

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

EXPLANTÁTOVÁ KULTURA *JUNIPERUS VIRGINIANA*

Václav Předota

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, PhD.

Oponent: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

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

Hradec Králové

Předota Václav

Na úvod práce bych chtěl poděkovat PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za její ochotu, pomoc a odborné vedení v průběhu vypracovávání diplomové práce.

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	CÍL PRÁCE	2
3.	TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1.	Jalovec virginský (<i>Juniperus Virginiana</i> L., <i>Cupressaceae</i>)	3
3.1.1.	Popis rostliny	3
3.1.2.	Použití	4
3.1.3.	Obsahové látky	5
3.1.4.	Podofylotoxin	5
3.1.4.1.	Obecná charakteristika	5
3.1.4.2.	Biologická aktivita	5
3.1.4.3.	Mechanismus účinku	6
3.1.4.4.	Chemická struktura	6
3.1.4.5.	Biosyntéza	8
3.2.	Rostlinné explantáty	9
3.2.1.	Obecná charakteristika	9
3.2.2.	Odvození explantátových kultur	9
3.2.3.	Podmínky kultivace	11
3.2.3.1.	Teplota	11
3.2.3.2.	Osvětlení	11
3.2.3.3.	Acidita živného média	12
3.2.3.4.	Atmosférická vlhkost	12
3.2.3.5.	Živné médium	12
3.2.3.6.	Růstové regulátory	16
3.2.4.	Růstové fáze kultury	19
3.2.5.	Využití explantátových kultur	21
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1.	Použitý materiál, přístroje, pomůcky	23
4.1.1.	Rostlinný materiál	23
4.1.2.	Chemikálie	23
4.1.3.	Přístroje a pomůcky	24
4.2.	Kultivace explantátové kultury	24

4.2.1.	Kultivační nádoby a nástroje	24
4.2.2.	Příprava kultivačního média	24
4.2.3.	Odvození a pasážování kalusové kultury	25
4.3.	Stanovení růstové křivky u kalusové kultury <i>Juniperus virginiana</i>	26
5.	VÝSLEDKY	27
5.1.	Tabulky	27
5.2.	Grafy	29
6.	DISKUZE	31
7.	ZÁVĚR	34
8.	LITERATURA.....	35
9.	PŘÍLOHA.....	38
	ABSTRAKT	44
	ABSTRACT.....	45

1. ÚVOD

Explantátové kultury představují nadějný zdroj látek pro farmacii a další odvětví. Uplatnění našly i při rozmnožování a šlechtění rostlin. A ačkoli řadu původně přírodních substancí lze uměle syntetizovat, ekonomické důvody vedou k tomu, že některé z nich jsou stále extrahovány z rostlin. Právě komerční význam některých látek přispěl k většímu zájmu kolem problematiky *in vitro* kultur. I přes četné výhody však výnosy u většiny případů nemohou splnit obchodní požadavky. Proto jsou zkoumány různé způsoby vedoucí k vyšší produktivitě. [1-3]

Nedostatek přírodních zdrojů vedl k rozvoji a následné komerční produkci šikoninu a taxolu explantátovými kulturami. Podobnému stavu čelí podofylotoxin, nákladný prekurzor pro syntézu derivátů používaných při léčbě nádorů. Ten se tradičně získává z pryskyřice vyskytující se v rostlinách *Podophyllum peltatum* a *Podophyllum hexandrum*. Jejich dostupnost se však stala omezená v důsledku špatných způsobů pěstování, nadměrného sběru, pomalého růstu a slabého množení. Divoce rostoucí rostlina *Podophyllum hexandrum* jako hlavní zdroj podofylotoxinu je i kvůli nadměrnému sběru prohlášena za ohroženou. Chemická syntéza podofylotoxinu je uskutečnitelná, avšak finančně náročná. Tato omezení v dostupnosti podofylotoxinu vedou k hledání alternativních zdrojů a metod. Bylo provedeno již několik výzkumů na úrovni explantátových kultur týkajících se převážně rodů *Podophyllum* a *Linum*, přesto se zatím nepodařilo dosáhnout výroby v průmyslovém měřítku. Jako potenciální zdroj se jeví *Juniperus virginiana*, u kterého lze možné způsoby hledat jak cestou *in vitro* kultur, tak zužitkováním nepotřebné biomasy pro izolaci potřebného prekurzoru. Další varianty lze hledat přes rostliny obsahující podofylotoxin a houbu *Fusarium oxysporum*, u které byla též zaznamenána produkce této látky. [4-9]

2. CÍL PRÁCE

1. Zvládnutí metodiky kultivace rostlinných explantátových kultur.
2. Odvození kalusové kultury z listů intaktních rostlin *Juniperus virginiana* Hetzii, *Juniperus virginiana* Glauca, *Juniperus virginiana* Grey Owl.
3. Stanovení růstové křivky těchto kultur.

3. TEORETICKÁ ČÁST

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

3.1.1. Popis rostliny

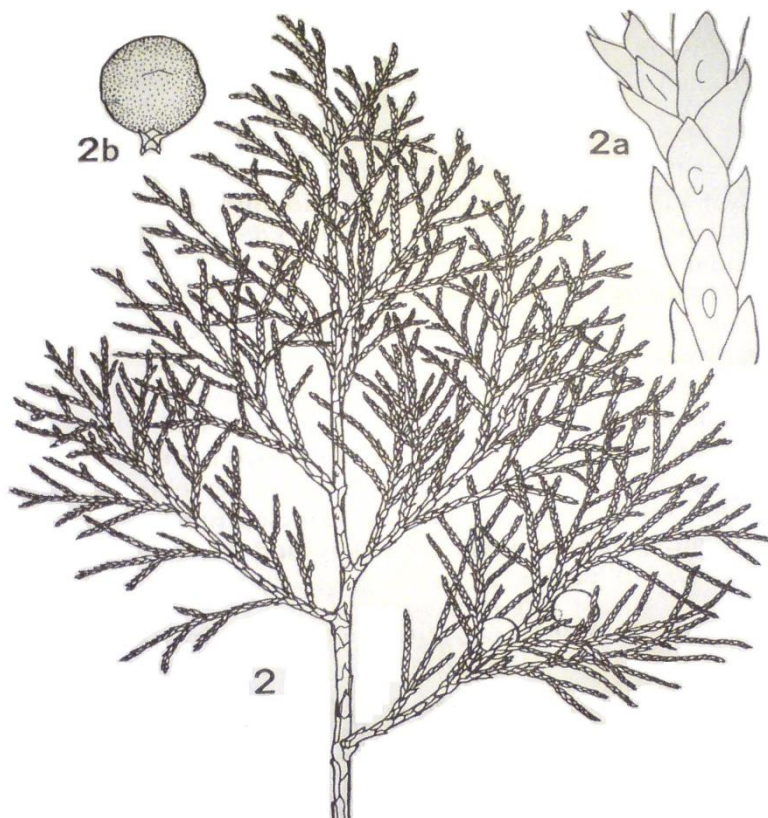
Rostlina patří do rodu *Juniperus* L., jalovec. Tyto vždyzelené, převážně dvoudomé dřeviny s úzce kuželovitou korunou mohou dorůstat do výšky kolem 15 m. Kůra je červenohnědě zbarvená. Čtyřhranné, tenké větvičky nesou 2 typy listů - jehlicovité s jedním pryskyřičným kanálkem nebo šupinovité, křížmostojné. Jehlicovité listy se vyskytují hlavně u mladých rostlin a bývají 5-10 mm dlouhé, špičaté, na svrchní straně se dvěma bílými proužky. Šupinovité listy se objevují u starších rostlin a jsou asi 2 mm dlouhé, přišpičatělé, na koncích odstálé od větvičky, s rýhovitou žlázkou. Listy po rozemnutí mají příjemné aroma. Samčí šištice, dlouhá asi 5 mm, se skládá z několika přeslenů šupinovitých tyčinek. Spodní tyčinky tvoří 3-4 prašná pouzdra, horní 1-2. Samičí šištici, dlouhou asi 2 mm, tvoří několik přeslenů semenných šupin, z nichž jen 3 horní šupiny nesou po 1 vajíčku. Při dozrávání šupiny dužnatí a srůstají v šišku připomínající bobuli. Tento útvar se označuje jako nepravý plod - galbulus. Galbuly jsou vejcovité, 1-2 semenné, temně modré, šedavě ožiněné a dozrávají 1. rokem. Semena jsou podlouhlá, trojhranná, bez křídel. Embryo má dvě, zřídka více děloh. Rostlina pochází z východní poloviny Severní Ameriky s výskytem od Kanady až po Floridu. Jalovec osidluje opuštěná území a soutěží s dalšími rostlinnými druhy na pastvinách. Zvyšuje riziko požárů a mění složení volně žijících živočichů a rostlin v přírodě. U nás se jalovec virginský hojně vysazuje pro ozdobu. [10-13]

Existuje kolem 40 vnítrodruhových variet jalovce virginského, které se liší především svým tvarem nebo vzrůstem a barvou listů. Najdeme v nich jak sloupovité druhy, tak i keřovité, široce rozložené a poléhavé.

