je JK pogojeno izražanje genov za proteinske inhibitorje, odvisno od etilena. Še več, etilen naj bi reguliral nastanek JK pri paradižniku (O'Donnell in sod., 1996) in pri *Arabidopsis*. Nasprotno pa etilen zavira niz genov, ki se odzivajo na JK, v poškodovanih listih *Arabidopsis* (Rojo in sod., 1999). Podobno negativno regulacijo najdemo tudi pri *Griffoniae*-ji (Zhu-Salzman in sod., 1998), kjer zavira izražanje genov za nastanek lektina. V obeh primerih, čeprav zavrti v poškodovanih listih, pa se ti geni izrazijo v listih, ki ne proizvajajo etilena. V nasprotju z nekaterimi namigi, da etilen uravnava JK odzive pri listih *Arabidopsis*, so z analizo 150 genov te rastline, ki so povezani z obrambo, pokazali: da ni bilo razlik pri genski ekspresiji, povzročeni lokalno z poškodbo lista, med divje rastočim organizmom in mutantom, ki je bil etilensko neobčutljiv (Reymond in sod., 2000). Ugotovljeno je bilo tudi, da ni razlike pri občutljivosti na splošnega herbivora, med istim mutantom in divje rastočo rastlino. Pri specializiranem herbivoru je mutant odpornejši (Stotz in sod., 2000). Ena interpretacija teh poskusov nam nakazuje možno vlogo etilena, kot zaviralca prepisovanja sistemskih, obrambnih genov (Rojo in sod., 1999). V etilensko neobčutljivem mutantu nakazuje možnost ektopičnega, izražanja teh genov.

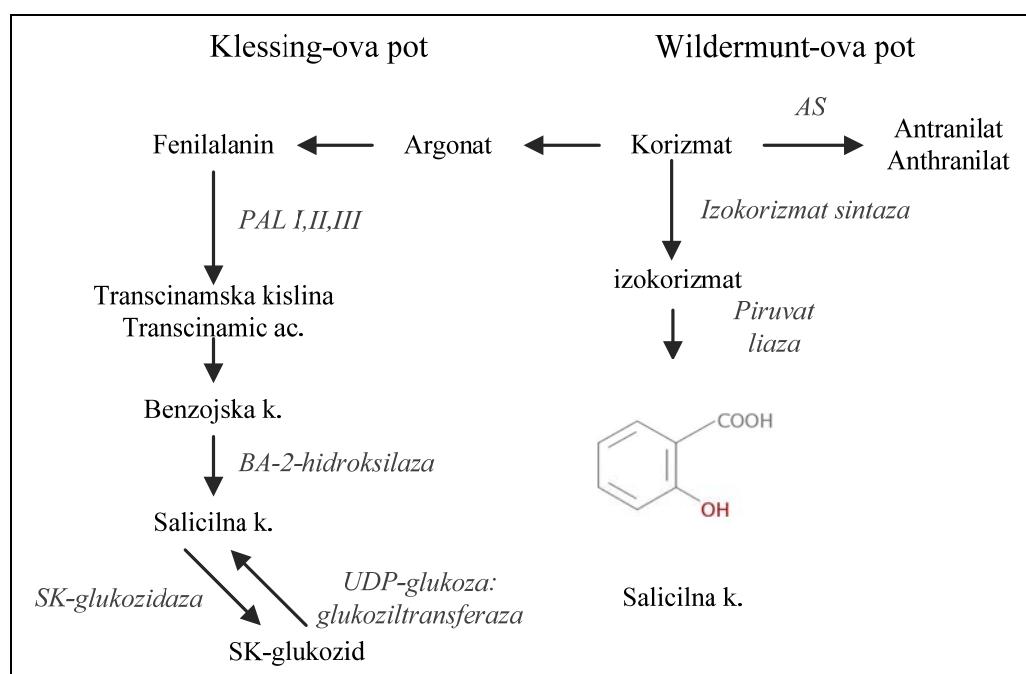
Ti podatki poudarjajo dejstvo, da so za obrambo pred različnimi herbivori potrebni različni obrambni sistemi in da prepletjenost različnih signalnih poti omogoča potencialni mehanizem regulacije raznovrstnih odgovorov (Bruxelles in Roberts, 2001).



Slika 5: Sinteza etilena (Matthews in Alkharouf, 2005)

### 2.5.4.3 Salicilna kislina

Salicilna kislina (SK) je signalna molekula, ki igra poglavito vlogo pri mnogih obrambnih mehanizmih rastlin. Spodbuja ekspresijo z obrambo povezanih genov, izmed katerih bi nekateri lahko bili vključeni v nastajanje tropanskih alkaloidov. SK zavira biosintezo etilena. Potencialno bi lahko povečala produkcijo alkaloidov, s svojo signalno vlogo; izražanja obrambnih genov in/ali posredno z zaviranjem sinteze etilena (Pitta-Alvarez in sod., 2000). Njeno delovanje je najverjetneje nasprotno delovanju JK. SK sproži sistemski odziv (SAR) in verjetno predstavlja daljnosežno komponento transdukcijske signalne poti. Inducira: s patogeni povezane proteine PR-1, PR-2, PR-5, beta 1,3glukonaze in glutation S-transferaze. Poznamo dve mogoči različici metabolnih poti za nastanek SK. Wildermunt predpostavlja pretvorbo korizmata s pomočjo izokorizmat sintaze in piruvat liaze v SK. Klessing nakazuje možnost konverzije fenilalanina s PAL in BA-2-hidroksilaze do SK. Za interkonverzijo SK in njenih derivatov, uporablja rastlina SK glukoziltransferazo in SK  $\beta$ -glukozidazo (Matthews in Alkharouf, 2005).



Slika 6: Sintesa salicilne kisline po Klessingu in Wildermuntu; PAL fenilalanin amonijeva liaza (Matthews in Alkharouf, 2005).

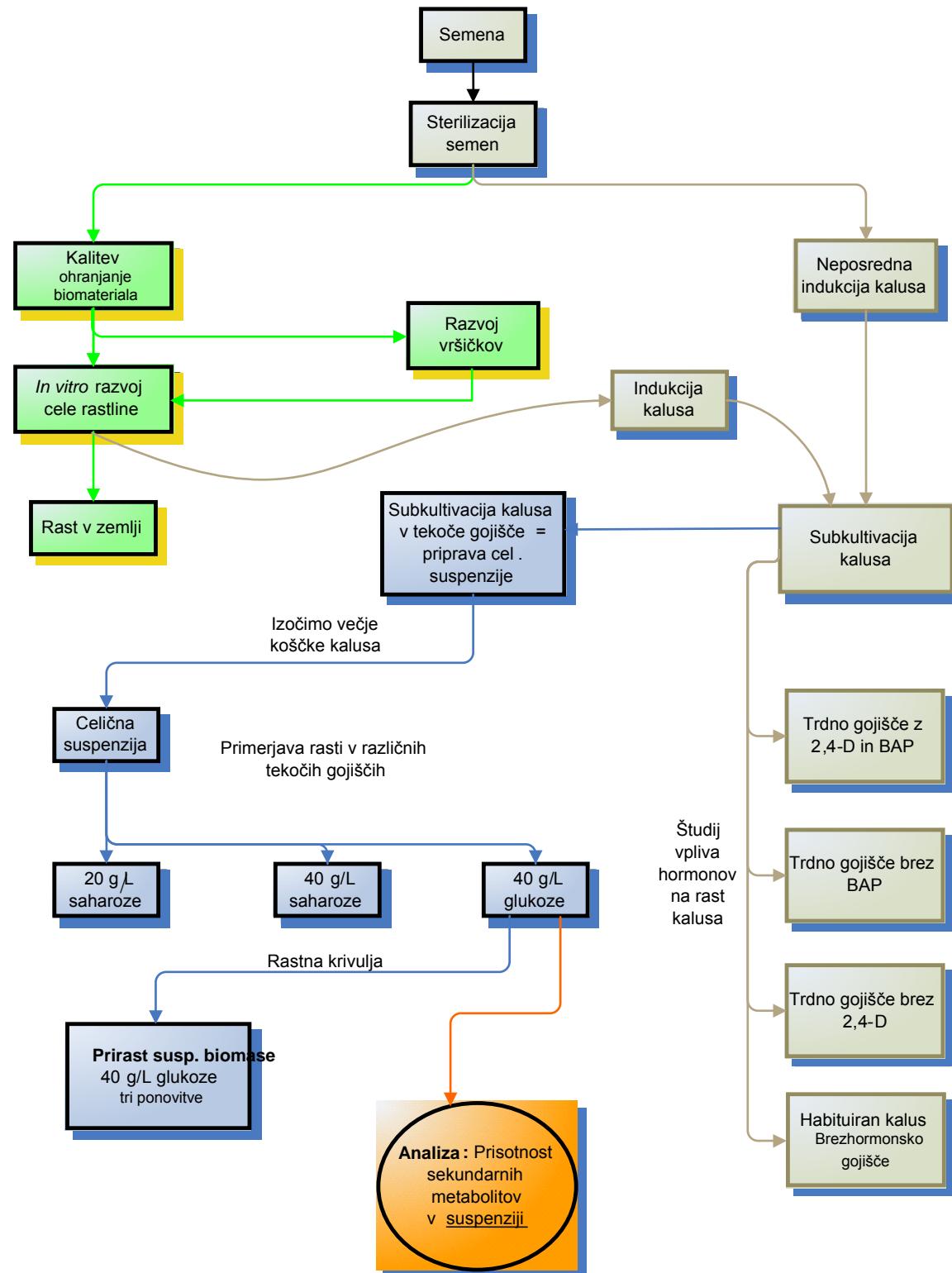
SK dviguje raven  $H_2O_2$  in povezuje ter inhibira katalaze, ki razgrajujejo  $H_2O_2$ , ta pa inducira PR-1; s patogeni povezane proteine. SK inhibira tudi askorbat peroksidazo, ki prav tako oksidira  $H_2O_2$ , ampak ne zavira peroksidaz vključenih v lignifikacijo in prečno povezovanje celične stene. Inhibira tudi ACC sintazo, kar zmanjšuje proizvodnjo etilena in akonitaze (Matthews in Alkharouf, 2005).

### 2.5.4.4 Polietilen glikol

Čisti polietilen glikol HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H (PEG) označimo kot čisto, viskozno tekočino (molekulska masa je manjša kot 200), voskom podobno substanco (molekulska masa med 200 – 2000) in kot motno, belo, kristalno snov (molekulska masa nad 2000). Topi se v večini organskih topil, kot so: benzen, kloroform, acetonitril. Popolnoma topen je tudi v vodi, vendar topnost pada z naraščajočo molsko maso polimera. Pri temperaturah večjih od 310 °C pride do termo-oksidativne ali oksidativne razgradnje, prav tako se razgradi pri visokih hitrostih mešanja. Tvori komplekse z alkalijskimi kovinami, HgCl<sub>2</sub>, tiourea in poliakrilno kislino. PEG so ne-toksične snovi in jih zato uporabljamo pri pripravi farmacevtskih učinkovin in kot aditive v živilski industriji. PEG nizke molekulske mase med drugim uporabljamo za ustvarjanje zelo visokih ozmotskih pritiskov v vodnih sistemih, biokemijskih in bioloških eksperimentih. V bioloških eksperimentih se uporablja kot ozmotik, ki ne penetrira čez celično membrano (Pavlík in sod., 2007)

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA



Slika 7: Hodogram vzpostavitev kulture kalusa, celične suspenzije, mikropropagacija in prirast suspendirane biomase ter analize prisotnosti sekundarnih metabolitov.

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Organizem

*Mandragora officinarum* iz rodu razhudnikovk. Uporabili smo semena, prinesena iz hribovitega, severno-vzhodnega zaledja Dubrovnika.

### 3.2.2 Sterilizacija semen

Za sterilizacijo semen smo potrebovali dikloroizocianurno kislino (Aldrich), koncentracije 16,6 g/L in nekaj kapljic detergenta Tween 20 (Sigma).

### 3.2.3 Gojišča

#### 3.2.3.1 Priprava raztopin hormonov

Običajno smo pripravili založne raztopine hormonov, ki smo jih hranili v hladilniku pri temperaturi 3 °C in v temi. To je pomembno, ker določeni hormoni razpadajo na svetlobi. Založne raztopine ostanejo ne-oborjene, če so razredčene, vsaj na 100 ppb (na primer: 10 mg/100 mL)

##### 3.2.3.1.1 Priprava raztopine 6-benzilamino purina (oznaka: BAP)

6-benzilamino purin je sintetičen citokin. 10 mg hormona smo natehtali v majhno čašo in mu dodamo tri do pet kapljic 1 M raztopine KOH (KOH, Merck), da se je raztopil. (S tem, ko smo ga raztopili v KOH, smo preprečili kasnejše obarjanje v raztopini. Vsebino smo kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in jo dopolnili do oznake z destilirano vodo.)

##### 3.2.3.1.2 Priprava raztopine 2,4-diklorofenoksiacetne kisline (oznaka: 2,4-D)

2,4-diklorofenoksiacetna kislina spada med avksine in je naravnega izvora. Natehtali smo ga 20 mg, ga raztopili s tremi do petimi kapljicami 1 M rastopine KOH (KOH, Merck), s spiranjem z destilirano vodo smo odplaknili vsebino čaše v 100 mL merilno bučko in jo dopolnili do oznake.

##### 3.2.3.1.3 Priprava raztopine indol-ocetne kisline (oznaka: IAA)

Hormon, indol ocetno kislino, smo pripravili tako, da smo natehtali 5 mg le-te v majhno čašo. Raztopili smo jo z nekaj kapljicami 1 M raztopine NaOH (NaOH, Merck). Ta avksin smo kvantitativno prenesli v 100 mL bučko, katero smo dopolnili do oznake z destilirano vodo. S tem hormonom je potrebno biti posebno pozoren, saj razpada na svetlobi, prisotnost soli (žezeleza in nitrati) na ta proces delujejo pospeševalno. Z avtoklaviranjem ga izgubimo do 40 %.

### 3.2.3.1.4 Priprava raztopine giberelinske kisline (oznaka: GA3)

100 mg giberelinske kisline (giberelin), ki smo jo predhodno raztopili v 1 M raztopine NaOH (NaOH, Merck), smo zatehtali in kvantitativno prenesli v 100 mL bučko. To smo dopolnili do oznake z destilirano vodo.

### 3.2.3.1.5 Priprava raztopine 6-furfurilaminopurina (oznaka: kinetin)

6-furfurilaminopurin je citokinin. Zatehto 5 mg smo raztopili z 1 M raztopine NaCl (NaCl, Merck) in jo prelili v 100 mL merilno bučko. Čašo smo sprali z destilirano vodo, ki smo jo ravno tako zlili v bučko, katero smo dopolnili do oznake.

### 3.2.3.2 Priprava raztopine vitaminov

Natehtali smo 20 mg tiamina, 10 mg pirodoksina in 10 mg niacina. Kvantitativno smo jih prenesli v 100 mL bučko in jih raztopili z destilirano vodo. Pri pripravi in rokovjanju z vitaminsko raztopino, smo bili posebno pozorni na morebitne okužbe z mikroorganizmi, saj ti lahko živijo in se množijo v takšnem substratu. Raztopino smo hranili v hladilniku na 1°C ter v temi.

### 3.2.3.3 Sestava in priprava trdnih in tekočih gojišč

Vsem gojiščem smo uravnali pH na 5,8, jim dodali agar v prahu, nato zmes segreli v mikrovalovni pečici in z mešanjem homogenizirali. Sledila je sterilizacija 20 minut pri temperaturi 121 °C ter nadtlaku 1,1 bar-a. Za tem smo gojišča sterilno razlili v petrijevke. Steklene posodice, za gojenje kalusa in mikropropagacijo, smo najprej napolnili z nesterilnim gojiščem in takšne avtoklavirali.

S tekočimi gojišči smo postopali enako, le agarja jim nismo dodali, zato jih ni bilo potrebno segrevati v mikrovalovni pečici in tako predhodno raztapljati agarja. Že sterilizirano gojišče smo naknadno nalivali v sterilne erlenmajerice ustrezne velikosti.

#### 3.2.3.3.1 Gojišče za kalitev semena

Vsa gojišča so vsebovala pripravljeno zmes soli (Duchefa Biochemie) za gojišče po Murashige Skoog-u (MS) (Murashige in Skoog, 1962), katere osnovna koncentracije je bila 4,43 g/L. Ulomek pred kratico MS predstavlja količnik za katerega smo zmanjšali to koncentracijo.

Preglednica 3: Sestava gojišča za kalitev semen

Sestavina	Proizvajalec	Koncentracija v gojišču (g/L)
1/4 MS	Duchefa Biochemie	1,075
tiamin	Sigma	0,002
pirodoksin	Sigma	0,001
niacin	Merck	0,001
mioinozitol	Sigma	0,1
saharoza	Duchefa Biochemie	20
GA3	Sigma	0,1
kinetin	Fluka AG	0,002
Agar	Duchefa Biochemie	8

### 3.2.3.3.2 Gojišče za mikropropagacijo rastline

Preglednica 4: Sestava gojišča za mikropropagacijo rastlin

Sestavina	Proizvajalec	Koncentracija v gojišču (g/L)
½ MS	Duchefa Biochemie	2,151
tiamin	Sigma	0,002
pirodoksin	Sigma	0,001
niacin	Merck	0,001
mioinozitol	Sigma	0,1
saharoza	Duchefa Biochemie	20
Agar	Duchefa Biochemie	8

### 3.2.3.3.3 Gojišče za mikropropagacijo vršička s kotiledoni

Preglednica 5: Sestava gojišča za mikropropagacijo vršička s kotiledoni

Sestavina	Proizvajalec	Koncentracija v gojišču (g/L)
½ MS	Duchefa Biochemie	2,151
tiamin	Sigma	0,002
pirodoksin	Sigma	0,001
niacin	Merck	0,001
mioinozitol	Sigma	0,1
saharoza	Duchefa Biochemie	20
BAP	BDH Chemicals	0,002*
IAA	BDH Chemicals	0,0005
Agar	Duchefa Biochemie	8

\* po 89 dneh uporabe gojišča zmanjšamo vsebnost tega hormona na 1 mg/L.

### 3.2.3.3.4 Gojišče za neposredno indukcijo kalusa

Preglednica 6: Sestava gojišča za indukcijo kalusa

Sestavina	Proizvajalec	Koncentracija v gojišču (g/L)
MS	Duchefa Biochemie	4,302
tiamin	Sigma	0,002
pirodoksin	Sigma	0,001
niacin	Merck	0,001
mioinozitol	Sigma	0,1
saharoza	Duchefa Biochemie	20
2,4-D	BDH Chemicals	0,002*
BAP	BDH Chemicals	0,002**
Agar	Duchefa Biochemie	8

\* po 89 dneh uporabe gojišča zmanjšamo koncentraciji teh dveh hormonov na 1 mg/L

### 3.2.3.3.5 Brezhormonsko gojišče

Preglednica 7: Sestava brezhormonskega gojišča za kultivacijo habituiranega kalusa

Sestavina	Proizvajalec	Koncentracija v gojišču (g/L)
MS	Duchefa Biochemie	4,302
tiamin	Sigma	0,002
pirodoksin	Sigma	0,001
niacin	Merck	0,001
mioinozitol	Sigma	0,1
saharoza	Duchefa Biochemie	20
Agar	Duchefa Biochemie	8

### 3.2.3.3.6 Tekoče gojišče z 2,4-D in BAP

Preglednica 8: Sestava tekočega gojišča z 2,4-D in BAP za celično suspenzijo

Sestavina	Proizvajalec	Koncentracija v gojišču (g/L)
MS	Duchefa Biochemie	4,302
tiamin	Sigma	0,002
pirodoksin	Sigma	0,001
niacin	Merck	0,001
mioinozitol	Sigma	0,1
glukoza	Kemika (Zagreb)	40*
2,4-D	BDH Chemicals	0,002**
BAP	BDH Chemicals	0,002**

\*Temu gojišču smo spremenjali sestavo, pri poskusu optimizacije rasti. Naredili smo tri variante in sicer: 1. koncentracija saharoze 20 g/L, 2. koncentracija saharoze 40 g/L in 3. koncentracija glukoze 40 g/L.

\*\*Po 180 dneh zmanjšamo koncentraciji teh dveh hormonov na 1 mg/L.

### 3.2.3.3.7 Brezhormonsko tekoče gojišče

Preglednica 9: Sestava tekočega gojišča (brez hormonov), za celično suspenzijo

Sestavina	Proizvajalec	Koncentracija v gojišču (g/L)
MS	Duchefa Biochemie	4,302
tiamin	Sigma	0,002
pirodoksin	Sigma	0,001
niacin	Merck	0,001
mioinozitol	Sigma	0,1
glukoza	Kemika (Zagreb)	40

### 3.2.3.4 Priprava elicitorjev

Vse elicitorje smo aseptično dodali v brezhormonsko tekoče gojišče sedmi dan po pripravi suspenzije.

#### 3.2.3.4.1 Metil jasmonat

Metil jasmonat (assay > 97 %, Duchefa) smo raztopili v etanolu in ga dodali suspenziji. Koncentracija je bila 0,5 mg/g (mase mokre biomase).  $\delta=1,02 \text{ g/cm}^3$ ,  $M=224,3 \text{ g/mol}$

#### 3.2.3.4.2 Salicilna kislina

Salicilno kislino (assay > 99 %, Duchefa) smo raztopili v etanolu in jo dodali suspenziji. Koncentracija je bila 0,02 mg/g (mase mokre biomase).  $\delta=1,44 \text{ g/cm}^3$ ,  $M=138,12 \text{ g/mol}$

#### 3.2.3.4.3 Polietilen glikol

V erlenmajerice s suspenzijo smo dodali polietilen glikol (PEG 4000, assay > 99 %, Duchefa) tako, da je koncentracija ustrezala 5 g/L tekočega gojišča.

### 3.2.4 Reagenti za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

Mešanica topil za ekstrakcijo:

- kloroform (Sigma)
- metanol (p.a., 99,0 %, J.T.Baker HPLC-analyzed)
- 28 % raztopina amoniaka (Merck)

Topili in raztopino amoniaka smo mešali v volumskem razmerju 15:5:1, upoštevajoč zgornji vrstni red.

Standardi za kvantitativno določanje s HPLC:

- atropin (p.a. < 97, Sigma)
- skopolamin (p.a. < 99, Fluka)

Mobilna faza za HPLC:

- 2-D destilirana voda
- acetonitril (ultra gradient HPLC probe, J.T.Baker)
- metanol (p.a., 99 %, J.T.Baker HPLC- analyzed)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (p.a., 99 %, Merck),
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (p.a., 99 %, Merck).

Mobilno fazo smo pripravili iz acetonitrila, metanola in 30 mMol raztopine KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (815:185 g/g) pufra, v volumskem razmerju 12:7,9:80,1. pH smo uravnali na 6.00.