Kalusová kultura byla odvozena z následujících variet:

- *Juniperus virginiana* **Glauca** - výška 5-10 m; sloupovitý, rychle rostoucí, hustě větvený; šedomodré až šedozelené listy, šupinaté, malé, přitisklé, uvnitř rostlin ojediněle také jehlicovité
- *Juniperus virginiana* **Grey Owl** - výška 3 m, šířka 1,8 m; keřovitý, vystoupavé silné větve, konečné větévky dost tenké; modrošedé listy, nepravidelně zvlňené

- *Juniperus virginiana* **Hetzii** - výška 3 m, šířka 6 m; keřovitý s rozložitými větvemi, na konci někdy mírně převislými; modrozelené listy, šupinovitě vzácně pentlicovité. [14]



Obr. 1: 2 – větvička *Juniperus virginiana*, 2a – část větvičky, 2b – galbulus [10]

3.1.2. Použití

Američtí indiáni používali galbuly a listy jalovce při léčbě nachlazení, revmatismu, bronchitidy, aftů. Dále sloužili jako diaforetikum, antiparazitikum, či k očištným rituálům. Mladé olistěné větvičky byly uvedeny v americkém lékopisu 1820-1894 jako diuretikum. Dnes se dřevo této rostliny používá na výrobu tužek a v nábytkářství, kde se využívá jeho vlastností odpuzovat hmyz poškozující oblečení. Díky vysoké odolnosti jsou ze dřeva dělány ploty. Ze dřeva je také získávána silice s antimikrobiálními účinky a repelentními vlastnostmi vůči různým škůdcům. Silice slouží pro výrobu repelentů,

parfémů a mýdel. Jako perspektivní se jeví listy, kterých by se dalo využít pro izolaci podofylotoxinu. [13, 15-18]

3.1.3. Obsahové látky

Mezi hlavní obsahové látky jalovce virginského patří komerčně využívaná silice, získávaná ze dřeva. Starší stromy obsahují více silice než mladší stromy. Obsah u starších stromů se pohybuje kolem 3,5 %. Silice jalovce se skládá až z 200 složek, tvořené převážně monoterpeny a seskviterpeny. Jednotlivé části rostliny mají různé zastoupení složek s různým obsahem. Cedrol, thujopsen, cedren, α - a β pinen, elemol, felandren, safrol, limonen, terpinen-4-ol patří mezi nejvíce zastoupené složky. Mezi další obsahové látky zastoupené v jalovci virginském se řadí flavonoidy, cukry, organické kyseliny, třísloviny, vitaminy, minerály, pryskyřice a lignany – podofylotoxin, α -, β - peltatin a další. Přítomnost podofylotoxinu byla dokázána v listech. Vyšší podíl této substance byl zaznamenán u starších jedinců bez ohledu na pohlaví. [6, 13, 16, 19-21]

3.1.4. Podofylotoxin

3.1.4.1. Obecná charakteristika

Podofylotoxin je aryltetralinový lakton patřící mezi lignany. Lignany vznikají dimerizací fenypropanových jednotek a mají chránit rostliny proti býložravcům a mikroorganismům. Tradičním zdrojem podofylotoxinu v přírodě je pryskyřice získávaná z rostlin rodu *Podophyllum*, převážně *P. peltatum* a *P. hexandrum*. Obsah této substance se v oddenku u *P. peltatum* pohybuje přibližně od 0,3 do 1 %, u *P. hexandrum* kolem 4 % suché hmotnosti. Mezi další rostliny obsahující podofylotoxin a příbuzné lignany patří rody *Linum*, *Juniperus*, *Hyptis*, *Teucrium*, *Nepeta*, *Dysosma*, *Callitris*, *Thymus*, *Thuja* a další. Bylo zaznamenáno, že podofylotoxin produkuje i houba *Fusarium oxysporum*. [5, 22, 23]

3.1.4.2. Biologická aktivita

Podofylotoxin a jeho deriváty mají protinádorové, antivirové, antirevmatické, projímavé, antioxidační, antitrypanozomální, insekticidní vlastnosti a účinky proti

receptoru pro melanokortin-4. V praxi se využívá protivirového účinku na topickou léčbu genitálních bradavic (*Condyloma acuminata*), perianálních a dalších typů bradavic. Deriváty podofylotoxinu se používají při léčbě novotvarů, především lymfomů, plicních a testikulárních nádorů. Samotný podofylotoxin se při léčbě nádorů u člověka nepoužívá, jelikož je pro něj příliš toxický. V praxi se uplatnily jeho glykosylované deriváty- etoposid, teniposid a etopophos, pro něž podofylotoxin slouží jako prekurzor při chemické syntéze. [5, 7, 24]

3.1.4.3. Mechanismus účinku

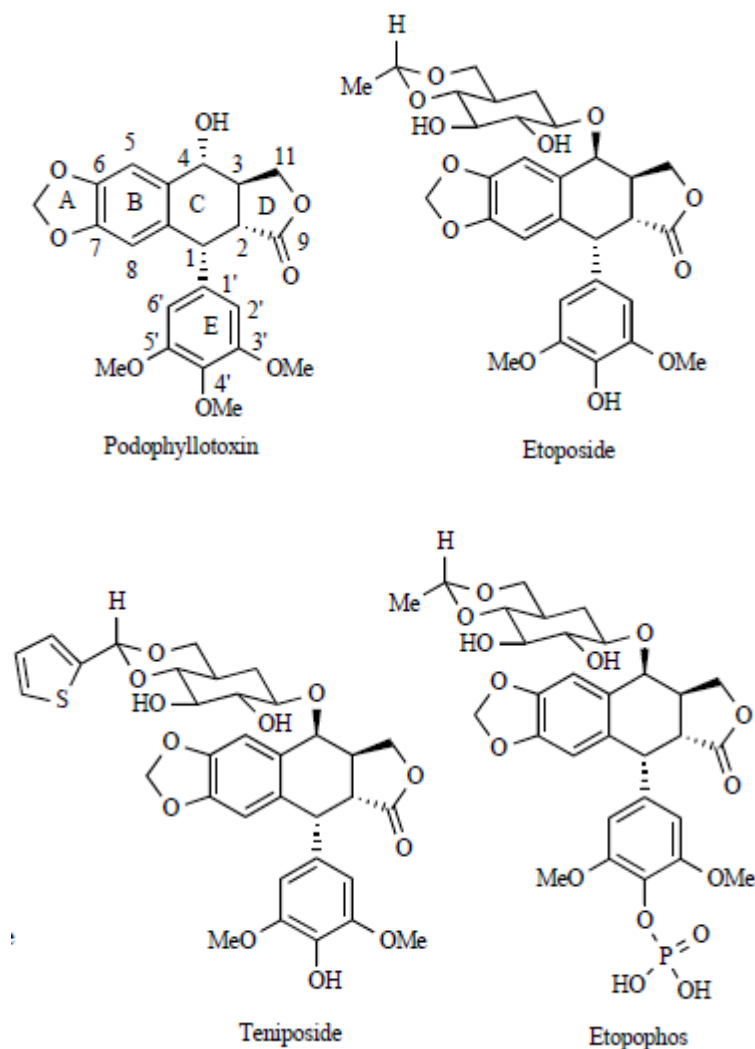
Protivirový mechanismus účinku spočívá v narušení tvorby dělicího vřeténka. Dělicí vřeténko, složené z mikrotubulů, je důležitou složkou pro buněčné dělení. Mikrotubuly jsou utvářeny polymerizací α a β tubulinových jednotek. Podofylotoxin se reverzibilně váže na α/β tubulinový dimer, čímž brání polymerizaci tubulinu a tím narušuje rovnováhu mezi polymerem a dimerem. Zatímco tvorba mikrotubul je vazbou podofylotoxinu na α/β tubulinový dimer zastavena, depolymerizace stále pokračuje. Toto vše způsobí zastavení buněčného cyklu v mitotické fázi. [7, 22, 24, 25]

Antineoplastický mechanismus účinku spočívá v inhibici topoizomerázy II. Topoizomeráza je enzym, který zodpovídá za kontrolu topologického stavu DNA, s významnou rolí během replikace DNA. Topoizomerázy dělíme do dvou skupin. Topoizomeráza I rozštěpuje jedno vlákno DNA, kdežto topoizomeráza II rozštěpuje obě vlákna dvoušroubovice. Deriváty podofylotoxinu se pravděpodobně nejprve váží na DNA, což zlepšuje vaznost k topoizomeráze II, a tak je bráněno opravě DNA. Takto vzniklý komplex vytváří jedno- a dvouvláknové zlomy v DNA. To vede k zastavení buněčného cyklu v pozdní S a rané G2 fázi a smrti buňky. [7, 22, 24, 25]

3.1.4.4. Chemická struktura

Molekula podofylotoxinu se čtyřmi chirálními uhlíky na pozicích 1-4 se skládá z pěti kruhů značených písmeny A-E. Kruhy A-D tvoří téměř planární útvar. Do krajů molekuly jsou zabudovány kyslíky - dioxol v kruhu A, lakton v kruhu D, sekundární alkohol na C-4 a tři methoxylové skupiny na C-3', -4', -5' v kruhu E. Aromatizovaný kruh E s α konfigurací má určitý stupeň volné otáčivosti. Stereochemické vlastnosti na uhlíku 4 určují afinitu molekuly k tubulinu. [7]

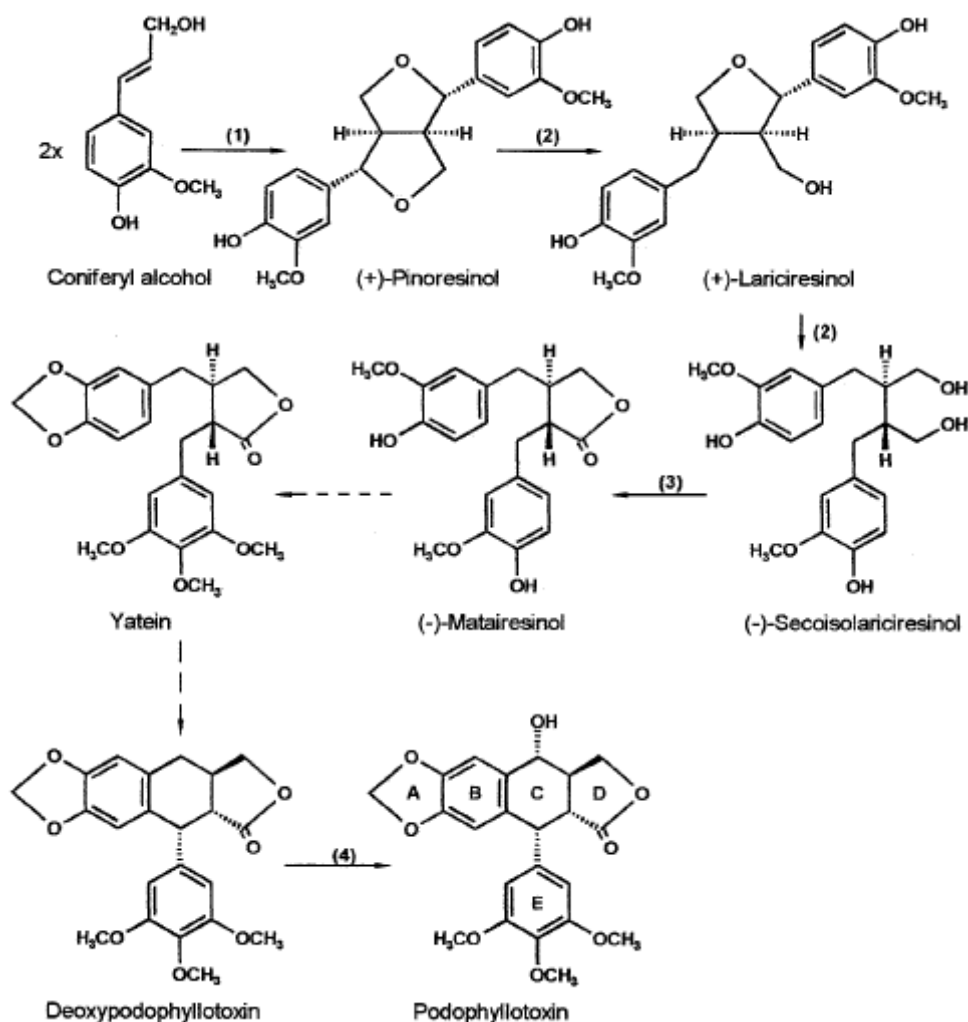
Kruh A není pro účinek nezbytný, ale jeho modifikacemi se snižuje účinek. Uskupení s dioxolem se proto jeví jako optimální. Modifikace na kruhu B vedou ke ztrátě účinku. Kruh C je hlavním místem strukturálních změn. 4- hydroxy epimer má o řád menší aktivitu. Aromatizací se účinek ztrácí. Současná epimerizace a zavedení objemného substituentu na uhlíku 4 však vede ke zvýšení topoizomerázové aktivity. Laktonová skupina v kruhu D není nutná, ale změny v tomto kruhu vedou ke snížení účinku molekuly. Trans uspořádání (2α , 3β) mezi kruhy C a D má výrazně vyšší účinnost než cis uspořádání. Kruh E musí mít volnou otáčivost a být v α konfiguraci. Demethylací na uhlíku 4' vzniká derivát s vyšší protinádorovou aktivitou. V této pozici je také možné připravit deriváty ve formě prolečiv. [7, 25]



Obr. 2: Chemická struktura podofylotoxinu a jeho derivátů [5]

3.1.4.5. Biosyntéza

Pravděpodobná biosyntéza podofylotoxinu vychází ze dvou molekul koniferyl alkoholu. Koniferyl alkohol vzniká fenyylpropanoidovou cestou přes dráhu kyseliny šikimové. Dimerizací koniferyl alkoholu na β -uhlíku se utváří (+)-pinoresinol, který redukcí v přítomnosti NADPH přechází přes (+)-lariciresinol na (-)-secoisolariciresinol. Následnou cyklizací se tvoří (-)-matairesinol. Další kroky vedoucí až k prvnímu aryltetralinovému derivátu, deoxypodofylotoxinu, nejsou doposud známy. Předpokládá se, že (-)-matairesinol je převeden na yatein přes chinometanové meziproducty. Z deoxypodofylotoxinu vzniká hydroxylací podofylotoxin. [7, 24]



Obr. 3: Pravděpodobná biosyntéza podofylotoxinu [24]

3.2. Rostlinné explantáty

3.2.1. Obecná charakteristika

Jako rostlinný explantát označujeme každý fragment živého pletiva, orgán nebo komplex orgánů, odebraný buď z intaktní rostliny, nebo z již existující kultury s cílem pěstovat jej v podmínkách *in vitro*.

Explantátová kultura je všeobecný termín používaný k popisu všech typů rostlinných explantátů. Kultury rostlinných explantátů můžeme rozlišovat dle více hledisek. Podle morfologické charakteristiky lze kultury dělit do pěti kategorií:

- 1) Orgánové kultury – skládají se z orgánových systémů, jednotlivých orgánů nebo jejich částí. Dané podmínky umožňují jejich diferenciaci a částečně zůstává zachována i jejich stavba a funkce.
- 2) Tkáňové (pletivové) kultury – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy pletiva, pomnožované většinou na polotuhých nebo tuhých živných půdách, výjimečně v tekutých půdách.
- 3) Suspenzní kultury – složené z volných buněk a buněčných shluků suspendovaných v tekuté živné půdě, kde jsou promíchávány a provzdušňovány.
- 4) Buněčné kultury – tvoří je jednotlivé buňky kultivované v tekuté, polotekuté půdě nebo i na nosiči nasyceném živnou půdou.
- 5) Protoplastové kultury – izolované kultury rostlinných buněk, u kterých došlo k enzymatickému nebo mechanickému odstranění buněčné stěny. Tyto buňky poté zůstávají obaleny jen plasmalemou. [26, 27]

3.2.2. Odvození explantátových kultur

Při zakládání *in vitro* kultur volíme vhodný explantát dle druhu kultury, kterou chceme založit, účelu zakládané kultury a použitého rostlinného druhu. Při výběru rostliny, pro odvození explantátové kultury je zapotřebí věnovat zvýšenou pozornost zdravotnímu stavu rostliny, zhodnotit růstové schopnosti, fyziologické vlastnosti a vlastnosti, pro které by měla být vybraná rostlina využita. Volba závisí také na ročním období a na postavení odebírané části v rámci celé rostliny. Správný výběr vhodného materiálu má velký vliv na úspěšnost založení explantátové kultury. Nejlepších výsledků je dosaženo, je-li explantát odebrán v aktivní fázi růstu anebo ze zásobních orgánů. [26, 27, 28]

Po výběru rostlinného materiálu je zapotřebí přistoupit k jeho sterilizaci. Sterilizace materiálu souvisí s jeho povrchovou dezinfekcí. Tento proces zahrnuje opláchnutí vodou a povrchovou dezinfekci pomocí jednoho nebo více dezinfekčních činidel. Redukci počtu mikroorganismů také napomáhá přidání detergentu, protože zlepšuje smáčivost povrchu a zvyšuje účinek dezinfekce. Dezinfekční roztok by neměl poškodit vlastní explantát. Mezi nejběžnější dezinfekční činidla patří etanol, chlornan sodný, chlornan vápenatý, peroxid vodíku, SAVO, chloramin B a další. Dané roztoky se používají v různých koncentracích. Doba sterilizace závisí na druhu a velikosti kontaminace. Po dezinfekci resp. sterilizaci je nutné zbytky činidel odstranit z rostlinného materiálu opakovaným oplachováním sterilní destilovanou vodou. Protože standardní postupy nejsou schopny eliminovat endogenní mikroorganismy, přidávají se někdy do kultivačních médií nebo na povrch explantátu antibiotika. [26, 28]

Vysterilizovaný materiál se může dále sterilně upravit např. do požadované velikosti a poté se umístí do kultivační nádoby s živným médiem. Uzavřená nádoba s explantátem se poté přemístí do kultivační místnosti nebo boxu, kde je kultivována za řízených podmínek. [28]

Pokud sterilizace proběhla úspěšně a máme vhodně nastavené kultivační podmínky, probíhá u explantátů organogeneze nebo tvorba neorganizovaného pletiva – kalusu. Růst kalusu lze indukovat umístěním explantátu na médium s relativně vysokou koncentrací auxinu (1-10 mg/l) v přítomnosti nižší koncentrace cytokininu. V případě, že sterilizace proběhla neúspěšně, projeví se kontaminace kultury během 3-5 dnů, u endogenní kontaminace kolem 10 dnů. [26, 28]

Při izolaci a sterilizaci rostlinného materiálu může také dojít k poranění pletiv a následnému uvolnění a zvýšené syntéze enzymů – oxidáz obsahujících měď (např. polyfenoloxidáza, tyrozináza). Tyto enzymy v interakci s polyfenoly způsobí hnědnutí až černání pletiv, což může vést k zastavení růstu až k nekróze. Barevné změny se více vyskytují u starších pletiv. Tomu lze zabránit odstraněním fenolových sloučenin např. častějším pasážováním na čerstvé médium či přidáním aktivního uhlí nebo polyvinylpyrrolidonu. Další metodou je ovlivnění redoxního potenciálu přidáním antioxidantů (kyselina askorbová, kyselina citronová, L-cystein, glutathion). [26, 28, 29]

Během kultivace dochází ke změnám některých parametrů. *In vitro* kultura mj. čerpá živiny z média a vylučuje exkrekty, čímž negativně ovlivňuje svůj růst. Proto i

z těchto důvodů dochází k pasážování - přenášení kultury z jednoho média na médium čerstvé. Interval pasážování bývá různě dlouhý, obvykle 4-5 týdnů. [26]

Kalus lze využít k organogenezi, embryogenezi, udržení kalusové kultury nebo k vytvoření suspenzní kultury. Suspenzní kultura může vznikat mechanickou nebo enzymatickou cestou. Při mechanické cestě se nádoba s kulturou umístí na roller nebo třepačku. Enzymatická cesta zahrnuje přidání pektináz nebo polygalakturonáz. U suspenzních kultur používáme tekutá média, která se pohybují. Buňky jsou tedy v přímém styku s médiem, což jim zajišťuje snadný přísun živin a dobrou výměnu dýchacích plynů. Toto umožňuje buňkám velmi rychlý růst. [26, 27]

3.2.3. Podmínky kultivace

Na růst explantátu má vliv mnoho faktorů, a to jak endogenních, tak i exogenních. Pomocí exogenních faktorů ovlivňujeme podmínky kultivace. Řadíme mezi ně složení živného média, růstové regulátory a fyzikální podmínky – světlo, teplotu, atmosférickou vlhkost a pH živného média. [30]

3.2.3.1. Teplota

Stejně jako u většiny organismů, tak i u explantátových kultur platí, že teplota má silný vliv na růst a vývoj. Pokud je to možné, tak by pro každou kulturu měla být stanovena optimální hodnota. Většinou se pohybuje v rozmezí 20-30°C. U řady druhů bylo popsáno, že i teploty mezi 30-35°C zvyšují růst. Příliš vysoké teploty poškozují buňky, pokud jsou hodnoty nízké, dochází ke zpomalení až zastavení metabolismu. Během experimentu by se teplota měla udržovat konstantní. [26, 30]

3.2.3.2. Osvětlení

Působením světla můžeme růst podpořit i inhibovat. Vliv osvětlení závisí na délce trvání světla a tmy, jeho intenzitě (většinou 500-1000 luxů) a dalších parametrech. Kultury pěstované s trvalým osvětlením, vykazovaly nižší růst než kultury pěstované v režimu 12 hodin světlo a 12 tma. Někdy lze pozorovat vyšší růst při expozici ve tmě. I rhizogeneze bývá podpořena tmou nebo nižší intenzitou světla. U explantátů se schopností fotosyntézy se zlepšil růst při vyšší intenzitě světla. Také reakce růstových regulátorů může být modifikována osvětlením. [26, 30]

3.2.3.3. Acidita živného média

Hodnota pH média se pohybuje většinou mezi 5,6 – 5,8, bývá tedy slabě kyselé. Různé kultury však mohou vyžadovat jiné pH pro jejich optimální růst. Aciditu média upravujeme přidáním NaOH (někdy KOH) nebo HCl. Nevhodně zvolené rozmezí může narušovat stěnu buněk, pufovací schopnosti cytoplazmy, případně může negativně ovlivňovat některé komponenty živných půd. Během sterilizace média je nutné počítat s tím, že dochází k poklesu pH. [26, 31]