### 3.2.5 Oprema

Steklovina in potrošni material:

- 500-, 300-, 100- mL erlenmajerice,
- steklene posodice s pokrovom
- merilni valji,
- merilne bučke,
- pipete 10 mL, 5 mL in 1 mL,
- sterilne, plastične pipete za enkratno uporabo 10 mL,
- skalpel,
- spatula,
- pincete,
- petrijeve plošče,
- nastavek za pipo, ki ustvarja vakuum,
- vakuumski lij s sitom (LF 70),
- vakuumska erlenmajerica,
- gumijasti zamaški za vakuumsko erlenmajerico,
- keramični nastavek za vakuumsko filtracijo,
- filter papir (Φ 70mm, 40 granulacija, brez-pepelni, Schleicher & Schuel),
- parafilm,
- objektna in krovna stekla,
- aluminijasta folija,
- pipete (Gilson- pipetman),
- 2-mL-Eppendorf centrifugirke
- injekcijske brizge
- injekcijske igle
- mikrofiltrti (sartorius, Minisart RC4) 0,20 µm

Aparature:

- avtoklav (Zirbus tech.),
- mikroskop (Nikon, Eclips 80i),
- brezprašna komora (Iskra IBK, 1H2),
- hladilnik,

- rastna komora (IZR Škofja Loka, LO650)
- magnetno mešalo (Rotamix 550 MM),
- mikrovalovna pečica (LG),
- pH meter (Mettler Toledo, MP220),
- sušilnik Elektromedicina Lj. SO-250,
- tehnicka (Exacta 300EB),
- električni sterilizator zraka (Oxford),
- HPLC naprava: Finnigan Surveyor plus (Thermo Electron Corp.)
- kolona AQUASIL C18 (THERMO Hypersil, dolžina 250, I.D.:4,6, particle size 5  $\mu\text{m}$ )
- avtomatski podajalnik vzorcev: MIDIAS (Spark), Autosampler plus (Thermo Electron Corp.)
- detektor: Variable Wavelenght Monitor (Knauer), Autosampler plus (Thermo Electron Corp.)
- črpalka: Maxi-Star (Knauer), LC pump plus (Thermo Electron Corp.)
- centrifuga (Sigma 3K30),
- sonifikacijska kopel (Pio, Sonis),
- centrifuga (eppendorf, centrifuge 5415C)
- rotacijski stresalnik Mrzel,
- vakumski sušilec s centrifugo (Uniequip, univapo 100H)
- vakumska črpalka s hlajenjem (Uniequip, refrigerated aspirator Unijet)
- liofilizator (Crist, alpha 1-4)

Programska oprema:

- Microsoft Office
- Lucija Citogenetics, Praga, CR
- Evrocrom 2000 (verzija 1.65, Knauer)
- ChromQuest 4.2.34 (Thermo Electron Corp.)

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 *In vitro* tehnika celične kulture

Preden smo pričeli z rokovanjem kateregakoli materiala ali biomateriala v brezprašni komori, je bilo potrebno pognati ventilatorsko filtracijo zraka. Prižgali smo električni sterilizator zraka. Po 15 minutah prezračevanja smo prižgali luč, odstranili vse predmete z delovne površine in jo temeljito obrisali z 70 % etanolom. Z orodjem smo ravnali enako. V električnem sterilizatorju smo še dodatno sterilizirali orodje. Vse to je bilo nujno, če smo se že leli izogniti pogostim okužbam celičnih suspenzij.

Sterilizirano orodje je bilo vroče in je poškodovalo kulture, ki smo jih precepljali, zato smo si avtoklavirali nekaj destilirane vode za ohlajevanje le tega.

Vsa gojišča smo označili z datumom in tipom gojišča, kadar je bilo potrebno smo temu dodali še druge oznake (npr.: masa, sev,...).

Vsa gojišča smo po končanem delu v brezprašni komori ovili po obodu s parafilmom in prenesli ter inkubirali v rastni komori. Obratovalni pogoji so bili:  $T=22,5 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ ,

svetlobni interval je trajal 16 ur nato mu je sledilo 8 ur teme, drugi svetlobni režim je bil 24 ur osvetljevanja. Te pogoje smo vzdrževali 24h na dan in so bili stalni. Vlage v komori nismo merili. Odvisna je bila od zunanje vlažnosti in frekvence odpiranja komore. Časovni interval je bil odvisen od rasti. Celične suspenzije smo inkubirali na stresalniku 100 obr./min v steriliziranih erlenmajericah pri istih pogojih. Odprtino erlenmajerice smo do razširitve pokrili z dvojno alufolijo in vratni del ovili z parafilmom. Oznake smo pisali na alufolijo.

### **3.3.1 Sterilizacija semen**

Semena smo zmočili v 70 % etanolu, nato smo jih 20 minut namakali v dikloroizocianurni kislini koncentracije 16,6 g/L. Premestili smo jih v Tween 20 in mešali. Sledilo je trikratno spiranje z destilirano vodo.

Semena so bila tedaj sterilna, zato so se vsi nadaljnji postopki opravljali aseptično.

Semenom je bilo potrebno prerezati oz. odstraniti testo (zunanji ovoj) in takšna položiti na sterilno gojišče. Najboljši način odstranjevanja teste je bil tisti, pri katerem smo seme samo obrezali, sicer smo jih razpolavljal po najdaljši osi.

### **3.3.2 Kalitev semen in razvoj rastline za ohranjanje biomateriala**

#### **3.3.2.1 Kalitev semen *in vitro***

Sterilizirano seme smo aseptično prenesli na gojišče za kalitev semen, razlito v petrijevke. Inkubirali smo ga do razvoja rastline z vidnimi koreninami in lističi. Listi rastlinice se niso smeli dotikati pokrova, da ne bi porjaveli.

#### **3.3.2.2 *In vitro* razvoj cele rastline in presaditev v zemljo**

Rastline, ki so razvile lepe koreninice in lističe, smo prenesli v sterilno stekleno posodico s pokrovom, ki je vseboval gojišče za mikropropagacijo rastlin (brezhormonsko gojišče z  $\frac{1}{2}$  MS). Pri tem smo bili posebej pozorni, da je bilo orodje s katerim smo delali, dovolj ohlajeno. Rastlinice smo prenesli v posodico, še preden so se koreninice in lističi popolnoma razvili, saj bi bilo razvezane korenine težko presaditi v gojišče. Ko je rastlina razvila večje liste 2-4 cm in daljše, razvezane korenine 6 in več cm, smo jo presadili v sterilno prst. Pri tem je bilo treba paziti, da smo odstranili vso gojišče s korenin.

Tako rastlino smo posadili v zasenčen rastlinjak. Neposredna sončna svetloba bi ji škodila. Posoda v kateri je rastla, je bila globoka, saj ima mandragora globoke korenine.

#### **3.3.2.3 *In vitro* mikropropagacija rastlin**

Rastlinicam, ki so bile slabše razvite, smo odrezali koreninico in nato postopali enako kot v prejšnjem sestavku, le da smo jih prenesli na gojišče za mikropropagacijo vršička s kotiledoni. To gojišče je služilo razraščanju vršičkov. Ko smo z aseptičnim razpolavljanjem

biomateriala, dosegli željeno število rastlin smo te prenesli na gojišče za mikropropagacijo rastlin.

### 3.3.3 Kultura kalusa

#### 3.3.3.1 Indukcija kalusa

Sterilizirano seme smo položili na trdno gojišče za neposredno indukcijo kalusa, razlito v petrijevki. Inkubirali smo ga tako dolgo, da je kalus zrastel od 1 do 2 cm v premeru in preden se je začel dotikati zgornjega pokrova petrijevke. Tako smo preprečili nastanek rjavenja na stičnih površinah. Pri subkultivacijah smo uporabljali steklene posodice s pokrovom v katerih je enako gojišče. S tem smo pridobili večji kalus, kultura je bila tako dlje obstojna.

#### 3.3.3.2 Habituiran kalus

Kalus smo prenesli iz gojišča za neposredno indukcijo kalusa na brezhormonsko gojišče.

#### 3.3.3.3 Vpliv hormonske sestave trdnih gojišč na rast mase kalusnega tkiva.

Kalus, ki je rasel na gojišču za neposredno indukcijo kalusa (vsebuje 2,4-D in BAP), smo očistili morebitnih ostankov trdega gojišča, ga položili na sterilizirano alufolijo, stehtali na tehnici v brezprašni komori in ga precepili na sveže gojišče.  
Tehtnico je bilo potrebno prej očistiti z 70 % etanolom, jo pustiti nekaj časa v komori, da smo odpihnili morebitne kontaminante in jo ograditi, da tok zraka ni oviral meritev.

Ta kalus smo precepili na štiri gojišča z agarjem, katerih hormonska sestava je bila naslednja:

- brezhormonsko gojišče
- gojišče z 2 mg/L BAP
- gojišče z 2 mg/L 2,4-D
- gojišče z 2 mg/L BAP in z 2 mg/L 2,4-D

Po 14 dneh kultivacije v rastni komori, smo biomaterial odvzeli iz gojišča in mu odstranili ostanke gojišča. Takšnega smo prenesli na sterilno, stehtano alufolijo ter ga tehtali. Nato smo ga ponovno razdelili na približno enake dele in ga inkubirali na sveža gojišča, katerih sestava je ustrezala predhodni. Kulture smo inkubirali 15 dni in postopek ponovili. V času inkubacije smo vizualno spremljali rast kulture.

### 3.3.4 Celična kultura

#### 3.3.4.1 Priprava celične suspenzije

Kalus smo previdno razdrobili na čim manjše dele. Najbolj drobljiv je bil habituirani kalus. Takšnega smo previdno potopili v tekoče gojišče z 2,4-D in BAP, ki smo ga predhodno nalili v sterilno erlenmajerico, to smo pokrili z dvojno folijo in ovili s parafilmom. Po nekaj dnevih inkubacije na stresalniku (100 obr./min) smo odstranili večje dele kalusa iz suspenzije. To smo najlažje dosegli tako, da smo sesali gojišče, ki je vsebovalo suspendirane celice, v

sterilno plastično pipeto. Vsebino pipete smo aseptično izpraznili v sterilno erlenmajerico, ki je vsebovalo dvakratni volumen svežega gojišča in inkubirali pri enakih pogojih. Erlenmajerica s svežim gojiščem je morala biti ohlajena na primerno temperaturo. Ko je bila suspenzija homogena, brez velikih delov kalusa ali skupkov celic, smo dobili celično suspenzijo. Pozneje smo lahko suspendirane celice odcedili na filtrirni papir, sprali z destilirano, sterilizirano vodo in jih ponovno suspendirali v brezhormonskotekoče gojišče.

### 3.3.4.2 Filtracija celične suspenzije

Suh filtrirni papir smo stehtali in nanj z vodoodpornim pisalom zapisali maso. Sterilizirali smo: destilirano vodo, vakuumsko erlenmajerico, gumijasti zamašek z luknjo, ki je bila dovolj velika za vstavitev nerjavečega cedila, nerjaveče cedilo, orodje, ki smo ga uporabljali (spatula, pinceta) in filtrirne papirje ( $\Phi$  70 mm, 40 granulacija). Vse naštete priprave smo pred sterilizacijo zavili v dvojno alufolijo.

Vključili smo brezprašno komoro. Na vodovodno pipo smo pritrdirili nastavek za vakuumsko sesanje. Nanj smo priključili dovolj dolgo, gumijasto cev. Del cevi katerega smo priključili na vakuumsko erlenmajerico, ki je stala v brezprašni komori, smo prej potopili v 70 % etanol. Odvili smo gumijasti nastavek in pri tem pazili, da se nismo dotknili notranjih delov nastavka. Vstavili smo ga na erlenmajerico. Pazljivo smo odvili cedilo, ki smo ga nasadili na gumijasti nastavek. Previdno smo odvili folijo, v kateri so bili filtrirni papirji, notranjosti se nismo dotikali. Filtrirni papir smo s sterilno pinceto vstavili v nerjaveče cedilo. Lego le tega smo popravili s spatulo.

Odprli smo pipo za pretok vode. Curek v korito ni smel biti premočen, sicer je prišlo do poškodbe celic zaradi prevelike sesalne sile. Celično suspenzijo smo previdno zlivali v cedilo s filtrirnim papirjem. Preostanek suspenzije v erlenmajerici smo sprali z ohlajeno destilirano vodo in ga prilili v sito. Najbolje je bilo v erlenmajerici pustiti  $\frac{1}{4}$  volumna gojišča, da ni prihajalo do poškodb celic, zaradi hipotoničnega okolja. Postopek smo po potrebi ponovili. Suspenzijo smo vakuumsko filtrirali toliko časa, da smo odstranili gojišče, ki se je zadrževalo med posameznimi celicami (masa celic je prešla iz vodene v puhasto konsistenco, iz rahlo zelene v svetlejšo belo zeleno barvo). Dobro izcejanje gojišča je bilo pomembno, ker smo s to metodo, dobili relativno dobro uniformirano celično biomaso, kar je bilo pomembno pri tehtanju.

### 3.3.4.3 Prirast suspendirane biomase pri različnih koncentracijah in virih energije ter ogljika

50 mL celične suspenzije smo odvzeli iz gojišča 2,4-D in BAP s sterilno, plastično pipeto ob stalnem mešanju. Vsebino smo suspendirali v 150 mL gojišča iste sestave, kot je tekoče gojišče z 2,4-D in BAP, le da smo mu spremenili koncentracijo ali vrsto sladkorja:

- saharoza 20 g/L
- saharoza 40 g/L
- glukoza 40 g/L

Suspenzijo smo inkubirali na stresalniku v rastni komori ter vizualno spremljali lastnosti suspenzije: barva, vitalnost, hitrost rasti, okužbe, tvorbo skupkov (velikost, barvo) in gostoto suspenzije.

### 3.3.4.4 Prirast suspendirane biomase, v tekočem gojišču z 2,4-D, BAP in 40 g/L glukoze

Odtehtali smo  $1,000 \text{ g} \pm 0,005 \text{ g}$  celične biomase, pridobljene po metodi opisani v: 3.3.4.2 filtracija celične suspenzije. Celice smo suspendirali v sterilne erlenmajerice (200 mL), ki so vsebovale 20 mL tekočega gojišča 2,4-D in BAP. Inkubirali smo jih na stresalniku v rastni komori. Vsake dva dni smo kvantitativno ovrednotili rast celic s tehtanjem.

Na vakuumsko erlenmajerico smo vsadili gumijast zamašek, ki je tesnil keramični nastavek za vakuumsko filtracijo. Slednjega smo vstavili in pripravo priključili s cevjo na nastavek za vakuumsko sesanje. Odprli smo pretok vode. Suhi filtrirni papir smo stehtali in nanj napisali maso (po potrebi smo dodatno označevali). Vstavili smo ga v lij, omočili z destilirano vodo in ga ponovno stehtali (zapisali smo oba podatka). Omočen papir smo ponovno vstavili v lij in skozenj kvantitativno prefiltrirali vsebino erlenmajerice. Filtrirni papir na katerem je ostala biomasa smo stehtali. Nato smo ga prenesli v sušilec, kjer se je sušil tri dni, ko je bil suh smo ga ponovno stehtali. Iz pridobljenih podatkov smo izračunali maso mokre biomase in maso suhe biomase.

### 3.3.4.5 Vpliv elicitorjev na prirast suspendirane biomase, v tekočem gojišču z 2,4-D, BAP in 40 g/L glukoze

Poskus je bil zasnovan na enaki osnovi kot tisti iz poglavja 3.3.4.4. Razlika je bila v času trajanja poskusa (17 dni) in v tem, da smo tu v gojišče dodali elicitorje. Slednje smo dodali sedmi dan kultivacije, ker smo na podlagi predhodnje rastne krivulje ugotovili, da je celična suspežija takrat v eksponentni fazì rasti in bodo spremembe vitalnosti kulture najočitnejše. V literaturi smo poiskali optimalne koncentracije elicitorjev, ki so bili uporabljeni pri produkciji benzofenantridinskih alkaloidov v celični kulturi in optimalni čas za dodatek elicitorjev (Hwa-Young Cho in sod., 2007). Dodali smo 0,5 mg metil jasmonata in 0,02 mg salicilne kisline na g mokrih celic ( $0,5 \text{ mg}_{\text{mj}}$  in  $0,02 \text{ mg}_{\text{sal.k.}}$  / g svežih celic an: FCW- fesh cell weight). Optimalno koncentracijo za dodatek PEG smo prav tako našli v literaturi in je znašala 2,5 g/L gojišča (Pavlík in sod., 2007).

Tukaj smo po odvzemu vzorca stehtali le maso mokre biomase, nato smo nekaj biomateriala prenesli v plastične epruvete s pokrovom (epice) in jih liofilizirali. Liofilizacija je potekala 48 ur pri tlaku 140 mBar. Posušen material smo stehtali. Iz razlike mase plastičnih epruvet, pred in po tehtjanju, smo izračunali suho maso. Ta podatek smo rabili za določitev atropina v suhi snovi.

### 3.3.4.6 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

#### 3.3.4.6.1 Priprava standarda atropina, skopolamina in mešanega standarda

10 mg atropina v prahu smo raztopili v 10 mL etanola, ki smo ga uporabljali za HPCL analize. S skopolaminom smo ravnali po istem postopku. Dobili smo raztopino s koncentracijo 1 g/L.

Mešano raztopino smo pripravili z mešanjem osnovnih raztopin atropina in skopolamina.  
 $200 \mu\text{L}$  raztopine atropina (0,5 g/L) +  $200 \mu\text{L}$  raztopine skopolamina (0,5 g/L) =  $400 \mu\text{L}$  raztopine atropina in skopolamina (0,25 g/L)

### 3.3.4.6.2 Ekstrakcija

V plastične epruvete, ki so vsebovale posušeni biomaterial, smo dodali 5 mL mešanice topil za ekstrakcijo. Sledila je 1 minuta ultrasonifikacije, 15 minut sonične kopeli pri T=30 °C in nato 5 minut centrifugiranja pri 4 000 obr./min. Supernatant smo odlili v plastično epruveto, usedlini v prvi epruveti dolili mešanico topil za ekstrakcijo in postopek ponovili. Drugi supernatant smo prilili prvemu in ga izparevali v vakuumskem sušilcu s centrifugo 4 ure. Napravo smo nastavilimo na program za izparevanje kloroformra, saj ima ta najvišji parni tlak v mešanici, pri obratovalnih pogojih.

### 3.3.4.6.3 Priprava vzorca za HPCL analizo

Po odstranitvi mešanice topil z izparevanjem, smo dodali v plastično epruveto 2 mL metanola za HPLC analizo. Zaprli smo z zamaškom, postavili v ultrasonično kopel (15 minut, 40 °C) in premešali na stresalniku 30 sekund. Sledilo je centrifugiranje 5 000 obr./min, 5 min, nato filtracija raztopine z mikrofiltri ter polnjenje vial za HPCL analizo.

### 3.3.4.6.4 Priprava mobilne faze za HPLC

V 1L 2-D destilirane vode smo raztopili 4,082 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Enako smo postopali z 5,2254 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Ti dve raztopini smo mešali med seboj, dokler nismo dosegli pH = 6,00. Mobilno fazo sestavlajo: acetonitril, metanol in 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> raztopina pufra s pH=6 v volumskem razmerju 12<sub>acetonitril</sub> : 7,9<sub>metanol</sub> : 80,1<sub>pufra</sub>.

### 3.3.4.6.5 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – (HPLC)

HPLC analize smo izvedli na napravi Finnigan Surveyor plus proizvajalca Thermo Electron Corp., opremljenim z avtomatskim podajalnikom vzorcev (Autosampler plus), detektorjem PDA plus (Variable Wavelenght Monitor, Knauer), črpalko LC pump plus (Maxi-Star, Knauer). Za pridobivanje, obdelavo in vizualizacijo podatkov smo uporabili program ChromQuest 4.2.34. Separacija se je odvijala v koloni AQUASIL C<sub>18</sub> (THERMO Hypersil, dolžina 250, I.D.:4,6, particle size 5 µm). Temperatura kolone je bila 30 °C, injekcijski volumen je znašal 20 µl (z vgrajeno zanko 100 µl), pladenj z vzorci je bil hlajen na 10 °C. Čas analiza enega vzorca je bil 35 minut. Mobilno fazo so sestavljali acetonitril/metanol/30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> puferska rastopina, pri pH=6,00 (12/7,9/80,1; v/v/v). Pretok je znašal 1 mL/min. Vrhove smo identificirali s pomočjo standardnih dodatkov in PDA plus detektorjem. Umeritvena krivulja za visokotlačno tekočinsko kromatografijo se nahaja v Priloga C1.

## 3.3.5 Statistična obdelava rezultatov

### 3.3.5.1 Povprečna vrednost

Meritve smo izvajali v treh ponovitvah. Rezultate meritev smo podali kot povprečno vrednost ( $\bar{x}$ ) (Adamič, 1989).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots(1)$$

n.....število vzorcev  
X<sub>i</sub>.....vrednost i-te meritve

### 3.3.8.2 Standardni odklon in koeficient variabilnosti

Za oceno variabilnosti rezultatov pri paralelnih vzorcih smo uporabili standardni odklon (SD) in koeficient variabilnosti (KV) (Adamič, 1989).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \dots(2)$$

$$KV (\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100 \quad \dots(3)$$

## 4 REZULTATI

V sladu z delovno hipotezo smo s tehniko tkivnih kultur vzgojili rastlino, vzpostavili tkivno kulturo poganjkov, vzpostavili učinkovito kalusno in celično kulturo ter optimizirali njuno rast. V nadaljevanju smo določili vpliv elicitorjev na prirast suspendirane biomase in njihov vpliv na vsebnost sekundarnega metabolita artopina v kulturi suspendiranih celic. Rezultate predstavljamo v nadaljevanju naloge.

### 4.1 TKIVNA KULTURA

Poglavlje o tkivnih kulturah obsega rezultate: kaljenja semen, mikropropagacije rastline in tkivne kulture poganjkov, neposredne in posredne indukcije kalusa, vzgoje habituiranega kalusa ter optimizacije rasti kalusnega tkiva. Vse te tkivne kulture smo vzgojili na trdnih gojiščih, v rastni komori.

#### 4.1.1 Kaljenje semen

Imeli smo 32 semen. Eno smo prerezali in ugotovili, da je v notranjosti votlo. Po namakanju je notranjost semena nabreknila, ali pa je bilo seme votlo - jalovo. Ovoj semenu je debel ter trd. Na podlagi teh lastnosti smo določili najprimernejši način sterilizacije semen. Hkrati smo morali preprečiti okužbe in zagotoviti varno uporabo kemikalij, ki sicer poškodujejo semena. Okužb gojišč ni bilo, sterilizacija z dikloroizocianurno kislino (16,6 g/L), etanolom in Tween 20 je bila uspešna.

Po sterilizaciji smo semena odpirali na različne načine, saj se je ovoj oz. testa po hidraciji zmehčala. Najbolj učinkovito je bilo obrezovanje teste. S skalpelom smo previdno obrezali ovoj, tako da nismo poškodovali notranjih tkiv in ga nato razprli, ali ga  $\frac{1}{2}$  odstranili ter vsebino položili na gojišče.

Dvakrat tedensko smo opazovali razvoj rastlin. Po 38 dneh kultivacije na gojišču za kalitev semen v petrijevkah je prišlo do stopnje rasti, pri kateri jih je bilo potrebno prenesti na sveža gojišča z drugačno sestavo, ki so bila razlita v steklenih posodicah.