3.2.3.4. Atmosférická vlhkost

Dle požadavků kultury volíme vhodnou hodnotu. Rozmezí se pohybuje od 20-98%. Při nižších hodnotách vlhkosti než je vyžadováno, pletiva korovají nebo hynou. Při vyšších hodnotách páry kondenzují a inhibují růst. [26]

3.2.3.5. Živné médium

Živné médium je umělý zdroj živin a růstových regulátorů používaný pro kultivaci rostlinných explantátů. Nároky jednotlivých kultur na složení půd se mohou měnit, proto je někdy nutné modifikovat složení půdy pro danou kulturu. Živná média lze rozdělit na tekutá a tuhá. Tuhá média se používají pro založení tkáňové a orgánové kultury a jejich udržení. Při práci s nimi musíme počítat s tím, že do kontaktu s médiem přichází jen spodní strana explantátu, a že s rostoucí kulturou se mění gradient živin, růstových faktorů a odpadních produktů mezi kulturou a médiem. Dále také může být omezena difúze plynů k explantátu okolním médiem. Tekutá média se používají hlavně u suspenzních kultur, ale slouží i pro růst orgánové a tkáňové kultury. U tekutých médií se lze často setkat s mícháním či třepáním kultivační nádoby s obsahem, což umožňuje zvýšení provzdušnění, rovnoměrnou distribuci živin a odpadních produktů. K nejznámějším médiím patří:

MS médium (Murashige, Skoog)

B5 médium (Gamborg)

SH médium (Schenk, Hildebrandt)

NN médium (Nitsch, Nitsch)

WPM médium (McCown, Lloyd)

[27, 31, 32]

Obsah jednotlivých médií mohou tvořit:

1) Minerální látky

A) Makroprvky – zahrnují šest prvků dusík, draslík, fosfor, vápník, hořčík a síru. Jejich optimální koncentrace závisí na rostlinném druhu.

- Dusík

Je to důležitý prvek pro růst rostliny. Rostlinné buňky mohou růst pouze na médiu obsahujícím dusík ve formě nitrátového iontu, ale mnohem lepšího růstu je většinou dosaženo, je-li do média dodáván společně v nitrátové formě a ve formě amonných solí. Určité množství dusíku lze zajistit také přidáním organického dusíku. Obsah dusíku v kultivačním médiu by se měl pohybovat v rozmezí 25-60 mM. Většina anorganického dusíku je převedena na aminokyseliny a poté na proteiny.

- Draslík

Je to hlavní ion v rostlině s kladným nábojem. Jeho koncentrace v médiích se pohybuje kolem 20-30 mM, kam se dodává ve formě chloridu nebo dusičnanu.

- Fosfor

Tvoří nedílnou součást DNA a dalších strukturálních sloučenin. Do médií se přidává ve formě fosforečnanů v koncentracích mezi 1-3 mM.

- Vápník

Hraje důležitou roli při syntéze buněčné stěny a slouží jako kofaktor mnoha enzymů. Do médií se přidává jako chlorid vápenatý nebo dusičnan vápenatý o koncentraci 1-3 mM.

- Hořčík

Hořčík je důležitý prvek pro fungování enzymů, který také tvoří důležitou část molekuly chlorofylu. V médiích se vyskytuje jako síran hořečnatý v koncentraci 1-3 mM.

- Síra

Síra je součástí AMK a má vliv na strukturu proteinů. V médiích se objevuje jako sírany (nejčastěji hořečnatý) v koncentraci 1-3 mM. [26, 32]

B) Mikroprvky – řadíme mezi ně železo, mangan, zinek, bor, měď, molybden, kobalt, jod, případně i nikl, křemík, hliník, sodík a chlor. Přidávání niklu, křemíku, hliníku, sodíku, chloru, jodu a kobaltu se zatím pro většinu *in vitro* kultur ukazuje jako nedůležité. Koncentrace těchto prvků se v živném médiu pohybuje v rozmezí od 0,1 μM do 100 μM . [26, 32]

2) Zdroj uhlíku a energie

Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie se používá sacharóza v koncentraci 2-3 %. Někdy je možné ji nahradit glukózou či fruktózou. Další zdroje se jeví jako méně efektivní. Sacharóza při rostlinných explantacích představuje substrát heterotrofní výživy, jelikož schopnost explantátu vyživovat se autotrofně je velmi omezená. Sacharóza také upravuje osmotickou hodnotu média a umožňuje v případě nedostatečné sterilizace růst mikroorganismů. Při sterilizaci v autoklávu se sacharóza částečně rozkládá na fruktózu a glukózu. [26, 28, 32]

3) Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku

Aminokyseliny, přidávané do živného média, mohou stimulovat růst explantátu, proto se přidávají při kultivaci buněčných suspenzí a protoplastů. Slouží jako operativní zdroj dusíku, který je kulturou rychle využíván. Jako zdroj organického dusíku se používá hydrolyzát kaseinu v koncentraci 0,05-0,1 % nebo jiný bílkovinný hydrolyzát. Často se do média přidávají i jednotlivé aminokyseliny např. glycin, L-glutamin, L-asparagin v koncentraci do 100 mg/l. Při vyšších koncentracích mohou tyto aminokyseliny růst inhibovat. [26, 28]

4) Vitamíny

Intaktní rostlina sama syntetizuje vitamíny nezbytné k jejímu růstu a vývoji, avšak v podmínkách explantace může být tato syntéza snížena nebo zastavena a může dojít ke zpomalení nebo k zastavení růstu rostlinného explantátu. Mezi vitamíny nejčastěji používané v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. Na rozdíl od thiaminu se přítomnost ostatních vitamínů nejeví tak nezbytná. Myo-inositol se vyskytuje ve většině médií a může stimulovat růst explantátu. Obecně se vitamíny používají ve velmi nízkých koncentracích. Dalšími vitamíny přidávaných do médií jsou biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin a další. [26, 28, 32]

5) Nedefinované organické složky

Hlavně v minulosti byly do médií přidávány těžce definovatelné různé extrakty, které do jisté míry nahrazovaly aminokyseliny, vitamíny, fytohormony atd. Některé z těchto látek se používají doposud v případech, kdy explantát na definovatelné půdě neroste nebo roste jen obtížně. Mezi tyto složky řadíme bílkovinné hydrolyzáty, kvasničné, sladové extrakty, kokosové mléko, ovocné šťávy a další. Jejich nevýhodou je, že neznáme přesné složení. Dnes se používá jen hydrolyzát kaseinu a kokosové mléko. [26, 28, 32]

6) Aktivní uhlí

V médiích má stimulační i inhibiční vliv na růst explantátu. Aktivní uhlí absorbuje látky produkované explantátem, ale také absorbuje látky přidávané záměrně do živných půd. Používá se v koncentraci 0,5-3 %. [28, 32]

7) Látky používané pro zpevnění média

Pro vytvoření tuhých půd se nejčastěji používá agar, který vykazuje oproti jiným gelizujícím látkám řadu výhod. Agarové půdy jsou stabilnější při kultivačních teplotách, agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. K tvorbě gelu dochází při teplotě 60-100 °C po předchozím smísení agaru s vodou, vzniklý gel tuhne zhruba při teplotě 45 °C. Tuhost půdy s agarem závisí na druhu agaru, pH a koncentraci, která bývá kolem 0,8-1 %. Agar se získává z mořských řas a prodává se v různých stupních kvality a čistoty, proto může být někdy zdrojem nečistot. Pokud je teplota při sterilizaci média příliš vysoká 121 °C nebo je doba sterilizace příliš dlouhá (více jak 30 minut), případně opakujeme sterilizaci několikrát, ztrácí agar schopnost tvořit gel. Dalšími látkami tvořících pevné médium jsou agaróza, phytigel a gerlit, které tvoří velmi čisté gely usnadňující detekci nečistot.

V případě, že nepoužijeme pevné médium, je možné použít mechanických podpor v podobě filtračního papíru, polyuretanové pěny, čedičové vaty, perforovaného celofánu, skleněných kuliček a dalších. [26, 28, 32]

8) Voda

Živná média se připravují z destilované, někdy se používá i voda redestilovaná. [28]

9) Antibiotika

Do médií se přidávají jen v některých případech. Nejčastěji se používá vankomycin, rifampicin, kanamycin a chloramfenikol. Používání antibiotik však není bez rizik, jelikož mohou být k rostlinným buňkám toxické. [28, 31]

10) Antioxidanty

Antioxidanty ovlivňují redoxní potenciál. Do živných půd se přidávají, aby zabránily hnědnutí explantátu. Řadíme mezi ně kyselinu askorbovou, kyselinu citronovou, L-cystein, glutathion a další. [28, 31]

11) Růstové regulátory

3.2.3.6. Růstové regulátory

Růstové regulátory jsou organické molekuly, které v nízkých koncentracích vyvolávají fyziologickou odpověď u rostlin. Umožňují tak regulovat vývojové procesy a přizpůsobovat se měnícím podmínkám prostředí prostřednictvím ovlivnění buněčného dělení, diferenciaci buněk a zvětšování buněk. U *in vitro* kultur umožňují růst, diferenciaci a organogenezi. Růstové regulátory můžeme dělit na přírodní a syntetické. Přírodní rostlinné regulátory označujeme jako fytohormony, které jsou syntetizovány v mnoha pletivech a buňkách, ale nejvíce v meristematických pletivech. Dále lze růstové regulátory dělit na indukory a inhibitory. Většina růstových regulátorů má více účinků, které často závisí na lokalizaci, koncentraci a podnětech prostředí. Často také fungují navzájem mezi sebou a jejich účinky se překrývají. O charakteru růstu explantátových kultur nerozhoduje jen typ a koncentrace růstových regulátorů, ale také jejich vzájemné poměry. [31, 33, 34]

Auxiny

Auxiny zahrnují řadu chemických látek přírodního i syntetického původu. Mezi nejznámější patří indol-3-octová kyselina (IAA) syntetizována z indolu nebo tryptofanu. Mezi další zástupce se řadí indol-3-máselná kyselina (IBA), kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D), kyselina naftylacetová (NAA), kyselina chlorfenoxycetová (4-CPA) a další. IAA představuje nativní auxin, ostatní zmíněné auxiny jsou syntetické. Různé druhy auxinů mají různou fyziologickou aktivitu,

pohybují se různou rychlostí pletivy, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jsou jiným způsobem metabolizovány. Většina syntetických auxinů bývá účinnější než přírodní. 2,4-D je například 8-12 x účinnější než IAA. [26, 28, 34]