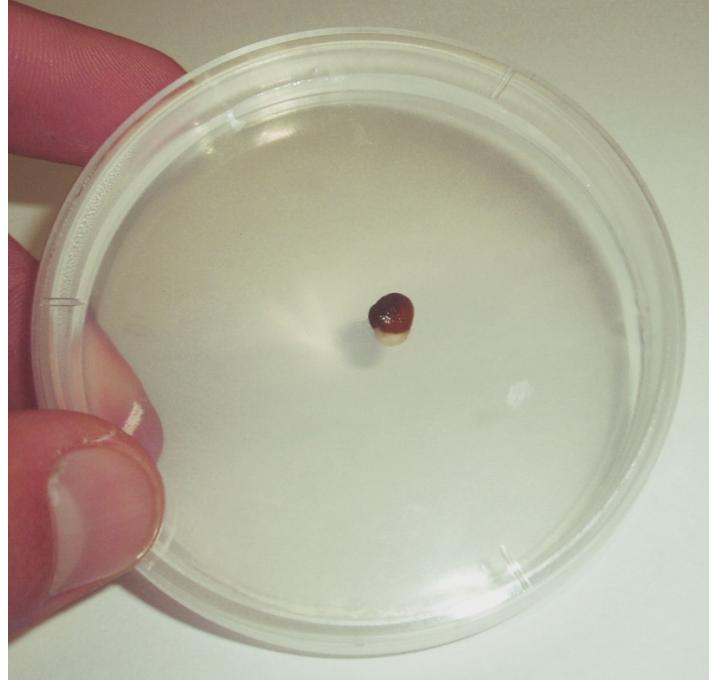
Preglednica 10: Odziv tkiva na gojišču za kalitev semen z oznako 1; število uspešnih in neuspešnih kalitev in način rezanja semen, ki so bila predhodno sterilizirana, po 38 dneh kultivacije v rastni komori: petrijevke, 23 +/- 1 °C in pH 5,8.

Način priprave semena	stanje rasti po 38 dneh	število semen	Oznaka posamičnih semen, ki so vzklila na gojišču z oznako 1
cela semena	niso vzklila	2	brez*
semena s prerezano ali obrezano testo	niso vzklila	2	brez*
	bolj ali manj razvite rastline z malim steblom, velikimi kličnimi listi in nerazvejano korenino	10	I., II., III., IV., V., VI., VII., VIII., IX., X.

\*Semenata, ki niso vzklila, niso dobila oznake.

V preglednici 10 je pregledano stanje rastlin po 38 dneh inkubacije. Od skupaj 14 semen je vzklilo 10 semen, 4 semena pa ne. Uspešnost je bila 71,4 %. Nekaj semen smo razpolovili in obe polovici kultivirali. Pri rezanju je pomembno, kje je kalček in ali ima ta na razpolago založno tkivo. V primeru, ko smo inkubirali samo kalček ali samo založno tkivo, ni prišlo do razvoja tkiv. Dvema semenoma teste (ovoja) nismo odstranjevali. Sterilizirani smo posadili na gojišči za mikropropagacijo rastlin.

Sledila je subkultivacija rastlin na dveh različnih gojiščih, in sicer: gojišče za mikropromulgacijo rastlin z oznako 1m in gojišče za mikropromulgacijo vršička s kotiledoni z oznako 2m. V prvo gojišče smo prenesli bolje razvite rastlinice, v drugo pa smo subkultivirali slabše razvite rastline, ki smo jim pred tem odrezali korenine. Celi semenii 32 dni nista vzklili, prav tako ni bilo okužbe gojišča, zato smo jih inkubirali pod istimi pogoji.



Slika 8: Slika semena mandragore na brezhormonskem gojišču. Temu semenu nismo odstranili teste, zato po treh mesecih še vedno ni vzklilo. Fotografija posneta po treh mesecih subkultivacije.

Po 26 dneh smo dvema semenoma odstranili testo z obrezovanjem in ju subkultivirali v stekleno posodico z gojiščem za mikropromulgacijo rastlin, kjer sta se razvili.

#### 4.1.2 Mikropromulgacija

##### 4.1.2.1 Gojišče za mikropromulgacijo rastline z oznako 1m

Semeni, ki so vzklila na gojišču za kalitev semen, smo prenesli na gojišče za mikropromulgacijo rastlin. Dvakrat na teden smo opazovali rast. 32. dan kultivacije smo pregledali stanje rasti. Rastline z oznakami: I., II., V., VI., X; so dobro uspevale na brezhormonskem gojišču v steklenih posodicah. Korenine so razvile stranske korenine.



Slika 9: Slika mandragore; rastlina je vzklila iz prerezanega semena na brezhormonskem gojišču. Vidni so vsi deli rastline. Korenina je rastla po notranjem obodu dna posode, pod gojiščem, bila je svetlo zelene barve in bila obrnjena proti opazovalcu. Bila je primerna za prenos oz. presaditev v sterilno šoto.

Tem petim, uspešno razvitim rastlinam smo odstranili gojišče s korenin. Presadili smo jih v sterilno šoto ter prenesli v senčni del rastlinjaka Biotehniške fakultete. V rastlinjaku jim je bilo potrebno zagotoviti zaščito pred neposredno sončno svetljobo. Preživeli so trije osebki, namenjeni ohranjanju biomateriala.

Po 119 dneh subkultivacije na brezhormonskem gojišču sta se iz celih semen, ki smo jima naknadno odstranili testo z obrezovanjem, razvili majhni rastlini z listi in koreninami.

Organizma z oznako III.<sub>1,2</sub>, iz gojišča za mikropropagacijo vršička s kotiledoni z oznako 2m, smo subkultivirali v gojišče za mikropropagacijo rastline z oznako 1m. Po 27 dneh smo ugotavili, da organizem z oznako III.<sub>1</sub> ne raste, ampak rumeni. Sestavljeni so ga listi in manjši del kalusnega tkiva na bazi listov. Organizem z oznako III.<sub>2</sub>, je tvoril kalusno rast brez korenin. Kalus je bil obsežen, intenzivnejše zelene barve in je imel dva predela iz katerih so poganjali listi. Pred ponovno subkultivacijo smo slednjemu odrezali predela z listi ter s tem odstranili kalusno tkivo in tako pridobili vzorce III.<sub>5,6,7</sub>.

Po 29 dneh smo rastlini, ki sta se razvili iz celih semen, razrezali. Korenino smo ločili od vršička. Korenine smo subkultivirali v gojišče za indukcijo kalusa. Vršiček smo subkultivirali v gojišče za mikropropagacijo vršička s kotiledoni.

33. dan smo opazili okužbo z zeleno plesnijo v vzorcu z oznako III.<sub>1</sub>. Polovico tega vzorca smo prenesli na gojišče za mikropropagacijo vršička s kotiledoni.

Vzorce III.<sub>5,6,7</sub>, in VII smo precepili v sveža gojišča.

V gojišču za mikropropagacijo rastlin smo uspešno vzgojili le rastline, ki so bile pridobljene neposredno iz semen. Vsa ta semena smo prenesli iz gojišča za kalitev semen.

Organizmi, ki smo jih prenesli iz gojišča za mikropropagacijo vršička s kotiledoni z oznako 2m, niso razvili rastlinskih organov ampak so rastli v obliki kalusa (organizem z oznako VII). Enako velja za organizme iz gojišča za mikropropagacijo vršička s kotiledoni (organizmi z oznako III<sub>1</sub>,III<sub>2</sub>, in organizmi (III<sub>5,6,7</sub> pridobljeni iz organizma III<sub>2</sub>)).

#### 4.1.2.2 Gojišče za mikropropagacijo vršička s kotiledoni z oznako 2m

Gojišče namenjeno razraščanju vršičkov za nadaljnjo mikropropagacijo. Semena z oznako III in IV smo prerezali na pol in kultivirali obe polovici v stekleni posodici. 32. dan smo opazili, da v polovicah semen, kjer ni bilo kalčka (odstranjen je bil pri razrezu semena) ali pa je bil majhen, mikropropagacija ni uspela, zato ni bilo vidnega razraščanja. Drugi dve polovici sta se razvijali v nediferencirano tkivo (kalusna rast), klični listi so rumeneli.

Za rastline z oznakami: III<sub>2</sub>, IV<sub>2</sub>, VII., VIII., IX., so bili značilni pari večjih (kličnih) listov, ki so se razvili na gojišču za kalitev semen po 36 dneh in so se nahajali na robu rastline. Po nadaljnjih 32 dneh kultivacije so zrastli novi, manjši listi iz osrednjega dela rastline. Tvorbe korenin nismo opazili.



Slika 10: Vršiček s kotiledoni. Dva večja klična lista, ki sta se razvila na gojišču za kalitev semen. Eden od njiju se je posušil. Med njima so rastli manjši listki, ki so se razvili na gojišču za mikropropagacijo vršička s kotiledoni. Slikano na 65. dan kultivacije.

Preglednica 11: Časovni potek dogodkov in pregled odziva tkiva in organov na gojišču za mikropagacijo vršička s kotiledoni, skozi 346 dnevno obdobje subkultivacij v rastni komori, v steklenih posodicah ali petrijevkah, pri pogojih: 23 +/- 1 °C in pH 5,8, 16 ur svetlobe 8 ur teme. Rimske številke označujejo posamezne rastline, indeksi pa pomenijo klone te rastline.

Št. dni po zadnji subkultivaciji (št. dni predhodne kultivacije)	Oznaka	Opis stanja rastlinic
0		prva subkultivacija na gojišče za mikropagacijo vršička s kotiledoni
32	III. <sub>1</sub>	nediferencirano tkivo rjav (1x0,5 cm), dva klična lista, tisti, ki je ob robu posode rjav
32	IV. <sub>1</sub>	klična lista nepravilne oblike - deformirana, malo nedefiniranega tkiva na bazi
32	III. <sub>2</sub>	veliko malih listov okoli baze, ki je vsajena v gojišče; dva večja klična lista (4 cm) (pokončni-bled, stranski dolg in malce rjav na osrednji žili), tretji srednje velik list
32	IV. <sub>2</sub>	dva srednje dolga lista iz baze; eden majhen čisto v vršičku in mogoče še en manjši zraven; 4 listi
32	VII.	dva velika lista (2 cm) in trije majhni (0,5 cm)
32	VIII.	dva pokončna velika lista (manjši rjav), dva srednje velika (1 cm, 1,5 cm), dva majhna iz baze in eden čisto majhen list
32	IX.	dva velika lista (eden bledi, drugi se suši), dva (1 cm) iz baze; baza dvignjena od gojišča
0 (po 47 dneh)	III. <sub>2</sub> , IV. <sub>2</sub> , VII., IX.	rastlinam, odstranimo suhe ali rjaveče liste in morebitno kalusno tkivo ter jih subkultiviramo v sveža gojišča za mikropagacijo vršičkov s kotiledoni
33	VIII.	vršiček s kotiledoni slikamo
47	VIII.	tkivo je propadlo zaradi okužbe
0 (po 51 dneh)	IX	ravnamo enako kot pred 51 dnevi
0 (po 51 dneh)	IV. <sub>2</sub> , VII.	tkivi razdelimo na tri dele in z njim postopamo enako kot pred 51 dnevi (rimskim črkam dodamo indekse 1,2,3)

se nadaljuje

Preglednica 11: Časovni potek dogodkov in pregled odziva tkiva in organov na gojišču za mikropropagacijo vršička s kotiledoni, skozi 346 dnevno obdobje subkultivacij v rastni komori, v steklenih posodicah ali petrijevkah, pri pogojih: 23 +/- 1 °C in pH 5,8, 16 ur svetlobe 8 ur teme. Rimske številke označujejo posamezne rastline, indeksi pa pomenijo klone te rastline.

Št. dni po zadnji subkultivaciji (št. dni predhodne kultivacije)	Oznaka	Opis stanja rastlinic
0 (po 51 dneh)	III. <sub>1</sub> , III. <sub>2</sub> III. <sub>3</sub> , III. <sub>4</sub>	ker so poganjki bujno rastli, tkivo z oznako III. <sub>2</sub> razdelimo na štiri dele, in ga subkultiviramo na gojišče za mikropropagacijo rastlin ter na gojišče za mikropropagacijo vršičkov s kotiledoni
Št. dni po zadnji subkultivaciji (št. dni predhodne kultivacije)	Oznaka	Opis stanja rastlinic
27	IV. <sub>1</sub> , IV. <sub>2</sub> propadli	tri okužene rastline, nobena od posodic ni bila ovita s parafilmom, v rastni komori so okuženi tudi drugi vzorci
27 (po 51 dneh)	IV. <sub>3</sub> , IX	ni opazne spremembe rasti, še vedno prisotni majhni listi, kalusne rasti ni
27 (po 51 dneh)	III. <sub>4</sub> , VII. <sub>1</sub> , VII. <sub>2</sub>	značilen obsežni del kalusnega tkiva, iz katerega na določenih delih izraščajo skupki večjih listov, ki niso specifično radialno zgoščeni
27 (po 51 dneh)	VII. <sub>3</sub>	raste samo kalusno tkivo
27 (po 51 dneh)	III. <sub>4</sub> , VII. <sub>2</sub> , VII. <sub>3</sub>	tkivo odstopili za praktikum, katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin
38	IX propadel	okužba – bela nagubana kolonija
0	½MS nova sub. 1, ½MS IV, ½MS IV <sub>1</sub> , ½MS III,	vršička rastlin, ki sta naknadno zrasla iz semen subkultiviramo v gojišča za mikropropagacijo vršičkov s kotiledoni, nova subkultivacija
0	III <sub>1</sub>	kalusno tkivo iz gojišča za mikropropagacijo rastlin presadimo ponovno na gojišče za mikropropagacijo vršičkov s kotiledoni, nova subkultivacija

se nadaljuje

Preglednica 11: Časovni potek dogodkov in pregled odziva tkiva in organov na gojišču za mikropropagacijo vršička s kotiledoni, skozi 346 dnevno obdobje subkultivacij v rastni komori, v steklenih posodicah ali petrijevkah, pri pogojih: 23 +/- 1 °C in pH 5,8, 16 ur svetlobe 8 ur teme. Rimske številke označujejo posamezne rastline, indeksi pa pomenijo klone te rastline.

Št. dni po zadnji subkultivaciji (št. dni predhodne kultivacije)	Oznaka	Opis stanja rastlinic
104 (po 51 dneh)	VII <sub>1</sub>	kalus: slab, rjavo jedro ob robu prehaja v zelene dele
0 (po 121 in 30 dneh)		ponovna subkultivacija vseh osebkov na gojišče za mikropropagacijo vršička s kotiledoni
33 (po 121 dneh)	VII. <sub>1</sub>	kalus je rjavo-bež z malo belega poprha, ki ni videti kot plesen; sicer je krhek in močnato-grisaste strukture, je drobljiv
47 (po 121 dneh)	VII. <sub>1</sub>	obsežen del kalusnega tkiva posejan z posamičnimi majhnimi listki, ki so dolgi do 4 mm
47 (po 30 dneh)	III. <sub>1</sub>	(tkivo je preneseno iz gojišča za mikropropagacijo rastlin) vršiček brez vidne rasti
47 (po 30 dneh)	½MS nova sub. 1	eden del čista kalusna rast, drugi del ima velik vršiček, brez korenin, veliki listi se sušijo
47 (po 30 dneh)	½MS IV	tri ne-ukoreninjeni vršički, pri bazi rjavijo; pri enem kalusno tkivo privzdignilo vršiček
47 (po 30 dneh)	½MS IV <sub>1</sub>	dva vršička, eden majhen in minimalno vraščen v gojišče, drugi majhen brez vraščanja
	½MS III	tri večji in višji posamični listi, svetlo rjavi do zeleni na vrhu; na bazi rjavi sledi odebelinev, bež barve, in prehajanje v strukturo lista
0 (po 97 dneh)		zadnja subkultivacija pregleda rasti ni

V gojišču za mikropropagacijo vršička s kotiledoni z oznako 2m, smo vzgojili razraščen vršiček iz majhnih rastlin, katerim smo po 32 dneh odrezali korenine. Istočasno smo opazili nastajanje kalusnega tkiva na mestu reza. Ko smo razraščene vršičke razrezali na več delov se je pri rani zopet začelo razraščati kalusno tkivo. Če smo ga odstranili, se je ponovno razrastlo. Po več subkultivacijah so listi popolnoma odmrli ali pa so rasli ločeno drug od drugega na kalusnem tkivu. V drugem poskusu mikropropagacije vršičkov ni prišlo do tako obsežnega razraščanja vršičkov. Najuspešneje se je razrastel vršiček, katerega kotiledon se je dotikal gojišča.

Ko smo poskusili vršiček presaditi v gojišče za mikropropagacijo rastline z oznako 1m, ta ni razvil korenin, prav tako ni bistveno zrastel. Ob ponovnem prenosu na gojišče za mikropropagacijo vršička s kotiledoni, se po 47 dneh kultivacije vršiček ni razraščal, ampak se je rastlo kalusno tkivo (Priloga A1).

#### 4.1.3 Kalusna kultura

Kalus smo pridobili na dva načina, in sicer z neposredno indukcijo ali pa se je pojavil spontano. Pri neposredni indukciji smo semenu obrezali testo na različne načine in ga posadili v gojišče za neposredno indukcijo kalusa z oznako 2. Gojišče je bilo razlito v petrijevki. Rast smo spremajali dvakrat tedensko in po 38 dneh stanje pregledali ter kalus presadili na sveža gojišča iste sestave. Pogojev rasti nismo spremajali, da ne bi povzročali dodatnega stresa tkivu, kar bi posledično vodilo do izgube biomateriala, ki ga je bilo malo. Pri poznejših manipulacijah rastline ali delov rastlin je prihajalo do spontanega pojava kalusnega tkiva. To je nastajalo, kadar smo prenašali biomaterial iz enega na drugo gojišče s spremenjeno hormonsko sestavo.

##### 4.1.3.1 Neposredna indukcija kalusa

Steriliziranim semenom smo na različne načine odstranili testo, jih posadili na gojišče za neposredno indukcijo kalusa z oznako 2 in opazovali razvoj tkiva. Po 38 dneh kultivacije je kalusno tkivo zrastlo do pokrova petrijevke. Razdelili smo ga na manjše kose in subkultivirati na sveža gojišča.

Preglednica 12: Pregled stanja tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa, število uspešnih in neuspešnih kalitet semen, ki so bila predhodno sterilizirana, po 38 dneh kultivacije v petrijevkah pri  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 24-urno osvetlitvijo in pH 5,8.

Način priprave semena	stanje rasti po 38 dneh	število semen	Oznaka posamičnih semen, kjer smo neposredno inducirali kalusno rast
samo kalček razdeljen na dva dela	ni kalusne rasti	1	brez*
semena s prerezano ali obrezano testo	niso kalusne rasti	8	brez*
semena s prerezano ali obrezano testo	kalus neposredno inducirani	8	I.,II.,III.,IV.,V.,VI.,VII.,VIII.

\*Semenata, kjer ni bilo rasti nismo označili.

V preglednici 12 je pregledano stanje rastlin po 38 dneh inkubacije. Od skupaj 16 semen je vzklilo 8 semen, 8 semen pa ne. Torej je bila uspešnost 50 %. Poskusili smo kultivirati samo kalček, vendar ni prišlo do razvoja kalusa. Izkazalo se je, da smo pri dani sestavi gojišč, za razvoj tkiv v prvi fazi nujno potrebovali založno tkivo matičnega semena.

Iz semena sta se po 38 dneh razvila klična lista in hkrati kalusno tkivo, ki ga je bilo na začetku malo, potem pa vedno več. Klična lista sta postopoma izgubljala obliko (70 dni) in spremajala barvo v rjavo. Po več subkultivacijah (70 dni in več) so klični listi odmrli in ali so se deloma spremenili v kalusno tkivo.

Preglednica 13: Opis rasti tkiva, na gojišču za neposredno indukcijo kalusa iz predhodno steriliziranih semen, po 38 dneh kultivacije v petrijevkah, pri 23 +/- 1 °C, 24-urno osvetlitvijo in pH 5,8.

čas inkubacije	Oznaka	opis rasti na gojišču za neposredno indukcijo kalusa
38 dni	I.	del tkiva – kalusna rast; drugi del ima liste in ni opaziti rasti
	II.	del tkiva – kalusna rast; drugi del ima liste in ni opaziti rasti
	III.	malo kalusnega tkiva ( $\Phi^* = 1 \text{ cm}$ ); prehajanje v 2 lista
	IV.	obsežni del kalusa ( $\Phi = 2,5 \text{ cm}$ ); na robu prehaja v list
	V.	2 obsežna dela kalusa ( $\Phi = 2 \text{ cm}$ ); 2 majhna lista na vsakem od kalusov
	VI.	2 kalusa (1,3 cm - malo kalusnega tkiva); na koncih prehajanje v list
	VII.	1 kalus, izrazit nediferenciran ( $r = 2 \text{ cm}$ ); ne koncu prehaja v neznačilni list
	VIII.	1 mali kalus; vidni listi (1,5 cm)

Legenda:  $r^*$  je premer kalusnega tkiva.

Preglednica 14: Pregled odziva tkiva na gojišču za neposredno indukcija kalusa z oznako 2, 32. dan po subkultivaciji v petrijevkah, pri 23 +/- 1 °C, 24-urno osvetlitvijo in pH 5,8.

čas inkubacije	oznaka tkiva in indeksi	barva	opis
32 dni	I.	1) 2) 3) 4)	rahlo zelena do bež rahlo zelena do bež rahlo zelena do bež rjava
	II.	1) 2) 3) 4)	rahlo zelena do bela rahlo zelena do bela rahlo zelena do bela rahlo zelena do bela
	III.	1) 2)	rahlo zelena rahlo zelena
	IV.	1) 2) 3)	rahlo zelena do bela rahlo zelena do bela rahlo zelena do bela
32 dni	V.	1) 2) 3) 4)	rahlo zelena do bela bež-rjav zeleno-bež belo-zelen
	VI.	1) 2) 3)	zelen rjav /
	VII.	1)	rjava
	VIII.	1) 2)	intenzivno zelena zelena

Kalus je bil sprva intenzivno zelene barve pozneje je prehajal iz zelene v manj zeleno, svetlo zeleno in v bež barvo. Nekaj kalusov je ob robovih postajalo rjavih, kar je pomenilo odmiranje tkiva. Tega smo pri subkultivacijah odstranjevali. Biomaterial smo najprej, 70 dni gojili v petrijevkah in ga dvakrat subkultivirali. V tem času je tkivo zrastlo do pokrova petrijevk in na stičišču začelo rjaveti. Po 70 dneh smo začeli uporabljati steklene posodice , v katerih je bilo več prostora in tako se tkivo ni dotikalo sten.

Povprečna subkultivacija je trajala 20 dni. V tem času je kalus s premerom 1,5 do 2 cm zrasel do premera 5 do 6 cm. Ena subkultivacija je trajala 50 dni (Priloga A1). Pri slednji je tkivo preraslo celo gojišče, vendar je spremenilo barva iz svetlo zelene ali bež do temnejšega odtenka bež z rjavimi predeli.