Obecně auxiny indukují buněčné dělení, elongaci, zvětšení buněk. Mechanismu účinku spočívá především ve vazbě auxinu na jaderný receptor TIR 1 (Transport Inhibitor Response). Tímto se spouští celá kaskáda událostí vedoucí k zapínání a vypínání různých genů, jejichž produkty pak odpovídajícím způsobem ovlivňují chování buněk. Dále také auxiny indukují protonovou pumpu, zvyšují koncentraci H^+ , čímž dochází k poklesu pH v buněčné stěně. To vede k aktivaci enzymů narušujících buněčnou stěnu a následné expanzi buňky. Auxiny se v kultivačním médiu používají především ke stimulaci růstu kalusu a buněk, k indukci tvorby adventivních kořenů, k indukci somatické embryogeneze a ke stimulaci růstu apikálních meristémů. Obvyklé množství se pohybuje mezi 0,1-20 mg/l. [33-35]

Cytokininy

Cytokininy se v rostlinách se nacházejí převážně v kořenových čepičkách, plodech a embryích. V rostlinách fungují často ve spolupráci s auxiny. Zpomalují stárnutí rostlin zvýšenou syntézou bílkovin, nukleových kyselin a snížením degradace chlorofylu. Výrazně podporují buněčné dělení, indukují aktivitu meristémů a tvorbu pupenů. Výrazně snižují apikální dominanci a podporují růst axilárních pupenů (stimulace větvení). Jejich přítomnost v médiu často brání tvorbě kořenů. Zástupci cytokininů jsou tvořeny deriváty odvozených od adeninu, které mají opět přírodní i syntetický původ. Mezi nejčastější zástupce patří benzylaminopurin (BAP), kinetin, zeatin a nejvíce aktivní cytokinin isopentenyladenin (2IP). Do této skupiny patří také adenin, který sice nevykazuje vlastní aktivitu, ale zvyšuje účinnost cytokininů. Reakce explantátu je značně závislá na vzájemném poměru cytokininů a auxinů. Je-li poměr auxinu a cytokininu vysoký dochází ke stimulaci embryogeneze, tvorby kořenů a kalusů. Je-li poměr nízký, dochází k indukci tvorby adventivních či axilárních prýtlů. Účinek však značně závisí i na koncentraci použitého růstového regulátoru. [26, 28, 33, 34]

Gibereliny

Jedná se o skupinu tetracyklických organických kyselin tvořených čtyřmi molekulami isoprenu. Nejvíce se využívá giberelin GA3 a giberelin GA7. Většina

explantátů gibereliny pro svůj růst nepotřebuje, proto se přidávají do médií jen zřídka. Nejvíce giberelinů produkují kořeny a mladé listy, ale největší koncentrace se nachází v semenech. Gibereliny stimulují růst explantátů, případně ruší endogenní dormanci. GA3 se přidává většinou do média za účelem stimulace buněčných kultur při nízké hodnotě suspenze, ke stimulaci růstu kalusu a ke stimulaci růstu zakrslých rostlin. K tomu aby se projevil stimulační účinek giberelinu, je zapotřebí přítomnost auxinu, ať již nativního v rostlinném explantátu nebo exogenního v živném médiu. [26, 28, 34]

Kyselina abscisová

Tento fytohormon odvozený od kyseliny mevalonové vykazuje inhibiční růstovou aktivitu a slouží tedy jako antagonist a k ostatním hormonům podporujících růst. Působí zejména ve stresových situacích. Dále například ovlivňuje vodní režim a metabolismus rostlin. Do médií se přidává jen výjimečně za účelem indukce somatických embryí, stimulace tuberizace, květní indukce, navození dormance nebo k zbrzdění růstu explantátu. [28, 34]

Ethylen

Jedná se o jediný růstový regulátor v plynném skupenství, který je produkován řadou rostlinných orgánů. Jeho účinky zahrnují převážně dozrávání plodů, stárnutí a opadávání listů. U klíčících rostlin vyvolává trojí efekt. Rostliny jsou pak kratší, silnější a vykazují změnu orientace v prostoru. Auxiny mohou zvýšit syntézu etylenu, naopak vysoká koncentrace CO₂ produkci etylenu inhibuje. U *in vitro* kultur bývá považován obvykle za nežádoucí. [33, 34]

Brassinosteroidy

Látky steroidní struktury v nízkých koncentracích podporují elongaci stonku, ale silně inhibují růst kořene. Vykazují podpůrný efekt k ostatním růstovým regulátorům. [34]

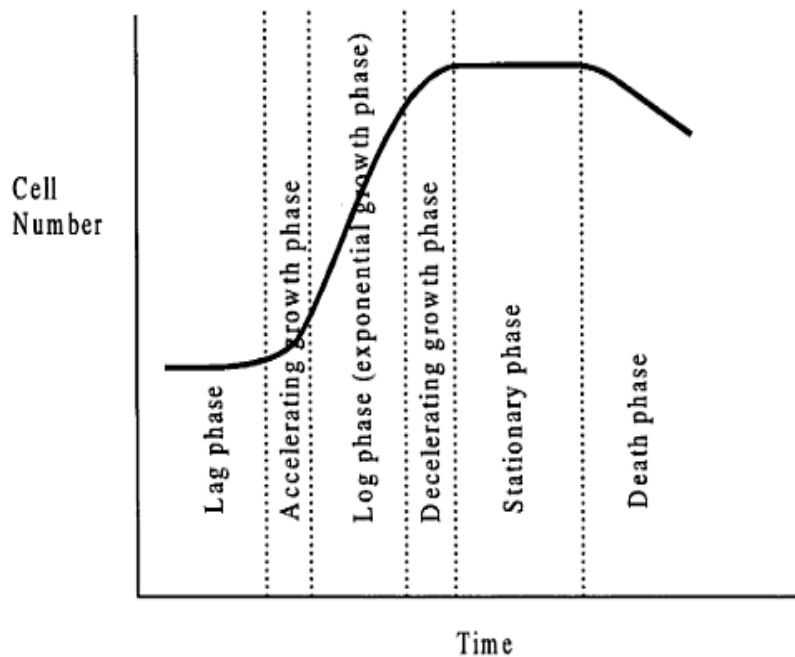
Mezi další růstové regulátory se řadí kyselina salicylová, oligosachariny, systemin, polyaminy, jasmonáty, maleinhydrazid a další. [33, 34]

3.2.4. Růstové fáze kultur

Kalusová kultura, vzniklá z nového explantátu, prochází třemi stupni vývoje. Jedná se o stupeň zahájení buněčného dělení. Stupeň aktivního buněčného dělení, kdy dochází k dediferenciaci buněk. A stupeň, kdy se buněčné dělení zpomaluje či úplně zastavuje a během kterého může dojít i ke zvýšení buněčné diferenciaci. Tyto stupně jsou obdobné růstu suspenzní kultury, kde podle různých parametrů (např. počet buněk, suchá hmotnost buněk, obsah DNA) v závislosti na čase můžeme změřit růst kultury a získat tak růstovou křivku ve tvaru písmene S. [27]

Růstovou křivku lze podrobně rozlišit na následující fáze:

- Lag fáze - období po naočkování, kdy se buňky přizpůsobují novému prostředí. V této fázi počet buněk zůstává konstantní, často ale i počet živých buněk klesá.
- Akcelerační fáze – buňky se množí se stále stoupající rychlostí. Všechny důležité enzymové reakce dosahují maximální rychlosti.
- Exponenciální fáze – počet buněk roste exponenciálně. Je dosaženo maximální rychlosti růstu. Tato fáze trvá, dokud není růst zbrzděn množstvím živin anebo hromaděním vlastních odpadních metabolitů.
- Deklinační fáze – rychlost množení se zpomaluje následkem vyčerpání substrátů nebo hromaděním toxických metabolitů. Křivka v této fázi se může značně lišit.
- Stacionární fáze – rychlost množení a odumírání buněk je v rovnováze. V této fázi počet živých buněk dosahuje maxima.
- Fáze odumírání – rychlost odumírání buněk převyšuje rychlost množení. Pro tuto fázi neplatí žádné obecné pravidlo, může probíhat rychle nebo pomalu. Dále lze také tuto fázi rozlišit na fázi zrychleného odumírání, fázi exponenciálního odumírání a deklinační fázi odumírání. [36]



Obr. 4: Růstová křivka [27]

V průběhu deklinační a stacionární fáze může dojít k diferenciaci buněk. U suspenzních kultur je méně výrazná než u kultur kalusových. Růst suspenzních kultur probíhá v porovnání s kalusovými rychleji. Rychlý růst způsobuje rychlejší odčerpávání živin a nutnost častějšího pasážování na čerstvé médium. Pasážování je třeba provádět na konci exponenciální fáze, kdy není růst brzděn. Délka doby mezi založením kultury a stacionární fází závisí na několika faktorech: na počáteční hustotě suspenze, délce lag fáze a růstové rychlosti buněčné linie. [26, 27]

3.2.5. Využití explantátových kultur

Využití explantátových kultur v různých odvětvích zahrnuje převážně produkci sekundárních metabolitů, rozmnožování a šlechtění rostlin. Sekundární metabolity rostlin se v průmyslovém měřítku většinou získávají chemickou syntézou nebo izolací z intaktních rostlin. Tyto způsoby však mohou být limitovány dostupností rostliny, obsahem látek v závislosti na ročním období a zacházení s rostlinou, obtížnou chemickou syntézou, cenou atd. Konečný produkt chemických syntéz bývá také obvykle směsí izomerů, zatímco buňka produkuje jediný stereoizomer. Kultury *in vitro* se mohou v průmyslové produkci sekundárních metabolitů uplatnit na několika úrovních, k tomu je však potřeba, aby jejich produkce byla ekonomičtější než dosavadní postupy získávání těchto látek. Získávání sekundárních metabolitů kultivací *in vitro* oproti tradičním způsobům má dále následující výhody:

- syntéza probíhá řízeně v kontrolovaných podmínkách nezávisle na klimatu a půdních podmínkách
- sterilní kultivací jsou vyloučeny negativní biologické vlivy měnící v přírodě produkci sekundárních metabolitů
- bez ohledu na geografický původ lze kultivovat buňky jakékoli rostliny během celého roku
- automatizací řízení buněčného růstu a regulací metabolických procesů může klesat výrobní cena a stoupat produkce [26, 38]

Kultury mohou obsahové látky v porovnání s intaktní rostlinou produkovat v menším, stejném či větším množství. Může dojít i k situacím, kdy kultury látky intaktní rostliny neprodukují vůbec nebo produkují odlišné. Právě nízká produktivita sekundárních metabolitů většinou rostlinných kultur je hlavním problémem, který brání jejich využití. [2, 3]