#### 4.1.3.2 Habituiran kalus

Tkiva iz gojišča za neposredno indukcijo kalusa smo po 260 dneh kultivacije, presadili v steklene posodice z brezhormonskim gojiščem. Pogoji v rastni komori so: 23 +/- 1 °C, 24-urna osvetlitev, pH gojišča je 5,8. To smo storili za potrebe poskusa vpliva hormonov iz trdih gojišč na prirast mase kalusnega tkiva. Po 33 dnevih smo kalus subkultivirali na sveže brezhormonsko gojišče. 15. dan po zadnji presaditvi smo ugotovili, da vzorec z oznako VIII<sub>3</sub> raste počasneje kot tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa, nima rjavih delov in je rahlo zelen do bež. Poleg slednjega vzorca smo pridobili nove iz dveh celih rastlinic, naknadno vzgojenih s kalitvijo semen (semeni, ki jima sprva nismo rezali teste). Oznake teh tkiv so: GM, G. Man, G. Mand in Nova sub. 3.. Po 30 dneh smo tkivo ponovno presadili. 19 dni po zadnji kultivaciji smo kalus uporabili za visokotlačno plinsko kromatografijo. 33. dan rasti smo ugotovili, da je kalus z oznako GM, rjav do bež,nima poprha in je mal. Po 47 dneh subkultivacije smo opravili pregled rasti in stanja kalusa na brezhormonskem gojišču ter ga subkultivirali.

Preglednica 15: Pregled rasti in stanja kalusa na brez-hormonskem gojišču, po 47 dneh subkultivacije pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8.

čas inkubacije	oznaka	opis
47 dni	VIII <sub>3</sub>	lepa počasna rast, gladek na posameznih delih kalusna brst, na dnu rjav
47 dni	GM	lepa počasna rast, gladek na posameznih delih kalusna brst
47 dni	GM	kalusni brsti prerasli izvorni del kalusa, ki je precej rjav
47 dni	GM	izvorni del kalusa obsežnejši, rjav, malo kalusnih brstov
47 dni	GM	več kalusnega brsta, na bazi rjav do temno rjav
47 dni	GM	gladka rast, temno zelen
47 dni	GM	lepa rast, gladek, posamezni brsti na vrhu, spodaj rahlo rjav
47 dni	G. Man	lepa rast bel do svetlo zelen, na vrhu veliko kupolastih izrastkov
47 dni	G. Mand	lep, na spodnjem delu rahlo rjav, na vrhu kupolasti izrastki
47 dni	Nova sub. 3.	en del precej rjav, z obsežnimi kupolasti izrastki

Kalus v brezhormonskem gojišču je bil mehkejši, prožnejši, zdrizast in je tekočina iz njega prej stekla, kot iz tistega, ki je rastel na gojišču za neposredno indukcijo kalusa. Pri rokovovanju z njim smo morali biti previdnejši.

#### 4.1.3.3 Vpliv hormonske sestave trdnih gojišč na prirast mase kalusnega tkiva

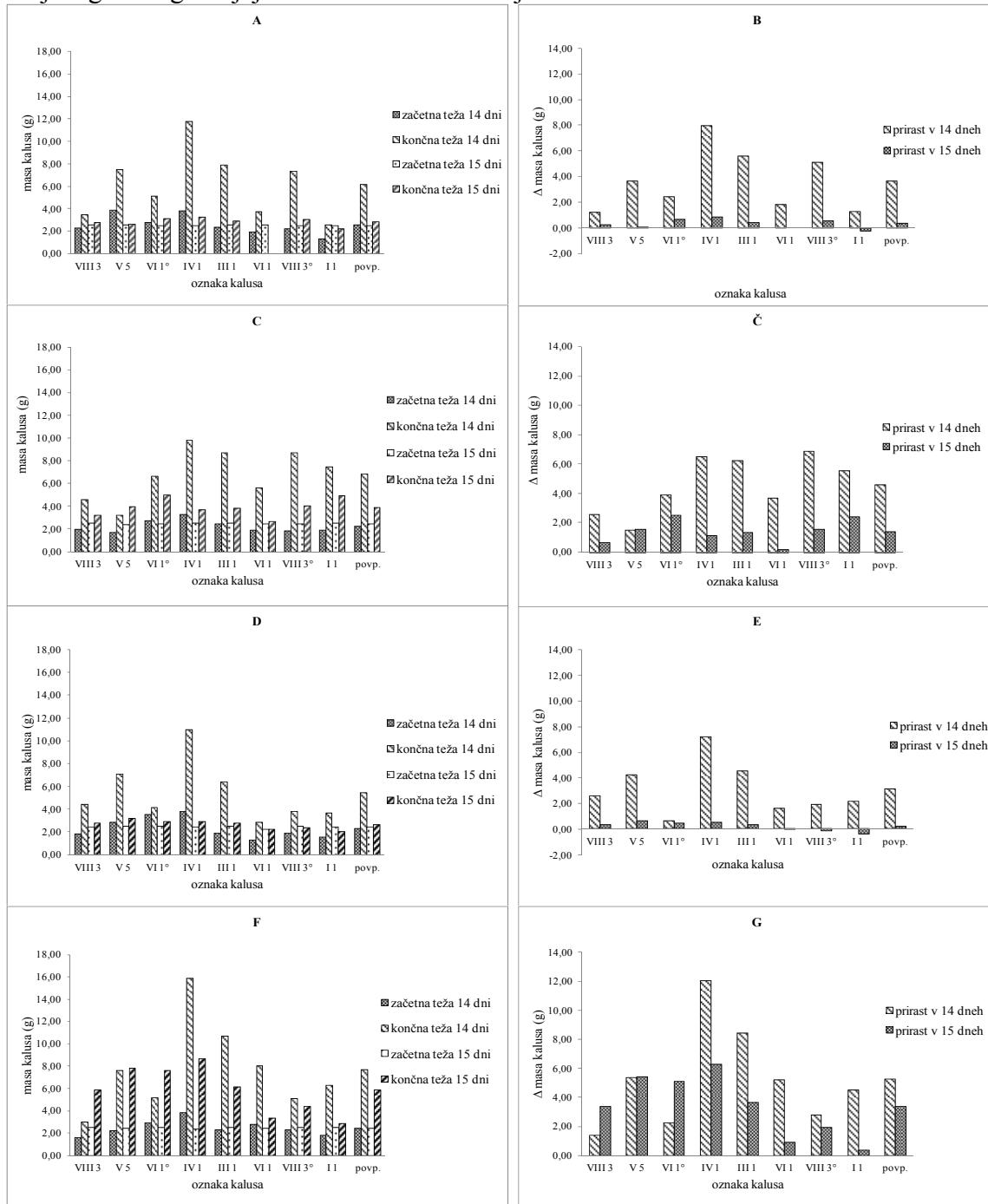
Pripravili smo štiri vrste gojišč, katerih sestava je navedena v poglavju 3.2.2.3 in sicer:

1. brezhormonsko gojišče (stolpčna diagrama A,B)
2. gojišče z 2 mg/L BAP (stolpčna diagrama C,C)
3. gojišče z 2 mg/L 2,4 D (stolpčna diagrama D,E)
4. gojišče z 2 mg/L 2,4 D in 2 mg/L BAP (stolpčna diagrama F,G)

Inkubirali smo jih v rastni komori pri temperaturi pri 23 +/- 1 °C in 24-urni osvetlitvi. Kalusu, pri 14 dnevni kultivaciji, smo na tehnici odstranjevali najslabše dele, dokler nismo dobili primerne mase tkiva za naslednjo 15-dnevno subkultivacijo.

Grafi A,C,D,F na sliki 12 nam kažejo maso celic po dveh zaporednih inkubacijah. Prvi stolpec predstavlja začetno maso celic v prvi, 14-dnevni periodi, drugi nam pove kolikšna je bila masa po 14 dneh rasti. Tretji stolpec ponazarja začetno maso biomase 15-dnevnega cikla, četrти pa končno maso tkiva po tem ciklu. Na desni strani slike 12 imamo grafe (oznake B,C,E,G), ki nam prikažejo prirast mase. Razliko med začetno in končno maso celic po 14-(prvi stolpec) in 15- dnevni (drugi stolpec) rasti. Zadnji štirje stolpcji v levih preglednicah z oznako »povp.« nam kažejo povprečno vrednost mase vseh vzorcev, na desni strani pa nam

zadnja stolpca z oznako »povp.« kažeta povprečno vrednost prirasta celokupnega biomateriala merjenega v odgovarjajočem časovnem obdobju.



Slika 11: Vpliv hormonske sestave trdih gojišč na prirast mase kalusnega tkiva; prvič v štirinajst in drugič v petnajst dnevniem ciklu (levi grafikoni) ter razlike prirasta mase v istih časovnih periodah (desni grafikoni).  
 A-B- Prirast (levo) in razlike prirasta kalusa (desno) v 14 in 15 dnevih kultiviranja na gojišču brez hormonov; C-Č- Prirast (levo) in razlike prirasta kalusa (desno) v 14 in 15 dnevih na gojišču z 2 mg/L hormona BAP; D-E- Prirast (levo) in razlike prirasta kalusa (desno) v 14 in 15 dnevih na gojišču z 2 mg/L hormona 2,4-D; F,G- Prirast kalusa v 14 in 15 dnevih na gojišču z 2 mg/L hormona BAP in 2 mg/L hormona 2,4-D; Če na desni strani ni stolpca, to pomeni, da je prišlo do okužbe oz. je kalus propadel.

Preglednica 16: Vpliv hormonske sestave trdnih gojišč: Vrsta gojišča, oznaka kalusnega tkiva, masa tkiva ob začetku 14 dnevne subkultivacije, masa tkiva po koncu 14 dnevne subkultivacije, razlika med končno in začetno težo tkiva po 14 dnevni kultivaciji, masa tkiva ob začetku 15 dnevne subkultivacije, masa tkiva po koncu 15 dnevne subkultivacije in razlika med končno in začetno težo tkiva po 15 dnevni kultivaciji.

vrsta gojišča	oznaka kalusa	začetna masa (g) 14 dni	končna masa (g) 14 dni	$\Delta$ mase po 14 dneh (g)	začetna masa (g) 15 dni	končna masa (g) 15 dni.	$\Delta$ mase po 15 dneh (g)
1	VIII 3	2,26	3,44	1,18	2,51	2,73	0,22
	V 5	3,82	7,46	3,64	2,51	2,56	0,05
	VI 1°	2,71	5,12	2,41	2,47	3,11	0,64
	IV 1	3,80	11,74	7,94	2,44	3,25	0,81
	III 1	2,33	7,89	5,56	2,49	2,89	0,4
	VI 1	1,87	3,69	1,82	2,51		
	VIII 3°	2,21	7,32	5,11	2,46	2,98	0,52
	I 1	1,27	2,52	1,25	2,44	2,19	-0,25
	povp.	2,534	6,148	3,61	2,479	2,816	0,341
2	VIII 3	1,94	4,54	2,60	2,49	3,17	0,68
	V 5	1,69	3,22	1,53	2,36	3,93	1,57
	VI 1°	2,69	6,60	3,91	2,45	4,96	2,51
	IV 1	3,28	9,79	6,52	2,49	3,66	1,17
	III 1	2,42	8,70	6,28	2,49	3,83	1,34
	VI 1	1,91	5,62	3,71	2,47	2,64	0,17
	VIII 3°	1,83	8,70	6,87	2,45	4,01	1,56
	I 1	1,88	7,46	5,58	2,49	4,9	2,41
	povp.	2,204	6,829	4,625	2,461	3,888	1,426
3	VIII 3	1,80	4,40	2,60	2,44	2,75	0,31
	V 5	2,85	7,09	4,24	2,48	3,13	0,65
	VI 1°	3,49	4,12	0,63	2,46	2,88	0,42
	IV 1	3,79	10,98	7,20	2,4	2,91	0,51
	III 1	1,86	6,41	4,55	2,45	2,77	0,32
	VI 1	1,23	2,82	1,59	2,23	2,17	-0,06
	VIII 3°	1,86	3,76	1,91	2,48	2,34	-0,14
	I 1	1,49	3,62	2,13	2,43	2,02	-0,41
	povp.	2,294	5,400	3,107	2,421	2,621	0,200
4	VIII 3	1,59	2,97	1,38	2,5	5,87	3,37
	V 5	2,25	7,64	5,39	2,45	7,85	5,4
	VI 1°	2,90	5,14	2,24	2,49	7,6	5,11
	IV 1	3,82	15,84	12,02	2,36	8,66	6,3
	III 1	2,27	10,70	8,43	2,47	6,11	3,64
	VI 1	2,78	8,00	5,22	2,45	3,33	0,88
	VIII 3°	2,29	5,07	2,78	2,48	4,41	1,93
	I 1	1,79	6,29	4,50	2,47	2,85	0,38
	povp.	2,462	7,706	5,245	2,459	5,835	3,376

Vsa gojišča smo inkubirali pod istimi pogoji pri 24-urni osvetlitvi,  $T=22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v rastni komori.

Kalusno tkivo je najbolje uspevalo v prvem 14 dnevнем obdobju, saj se je celokupna masa v prvem gojišču povečala za faktor 2,4, v drugem za faktor 3,1, v tretjem za faktor 2,3 in v četrtem za 3,1. V 15 dnevнем ciklu so ti faktorji bistveno manjši: v prvem 1,1, v drugem 1,6, v tretjem 1,1 in v četrtem 2,4. Najbolj produktivni sta bili tkivi z oznakama III<sub>1</sub> in IV<sub>1</sub>. V poskusu smo imeli dva para tkiv (VIII<sub>3</sub>, VIII<sub>3°</sub> in IV<sub>1</sub>, IV<sub>1°</sub>), ki sta izhajala iz istega semena. Rezultati glede produkcije mase ne kažejo nobene značilne povezave. Največ biomase je bilo proizvedene na gojišču z 2 mg/L hormona BAP in 2 mg/L hormona 2,4-D (69 g), sledilo je gojišče z 2 mg/L BAP (48 g), nato gojišče brez hormonov ( 31 g), najmanj biomase je bilo proizvedene v gojišču z 2 mg/L hormona 2,4-D (26 g).

## 4.2 CELIČNA KULTURA

To poglavje zajema rezultate o: vzpostavljivosti celične suspenzije, prirastu suspendirane biomase pri različnih koncentracijah in virih energije ter ogljika, optimalni sestavi gojišča za rast celične kulture, določanju prirasta suspendirane biomase, vplivu elicitorjev na prirast suspendirane biomase in vplivu elicitorjev na koncentracijo sekundarnega metabolita atropina v suspendirani biomasi.

### 4.2.1 Vzpostavitev celične suspenzije

Kalusno tkivo iz gojišča za neposredno indukcijo kalusa smo sterilno razdrobili na manjše kose, mu odstranili slabše dele in ga suspendirali v tri različna tekoča gojišča z 2 mg/L 2,4-D in 2 mg/L BAP za celično suspenzijo:

1. Tekoče gojišče z 2,4-D in BAP ter 20 g/L saharoze (1)
2. Tekoče gojišče z 2,4-D in BAP ter 40 g/L saharoze (2)
3. Tekoče gojišče z 2,4-D in BAP ter 40 g/L glukoze (3)

Gojišča s kalusom v petrijevkah smo previdno premešali in jih postavili v rastno komoro. Njihovo rast smo vizualno spremljali. Suspendirali smo naslednja tkiva:

Preglednica 17: Pregled stanja kalusa, ki smo ga suspendirali v tekoča gojišča (20 g/L saharoze (1); 40 g/L saharoze (2), 40 g/L glukoze (3)) z 2 mg/L BAP in 2 mg/L 2,4 D, pri  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24-urni osvetlitvi pH 5,8 ter 100 obratih na minuto.

oznaka	opis suspendiranega kalusa	novo gojišče
I <sub>1</sub>	bujen, svetlo zelen, malo rjavih delov	1
I <sub>2</sub>	svetlo zelen, več rjavih delov	2
I <sub>3</sub>	mehak	1 in 3
II <sub>1</sub>	svetlo zelen	2 in 3
II <sub>2</sub>	bujna rast	1 in 2
II <sub>3</sub>	bel do rahlo svetlo zelen	3
II <sub>4</sub>	bel z več rjavimi mesti	1
IV <sub>2</sub>	svetlo zelen do bel, velik	1 in 2
IV <sub>3</sub>	bel do svetlo zelen, velik	2 in 3
IV <sub>4</sub>	bel do svetlo zelen, velik	1 in 3
V <sub>1</sub>	svetlo zelen	1 in 2
V <sub>2</sub>	svetlo zelen	3

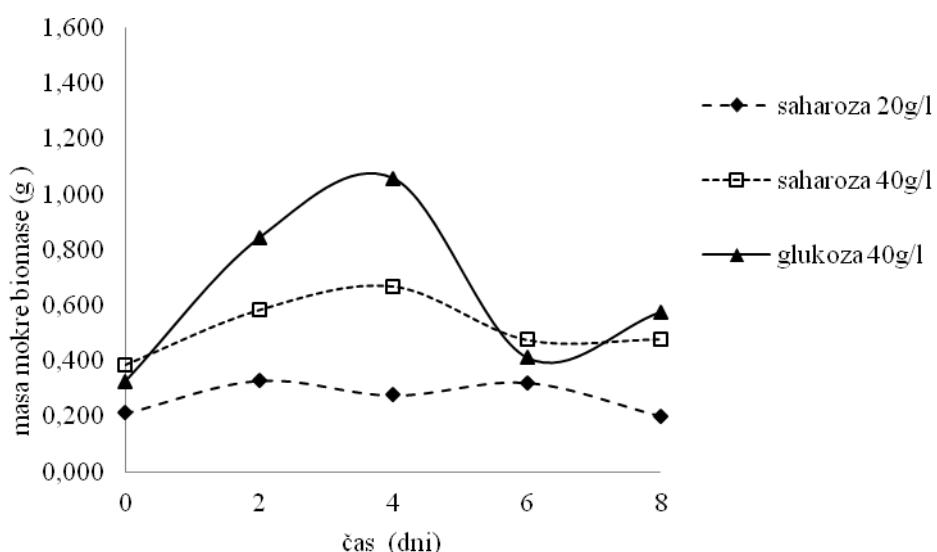
Po 12 dneh smo ugotovili, da kalusa ni bilo mogoče dobro razdrobiti. V tekočem gojišču so bili veliki kosi celičnih skupkov, ki so se razrastli v kalus značilen za trda gojišča. Tekoče gojišče v erlenmajerici je bilo povsem preraščeno, torej celice niso bile suspendirane. Tekoči del gojišča smo prelili v sterilne 100 mL erlenmajerice in mu dodali 25 mL svežega gojišča iste sestave. Pri tem smo združili vzorce, ki so rastli v istih gojiščih.

#### 4.2.2 Prirast suspendirane biomase pri različnih koncentracijah in virih energije ter ogljika

V poskusu smo določili optimalno sestavo gojišča glede vira ogljika oz. sladkorjev in koncentracije le teh.

Maso suhe in mokre biomase smo merili osem dni v dvodnevnih intervalih. 20 mL suspenzije smo dodali 25 mL tekočega gojišča z 2,4-D in BAP ter vse inkubirali v rastni komori, pri 24-urni osvetlitvi,  $T=22,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , na stresalniku pri 100 obratov na minuto. Gojišče z biomaso smo filtrirali in filtrirni ostanek stehtali.

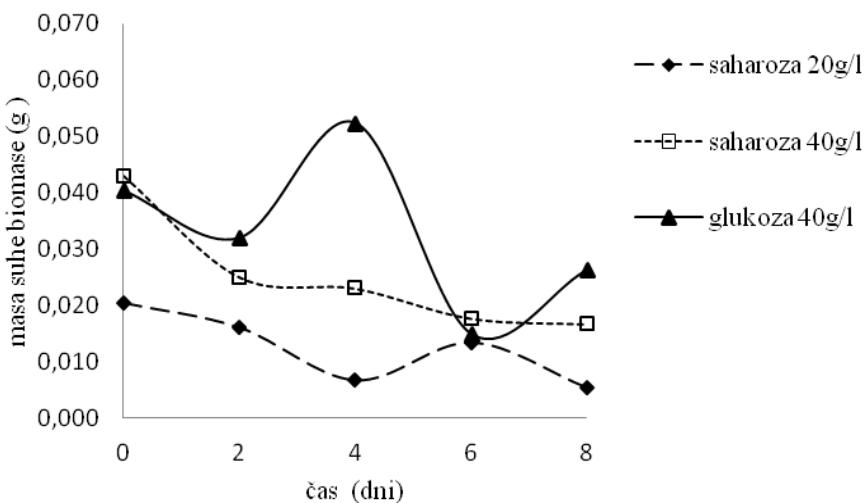
Naš namen je bil ugotoviti katero gojišče je najprimernejše za rast celične suspenzije.



Slika 12: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem mokre biomase; Primerjava rasti v gojiščih z različnimi koncentracijami in vrstami sladkorjev. Vzporedno smo gojili tri vzorce z 20 mL celične suspenzije in vsakemu dodali 25 mL tekočega gojišča z 2,4-D in BAP: 1. saharoza ( $c=20 \text{ g/L}$ ), 2. saharoza ( $c=40 \text{ g/L}$ ) in 3. glukoza ( $c=40 \text{ g/L}$ ). Vse smo inkubirali 8 dni na stresalniku (100 obratov na minuto), pri 24-urni osvetlitvi,  $T=22,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , v rastni komori. Gojišče z biomaso smo filtrirali in filtrirni ostanek stehtali.

Preglednica 18: Primerjava rasti z meritvijo mase mokre biomase v tekočih gojiščih z 2,4-D in BAP z različnimi koncentracijami in vrstami sladkorjev; 1 – 20 g/L saharoze, 2 - 40 g/L saharoze, 3 - 40 g/L glukoze. Čas kultivacije biomase, največja izmerjena masa mokre biomase, srednja izmerjena masa mokre biomase, najmanjša izmerjena masa mokre biomase, povprečna masa mokre biomase, standardna deviacija in koeficient variabilnosti.

čas (dan)	max masa celic (g)	srednja masa celic (g)	min masa celic (g)	povprečna masa m. biom. (g)	SD	KV (%)
20 g/L saharoze – masa mokre biomase						
0	0,319	0,208	0,107	0,211	0,106	50,2
2	0,532	0,369	0,085	0,329	0,226	68,8
4	0,342	0,273	0,213	0,276	0,064	23,4
6	0,584	0,232	0,149	0,322	0,2309	71,8
8	0,367	0,126	0,112	0,202	0,143	71,1
40 g/L saharoze – masa mokre biomase						
0	0,502	0,331	0,326	0,386	0,100	25,9
2	1,029	0,366	0,352	0,582	0,387	66,4
4	1,061	0,528	0,412	0,667	0,346	51,9
6	0,601	0,459	0,367	0,476	0,117	24,8
8	0,528	0,474	0,432	0,478	0,048	10,1
40 g/L glukoze – masa mokre biomase						
0	0,348	0,326	0,302	0,325	0,023	7,1
2	1,325	0,633	0,568	0,842	0,420	49,8
4	1,148	1,067	0,959	1,058	0,095	9,0
6	0,452	0,413	0,373	0,413	0,400	9,6
8	0,655	0,64	0,434	0,576	0,123	21,4



Slika 13: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem suhe biomase; Primerjava rasti v tekočih gojiščih z 2,4-D in BAP z različnimi koncentracijami in vrstami sladkorjev. Vzopredno smo gojili tri vzorce z 20 mL celične suspenzije in vsakemu dodali 25 mL gojišča: 1. saharoza ( $c=20 \text{ g/L}$ ); 2. saharoza ( $c=40 \text{ g/L}$ ); 3. glukozo ( $c=40 \text{ g/L}$ ). Vse smo 8 dni inkubirali na stresalniku (100 obratov na minuto), pri 24-urni osvetlitvi,  $T=22,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , v rastni komori. Gojišče z biomaso smo filtrirali, filtrirni ostanek posušili v sušilniku in stehtali.

Preglednica 19: Primerjava rasti z meritvijo mase suhe biomase v tekočih gojiščih z 2,4-D in BAP, z različnimi koncentracijami in vrstami sladkorjev; 1 – 20 g/L saharoze, 2 - 40 g/L saharoze, 3 - 40 g/L glukoze. Čas kultivacije biomase, največja izmerjena masa celic, srednja izmerjena masa celic, najmanjša izmerjena masa celic, povprečna celična masa, standardna deviacija in koeficient variabilnosti.

čas (dan)	max masa celic (g)	srednja masa celic (g)	min masa celic (g)	povprečje mas celic (g)	SD	KV (%)
20 g/L saharoze – suha masa						
0	0,022	0,021	0,018	0,020	0,002	10,2
2	0,036	0,010	0,002	0,016	0,018	111,1
4	0,008	0,007	0,005	0,007	0,002	22,9
6	0,026	0,008	0,006	0,013	0,011	82,6
8	0,013	0,002	0,001	0,005	0,007	124,8
40 g/L saharoze – suha masa						
0	0,049	0,040	0,040	0,043	0,005	12,1
2	0,052	0,012	0,011	0,025	0,023	93,6
4	0,043	0,014	0,012	0,023	0,017	75,4
6	0,018	0,018	0,017	0,018	0,001	3,3
8	0,02	0,018	0,012	0,017	0,004	25,0
40 g/L glukoze – suha masa						
0	0,042	0,040	0,039	0,040	0,002	3,8
2	0,064	0,020	0,012	0,032	0,028	87,5
4	0,053	0,053	0,051	0,052	0,001	2,2
6	0,017	0,014	0,014	0,015	0,002	11,5
8	0,034	0,027	0,018	0,026	0,008	30,5

Standardna deviacija in koeficient variabilnosti sta tudi tu pokazatelja da e ta metoda inokulacije neustrezna. smo kasneje dokazali v poskusu (Določanje natančnosti odmerjanja biomase s pipeto za namen inokulacije celične suspenzije) poglavje 4.2.2.1; preglednica 20. Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je najprimernejše tekoče gojišče z 2,4-D in BAP za gojenje suspenzije tisto s 40 g/L glukoze, saj je tu nastalo največ biomase. Biomasa je bila dobro suspendirana, celice so rastle posamič ali v zelo majhnih skupkih, ki so bili neopazni s prostim očesom.

#### 4.2.2.1 Določanje mase biomase v celični suspenziji odvzeti s pipeto.

V tem poskusu smo določili maso biomase v 10 mL suspenzije, ki smo jo odvzeli iz elrenmajerice, v kateri smo jo gojili, po predhodnem mešanju z 20 mL pipeto. S tem smo hoteli ugotoviti, če je ta način odmerjanja dovolj natančen za kvantitativen odvzem mase biomase iz vzorca. Prednost tega načina je manjši stres za celice, manjše tveganje okužb in lažje ter hitrejše rokovanje z le-temi.

Ta del naloge smo opravili po neuspelem prvem predposkusu (primerjava rasti celične suspenzije pri različnih koncentracijah in virih energije ter ogljika).

Preglednica 20: Tehtanje biomase v tekočem gojišču (40 g/L glukoze (3)) z 2 mg/L BAP in 2 mg/L 2,4 D. 10 mL suspenzije odvzete s pipeto posušimo s pomočjo podtlaka ter stehtamo.

mokra masa biomase (g)	suha masa; prva meritev (g)	suha masa; druga meritev (g)	% suhe snovi; prva meritev	% suhe snovi; druga meritev
3,235	0,113	0,105	3,5	3,3
4,342	0,144	0,136	3,3	3,1
3,248	0,111	0,105	3,4	3,2
4,382	0,143	0,135	3,3	3,1
4,114	0,143	0,134	3,5	3,2
4,705	0,144	0,136	3,1	2,9
3,106	0,104	0,098	3,3	3,2
3,876	0,129	0,121	= povprečna vrednost	
0,660	0,019	0,018		= SD
17,03	14,33	14,58		= KV( %)

Povprečna mokra masa biomase je znašala 3,88 g, standardna deviacija 0,66 in koeficient variabilnosti v % 17,03. Suho težo biomase smo merili v dveh paralelkah. V prvem primeru je znašala povprečna masa 0,1289 g, standardna deviacija 0,0185 in koeficient variabilnosti v % 14,33. Za drugi primer zanašajo te vrednosti v enakem zaporedju: 0,121 g, 0,018 in 14,58 %.



Slika 14: Mikroskopska slika celične suspenzije, ki je vsebovala 40 g/L glukoze. Črta na levi strani predstavlja dolžino 100  $\mu\text{m}$ . Celice rastejo posamič ali v majhnih skupkih imenovanih celični agregati. Suspenzijo smo gojili 8 dni na stresalniku (100 obratov na minuto), pri 24-urni osvetlitvi,  $T=22,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 5,8, v rastni komori.

Zaradi nehomogenosti celične suspenzije je inokulacija erlenmajeric z 20 mL pipeto neprimerna. Na ta način nismo dosegli želene natančnosti pri odmerjanju suspendirane biomase, ki je bila pomembna za nadaljnje delo. V poglavju 3.3.4.2 je opisana metoda filtracije suspendirane biomase, ki smo jo nato aseptično stehtali ter kvantitativno prenesli v gojišče. Pri nadalnjih inokulacijah tekočih gojišč smo uporabljali opisano metodo.

Zadnjih vzorcev tega poskusa nismo tehtali, ker smo potrebovali suspenzijo za nadaljno delo.

#### 4.2.2.2 Subkultivacija celične suspenzije

Po poskusu določitve rastne krivulje smo zadnje tri paralelke vzorca (10. dan) ohranili za nadaljnje delo in ohranitev suspenzije. Celice so sedaj rastle posamič, nismo opazili več celičnih skupkov. Erlenmajerice  $\frac{1}{2}$  ure nismo mešali, da se je biomasa posedla na dno, odlili smo starega in dolili 50 mL novega gojišča. Imeli smo tri vrste suspenzij in sicer eno z 20 g/L saharoze (z oznako: 1), drugo s 40 g/L saharoze (z oznako: 2) ter tretjo s 40 g/L glukoze (z oznako: 3) ter devet paralelk. Tri suspenzije so bile okužene; dve iz gojišča 1 in ena iz gojišča 2. 50 mL pripadajočega (1, 2, 3) tekočega gojišča z 2 mg/L 2,4-D in 2 mg/L BAP za celično suspenzijo s suspendirano biomaso je rastlo v 100 mL erlenmajericah, 10 dni pri  $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 24-urni osvetlitvi, pH 5,8, na stresalniku pri 100 obratih na minuto. Sledila je subkultivacija v

sveža gojišča, in sicer tako, da smo suspenziji dodali 50 mL ustreznega gojišča (1, 2 oziroma 3), premešali in previdno prelili v 200 mL erlenmajerice. Po 21 dneh smo ponovno subkultivirali suspenzije, kot je prikazano v preglednici 17.

Preglednica 21: Subkultivacije celične suspenzije z dodatkom svežega tekočega gojišča (20 g/L saharoze (1); 40 g/L saharoze (2), 40 g/L glukoze (3)) z 2 mg/L BAP in 2 mg/L 2,4 D in prostornina nove erlenmajerice, po 21 dneh subkultivacije pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi, pH 5,8 ter 100 obratih na minuto.

oznaka gojišča	sestava (sveže gojišče + prostornina suspenzije)	prostornina subkult. erlenmajerice
1	50 mL + 50 mL	200 mL
2	10 mL + 25 mL	100 mL
2	25 mL + 25 mL	200 mL
2	30 mL + 50 mL	500 mL
3	50 mL + 80 mL	500 mL
3	50 mL + 100 mL	500 mL

19 dni pozneje smo pregledali stanje celičnih suspenzij in stehtali biomase, kar prikazujeta preglednici 18. Suspenzija z oznako 1 je postala temno rjave barve, zato smo jo izločili. Suspendirane celice v tej erlenmajerici so propadle.

Preglednica 22: Pregled stanja suspendiranih celic v tekočih gojiščih (20 g/L saharoze (1); 40 g/L saharoze (2), 40 g/L glukoze (3)) z 2 mg/L BAP in 2 mg/L 2,4 D, po 19 dneh subkultivacije , pri 23 +/- 1 °C, pH 5,8 ter 100 obratih na minuto.

oznaka gojišča	sestava suspenzije; $V_{\text{suspenzije}} + V_{\text{gojišča}}; V_{\text{erlenmajerice}}$	opis suspenzije
1	50 mL + 50 mL; 200 mL	temno rjavo-bele kepice kalusa, $\Phi = 1-2$ mm
2	10 mL + 25 mL; 100 mL	bele suspend. celice na dnu, slabo mešanje
2	25 mL + 25 mL; 200 mL	rjavo-zeleni celični skupki in celična suspenzija male gostote
2	20 mL + 100 mL; 500 mL	svetlo zelena z veliko gostoto
3	50 mL + 80 mL; 500 mL	rahlo rjavi, veliko gostota
3	50 mL + 100 mL; 500 mL	rahlo rjavi, veliko gostota

Celice smo pred tehtanjem sterilno odcedili in biomaso stehtali v laminariju. Po tehtanju, je bilo biomase iz gojišča 3 več, zato smo jo razdelili na tri dele. Dva smo suspendirali v gojišče 3, enega pa v gojišče 2. Suspendirane celice iz gojišča 2 smo prenesli v gojišče 2.

Preglednica 23: Tehtanje biomase v tekočih gojiščih po sušenju s pomočjo podtlaka(40 g/L saharoze (2), 40 g/L glukoze (3)) z 2 mg/L BAP in 2 mg/L 2,4 D, po 19 dneh subkultivacije , pri 23 +/- 1 °C, pH 5,8 ter 100 obratih na minuto.

oznaka gojišča	masa cedila	zatehta	masa biomase
2	44,879 g	101,046 g	56,167 g
3	44,090 g	96,934 g	52,844 g
		95,601 g*	51,601 g*
3	43,591 g	68,725 g**	25,134 g**

\* drugo tehtanje istega vzorca

\*\* iz vzorca smo dvakrat vzeli 25 mL vzorca in ga nato precedili

Preglednica 24: Pregled stanja suspendiranih celic v tekočih gojiščih (40 g/L glukoze (3), 40 g/L saharoze (2)) z 2 mg/L BAP in 2 mg/L 2,4 D, po 17 in 20 dneh subkultivacije, pri 23 +/- 1 °C, pH 5,8 ter 100 obratih na minuto.

čas po subkultivaciji (dan)	oznaka gojišča	opis suspenzije	tip svežega gojišča
17	2	bež barve, dobra rast	100 mL gojišča 2 (g <sub>2</sub> )
17	2	bež do svetlo rjava	100 mL gojišča 2 (g <sub>2</sub> )
17	3	bež barve, dobra rast	90 mL gojišča 3 (g <sub>3</sub> )
17	3	rahlo zelena do bež, dobra rast	100 mL gojišča 3 (g <sub>3</sub> )
20	2	bež zelene barve, dobra rast	100 mL gojišča 2 (g <sub>2</sub> )
20	2	temno rjava	100 mL gojišča 2 (g <sub>2</sub> )
20	3	bež zelene barve, dobra rast	90 mL gojišča 3 (g <sub>3</sub> )
20	3	bež zelene barve, dobra rast	100 mL gojišča 3 (g <sub>3</sub> )

Gojišče z oznako 3 (tip gojišča 100 mL gojišča 3 (g<sub>3</sub>)) smo uporabili za drugi poskus določanja rastne krivulje.

Celična suspenzija je najbolje rastla v gojišču z 40 g/L glukoze, kar razberemo iz mase biomase, ki smo jo tehtali. Prav tako je v tem gojišču najdlje uspevala (priloga B1).

#### 4.2.2.3 Subkultivacija celične suspenzije v tekoča gojišča z različnimi sestavami hormonov

V tem poskusu smo želeli ugotoviti do kakšnih morfološki sprememb in sprememb rasti je prihajalo, če smo suspenziji dodajali hormone. Gojišča so imela enako sestavo, kot pri poskusu: vpliv hormonov na rast kalusa, le da jim nismo dodali agarja in sicer:

1. brezhormonsko gojišče
2. gojišče z 2 mg/L BAP
3. gojišče z 2 mg/L 2,4 D
4. gojišče z 2 mg/L 2,4 D in 2 mg/L BAP

V 120 mL ustreznegra gojišča smo dodali 60 mL dobro premešane suspenzije in jih subkultivirali na stresalniku v rastni komori.

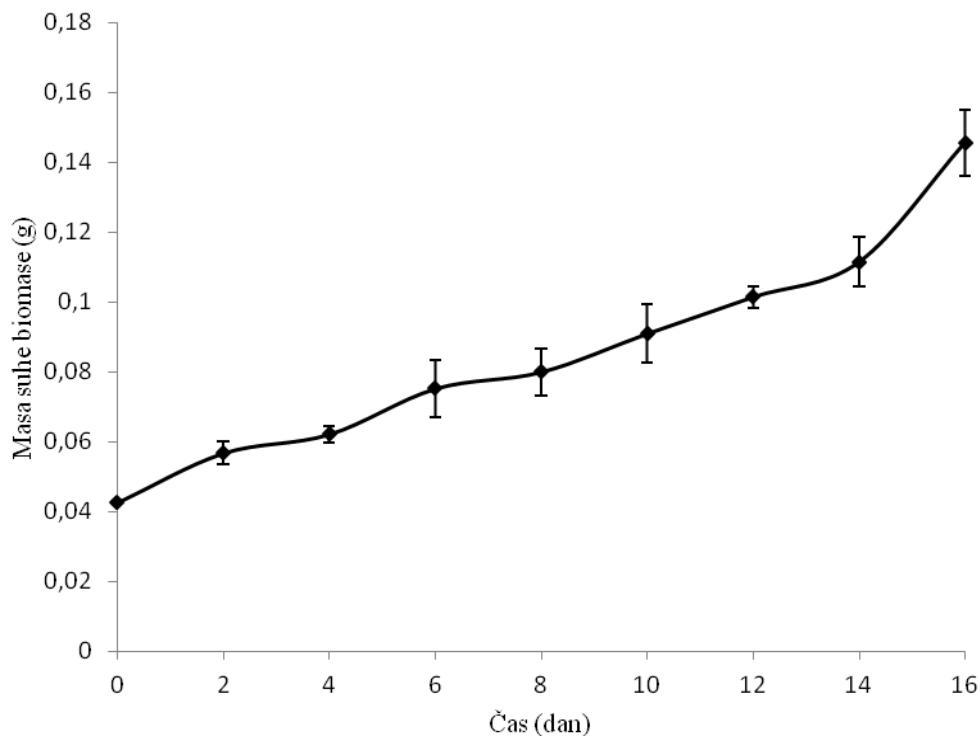
Preglednica 25: Odziv celične suspenzije po 33dneh subkultivacije v tekočih gojiščih s 40 g/L glukoze in: 1. brez dodanih hormonov; 2. z dodatkom 2 mg/L BAP; 3. z dodatkom 2 mg/L 2,4 D in 4. z dodatkom 2 mg/L BAP ter 2 mg/L 2,4 D. Celične suspenzije gojimo v 50 mL erlenmajericah na stresalniku, pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi, pH 5,8 ter 100 obratih na minuto

oznaka gojišča	sestava gojišča	opis suspenzije
1	brezhormonsko gojišče	rjave barve, vsebuje velike koščke kalusa; gostota suspenzije je majhna; gojišče je rjavo-rdeče barve
2	gojišče z 2 mg/L BAP	živo zeleni kosi kalusa s premerom od 1 do 6 mm; gostota suspenzije je srednja; gojišče je rjavo-rdeče barve
3	gojišče z 2 mg/L 2,4 D	temno sivi in zelene koščki kalusa; gostota suspenzije je majhna, nekaj zelo dobro suspendiranih celic (svetlo bela meglina)
4	gojišče z 2 mg/L 2,4 D in 2 mg/L BAP	bež do svetlo rjava barva; gostota suspenzije je srednja

Po 33 dneh subkultivacije na stresalniku pri 100 obratih na minuto, v rastni komori pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8, smo ugotavljali, da so bili v brezhormonskem gojišču (oznaka 1) veliki koščki kalusa rjave barve, gostota suspenzije je bila majhna in da je bila barva gojišča rjavo rdeča. Gojišče z 2 mg/L BAP (oznaka 2) je vsebovalo živo zelene kose kalusa s premerom od 1 do 6 mm, gostota suspenzije je bila srednja in da je gojišče spremenilo barvo v rjavo rdeče. Gojišče z oznako 3, v katerem smo imeli 2 mg/L 2,4 D je vsebovalo temno sive in zelene koščke kalusa, nekaj celic je bilo zelo dobro suspendiranih, opazili smo belo meglino. V slednjem gojišču je bila gostota suspenzije majhna. Za gojišče 4 z 2 mg/L 2,4 D in 2 mg/L BAP je bila značilna bež do svetlo rjava barva in srednja gostota suspenzije.

#### 4.2.3 Prirast mase suspendirane biomase

Iz predhodnih poskusov smo ugotovili, da kultura suspendiranih celic najbolje uspeva v tekočem gojišču 2,4-D in BAP z 40 g/mL glukoze, na stresalniku (100 obratov na minuto), v rastni komori pri 24-urni osvetlitvi, T=22,5 °C ± 0,5 °C, pH 5,8.

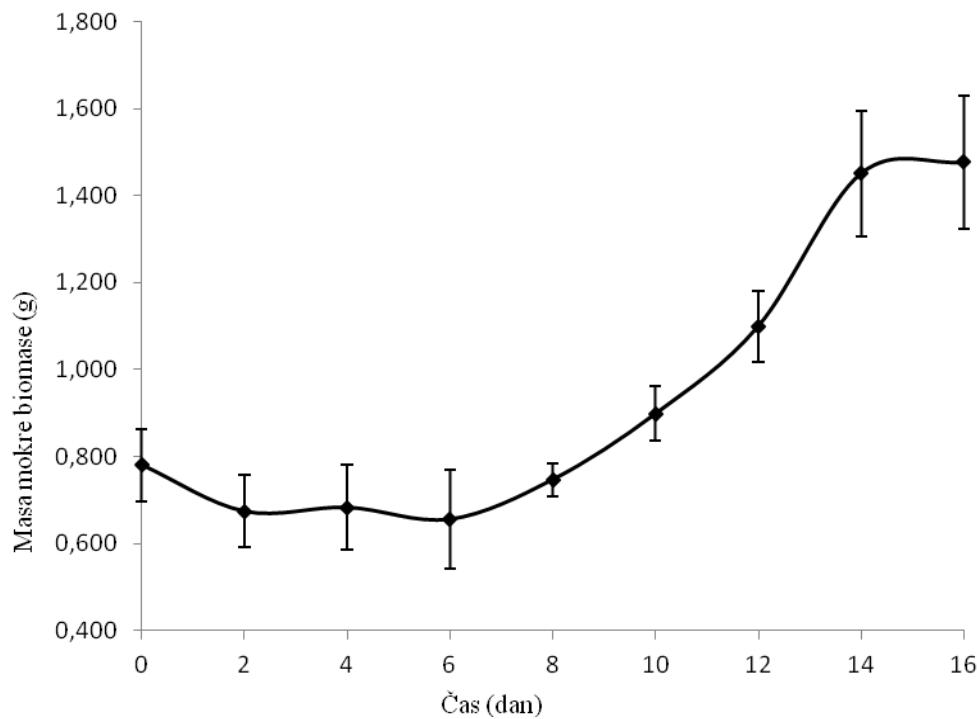


Slika 15: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem suhe biomase; Točka na grafu predstavlja povprečje treh vzporednih vzorcev, pripravljenih iz 1 g suspendirane nato pa filtrirane celične suspenzije. Biomaso smo kultivirali v erlenmajericah, v katere smo dodali 20 mL tekočega gojišča z 2,4-D in BAP in z glukozo ( $c=40$  g/L). Inkubirali smo jih 14 dni na stresalniku (100 obratov na minuto), pri 24-urni osvetlitvi,  $T=22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v rastni komori. Gojišče smo filtrirali, filtrirni ostanek posušili v sušilniku in stehtali.

Preglednica 26: Prirast suhe biomase; količina nastale biomase (suhu masa), začetna masa biomase – inokuluma, masa suhega papirja, masa papirja z biomaso po filtraciji, masa suhe biomase, povprečna masa biomase pri treh ponovitvah in standardna deviacija.

čas (dan)	ponovitev	zač. masa biomas. (g)	m. suh. pap. (g)	m. suh. pap. + biomas. (g)	m. suh. biomas. (g)	povpr. (g)	SD
0	1	1,001	0,376	0,4244	/		
0	2	1,003	0,377	0,4267	/		
0	3	1,000	0,365	0,4176	0,0526	0,0526	/
2	1	1,001	0,366	0,4260	/		
2	2	1,002	0,38	0,4332	0,0532		
2	3	0,999	0,376	0,4331	0,0571	0,0568	0,0034
4	1	1,000	0,386	0,4484	0,0624		
4	2	0,999	0,379	0,4434	0,0644		
4	3	1,001	0,369	0,4287	0,0597	0,0622	0,0024
6	1	0,998	0,349	0,4210	0,0720		
6	2	1,003	0,373	0,4576	0,0846		
6	3	1,001	0,368	0,4370	0,0690	0,0752	0,0083
8	1	0,999	0,353	0,4267	0,0737		
8	2	1,003	0,372	0,4511	0,0791		
8	3	0,997	0,364	0,4511	0,0871	0,0800	0,0067
10	1	1,002	0,346	0,4305	0,0845		
10	2	1,004	0,364	0,4643	0,1003		
10	3	1,004	0,372	0,4600	0,0880	0,0909	0,0083
12	1	0,998	0,367	0,4719	0,1049		
12	2	0,999	0,347	0,4463	0,0993		
12	3	1,004	0,371	0,4711	0,1001	0,1014	0,0030
14	1	0,999	0,355	0,4722	0,1172		
14	2	1,003	0,365	0,4788	0,1138		
14	3	1,000	0,368	0,4714	0,1034	0,1115	0,0072
16	1	0,999	0,354	0,5104	0,1564		
16	2	1,002	0,363	0,5014	0,1384		
16	3	1,000	0,362	0,5041	0,1421	0,1456	0,0095

Rastna krivulja nam prikazuje razmeroma konstanten prirast mase suhe biomase do dneva 14, kjer se prirast značilno poveča. Standardna deviacija je precej nižja od tiste pri poskusu: Primerjava rasti celične suspenzije pri različnih koncentracijah sladkorjev. Metoda z vakuumskim cejenjem in tehtanjem v brezprašni komori, boljša od metode odvzemanja biomase s pipeto.