Zvýšení produkce sekundárních metabolitů lze dosáhnout několika postupy jako je např. selekce buněčných linií s vyšší produkcí, optimalizace buněčného média, optimalizace fyzikálně-chemických parametrů, elicitace, imobilizace, biotransformace, genetická transformace, využití bioreaktorů atd. [3]

Relativně velkých hodnot dosahoval např. morfin a kodein u kultur *Papaver somniferum*, L-DOPA u *Mucuna pruriense*, diosgenin u *Dioscorea deltoidea*, kapsaicin u *Capsicum frutescens* a camptothecin u *Camptotheca acuminata*. [39, 40]

Product	Plant Species	<i>In Vitro</i> Culture %DW	Plant %DW	Performance Ratio
Glutathione	<i>Nicotiana tabacum</i>	1.0	0.1	10.0
Anthraquinones	<i>Morinda citrifolia</i>	18.0	2.2	8.0
Rosmarinic acid	<i>Coleus blumei</i>	15.0	3.0	5.0
Ajmalicine	<i>Catharanthus roseus</i>	1.8	0.3	6.0
Serpentine	<i>Catharanthus roseus</i>	1.3	0.5	2.6
Diosgenine	<i>Dioscorea deltoide</i>	2.0	2.0	1.0

Obr. 5: Porovnání přítomnosti látek v suspenzní kultuře a intaktní rostlině [3]

Šikonin, první látka získávaná i k farmaceutickým účelům v průmyslovém měřítku, dokazuje úspěšnost využití explantátových kultur k produkci sekundárních metabolitů. K výrobě šikoninu bylo použito kultur *Lithospermum erithrorhizon*. Dalšími úspěšnými příklady z farmaceutického průmyslu jsou berberin z kultury *Coptis japonica*, kyselina rozmarýnová produkovaná *Coleus blumei* či vysoce ceněná látka paclitaxel z *Taxus sp.* [3, 4]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál, přístroje, pomůcky

4.1.1. Rostlinný materiál

Pro odvození kalusových kultur byly použity listy *Juniperus virginiana* Hetzii, *Juniperus virginiana* Glauca a *Juniperus virginiana* Grey Owl.

4.1.2. Chemikálie

Dihydrogenfosforečnan amonný *p.a.*

Dusičnan draselný *p.a.*

Ethanol 96%

Ethylendiaminotetraoctan sodno-železitý *p.a.*

Chloramin B

Chlorid kobaltnatý *p.a.*

Chlorid pyridoxinia *p.a.*

Chlorid thiaminia *p.a.*

Chlorid vápenatý *p.a.*

Jodid draselný *p.a.*

Kinetin *p.a.*

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová *p.a.*

Kyselina α -naftyloctová *p.a.*

Kyseliny boritá *p.a.*

Kyselina nikotinová *p.a.*

Molybdenan sodný *p.a.*

Myoinositol *p.a.*

Sacharóza *p.a.*

Savo

Síran hořečnatý *p.a.*

Síran manganatý *p.a.*

Síran měďnatý *p.a.*

Síran zinečnatý *p.a.*

4.1.3. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen

Autokláv PS 20A, Chirana, Brno

Horkovzdušný sterilizátor HS 31 A, Chirana, Brno

Box s laminárním prouděním Fatran LF, Žilina

4.2. Kultivace explantátové kultury

4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje

Při práci s explantátovými kulturami bylo použito sklo SIAL, dostatečně odolné vůči vodě, chemikáliím a změnám teplot. Kovové nástroje používané při manipulaci s rostlinným materiálem byly opláchnuty 96% etanolem, zabaleny hliníkovou fólií a poté sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200°C po dobu 2 hodin.

4.2.2. Příprava kultivačního média

Pro kultivaci explantátových kultur *Juniperus virginiana* bylo použito živné médium dle Schenka a Hildebrandta (SH), které má následující složení [41]:

KNO ₃	2 500,00 mg.l ⁻¹
CaCl ₂	151,00 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	195,00 mg.l ⁻¹
(NH ₄)H ₂ PO ₄	300,00 mg.l ⁻¹
KI	1,00 mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	5,00 mg.l ⁻¹
MnSO ₄ H ₂ O	10,00 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,00 mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,10 mg.l ⁻¹
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,20 mg.l ⁻¹
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,10 mg.l ⁻¹
NaFeEDTA	19,80 mg.l ⁻¹
kyselina nikotinová	5,00 mg.l ⁻¹
pyridoxin chlorid	0,50 mg.l ⁻¹
thiamin chlorid	5,00 mg.l ⁻¹
myoinositol	1000,00 mg.l ⁻¹
sacharóza	30 000,00 mg.l ⁻¹

K SH médiu byly přidány růstové regulátory v kombinaci:

1. 3,0 mg.l⁻¹ α -NAA a 0,2 mg.l⁻¹ kinetin
2. 1,0 mg.l⁻¹ 2,4-D a 0,2 mg.l⁻¹ kinetin
3. 1,0 mg.l⁻¹ α -NAA a 0,2 mg.l⁻¹ kinetinu

Pro přípravu živného média byly jednotlivé látky odváženy na analytických vahách, či pipetovány z předem připravených zásobních roztoků. Po doplnění destilovanou vodou na objem 1 litr bylo živné médium rozlito po 30 ml do Erlenmeyerových baněk s předem vloženými můstky z filtračního papíru. Takto upravené baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány. Sterilizace probíhala při teplotě 121 °C, tlaku páry 0,1 MPa po dobu 15 minut v autoklávu.

4.2.3. Odvození a pasážování kalusové kultury

Odvození a pasážování kalusových kultur probíhalo v aseptickém boxu s laminárním prouděním. Box byl před prací vyčištěn 96% ethanolem a vyzářen germicidní lampou po dobu jedné hodiny.

K odvození kalusových kultur bylo nejprve nutné nalézt vhodný způsob povrchové sterilizace listů. Listy byly sterilizovány postupně v následujících krocích:

1. Ponořením do 70% (V/V) ethanolu po dobu 1-5 minut a následným opláchnutím sterilizovanou destilovanou vodou.
2. Ponořením do 10% (m/V) vodného roztoku chloraminu po dobu 10-20 minut a následným opláchnutím sterilizovanou destilovanou vodou.
3. Ponořením do 10% roztoku Sava po dobu 15-25 minut a následným opláchnutím sterilizovanou destilovanou vodou.
4. Opláchnutím 70% etanolem

Jako nejúspěšnější postup byla vyhodnocena sterilizace, kdy listy byly upraveny:

1. Ponořením do 70% (V/V) ethanolu po dobu 3 minut a následným opláchnutím sterilizovanou destilovanou vodou.
2. Ponořením do 10% (m/V) vodného roztoku chloraminu po dobu 20 minut a následným opláchnutím sterilizovanou destilovanou vodou.
3. Ponořením do 10% roztoku Sava po dobu 20 minut a následným opláchnutím sterilizovanou destilovanou vodou.
4. Opláchnutím 70% ethanolem.

Takto upravený rostlinný materiál byl přenesen pinzetou na můstky z filtračního papíru do Erlenmeyerových baněk s živným médiem. Kultivace probíhala při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma v subkultivačním intervalu 5 týdnů.

Byla zvolena nejvhodnější kombinace růstových regulátorů.

4.3. Stanovení růstové křivky u kalusové kultury *Juniperus virginiana*

Hodnocení růstu kultur probíhalo během šestitýdenní kultivace při 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma na médiu SH s přidavkem 3,0 mg.l⁻¹ α-NAA a 0,2 mg l⁻¹ kinetinu. Kalusové kultury variety Glauca v 16. pasáži a variet Hetzii a Grey Owl v 10. pasáži byly odebírány každý 7. den kultivace, tedy 7., 14., 21., 28., 35., 42. den. Každý odběr probíhal po pěti bankách. Výsledky byly pro jednotlivé dny zprůměrovány a vyneseny do tabulek 1-3 společně s hodnotami směrodatných odchylek.

Z rozdílu hmotností baněk před a po inokulaci byla vypočtena hmotnost inokula (m_i). Čerstvá hmotnost kalusu (m_k) byla stanovena z rozdílu váhy baněk před a po vyjmutí kalusu. Přírůstek čerstvé hmotnosti kalusu vyjádřený v gramech byl určen rozdílem mezi m_k a m_i . [42]

Procentuální přírůstek čerstvé hmotnosti byl určen dle vzorce:

$$\% = \frac{m_k - m_i}{m_k} [42]$$

Růstový faktor (R_f) byl vypočten dle vzorce:

$$R_f = \frac{\text{Procentuální přírůstek čerstvé hmotnosti}}{100} [42]$$

Aritmetický průměr byl určen dle vzorce:

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

Směrodatná odchylka byla vypočtena dle vzorce:

$$S = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} [43]$$

Růstová křivka byla určena vnesením růstového faktoru v závislosti na dnech odběru.

5. VÝSLEDKY

5.1. Tabulky

Tab. 1: Růst kalusové kultury *Juniperus virginiana* Hetzii

Den odběru	Hmotnost inokula [g]	Čerstvá hmotnost kalusu [g]	Přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	Přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	Růstový faktor
7	0,5151±0,1479	0,5548±0,1590	0,0397±0,0133	7,75±1,49	0,08±0,01
14	0,3618±0,1282	0,4609±0,1462	0,0991±0,0251	28,84±7,84	0,29±0,08
21	0,5219±0,1613	0,7626±0,2310	0,2407±0,0728	46,14±4,69	0,46±0,05
28	0,4354±0,0774	0,7573±0,1547	0,3219±0,1841	74,19±19,42	0,74±0,19
35	0,5642±0,0642	0,9866±0,1056	0,4224±0,0458	74,99±4,40	0,75±0,04
42	0,4899±0,1059	0,7979±0,2120	0,3080±0,1133	61,76±12,30	0,62±0,12