Slika 16: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem mokre biomase; Točka na grafu predstavlja povprečje treh vzorednih vzorcev, pripravljenih iz 1 g suspendirane nato pa filtrirane celične suspenzije. Biomaso smo kultivirali v erlenmajericah v katere smo dodali 20 mL tekočega gojišča z 2,4-D in BAP z glukozo ( $c=40$  g/L). Sledila je 16 dnevna inkubacija na stresalniku (100 obratov na minuto), pri 24-urni osvetlitvi,  $T=22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v rastni komori. Vsak drugi dan smo odvezeli tri vzorce, jih filtrirali in filtrirni ostanek stehtali.

Preglednica 27: Krivulja rasti celične kulture z merjenjem mokre biomase; začetna masa biomase – inokulum, masa mokrega papirja, masa papirja z biomaso po filtraciji, količina nastale biomase (mokra masa), povprečna masa biomase treh ponovitev in standardna deviacija.

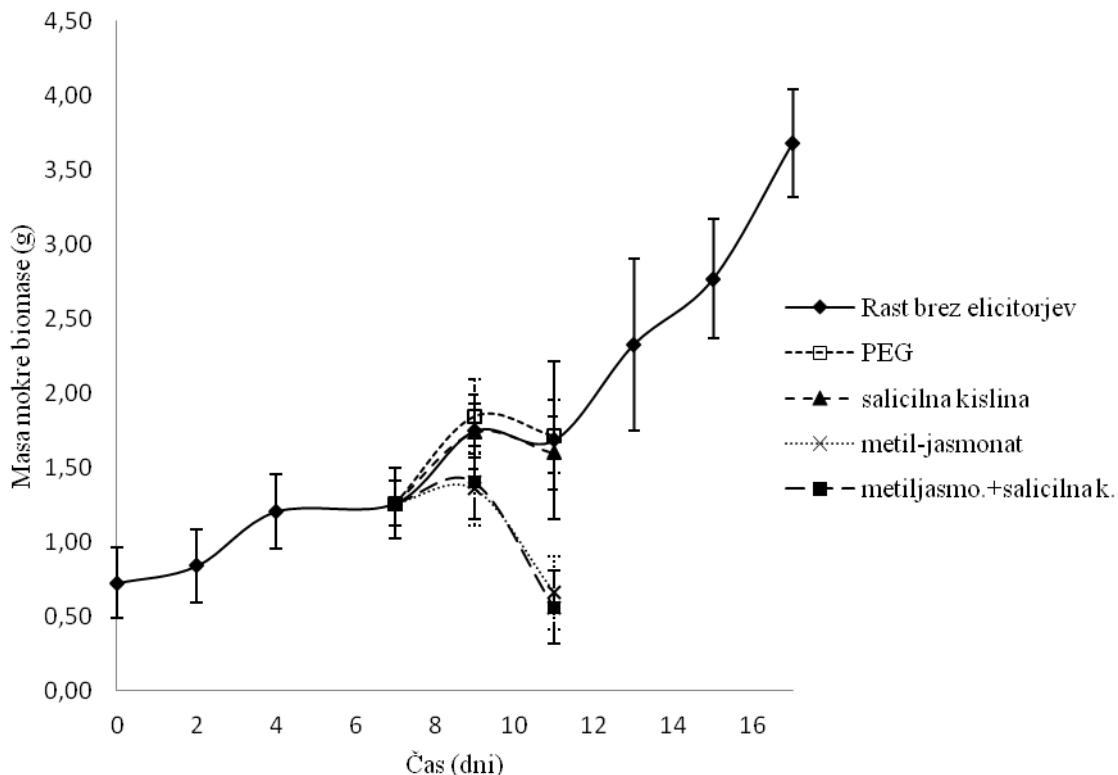
čas (dan)	gojišče	zač. masa biomas. (g)	m. mok. pap. (g)	m. mok. pap. + biomas. (g)	m. mok. biomas. (g)	povpr. (g)	SD	KV(%)
0	1	1,001	0,934	1,463	/			
0	2	1,003	0,914	1,491	/			
0	3	1,000	0,877	1,658	0,781	0,781	/	/
2	1	1,001	0,897	1,656	/			
2	2	1,002	0,791	1,406	0,615			
2	3	0,999	0,754	1,487	0,733	0,674	0,083	12,38
4	1	1,000	0,948	1,565	0,617			
4	2	0,999	0,784	1,578	0,794			
4	3	1,001	0,921	1,559	0,638	0,683	0,097	14,16
6	1	0,998	0,857	1,489	0,632			
6	2	1,003	0,813	1,592	0,779			
6	3	1,001	0,93	1,486	0,556	0,656	0,113	17,29
8	1	0,999	0,829	1,542	0,713			
8	2	1,003	0,787	1,574	0,787			
8	3	0,997	0,763	1,504	0,741	0,747	0,037	5,00
10	1	1,002	0,708	1,585	0,877			
10	2	1,004	0,772	1,741	0,969			
10	3	1,004	0,807	1,657	0,850	0,899	0,062	6,94
12	1	0,998	0,826	1,924	1,098			
12	2	0,999	0,735	1,674	0,939			
12	3	1,004	0,746	1,833	1,087	1,041	0,089	8,53
14	1	0,999	0,849	2,203	1,354			
14	2	1,003	0,939	2,322	1,383			
14	3	1,000	0,791	2,408	1,617	1,451	0,144	9,94
16	1	0,999	0,785	2,267	1,482			
16	2	1,002	0,823	2,451	1,628			
16	3	1,000	0,756	2,077	1,321	1,477	0,154	10,40

Ob začetku subkultivacije se je masa mokre biomase zmanjšala za 20 do 30 %, glede na začetno maso biomase oz. inokulum. Mokra masa je nato še padala do dneva 6, nato pa je začela strmo naraščati do dneva 14. Po tem je prirast mase le še zmerno narastel do dneva 16. Standardna deviacija (SD) je bila tu nekoliko večja kot pri masi suhe biomase, vendar v povprečju manjša kot pri odmerjanju biomase s pipeto.

Zanimiva je primerjava rasti mase mokre in suhe biomase. Pri prvi smo videli skoraj eksponentno rast z značilno fazo prilagajanja, medtem ko prirast suhe biomase poteka skoraj linearно. 14 dan se je zgodil preobrat, saj se je prirast mokre biomase skoraj ustavil, prirast suhe biomase pa je nakazoval tendenco eksponentne rasti.

#### 4.2.4 Vpliv elicitorjev na prirast mase suspendirane biomase

Pri poskusu smo določali maso mokre biomase in vsebnost atropina v suspendiranih celicah.



Slika 17: Prirast biomase v tekočem gojišču z 2,4-D in BAP in s 40 g/L glukoze: brez dodanih elicitorjev ali z dodatkom polietilen glikola, salicilne kisline, metil jasmonata in kombinacijo slednjega ter salicilne kisline. Vzorce smo gojili v rastni komori, na stresalniku (100 obratov na minuto), pri 24-urni osvetlitvi, T=22,5 °C ± 0,5 °C. Gojišče smo filtrirali in filtrirni ostanek stehtali (masa mokre biomase).

Preglednica 28: Prirast biomase v tekočem gojišču z 2,4-D in BAP in s 40 g/L glukoze; čas merjen v dneh od inokulacije, tip gojišča: brez dodanih elicitorjev oznaka (goj 3), z dodatkom polietilen glikola oznaka (goj PEG), z dodatkom salicilne kisline oznaka (goj SK), z dodatkom metiljasmonata oznaka (MeJ) in z dodatkom kombinacije slednjega ter salicilne kisline oznaka (SK+MeJ), masa inokuluma, masa mokrega filtrirnega papirja, masa mokrega filtrirnega papirja in biomase po filtraciji, masa mokre biomase, povprečje mas mokre biomase izmerjene na v tem dnevnu in standardna deviacija.

čas (dan)	oznaka gojišča	masa inok uluma (g)	m. mok. pap. (g)	m. mok. pap. + biomas. (g)	m. mok. biomas. (g)	Povpr. (g)	SD	KV(%)
0	goj 3	1,493	0,943	1,890	0,95			
0		1,498	0,943	1,690	0,75			
0		1,505	0,977	1,456	0,48	0,72	0,24	32,4
2	goj 3	1,505	0,912	1,601	0,69			
2		1,504	0,809	1,934	1,13			
2		1,504	0,794	1,496	0,70	0,84	0,25	29,6
4	goj 3	1,509	0,901	2,248	1,35			
4		1,505	1,030	2,378	1,35			
4		1,501	1,046	1,965	0,92	1,20	0,25	20,5
7	goj 3	1,508	0,857	2,010	1,15			

se nadaljuje

Preglednica 28: Prirast biomase v tekočem gojišču z 2,4-D in BAP in s 40 g/L glukoze; čas merjen v dneh od inokulacije, tip gojišča: brez dodanih elicitorjev oznaka (goj 3), z dodatkom polietilen glikola oznaka (goj PEG), z dodatkom salicilne kisline oznaka (goj SK), z dodatkom metiljasmonata oznaka (MeJ) in z dodatkom kombinacije slednjega ter salicilne kisline oznaka (SK+MeJ), masa inokulum, masa mokrega filtrirnega papirja, masa mokrega filtrirnega papirja in biomase po filtraciji, masa mokre biomase, povprečje mas mokre biomase izmerjene na v tem dnevu in standardna deviacija

čas (dan)	oznaka gojišča	masa inok ulum a (g)	m. mok. pap. (g)	m. mok. pap. + biomas. (g)	m. mok. biomas. (g)	Povpr. (g)	SD	KV(%)
7		1,502	0,915	2,343	1,43			
7		1,506	0,928	2,127	1,20	1,26	0,15	11,7
9	goj 3	1,507	1,059	2,760	1,70			
9		1,504	0,920	2,865	1,95			
9		1,499	0,859	2,454	1,60	1,75	0,18	10,3
9	PEG	1,508	0,928	3,123	2,20			
9		1,495	0,850	2,657	1,81			
9		1,501	0,917	2,443	1,53	1,84	0,34	18,2
9	SK	1,497	0,887	2,567	1,68			
9		1,518	0,888	2,449	1,56			
9		1,512	0,849	2,822	1,97	1,74	0,21	12,2
9	MeJ	1,500	0,953	2,343	1,39			
9		1,494	0,877	2,290	1,41			
9		1,506	0,945	2,212	1,27	1,36	0,08	5,8
9	SK+MeJ	1,506	0,897	2,321	1,42			
9		1,496	0,887	2,282	1,40			
9		1,496	0,930	2,311	1,38	1,40	0,02	1,6
11	goj 3	1,502	0,852	3,089	2,24			
11		1,499	0,87	2,054	1,18			
11		1,503	0,877	2,506	1,63	1,68	0,53	31,4
11	PEG	1,498	0,842	2,569	1,73			
11		1,504	0,822	2,433	1,61			
11		1,495	0,804	2,597	1,79	1,71	0,10	5,4
11	SK	1,502	0,823	2,345	1,52			
11		1,5	0,75	2,524	1,77			
11		1,509	0,795	2,290	1,50	1,60	0,15	9,6
11	MeJ	1,499	0,725	1,749	1,02			
11		1,496	0,802	1,153	0,35			
11		1,507	0,818	1,418	0,60	0,66	0,34	51,7
11	SK+MeJ	1,505	0,779	1,218	0,44			
11		1,496	0,751	1,296	0,55			
11		1,5	0,860	1,562	0,70	0,56	0,13	23,5
13	goj 3	1,502	0,773	2,523	1,75			
13		1,492	0,907	3,817	2,91			
13		1,495	0,815	3,133	2,32	2,33	0,58	24,9
15	goj 3	1,502	0,756	3,232	2,48			

se nadaljuje

Preglednica 28: Prirast biomase v tekočem gojišču z 2,4-D in BAP in s 40 g/L glukoze; čas merjen v dneh od inokulacije, tip gojišča: brez dodanih elicitorjev oznaka (goj 3), z dodatkom polietilen glikola oznaka (goj PEG), z dodatkom salicilne kisline oznaka (goj SK), z dodatkom metiljasmonata oznaka (MeJ) in z dodatkom kombinacije slednjega ter salicilne kisline oznaka (SK+MeJ), masa inokuluma, masa mokrega filtrirnega papirja, masa mokrega filtrirnega papirja in biomase po filtraciji, masa mokre biomase, povprečje mas mokre biomase izmerjene na v tem dnevu in standardna deviacija

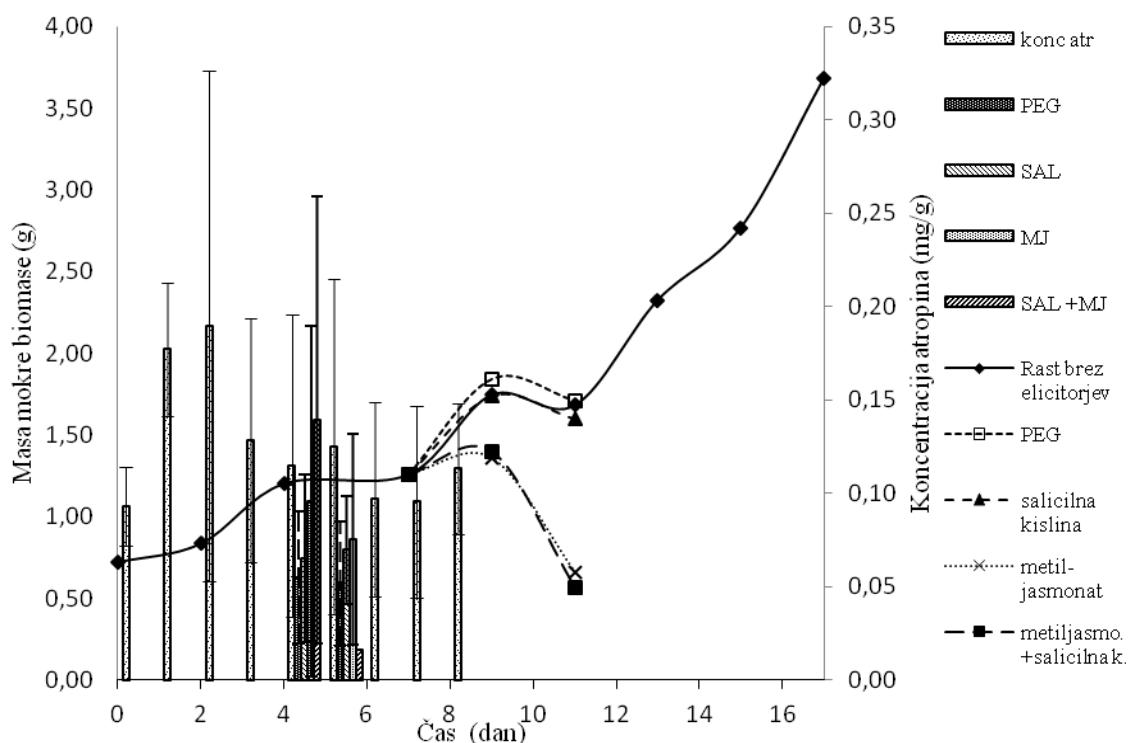
čas (dan)	oznaka gojišča	masa inok ulum a (g)	m. mok. pap. (g)	m. mok. pap. + biomas. (g)	m. mok. biomas. (g)	Povpr. (g)	SD	KV(%)
15		1,506	0,768	3,368	2,60			
15		1,505	0,73	3,959	3,23	2,77	0,40	14,6
17	goj 3	1,509	0,792	4,332	3,54			
17		1,504	0,876	4,801	3,93			
17		1,495	0,794	4,377	3,58	3,68	0,36	9,8

Zaradi 20 do 30 % izgube inokuluma pri poskusu (rastna krivulja) smo pri tokratnem inokuliraju uporabili 1,5 g začetne mase biomase. Tako smo zagotovili večjo koncentracijo živih celic ob začetku poskusa ter hkrati skrajšali fazo prilagajanja. Pri tem je nastala približno 50 % razlika med maso inokuluma in izmerjeno maso mokre biomase na dan 0. Pri prejšnjem poskusu je ta znašala okoli 20 do 30 %.

Zopet smo opazili inverzno sinusno nihanje rasti značilno za krivulje prirasta mokre biomase. Dodatek elicitorjev je vplival na rast mokre biomase v primeru, ko smo dodali gojišču metiljasmonat (MeJ) in ko smo ga dodali v kombinaciji z salicilno kislino (SK). Ko smo dodali samo polietilen glikol ali samo SK, ta dva nista imela vpliva na prirast.

#### 4.2.5 Vpliv elicitorjev na koncentracijo sekundarnega metabolita atropina in na prirast suspendirane biomase

Pri poskusu smo določali vsebnost (masa atropina v mg na g suhe biomase) atropina v suspendirani biomasi. Koncentracije skopolamina nismo določali, ker to ni bilo mogoče, saj so se je površine vrhov pri visokotlačni tekočinski kromatografiji



Slika 18: Vpliv elicitorjev na prirast suspendirane biomase v tekočem gojišču z 2,4-D in BAP ter 40 g/L glukoze, brez dodanih elicitorjev, ali z dodatkom polietilen glikola, salicilne kisline, metil jasmonata in kombinacijo slednjega ter salicilne kisline. Vzorce smo gojili v rastni komori, na stresalniku (100 obratov na minuto), pri 24-urni osvetlitvi,  $T=22,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 5,8. Gojišče smo filtrirali in filtrirni ostanek stehtali (masa mokre biomase). Vsebnost atropina v vzorcih smo določali z visokotlačno tekočinsko kromatografijo.

Preglednica 29: Vpliv elicitorjev na koncentracijo atropina masi suspendiranih celic; Čas od začetka eksperimenta v dnevih z oznako gojišča, če je to vsebovalo elicitor (PEG, SK, MeJ, kombinacija SK in MeJ), oznaka vzorca pri visokotlačni tekočinski analizi, masa »falkonke« oz. posode v kateri je potekala liofilizacija, masa posodice z biomaso, masa suhe biomase za analizo, površina vrha pri analizi z visokotlačno tekočinsko kromatografijo, koncentracija atropina, vsebnost atropina v vzorcu, vsebnost atropina v µg/g suhe snovi, povprečna koncentracija atropina v treh paralelkah in standardna deviacija.

čas (dan)+ozn.	masa falk.	masa falk. + biom.	masa suhe biom.	pat* $10^6$	konz. catr (µg/)	masa atr. v vzorcu (µg)	konz. µg/g Atr s.s.	povp. konz. v s.s.	SD	KV (%)
0	6,5863	6,9888	0,403	1,9	0,0157	0,0314	0,0780			
0	6,5881	6,8182	0,230	1,5	0,0124	0,0248	0,1077			
0	6,572	6,6849	0,113		0,0000	0,0000	0,0000	0,0928	0,0210	/
2	6,5718	6,8595	0,288	2,4	0,0198	0,0397	0,1378			
2	6,5836	6,7789	0,195	2,2	0,0182	0,0363	0,1861			
2	6,5649	6,9082	0,343	4,3	0,0355	0,0710	0,2069	0,1770	0,0355	20,0
4	6,5736	7,0355	0,462	8,6	0,0710	0,1421	0,3076			
4	6,5673	7,1137	0,546	7,3	0,0603	0,1206	0,2207			
4	6,5725	7,2355	0,663	1,6	0,0132	0,0264	0,0399	0,1894	0,1366	72,1
7	6,5909	7,1974	0,607	3,6	0,0297	0,0595	0,0981			
7	6,5818	7,1985	0,617	7,6	0,0628	0,1256	0,2036			
7	6,5727	7,2222	0,650	3,3	0,0273	0,0545	0,0839	0,1285	0,0654	50,9
9	6,5647	7,838	1,273	12,4	0,1024	0,2049	0,1609			
9	6,5779	7,3132	0,735	7,2	0,0595	0,1190	0,1618			
9	6,5624	7,5047	0,942	1,2	0,0099	0,0198	0,0210	0,1146	0,0810	70,7
9 PEG	6,5785	7,9445	1,366	3,7	0,0306	0,0611	0,0448			
9 PEG	6,5679	7,4973	0,929	5,3	0,0438	0,0876	0,0942			
9 PEG	6,5645	7,5903	1,026	1,6	0,0132	0,0264	0,0258	0,0549	0,0353	64,4
9 SK	6,5752	7,7668	1,192	2,1	0,0173	0,0347	0,0291			
9 SK	6,5774	7,5512	0,974	3	0,0248	0,0496	0,0509			
9 SK	6,573	7,5342	0,961	6,7	0,0553	0,1107	0,1152	0,0651	0,0447	68,8
9 MeJ	6,5736	7,2866	0,713	8,8	0,0727	0,1454	0,2039			
9 MeJ	6,5681	7,3166	0,749	1,8	0,0149	0,0297	0,0397			
9 MeJ	6,5958	7,4287	0,833	2,2	0,0182	0,0363	0,0436	0,0958	0,0937	97,8
9 SK+MeJ	6,5811	7,4443	0,863	3,7	0,0306	0,0611	0,0708			
9 SK+MeJ	6,592	7,3115	0,720	3	0,0248	0,0496	0,0689			
9 SK+MeJ	6,5666	7,1626	0,596	10	0,0826	0,1652	0,2772	0,1390	0,1197	86,1
11	6,5873	7,7963	1,209	2,4	0,0198	0,0397	0,0328			
11	6,5759	8,029	1,453	18,7	0,1545	0,3090	0,2126			
11	6,5897	7,2406	0,651	5,1	0,0421	0,0843	0,1295	0,1250	0,0900	72,0
11 PEG	6,5893	7,8115	1,222	1,9	0,0157	0,0314	0,0257			
11 PEG	6,5847	7,8111	1,226	3	0,0248	0,0496	0,0404			

se nadaljuje

Preglednica 29: Vpliv elicitorjev na koncentracijo atropina masi suspendiranih celic; Čas od začetka eksperimenta v dnevih z oznako gojišča, če je to vsebovalo elicitor (PEG, SK, MeJ, kombinacija SK in MeJ), oznaka vzorca pri visokotlačni tekočinski analizi, masa »falkonke« oz. posode v kateri je potekala liofilizacija, masa posodice z biomaso, masa suhe biomase za analizo, površina vrha pri analizi z visokotlačno tekočinsko kromatografijo, koncentracija atropina, vsebnost atropina v vzorcu, vsebnost atropina v µg/g suhe snovi, povprečna koncentracija atropina v treh paralelkah in standardna deviacija

čas (dan)+ozn.	masa falk.	masa falk. + biom.	masa suhe biom.	patr* $10^6$	konz. catr (µg/)	masa atr. v vzorcu (µg)	konz. µg/g Atr S.S.	povp. konz. v s.s.	SD	KV (%)
11 PEG	6,5845	7,4362	0,852	4,6	0,0380	0,0760	0,0892	0,0518	0,0333	64,2
11 SK	6,5757	7,6232	1,048	2,5	0,0207	0,0413	0,0394			
11 SK	6,5736	7,7905	1,217	7,2	0,0595	0,1190	0,0978			
11 SK	6,564	7,3964	0,832	3,6	0,0297	0,0595	0,0715	0,0695	0,0292	42,0
11 MeJ	6,573	6,7959	0,223	0	0,0000	0,0000	0,0000			
11 MeJ	6,5784	6,6973	0,119	0,8	0,0066	0,0132	0,1112			
11 MeJ	6,5727	7,0955	0,523	1,2	0,0099	0,0198	0,0379	0,0745	0,0518	69,5
11 SK+MeJ	6,5886	6,8133	0,225	0	0,0000	0,0000	0,0000			
11 SK+MeJ	6,5634	6,7085	0,145	0	0,0000	0,0000	0,0000			
11 SK+MeJ	6,5684	6,9805	0,412	0,4	0,0033	0,0066	0,0160	0,0053	0,0093	173,2
13	6,576	8,9357	2,360	11,6	0,0958	0,1917	0,0812			
13	6,5837	8,2449	1,661	5,5	0,0454	0,0909	0,0547			
13	6,5847	7,5766	0,992	9,3	0,0768	0,1537	0,1549	0,0969	0,0519	53,6
15	6,5831	8,5609	1,978	14,8	0,1223	0,2445	0,1236			
15	6,5828	8,5558	1,973	4,3	0,0355	0,0710	0,0360			
15	6,568	8,9525	2,385	18,3	0,1512	0,3024	0,1268	0,0955	0,0515	54,0
17	6,5648	9,5544	2,990	27,1	0,2239	0,4477	0,1498			
17	6,5817	9,4286	2,847	18,9	0,1561	0,3123	0,1097			
17	6,5889	9,3086	2,720	13,1	0,1082	0,2164	0,0796	0,1130	0,0352	31,2

7. dan kultivacije smo vzorcem dodali elicitorje. 11. dan ugotavljamo, da je polietilen glikol (PEG) najbolj očitno znižal produkcijo atropina, prav tako smo zaznali, da je salicilna kislina (SK) znižala vsebnost atropina v biomasi, vendar manj kot PEG. Ta dva elicitorja nista imela vpliva na prirast mase celične suspenzije. V primeru, ko smo dodali metiljasmonat (MeJ), smo zaznali majhen porast koncentracije atropina glede na gojišče s PEG ali tisto s SK, vendar je bila koncentracija manjša kot v kontrolni suspenziji brez dodatka elicitorjev. Največjo produkcijo atropina smo zaznali v celični suspenziji s kombinacijo MeJ in SK. V gojišču z MeJ je prišlo do upada mase mokre biomase. Podoben upad smo izmerili tudi v gojišču, ki smo mu dodali kombinacijo MeJ in SK. 13. dan smo izmerili približno isto količino atropina v gojišču s PEG, kot pri prejšnji meritvi. V gojišču z SK smo opazili ne očitno povečanje vsebnosti alkaloida glede na prejšnjo meritve. Masa mokre biomase v teh dveh gojiščih je bila skoraj enaka kot tista v kontrolni suspenziji. V gojišču z MeJ smo zaznali manjšo količino atropina, kot pri meritvi na 11. dan. Masa biomase se je tu občutno zmanjšala. V biomasi celične suspenzije z dodatkom MeJ in SK smo izmerili zelo majhno količino atropina, prav tako smo ugotovili, da je masa biomase zelo padla glede na 11. dan.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Propagacija rastlin preko tkivnih kultur je sodoben način razmnoževanja rastlin. Rastlinske celične kulture so obetavni, potencialni viri visoko cenovnih, sekundarnih metabolitov, ki so lahko velikega industrijskega pomena (Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002). Optimizacija biotehnoloških postopkov pridobivanja teh snovi bo v prihodnosti prednjacija pred dragi in zapleteno kemijsko sintezo le-teh (Oksman-Caldentey in Inzé, 2004). Namen naše naloge je bil s tehnikami tkivne kulture inducirati in optimizirati rast mandragore (*Mandragora officinarum*). Prvi del je vključeval *in vitro* vzgojo rastline, *in vitro* mikropagacijo vršička s kotiledoni in vzpostavitev kalusne kulture. Iz pridobljenega kalusa smo v drugem delu pripravili celično suspenzijsko kulturo, določili optimalne pogoje za njeno rast, določili vpliv elicitorjev na masni prirast celične kulture in ugotovili prisotnosti atropina v vzorcu.

#### 5.1.1 Tkivna kultura

Tkivna kultura je *in vitro* tehnika aseptičnega gojenja rastlin oz. drugih tkiv. Pri tovrstnem gojenju smo posebej pozorni na zagotavljanje sterilnih pogojev dela, materiala in orodja. Prav tako je potrebno biomaterial iz katerega pridobimo tkiva razkužit. V našem primeru okužb gojišč pri kaljenju semen ni bilo in ravno tako ne, ko smo dve semen pustili na gojišču štiri in pol mesece. Na podlagi tega sklepamo, da je bila sterilizacija z dikloroizocianurno kislino (16,6 g/L), etanolom in Tween 20 uspešna.

Obrezovanje semen zahteva največ časa in pozornosti, vendar se je izkazalo za najuspešnejši način predpriprave za kalitev. Ta morajo biti predhodno namočena v vodo, da se semenski ovoj zmeheča. Za uspešno vzgojo rastlin je potrebna subkultivacija na gojišču za kalitev semen, nato subkultivacija na gojišču za mikropagacijo rastlin in končno presaditev v sterilizirano prst v senčni del rastlinjaka.

Ko smo poskusili vršiček s kotiledonom presaditi v gojišče za mikropagacijo rastline z oznako 1m, ta ni razvil korenin, prav tako ni bistveno zrastel. Mikropagacija je bila le delno uspešna saj nam iz poganjkov ni uspelo pridobiti rastline s koreninami, uspešno pa smo vzgojili več poganjkov. Te bi morali med sabo ločiti in jih ukoreniniti (Bohanec in sod., 2004). Z nadaljnjjimi subkultivacijami so izgubljali obliko, velikost in število listov, hkrati pa je rastlo vedno več kalusnega tkiva.

Kalus smo uspešno inducirali iz semen, ki jim je bila odstranjena testa. Pomembno pri tem je, da ima na gojišče posadimo kalček z založnim tkivom, ker se sicer kalus ne razvije (poglavlje 4.1.3.1(preglednica 12)). Kalus lahko ohranjam v danem gojišču tudi do 50 dni. Ta čas je odvisen od začetne mase kalusa, ki jo nacepimo, od dimenzij same posode, ravno tako je zelo pomembna starost gojišča saj nekatere sestavine gojišča npr. vitamini s časom razpadajo, rezultati gojenja pa so slabši tako po masi, kot tudi kvaliteti produkta (Priloga A1, A2, A3, A4, A5). Po daljših subkultivacijah je potrebno narediti eno ali dve krajši. Pri krajših je potrebno uporabiti večjo začetno količino kalusa, da dobimo kalus boljše kvalitete. V primerih, ko smo prenašali nekatera tkiva ali organe iz gojišča na gojišče z drugo ali enako sestavo, je prihajalo do spontane rasti (kalusa poglavje 4.1.2.1 in poglavje 4.1.2.2). Zaradi spontanega nastajanja bi ga bilo smiselno pridobiti iz različnih rastlinskih organov, saj bi se s

tem izognili dodatku hormonov, ki lahko imajo vpliv na produkcijo sekundarnih metabolitov (Ramachandra Rao in Ravishankar, 2002). Koncentracije hormonov v gojišču so bile visoke, kar je lahko rezultiralo v tvorbi kalusnega tkiva pri subkultivaciji na drug tip gojišča. S tem namenom smo po 89 dneh spremenili sestavo gojišča za neposredno indukcijo kalusa, od takrat naprej smo dodajali 1 mg/L BAP in 1 mg/L 2,4 D. Manjša koncentracija hormonov ni vplivala obseg rasti kalusnega tkiva, ali njegovo morfološko obliko.

V poskusu z različnimi hormoni smo ugotovili, da se vzorci glede na prirast mase in odzivu na rastni regulator, med seboj zelo razlikujejo. Še več, celo vzorca pridobljena iz istega izvornega tkiva se med sabo zelo razlikujeta. Vzrok temu je lahko oblika rasti (se vzpenja, raste horizontalno po gojišču), različna osvetljenost zaradi pozicije v rastni komori in nehomogenost matičnega tkiva (količina, distribucija in dostopnost hormonov znotraj tkiva) Način na katerega raste kalus lahko vpliva na vsebnost hormonov znotraj samega tkiva, ker ti prihajajo vedno iz površine gojišča. Tkivo pa se širi neenakomerno v treh dimenzijah nad gojiščem, zato pride do nehomogenosti vzorca. Npr. spodnji del kalusa vsebuje več hormonov. To bi lahko spremeljali s slikanjem kalusa v dnevnih intervalih na istem mestu in tako določili geometrijsko dinamiko rasti. Zanimiv je fenomen upada prirastka tkiva v drugi 15 dnevni subkultivaciji, kar se sicer ni zgodilo pri vseh osebkih, se je pa prirast v večini primerov občutno zmanjšal (poglavlje 4.2.1 (slika 12)). Možno je, da tkivo hormone skladišči, kar bi razložilo ta pojav, saj je prirast največji v gojišču kateremu nismo spremenili sestava. Kljub temu pa je prirast slednjemu v 15 dnevni kultivaciji tudi upadel. Edina razlika med gojiščema pri 14 in 15 dnevni kultivaciji je bila ta, da je bilo 15 dnevno staro 14 dni, ko smo ga uporabili. Sicer je bilo hranjeno v hladilniku na 5 °C in v temi, kljub temu pa je najverjetnejše prišlo do sprememb v sestavi gojišča. Tkivo, ki je rastlo v gojišču brez-hormonov imenujemo habituiran kalus. Rastlo je počasneje kot tisto s hormonskega gojišča in je bilo drugačne konsistence (poglavlje 4.1.3.2).

Dinamika rasti posameznih vzorcev, prav tako njihovih klonov je bila zelo spremenljiva, to pomeni, da je selekcija glede na produktivnost mogoča in nujna pri morebitni nadaljnji produkciji. Ugotovili smo, da je hitrost rasti odvisna od velikosti tkiva oz. njegove mase.

### 5.1.2 Celična kultura

Iz kalusa drobljive strukture pridobimo celično suspenzijo tako, da kalus subkultiviramo v tekoče gojišče in ga močneje stresamo na stresalniku. Tako se drobci kalusa in celic od-drobijo od matičnega tkiva. Ker se drobijo neenakomirno je v prvi fazi to vzrok, da je celična suspenzija nehomogena. V starejših celičnih suspenzijah najdemo posamične celice različnih velikosti in oblik ter celični aggregate (slika 15). Pri proučevanju rasti kulture suspendiranih celic moramo izmeriti maso biomase. En način je, da jo filtriramo in stehtamo, vendar je tu velika nevarnost kotaminavije, drugi pa je da suspenzijo z biomaso enostavno odvzamemo s pipeto. Najprej smo poskusili s pipeto, vendar zgoraj navedena dejstva otežujejo odmerjanje vzorcev s pipeto, ki se je izkazalo za nenatančno metodo odmerjanja kulture suspendiranih celic, zato smo pri nadaljnji poskusih suspendirano biomaso cedili in tehtali ter jo nato ponovno suspendirali v gojišče. Ravno tako kot je pri kalusu pomemben podatek o volumnu tkiva oz. njegovi masi, je tudi pri sestavi suspenzije pomembno razmerje med maso mokre biomase in V gojišča, ker določa hitrost rasti biomase v suspenziji. Dokaz za to je primerjava prirasta mokre biomase v poglavju 4.2.3 in 4.2.4 (slika 17 in slika 18). Zgoraj navedena metoda nam je omogočila dovolj dobro natančnost, da smo določili rastno krivuljo in nekatere zanje značilne faze (Bolta, 2002). Faza prilagajanja (lag faza) je pri prvem poskusu z 1 g inokuluma trajala štiri dni in nato prešla v fazo eksponentne rasti, sledila ji je linearne faza

konstantne rasti (slika 17). V tej fazi smo prenehali z meritvami. Prirast suhe biomase ni pokazal značilnih faz rasti, ker pri tej metodi izmerimo tudi biomaso, ki je odmrla. Sicer pri tehtanju mokre biomase ravno tako stehtamo mrtvo biomaso, vendar ta vsebuje manj vode, kot živa biomasa in je zato prispevek k celotni izmerjeni masi manjši in s tem tudi napaka. Krivulja mase suhe biomase kaže konstanten prirast do dneva 14, potem pa je ta značilen za fazo eksponentne rasi. V drugem poskusu suhe mase ni bilo mogoče izmeriti. Faze prilagajanja v prirastu mokre biomase z 1,5 g inokuluma, ni zaznati. Znatno pa je prirast poskočil od 13 do 17 dneva. Iz povedanega zaključimo, da razmerje med maso dodanega inokuluma in volumnom gojišča odločilno vpliva na posamezne faze rasti celične suspenzije in posledično na hitrost prirasta biomase.

Ker je iz literature razvidno (Bolta, 2002; Oksman-Catdente in Inzé, 2004), da dodatek elicitorjev sproži indukcijo sekundarnih metabolitov, smo v celično suspenzijo dodali metil jasmonat MeJ, salicilno kislino (SK) in polietilen glikol (PEG) Slednje smo dodali sedmi dan kultivacije, ko smo na podlagi predhodnega poskusa predpostavljali, da je celična kultura v eksponentni fazi rasti in bodo spremembe vitalnosti kulture najočitnejše. Najprej smo preverili vpliv na rast kulture v poskusu: vpliv elicitorjev na prirast mase suspendirane biomase (poglavje 4.2.4.), zaznali smo močan vpliv MeJ na prirast mase biomase. Če smo uporabili kot elicitor samo SK to dejstvo ni vplivalo na potek rasti, ko pa smo uporabili oba elicitorja je masa celic zopet močno upadla. V štirih dneh je izgubila približno 70 % mase. Iz tega lahko zaključimo, da ima na rast celic v suspenziji odločilen vpliv predvsem MeJ. Drugi uporabljeni elicitorji nimajo bistvenega vpliva. Namen uporabe elicitorjev pa je bil v prvi vrsti vzpodbuditi nastajanje sekundarnih metabolitov v našem primeru atropina. Koncentracijo tega smo merili s pomočjo visokotlačne tekočinske kromatografije. V fazi prilagajanja ugotovimo največjo koncentracijo atropina, ki se s prehodom v eksponentno fazo rasti celične suspenzije, zmanjšuje in se v ustali v stacionarni fazi rasti. Začetni skok količine atropina nam pove, da je do povečanja prišlo zaradi nekega stresnega dejavnika, ki se zgodi kmalu po subkultivaciji suspenzije. V fazi adaptacije je odmiranje celic relativno gledano največje (razmerje med živo in mrtvo biomaso. Če predpostavljamo, da atropin iz poškodovanih celic difundira v gojišče (tega nismo merili), potem mora obstajati nek signal, ki poveča vsebnost alkaloida v celici. Drug možen scenarij je, da so bile celice poškodovane, so izgubile del citoplazme in so odmirale, vendar so še vedno vsebovale atropin, ki še ni iztekel v gojišče. Koncentracija atropina je bila največja v gojišču s kombinacijo elicitorjev MeJ in SK. Elicitorja imata očitno sinergičen učinek na producijo atropina, vendar je tu biomasa v štirih dneh v veliki meri propadla. V slednjem je tudi razlog, zakaj na 13. dan ne določimo velike vsebnosti atropina, saj smo ga merili v biomasi in ne v gojišču. Bolta poroča, da je v preliminarni študiji s celično suspenzijo žajblja, ta propadla, ko so dodali 200 µM MeJ, pri koncentracijah nižjih od 100 µM tega niso opazili (Bolta, 2002). V našem primeru je znašala koncentracija 140 µM. Pri proučevanju vpliv elicitorjev na sintezo sekundarnega metabolita atropina, moramo poudariti, da pridobljeni podatki niso statistično značilni, ampak nakazujejo trende. Za potrditev le teh so potrebne nadaljnje raziskave.

## 5.2 SKLEPI

V gojišču za mikropropagacijo rastlin smo uspešno vzgojili rastline *Mandragora officinarum*, ki so bile pridobljene neposredno iz semen. Vsa ta semena smo prenesli iz gojišča za kalitev semen. Organizmi, ki smo jih prenesli iz gojišča za mikropropagacijo vršička s kotiledoni,

niso razvili rastlinskih organov ampak so rastli v obliki kalusa. Da bi razvili korenine bi jih bilo potrebno prenesti v gojišče namenjeno ukoreninjanju.

S prvo kultivacijo semena na gojišče za neposredno indukcijo kalusa smo dobili tkivo ki je bilo drobljive konsistence, kar je ključnega pomena za vzpostavitev celične suspenzije. Povprečna subkultivacija je trajala 21 dni. V tem času je kalus s premerom 1,5 do 2 cm zrasel do premira 5 do 6 cm in s tem pridobil približno 500 % mase Vpliv hormonov na prirast kalusnega tkiva je bil največji v prvem 14-dnevnom obdobju, saj se je celokupna masa v gojišču brez hormonov povečala za faktor 2,4, v gojišču z 2 mg/L hormona BAP za faktor 3,1, v gojišču z 2 mg/L hormona 2,4-D za faktor 2,3 in v gojišču z 2 mg/L hormona BAP in 2 mg/L hormona 2,4-D za 3,1. Kalus drobljive konsistence dobimo na gojišču s hormonoma 2,4-D in BAP.

Celična kultura je najbolje uspevala v tekočem gojišču z 2 mg/L 2,4-D in z 2 mg/L BAP. Najboljši vir ogljika in energije za rast suspendirane biomase je bila glukoza s koncentracijo 40 g/L, saj je bil tu prirast suspendirane biomase največji. V tem gojišču so bile celice dobro suspendirane oz. celice so rastle posamič ali v zelo majhnih skupkih, ki so bili neopazni s prostim očesom.

Dodatek elicitorjev je vplival na rast celične suspenzijske kulture v primeru, ko smo dodali gojišču metiljasmonat (MeJ) in ko smo ga dodali v kombinaciji z salicilno kislino (SK). Dodatek samega polietilen glikol ali same SK, ni imel vpliva na prirast biomase.

Največjo koncentracijo sekundarnega metabolita atropina v biomasi zaznamo ob koncu lag faze rasti. Zaznali smo sinergističen učinek dodatka elicitorjev MeJ in SK, ki je najbolj povišal koncentracijo atropina v biomasi. Ob dodatku PEG in SA se je koncentracija sekundarnega metabolita zmanjšala, ob dodatku MeJ pa je ostala nespremenjena. Rezultati povezani s koncentracijo atropina so statistično neznačilni in kot taki le nakazujejo trend, za potrditev so potrebne nadalne raziskave.

## 6 POVZETEK

Vse gostejša naseljenost planeta in zato vse večja potreba ljudi po hrani, ima za posledico vse manj razpoložljive zemlje za pridelavo rastlin, ki niso namenjene prehranjevanju. Poleg tega se trendi prehranjevanja obračajo k naravnim aromam, barvilom, sladilom itd.. To so razlogi zaradi katerih se bo vse več produkcije naravnih rastlinskih snovi vršilo v bioreaktorjih, saj je takšna proizvodnja neodvisna od okoljskih in družbenih dejavnikov ter jo je možno zelo dobro nadzorovati in upravljati. Da bi omogočili tovrstno proizvodnjo je potrebno identificirati modelni sisteme za proizvodnjo sekundarnih metabolitov. V našem primeru je bila to razhudnikovka *Mandragora officinarum*, iz katere smo v prvem koraku s tehniko rastlinskih tkivnih kultur: *in vitro* vzklili semе; vzgojili *in vitro* rastlino, ki smo jo uspešno presadili v rastlinjak in je služila za nadaljnje poskuse in *in vitro* kulturo vršičkov, namenjeno ohranjanju biomateriala. Vzporedno smo vzpostavili kulturo kalusa, ki smo ga inducirali iz semen in določili optimalne pogoje za njegovo rast ter vzgojili habituiran kalus. Vse to je potekalo na agarskih gojiščih po Murashige Skoog-u (MS) (Murashige in Skoog, 1962) z ali brez dodatka rastnih regulatorjev. V naslednjem koraku smo z nadaljnimi *in vitro* postopki in prenosom kalusnega tkiva v tekoče gojišče pripravili kulturo suspendiranih celic. Ta kultura suspendirane bimase nam je služila kot produkcijski organizem za pridobivanje sekundarnih metabolitov. Da nam je to uspelo, smo morali določiti najboljše pogoje rasti. Preverili smo vpliv hormonov na rast biomase v suspenziji, osredotočili pa smo se na vpliv različnih virov ogljika in energije, ter koncentracij le-teh na prirast mase kulture suspendiranih celic. Ugotovili smo, da je najboljši vir energije in ogljika glukoza s koncentracijo 40 g/L. Da bi lahko čim bolje ovrednotili ta vpliv, smo imeli na izbiro dva načina inokulacije, in sicer s pipeto ali s filtrirano biomaso, ki smo jo stehtali in takoj spet suspendirali. Odločili smo se za slednjo metodo, saj je bila natančnejša, kar nam je koristilo pri zadnjem koraku naše naloge. Na tem mestu smo kulturi suspendiranih celic dodali elicitorje. Mnogo znanstvenih publikacij poroča, da so to snovi, ki povečajo produkcijo sekundarnih metabolitov. Ker smo že imeli metodo za določanje prirasta mase kultur suspendiranih celic, in smo iz predhodnih rezultatov tega poskusa vedeli, da bo najočitnejša razlika v prirastu biomase 7. Dan, ko je biomasa v eksponentni fazi rasi, smo sedaj poskus ponovili le, da smo dodali tudi elicitorje, na izbrani dan. Ugotovili smo, da elicitor metil jasmonat najbolj upliva na rast biomase sam ali v kombinaciji s salicilno kislino, kadar je bil prisoten je biomasa propadla. Salicilna kislina in polietilen glikol nista imela vpliva na rast biomase. Na koncu smo biomaso posušili v liofilizatorju ter z visokotlačno kromatografsko analizo določili koncentracijo atropina v posameznem vzorcu in izračunali vsebnost atropina v mg na gram suhe biomase vzorca. Ta analiza je pokazala, da je bila največja vsebnost atropina, prisotna v biomasi ob koncu lag faze rasti. Z naraščanjem mase suspendirane biomase pa se je vsebnost zmanjševala. Elicitorji niso imeli značilnega vpliva na vsebnost atropina je pa opaziti povečanje vsebnosti le tega na deveti dan kultivacije pri suspendirani celični kulturi, ki je vsebovala metil jasmonat in salicilno kislino. Ob dodatku PEG in SA se je vsebnost sekundarnega metabolita zmanjšala, ob dodatku MeJ pa je ostala nespremenjena.