Tab. 2: Růst kalusové kultury *Juniperus virginiana* Glauca

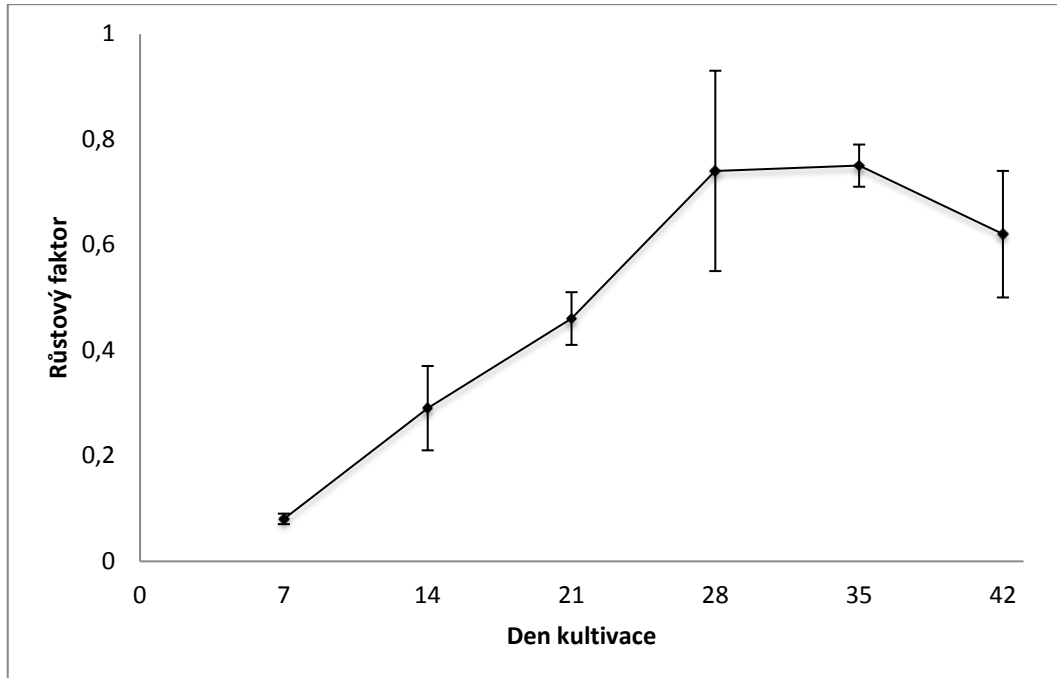
Den odběru	Hmotnost inokula [g]	Čerstvá hmotnost kalusu [g]	Přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	Přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	Růstový faktor
7	0,6802±0,0681	0,7757±0,1034	0,0955±0,0547	13,85±7,62	0,14±0,08
14	0,6539±0,0485	0,8473±0,1007	0,1934±0,0644	29,39±8,69	0,29±0,09
21	0,7231±0,1268	1,1405±0,1874	0,4173±0,0868	58,15±10,41	0,58±0,10
28	0,6741±0,1040	1,2047±0,1320	0,5306±0,0527	79,73±11,72	0,80±0,12
35	0,6267±0,1042	1,3479±0,1893	0,7212±0,0898	116,02±9,53	1,16±0,10
42	0,6317±0,1220	1,1808±0,1615	0,5491±0,0631	88,78±14,66	0,89±0,15

Tab. 3: Růst kalusové kultury *Juniperus virginiana* Grey Owl

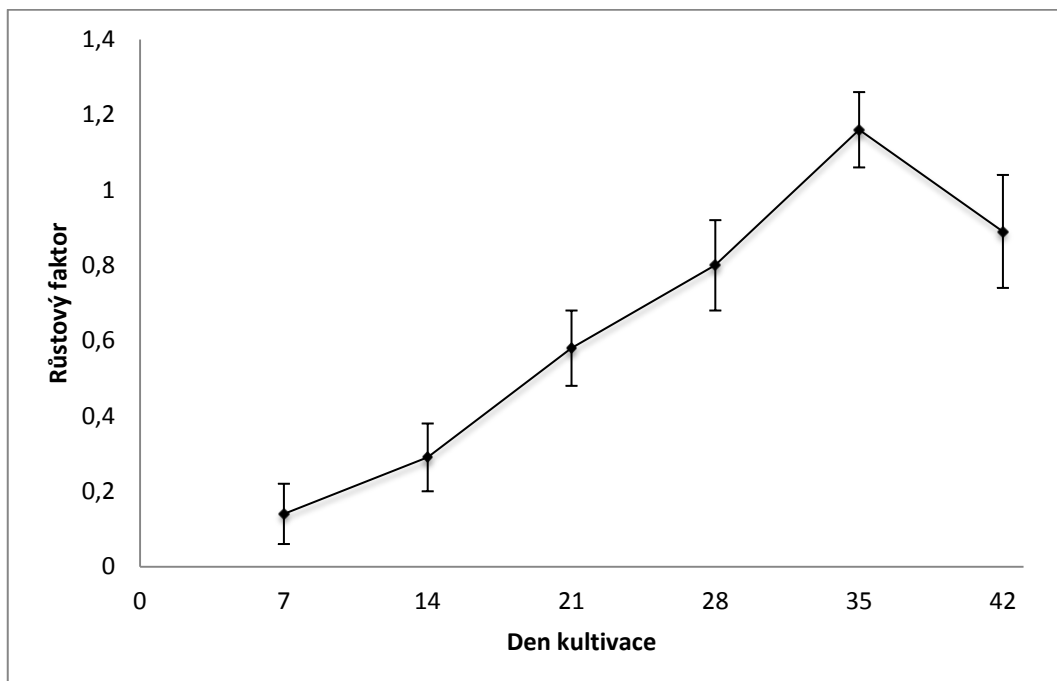
Den odběru	Hmotnost inokula [g]	Čerstvá hmotnost kalusu [g]	Přírůstek čerstvé hmotnosti [g]	Přírůstek čerstvé hmotnosti [%]	Růstový faktor
7	0,4856±0,2236	0,5262±0,2145	0,0406±0,0296	10,53±8,37	0,11±0,08
14	0,5659±0,1996	0,6864±0,2160	0,1205±0,0266	22,38±6,16	0,22±0,06
21	0,6071±0,1887	0,8601±0,2576	0,2530±0,0770	42,07±6,38	0,42±0,06
28	0,5967±0,1178	0,9572±0,1466	0,3601±0,0475	61,60±11,43	0,62±0,11
35	0,5531±0,1048	0,9181±0,1679	0,3650±0,0822	66,51±10,73	0,67±0,11
42	0,5939±0,1761	0,9383±0,2041	0,3443±0,0565	61,14±16,01	0,61±0,16

5.2. Grafy

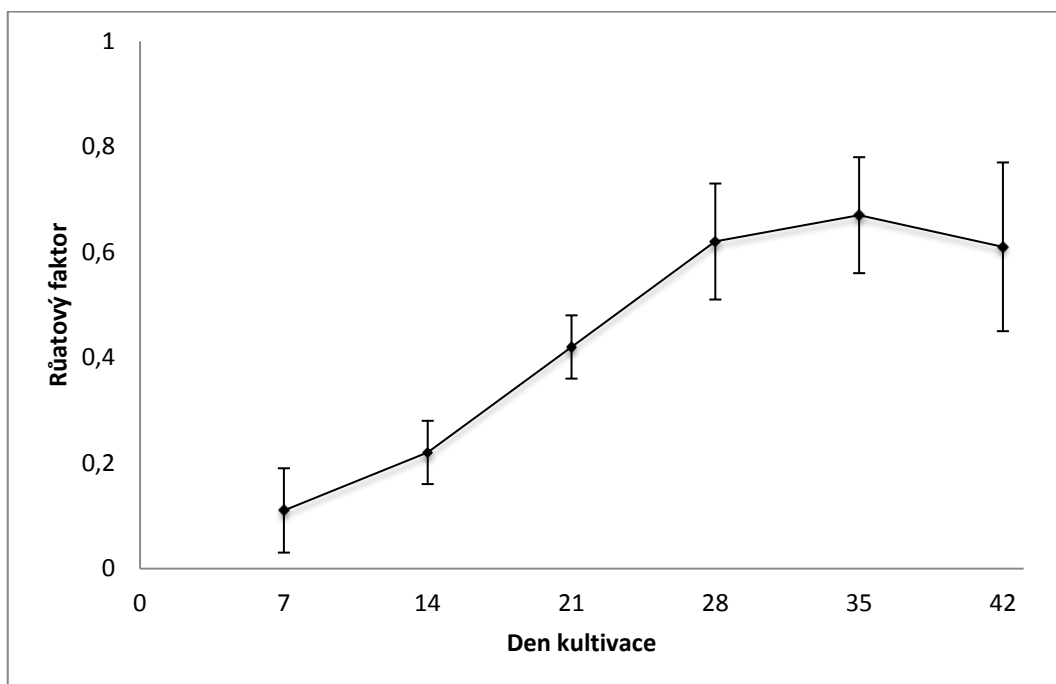
Graf 1: Růstová křivka kalusové kultury *Juniperus virginiana* Hetzii



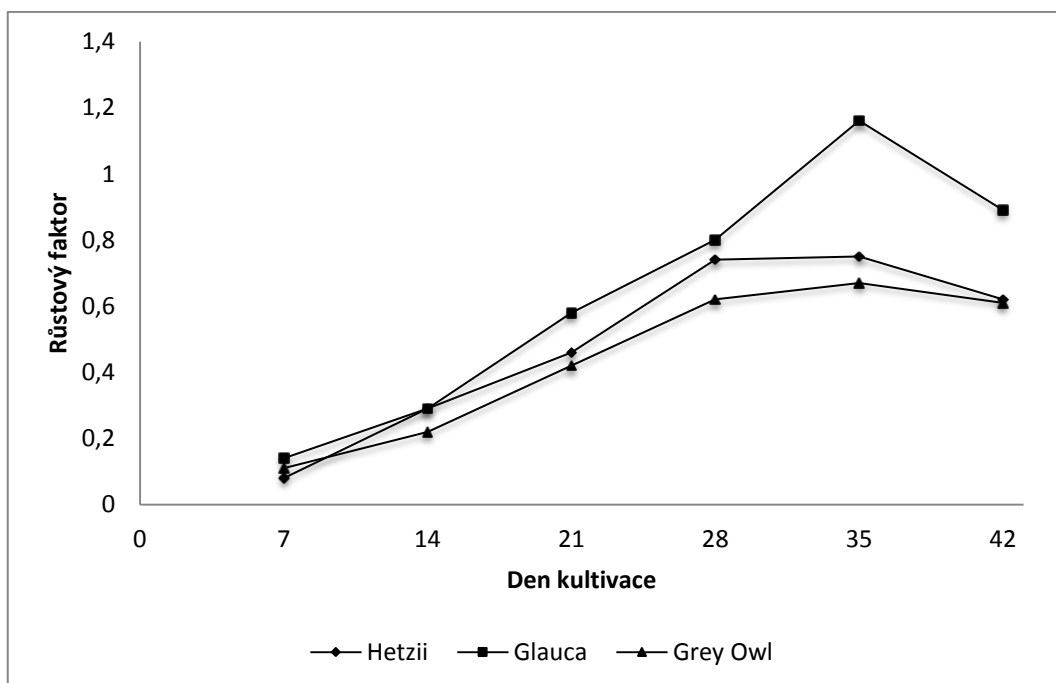
Graf 2: Růstová křivka kalusové kultury *Juniperus virginiana* Glauca



Graf 3: Růstová křivka kalusové kultury *Juniperus virginiana* Grey Owl



Graf 4: Porovnání růstových křivek kalusových kultur *Juniperus virginiana*



6. DISKUSE

Podofylotoxin, látka tradičně získávána z pryskyřice rodu *Podophyllum*, slouží jako významný prekurzor pro syntézu cytostatik - etoposidu, teniposidu a etopophosu. Samotný podofylotoxin pro léčbu nádorů není vhodný. Omezená dostupnost přírodních zdrojů podofylotoxinu a jeho nákladná syntéza nutí hledat další alternativy vedoucí k zisku této látky. Jednou z možných cest jsou i explantátové kultury rodu *Juniperus*. Explantátové kultury byly odvozeny již z několika druhů rodu *Juniperus*. Tato práce se zabývá odvozením kalusových kultur druhu *virginiana*, u kterého zatím nebyly zveřejněny žádné výsledky o explantátových kulturách. [5, 7, 9, 24]

Cílem práce bylo zvládnout metodiku kultivace kultur *in vitro*, odvodit kalusovou kulturu tří variet *Juniperus virginiana* (varieta Hetzii, Glauca a Grey Owl) a stanovit pro ně růstovou křivku.