## 7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izdaja. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 27-89
- Barbaud J. 1994. The “Alphabetical Dioscorides” (a propos the Codex Vindobonensis Med. gr. 1). *Revue d'Historie de la Pharmacie*, 41: 321–330
- Baudouin E., Meskiene I., Hirt H. 1999. Unsaturated fatty acids inhibit MP2C, a protein phosphatase 2C involved in the wound-induced MAP kinase pathway regulation. *Plant Journal*, 20: 343-348
- Bi J. L., Felton G. W. 1995. Foliar oxidative stress and insect herbivory – primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygene species as components of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology*, 21: 1511-1530
- Blechert S., Brodschelm W., Holder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Mueller M.J., Zhi-Qiang X., Zenk M.H. 1995. The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 4099-4105
- Bergey D.R., Ryan C. A. 1999. Wound-and-systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Molecular Biology*, 40: 815-823
- Bradley D.J., Kjellbom P., Lamb C.J. 1992. Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant-cell wall protein – a novel, rapid defense response. *Cell*, 70: 21-30
- Bruxelles G.L., Roberts M. R. 2001. Signal regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Critical Reviews in Plant Science*, 20: 487-521
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnenje rastlin: 168 str.
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Bolta Ž. 2002. Optimizacija bioreaktorske proizvodnje ursolne kisline v žajblju (*Salvia officinalis* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.
- Carter A.J. 2003. Myths and mandrakes. *Journal of Royal Society of Medicine*, 96: 144–147

- Chandra S., Steanis M., Low P. S. 1997. Measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequonin-transformed tobacco cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 28274-28280
- Cho H-Y., Lee-Parsons C., Yoon S-Y., Rhee H., Park J. 2007. Enhanced benzophenanthridine alkaloid production and protein expression with combined elicitor in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *Biotechnology Letters*, 29, 12: 2001-2005
- Creelman R. A., Mullet J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 355-381.
- De Luca V., St Pierre B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 5, 4: 168-173
- Dixon R.A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411: 843–847
- Dixon R.A., Paiva N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085-1097
- Facchini P. J., Bird D.A., St-Pierre B. 2004. Can *Arabidopsis* make complex alkaloids?. *Trends in Plant Science*, 9, 3: 116-122
- Farmer E. E., Ryan C. A. 1990. Interplant communication – airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 7713-7716
- Farmer E. E., Johnson R. R., Ryan C. A. 1992. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology*, 98: 995-1002
- Felix G., Boller T. 1995. Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *Plant Journal*, 7: 381-389
- Günter Gassen H., Minol S. 2006. Die Alraune oder die Sage vom Galgenmännlein. *Biologie Unserer Zeit*, 36, 5: 302-307
- Hahlbrock K., Schell D. 1989. Physiology and molecular-biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 347-369
- Howe G. A., Lightner J., Browse J., Ryan C. A. 1996. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell*, 8: 2067-2077
- Krumm T., Bandemer K., Boland W. 1995. Induction of volatile biosynthesis in the Lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine and isoleucine conjugates of 1-oxo-and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: Evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signaling pathway. *FEBS Letters*, 377: 523-529

- Lee S. H., Lee M. H., Chung W. I., Liu J.R. 1998. WAPK, a Ser/Thr protein kinase gene of *Nicotiana tabacum*, is uniquely regulated by wounding, abscisic acid and methyl jasmonate. Molecular and General Genetics, 259: 516-522
- Leon J., Sánchez-Serrano J. J. 1999. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. Plant Physiology and Biochemistry, 37, 5: 373-380
- Leon J., Rojo E., Titarenko E., Sánchez-Serrano J. J. 1998. Jasmonic acid-dependent and – independet wound signal transduction pathways and differentially regulated by  $\text{Ca}^{2+}$ / calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. Molecular and General Genetics, 258: 412-419
- Mathieu Y., Kurkdjian A., Xia H., Guern J., Koller A., Spiro M., O'Neill M., Albersheim P., Darvill A. 1991. Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. Plant Journal, 1: 333-343
- Matthews B., Alkharouf N. 2005. Salicylic acid synthesis. Beltsville, The Matthews' Laboratory,The United States Department of Agriculture Agricultural Research Service Plant Science Institute: 1str.  
[http://bldg6.arsusda.gov/benlab/Soybean%20Defense%20Response/salicylic\\_acid\\_synthesis](http://bldg6.arsusda.gov/benlab/Soybean%20Defense%20Response/salicylic_acid_synthesis), (5.5.2009.)
- Matthews B., Alkharouf N. 2005. Jasmonic acid synthesis. Beltsville, The Matthews' Laboratory,The United States Department of Agriculture Agricultural Research Service Plant Science Institute: 1str.  
[http://bldg6.arsusda.gov/benlab/Soybean%20Defense%20Response/jasmonic\\_acid\\_synthesis](http://bldg6.arsusda.gov/benlab/Soybean%20Defense%20Response/jasmonic_acid_synthesis), (5.5.2009.)
- McConn M., Creelman R.A., Bell E., Mullet J. E., Browse J. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 5473-5477
- Moyen C., Hammond-Kosack K. E., Jones J., Knight M. R., Johannes E. 1998. Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells:  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from intra- and extracellular compartments. Plant Cell and Environment, 21: 1101-1111
- Müller-Kuhrt L. 2003. Putting nature back into drug discovery. National Biotechnology, 21: 602
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 437-497
- Narváez-Vásquez J., Florin-Christensen J., Ryan C. A. 1999. Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. Plant Cell, 11: 2249-2260

- Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 m 2002. *Journal of Natural Products*, 66, 7: 1022-1037
- O'Donnell P. J., Calvert C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H. M. O., Bowles D. J. 1996. Ethylene as signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, 277: 1914-1917
- Orozco-Cardenas M., Ryan C. A. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid path-way. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 6553-6557
- Oksman-Caldentey K.M., Inzé D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9, 9: 433-440
- Olmstead R.G., Sweere J.A., Spangler R.E., Bohs L., Palmer J. 1999. Phylogeny and provisional classification of the *Solanaceae* based on chloroplast DNA. V: *Solanaceae IV*, Nee M., Symon D.E., Lester R.N., Jessop J.P. (eds.). Surrey, Royal Botanic Gardens Richmond Kew: 111-117
- Pavlík M., Vacek J., Klejdus B., Kubá 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, 15: 6147-6153
- Peduto V.A. 2001. The mandrake root and the Viennese dioscorides. *Minerva Anestesiologica*, 67: 751-766
- Pitta-Alvarez S. I., Spollansky T. C., Giulietti A. M. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 2: 252-258
- Poulev, A., O'Neal, J. M., Logendra, S., Pouleva R. B., Timeva V., Garvey A. S., Gleba D., Jenkins I. S., Halpern B. T., Kneer R., Cragg G. M., Raskin I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 12: 2542-2547
- Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 2: 101-153
- Raskin I., Ribnicky D.M., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D.A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J.M., Cornwell T., Pastor I., Fridlander B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, 20, 12: 522-531
- Ravnikar M. 1996. Rastlinske tkivne kulture. V: *Biotehnologija-osnovna znanja*. Raspored P. (ur.). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 149-164

- Reymond P., Weber H., Damond M., Farmer E. E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. Plant Cell, 12:707-719
- Rojo E., Titarenko E., Léon J., Berger S., Vancanneyt G., Sánchez-Serrano J.J. 1998. Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and –independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 13:153-165
- Rojo E., Léon J., Sánchez-Serrano J. J. 1999. Crosstalk between wound signaling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 20:135-142
- Schultes R.E. 1970. The botanical and chemical distribution of hallucinogens. Annual Review Plant Physiology, 21: 571–598
- Seo S., Okamoto N., Seto H., Ishizuka K., Sano H., Ohashi Y. 1995. Tobacco map kinase – a possible mediator in wound signal-transduction pathways. Science, 270:1988-1992
- Showalter A. M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. Plant Cell, 5: 9-23
- Stotz H. U., Pittendrigh B. R., Kroymann J., Weniger K., Fritzsche J., Bauke A., Mitchell-Olds T. 2000. Inducet plant defense responses against chewing insects. Ethilene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against Egiptian cotton worm but not diamondback moth. Plant Phisiology, 124: 1007-1017
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature, 408: 796-815
- Thomson N., Evert R.F., Kelman A. 1995. Wound healing in whole potato tubers – a cytochemical, flourescence and ultrrastructural analysis of cut and bruise wounds. Canadian Journal of Botany, 73: 1436-1450
- Usami S., Banno H., Ito Y., Nisihihama R., Machida Y. 1995. Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 8660-8664
- Verpoorte R. 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. Drug Discovery Today, 3, 5: 232-238
- Verpoorte R., van der Heijden R., Memelink J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. Transgenic Research, 9, 4-5 : 323-343
- Vidal F. 1982. An anesthetic 19 centuries old: *mandragora*. Le Chirurgien-dentiste de France, 52: 21–26

- Wang C., Zien C. A., Afitlhile M., Welti R., Hildebrand D. F., Wang X. 2000. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12: 2237-2246
- Watanabe T., Sakai S. 1998. Effects of active oxygen species and menhyl jasmonate on expression of the gene for a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*). *Planta*, 206: 570-576
- Zhang S. Q., Klessing D. F. 1997. Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell*, 9: 809-824
- Zhu-Salzman K., Salzman R. A., Koiwa H., Murdock L. L., Bressan R. A., Hasegawa P. M. 1998. Ethylene negatively regulates local expression of plant defense lectin genes. *Physiologia Plantarum*, 104: 365-372
- Zohary M. 1982. Plants of the Bible. Cambridge, Press Syndicate of the University of Cambridge: 188–189

## ZAHVALA

4

Zahvalil bi se rad mentorju prof. dr. Janezu Hribarju za vso podporo in pomoč pri doseganju tega kar se je še pred kratkim zdelo nemogoče.

prof. dr. Borutu Bohancu, se zahvaljujem za vso strokovno pomoč, podporo, zaupanje in potrpežljivost pri nastanku te naloge.

prof. dr. Poloni Jamnik se zahvaljujem za vso strokovno pomoč tako znanstveno, kot osebnostno, ki me je pripeljala na cilj.

Zahvaljujem se Mariji Pintar in Selmi Mohar za njune birokratske podvige.

Lini Burkan se zahvaljujem za pomoč pri pisanju in prijateljske namige.

Katji Cern se zahvaljujem za prijateljstvo in neusahljivo fotopodporo.

Nazadnje bi se rad zahvalil še svoji družini.

Ko sem stopil v to zgodbo, je bila hladna noč z nekaj trepetajočimi zvezdami, sedaj je svetel dan in vsi Vi ste sonca na mojem nebu.

HVALA VAM

Goran Pandol

## PRILOGE

Priloga A1: Nadaljnji dogodki in aktivnosti, ki smo jih izvedli na gojiščih za neposredno indukcijo kalusa, število subkultivacij in čas trajanja le teh.

zaporedna št. subkultivacije	čas trajanja subkultivacije (dan)	dogodki in aktivnost, ki smo jo izvedli
2.	26	kalus iz gojišča 2 smo razdelili na več delov in vsak del posamično subkultivirali v steklene posodice s svežim gojiščem pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8.
2.		odziv tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z oznako 2 po 27 dneh subkultivacije (Priloga A2)
3.	21	kalus subkultiviramo na gojišča za neposredno indukcijo kalusa, v steklene posodice, pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8.
4.	51	kalus subkultiviramo na gojišča za neposredno indukcijo kalusa v steklene posodice, pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8.
4.		določimo ustreznost posamičnega kalusnega tkiva za poskus: vpliv hormonov iz trdih gojišč na prirast mase kalusnega tkiva. (Priloga A3)
5.	27	kalus subkultiviramo na gojišča za neposredno indukcijo kalusa
6.	29	poskus: vpliv hormonov iz trdih gojišč na prirast mase kalusnega tkiva; kalus subkultiviramo na gojišča z različno hormonsko sestavo v steklene posodice, pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8.
		57 dan kultivacije tkivo z oznako VII odstopimo katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtenje rastlin,
6.		61 dan kultivacije del tkiva z oznako VII vračamo ter inkubiramo na gojišče za neposredno indukcijo kalusa.
6.	62	kalus rastel na gojiščih iz prejšnjega poskusa
7.	15	kalus subkultiviramo na gojišča za neposredno indukcijo kalusa v steklene posodice, pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8. Uporabimo gojišča, ki so bila pripravljena pred 62 dnevi.
		7. dan kultivacije odkrijemo, da so tri gojišča okužena (VIII nova <sub>1</sub> , VIII nova <sub>2</sub> in VII.).
		12. dan po zadnji precepitvi odkrijemo dve okužbi.
7.		Po 15 dneh (vzorci pridobljeni iz korenin rastlinic in ostali vzorci) popišemo odziv tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa. (Priloga A4)
8.	15	kalus subkultiviramo na gojišča za neposredno indukcijo kalusa v steklene posodice, pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8. Uporabimo gojišča, ki so bila pripravljena pred 77 dnevi.
		gojišč za neposredno indukcijo spremenimo koncentracijo hormonov z 2 mg/L BAP in 2,4 D v 1 mg/L BAP in 2,4 D. V vseh naslednjih subkulticacijah uporabljamо gojišče z nižjo koncentracijo hormonov
9.	33	kalus subkultiviramo na gojišča za neposredno indukcijo kalusa
9.		19 dan rasti en kalus porabimo za HPLC analizo
9.		Po 33 dneh popišemo odziv tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z novo koncentracijo hormonov (1 mg/L BAP in 1 mg/L 2,4 D). (Priloga A5)
9.		Po 47 dneh popišemo odziv tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z novo koncentracijo hormonov (Priloga A6)
10.		kupolasti izrastki so značilni za kalus, ki je predhodno rasel na gojišče v katerem smo imeli samo hormon BAP
10.	50	kalus subkultiviramo na gojišča za neposredno indukcijo kalusa v steklene posodice, pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8.
11.	ni podatka	kalus subkultiviramo na gojišča za neposredno indukcijo kalusa v steklene posodice, pri 23 +/- 1 °C, 24-urni osvetlitvi in pH 5,8.

Priloga A2: : Pregled odziva tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z oznako 2, 27. dan po subkultivaciji, v steklenih posodicah, pri  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 24-urna osvetlitev in pH 5,8.

čas inkubacije	oznaka tkiva in indeksi	barva	opis
27 dni	I.	1) 2) 3)	svetlo zelen svetlo zelen svetlo zelen
			bujen z porjavel na določenih delih več rjavih delov majhna rjava območja
27 dni	II.	1) 2) 3) 4) 5)	svetlo zelen svetlo zelen bel + malo svetlo zelen zelo bledo rjav
			prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$ prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$
27 dni	III.	1) 2)	zeleno rjav svetlo zelen do bel
			mali ( $1 \times 1 \text{ cm}$ ) majhna rjava območja
27 dni	IV.	1) 2) 3) 4)	svetlo zelen do zelen svetlo zelen do bel bel do svetlo zelen bel do svetlo zelen
			bujen in krhek prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$ prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$ prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$
27 dni	V.	1) 2) 3) 4) 5)	svetlo zelen svetlo zelen rjav do zelen svetlo zelen svetlo zelen do rjav
			prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$ prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$ mali prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$ prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$
27 dni	VI.	1) 2) 3)	svetlo zelen svetlo zelen do bel svetlo zelen do bež
			prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$ prerasel gojišče $\Phi \geq 4 \text{ cm}$ majhna rjava območja $\Phi = 2 \text{ cm}$
27 dni	VIII.	1) 2) 3)	svetlo zelen do bel bel svetlo zelen do svetlo rjav
			mali $\Phi = 1,5 \text{ cm}$ $\Phi = 3 \text{ cm}$ $\Phi = 3,5 \text{ cm}$

Priloga A3: Določanje ustreznosti posamičnega kalusnega tkiva, po 51 dneh kultivacije, za poskus: vpliv hormonov iz trdih gojišč na prirast mase kalusnega tkiva.

Čas ikubacije	oznaka za uporabni kalus	opombe	Čas ikubacije	Oznaka za neuporabni kalus	opombe
51 dni	I <sub>1</sub>	primeren	51 dni	I <sub>1</sub>	
51 dni	III <sub>1</sub>	primeren	51 dni	I <sub>2</sub>	
51 dni	IV <sub>1</sub>	primeren	51 dni	II <sub>2</sub>	
51 dni	IV <sub>1</sub>	primeren	51 dni	II <sub>2</sub>	
51 dni	IV <sub>7</sub>	vprašljivo	51 dni	II <sub>4</sub>	
51 dni	V <sub>5</sub>	pol primernega	51 dni	III <sub>1</sub>	
51 dni	V <sub>5</sub>		51 dni	III <sub>2</sub>	
51 dni	VI <sub>1</sub>	vprašljivo	51 dni	III <sub>2</sub>	
51 dni	VI <sub>1</sub>	pol primernega	51 dni	IV <sub>1</sub>	okužen
51 dni	VI <sub>1</sub>		51 dni	IV <sub>7</sub>	drobljiv
51 dni	VI <sub>1</sub>	primeren	51 dni	IV <sub>7</sub>	drobljiv
51 dni	VI <sub>2</sub>		51 dni	IV <sub>7</sub>	
51 dni	VIII <sub>2</sub>	vprašljivo	51 dni	V <sub>3</sub>	
51 dni	VIII <sub>3</sub>	primeren	51 dni	V <sub>4</sub>	
51 dni	VIII <sub>3</sub>	primeren	51 dni	V <sub>4</sub>	
			51 dni	VI <sub>2</sub>	
			51 dni	VI <sub>2</sub>	drobljiv
			51 dni	VI <sub>2</sub>	

Priloga A4: Pregled odziva tkiva na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z manjšo koncentracijo hormonov po 16 dneh subkultivacije (1 mg/L BAP in 1 mg/L 2,4 D), pri 23 +/- 1 °C, 24-urna osvetlitev in pH 5,8.

Čas ikubacije (dan)	Oznaka	Opis	Št. pridobljenih delov
16	III <sub>1</sub>	slab rjav	3
16	VII	slab svetlo-rjav	2
16	VIII <sub>1</sub>	eden zelo lepa rast	1
16	2m VII	slabo rjavo jedro	1
16	VIII nova	slab rjav	4
16	nova VIII 2k	lep svetlo zelen	4
16	7.9 Mand. G.	slab rjav in dober bež	4 dobri, 2 slaba
16	M.Goran	zelo lep zelen	10
16	**	lep zelen in velik	4
16	***	slab rjav	1

Priloga A5: Pregled rasti na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z manjšo koncentracijo hormonov (1 mg/L BAP in 1 mg/L 2,4 D), po 33 dneh subkultivacije pri 23 +/- 1 °C, 24-urna osvetlitev in pH 5,8

Čas inkubacije	Oznaka	Opis
33 dni	VII	rjav do bež z malo belega poprha, drobljiv in močnat
33 dni	GM	sestavlja ga skupki, bež z belim poprhom, rahlo zelen in nekaj rjavega
33 dni	GM	zelen, svetlo zelen
33 dni	GMan.	belkast, na bazi rjav rahlo zelen, krhek
33 dni	G. Mand*	bež z belim poprhom na bazi zeleni

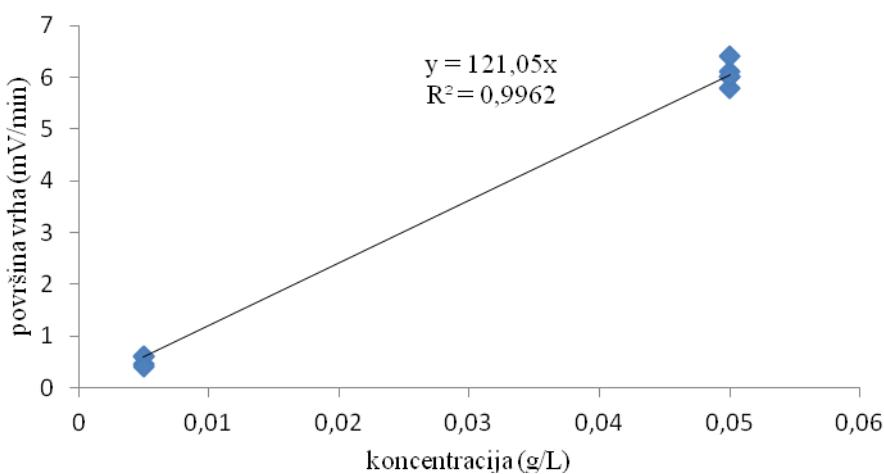
\* Tkivo z oznako G. Mand. je bež barve, ki na vrhu prehaja v belo na bazi pa zeleni. Kalus GM je zelen do svetlo zelen.

Priloga A6: Pregled rasti na gojišču za neposredno indukcijo kalusa z manjšo koncentracijo hormonov (1 mg/L BAP in 1 mg/L 2,4 D), po 47 dneh subkultivacije pri 23 +/- 1 °C, 24-urna osvetlitev in pH 5.

Čas inkubacije	Oznaka	Opis
46 dni	VII	obsežen kalus temno zelen, ki na vrhu prehaja v bež
46 dni	VIII <sub>1</sub>	zelo slab, propada, rjav
46 dni	GM (8 tkiv)	svetlo do temno zelen, na vrhu veliko kupolastih izrastkov, lokalni rjavi deli, ki prehajajo v bež
46 dni	GMan.	obsežen kalus z bež, z malo rjavih in zelenimi deli
46 dni	G. Mand	obsežen, na bazi rjav prehaja v temno zelenega in nato v bež, čisto na vrhu rjavi, majhni kupolasti izrastki

Priloga B1: Potek dogodkov in aktivnosti povezanih z celično suspenzijo, zaporedna številka subkultivacije in čas trajanja subkultivacije. Vsa tkiva smo inkubirali v rastni komori na stresalniku pri 100 obratih na minuto, 23 +/- 1 °C, 24-urna osvetlitev, pH 5,8.

zaporedna št. subkultivacije	čas trajanja subkultivacije (dan)	dogodki in aktivnost, ki smo jo izvedli
6.	23	odstranimo suspenzijo z oznako 2; suspendirane celice so rjave do temno rjave barve; gojišče spremenilo barvo in je rjavo rumene barve
7.	16	drugi poskus določanja rastne krivulje
8.	28	subkultivacija celične suspenzije z oznako 3; dodamo 100 mL gojišča s 40 mg/L saharoze (oznaka 2); celice suspendirane, gostota velika subkultivacija celične suspenzije z oznako 3; dodamo 90 mL gojišča s 40 mg/L glukoze; suspenzija nehomogena (manjši skupki celic)
	0	poskus: masa celic v 10 mL suspenziji
	8	vakuumsko cejena suspenzija ima rjave drobce; pipetirana celična suspenzija nima rjavih delcev.
	14	celična suspenzija v dveh erlenmajericah je rahlo rumene do rjave barve dohranjevanje: dolijemo 20 mL gojišča s 40 mg/L glukoze v oba gojišča
	17	suspenzije ohranile isto barvo, gostota celic je nizka
9.	32	subkultivacija celične suspenzije v tekoča gojišča s štirimi različnimi hormonskimi sestavami
	32	pregled stanja celičnih suspenzij
10.	31	subkultivacija celične suspenzije v tekoča gojišča s štirimi različnimi hormonskimi sestavami
	24	prišlo je do okužbe gojišča z oznako 3.. Na robu erlenmajerice in na drobcih kalusa smo opazili črne kolonije plesni.
11.	41	subkultivacija celične suspenzije iz poskusa; dodamo 90 mL gojišča s 40 mg/L glukoze brez-hormonov
12.	7	subkultivacija
13.	6	subkultivacija
14.	17	poskus: vpliv elicitorjev na sintezo sekundarnega metabolita atropina
15		zadnja subkultivacija



Priloga C1: Umeritvena krivulja za visokotlačno tekočinsko kromatografijo. Zadrževalni čas atropina na koloni AQUASIL C18 (THERMO Hypersil, dolžina 250, I.D.:4,6, particle size 5 µm) je bil 30,6 min. Merjeno z detektorjem Variable Wavelenght Monitor (Knauer) pri valovni dolžini 210 nm.