Kalusová kultura byla odvozena z listů matečné rostliny. Předtím však bylo nutné nalézt vhodný způsob sterilizace rostlinného materiálu. Byly zkoušeny různé časy působení desinfekčních činidel. Jako nejvhodnější postup sterilizace byl nakonec zvolen postup, kdy byl rostlinný materiál:

1. ponořen do 70% (V/V) ethanolu po dobu 3 min a následně opláchnut sterilizovanou destilovanou vodou.
2. ponořen do 10% (m/V) vodného roztoku chloraminu po dobu 20 min a následně opláchnut sterilizovanou destilovanou vodou.
3. ponořen do 10% roztoku Sava po dobu 20 min a následně opláchnut sterilizovanou destilovanou vodou.
4. opláchnut 70% ethanolem.

Při tomto postupu docházelo přibližně k 30% kontaminaci. Při sterilizaci s kratšími dobami docházelo k 50% až 70% kontaminaci, naopak delší sterilizace vedla k usmrcení rostlinného materiálu.

Volba živného média dle Schenka a Hildebrandta (SH médium) vycházela z dat publikovaných pro *Juniperus chinensis*. [44]

K tomuto médiu byly přidány tři různé kombinace růstových regulátorů, důležitých složek živných médií, a zkoumán jejich vliv na odvození a údržbu kalusu.

Zkoušené růstové regulátory byly:

1. 3,0 mg.l⁻¹ α -NAA a 0,2 mg.l⁻¹ kinetin
2. 1,0 mg.l⁻¹ 2,4-D a 0,2 mg.l⁻¹ kinetin
3. 1,0 mg.l⁻¹ α -NAA a 0,2 mg l⁻¹ kinetinu

Nejlepšího růstu kalusy dosahovaly při kombinaci 3,0 mg.l⁻¹ α -NAA a 0,2 mg.l⁻¹ kinetinu, tedy stejné kombinaci určené jako nejvýhodnější pro růst kalusových kultur *Juniperus chinensis*. [44]

Další média (MS, WPM a B5) zkoušená taktéž pro růst kalusových kultur *Juniperus chinensis* byla sledována v jiné diplomové práci.

K tvorbě kalusů došlo u všech tří variet zhruba po 28 dnech po naočkování. Kalusy byly křehké, drolivé, zpočátku bělavé nebo světle žluté barvy. S vyšším počtem pasáží se více stávaly žlutozelenými a měkčími. Během kultivace, často již krátce po přepasáží kultury na čerstvé živné médium, bylo zřejmé hnědnutí pletiva. K tomuto jevu docházelo pravděpodobně v důsledku poranění pletiva při pasáží kultury a následného uvolnění enzymů. Hnědnutí se nedařilo dostatečně zabránit ani častým pasáží na čerstvé médium. Bylo by tedy vhodné vyzkoušet přidání antioxidantů nebo jiné metody vedoucí k eliminaci tohoto jevu (viz kapitola 3.2.2 Odvození explantátových kultur). Kalusy rostly pomalu a neměly tendenci k morfogenezi. Protože se kalusy pomalu tvořily a velmi pomalu rostly, bylo jejich odvození poměrně problematické a zdlouhavé. Nejlepších růstových vlastností dosahovaly kalusy odvozené z variety Glauca.

Z důvodu omezeného množství vypěstovaného materiálu bylo možné stanovit růstovou křivku až po jednom roku kultivace ve stabilních podmínkách při teplotě 25°C, světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma v subkultivačním intervalu 5 týdnů.

Stanovení růstové křivky probíhalo u variet Hetzii a Grey Owl v 10. pasáží, u variety Glauca v 16. pasáží. Kalusy byly odebrány každý 7. den během šestitýdenní kultivace. Z jejich růstu byly odvozeny hodnoty vynesené do tab. 1-3. Růstový faktor jako hodnota růstu byl použit pro sestrojení růstových křivek. Růstová křivka vznikla vynesením růstového faktoru v závislosti na dnech odběru.

Z růstových křivek (graf 1-3) vyplývá, že maxima růstu bylo dosaženo ve 35. dnu kultivace u všech tří variet. U variet Hetzii a Grey Owl lze uvést, že konec exponenciální fáze se nachází ve 28. dnu kultivace, potom následuje krátká stacionární fáze. Na rozdíl od variety Glauca, u které exponenciální fáze přechází až do maxima růstu a u které není stacionární fáze zřejmá. Z těchto výsledků lze doporučit u variet

Hetzii a Grey Owl 28. den jako vhodný pro pasážování kultury, u variety Glauca je možné pasážování posunout k dalšímu týdnu. Z uvedených variet si v růstu nejlépe vedla Glauca (graf 4), vykazující nejlepší růst již během odvozování kalusů. Varieta Glauca vykazovala v maximu růstu oproti odrudám Hetzii a Grey Owl rozdíl 41,03%, resp. 49,51%.

Jak již bylo uvedeno, k nejlepší indukci kalusů ze sterilních listů *Juniperus chinensis* došlo také na SH médiu obsahujícím 3,0 mg.l⁻¹ α-NAA a 0,2 mg.l⁻¹ kinetinu, pěstováno za tmy. Růst kalusu byl zvýšen během 40 denní kultivace asi 11krát. Ovšem po pěti subkultivacích bylo zaznamenáno snížení proliferace kalusové kultury a nakonec po deseti subkultivacích až úplné zastavení růstu. [44]

Naproti tomu naše první výsledky ukazují, že stabilní a homogenní kalusová kultura *Juniperus virginiana* byla získána až po jednoleté kultivaci za stálých podmínek (teplota, osvětlení, složení média, četnost pasážování).

Další studie uvádí, že z jarních pupenů *Juniperus communis* byla kalusová kultura odvozena na médiu dle Murashigeho a Skooga doplněném benzylaminopurinem 0,1 mg.l⁻¹ a indol-3-máselnou kyselinou v koncentracích 0,5-4,0 mg.l⁻¹. [45]

Mladé výhonky tří druhů *Juniperus excelsa*, *Juniperus horizontalis* a *Juniperus chinensis* byly kultivovány také na MS a WPM médiu, s přídavkem různých koncentrací IAA, IBA, 2,4-D v kombinaci s BAP. Nejlepší tvorba kalusů u všech třech druhů byla zjištěna na WPM médiu doplněném 0,50 mg.l⁻¹ 2,4-D a BAP. [46]

Uvedené rozdíly by se mohly zdůvodnit mimo jiné i odlišnou genetickou výbavou rostlinného materiálu, která může významně ovlivnit reakci rostlinných buněk *in vitro*.

Pro další závěry ohledně explantátových kultur *Juniperus virginiana* je ještě potřeba odvodit suspenzní kultury a stanovit obsah podophyllotoxinu, případně se ještě pokusit optimalizovat složení živného média pro zlepšení růstu kultury.

7. ZÁVĚR

Z výsledků práce vyplývá:

- 1) Byl zvolen vhodný postup sterilizace pro rostlinný materiál.
- 2) Byla odvozena kalusová kultura z listů *Juniperus virginiana* Hetzii, *Juniperus virginiana* Glauca a *Juniperus virginiana* Grey Owl.
- 3) Z růstových regulátorů přidávaných ke kultivačnímu SH médiu byla vyhodnocena jako nejvýhodnější kombinace $3,0 \text{ mg.l}^{-1}$ α -NAA a $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ kinetinu.
- 4) Dle růstových křivek dosahovaly všechny tři variety maxima růstu v 35. dnu kultivace. Jako vhodný den pasážování se u variet Hetzii a Grey Owl jeví 28. den. U variety Glauca je pasážování možné posunout k 35. dnu.
- 5) Nejlepšího růstu dosahovala varieta Glauca.

8. LITERATURA

- [1] Vijaya Sree, N. et al.: Advancements in the production of Secondary Metabolites. *J. Nat. Prod.*, 2010, 3: 112-123.
- [2] Siatka, T., Kašparová, M.: Vliv sloučenin vanadu na růst a produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Čes. slov. Farm.*, 2007, 56: 230-234.
- [3] Orhan, I. E. (Ed.): *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*, Bentham Science Publishers, 2012, s. 3-13, 215.
- [4] Bhojwani, S. S., Dantu, P. K.: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, Springer, New Delhi, 2013, s. 284-285.
- [5] Lv, M., Xu, H.: Recent Advances in Semisynthesis, Biosynthesis, Biological Activities, Mode of Action, and Structure-Activity Relationship of Podophyllotoxins: An Update (2008-2010). *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2011, 11: 901-909.
- [6] Cantrell, Ch. L. et al.: Podophyllotoxin and Essentials oil profile of *Juniperus* and related species. *Ind. Crop Prod.*, 2013, 43: 668-676.
- [7] Guerram, M., Jiang, Z., Zhang, L.: Podophyllotoxin, a medicinal agent of plant origin: past, present and future. *Chin. J. Nat. Med.*, 2012, 10: 161-169.
- [8] Aroo, R. R. J. et al.: Plant cell factories as a source of for anti-cancer lignans. *Phytochem. Rev.*, 2002, 1: 27-35.
- [9] Majumder, A., Jha, S.: Biotechnological approaches for the production of potential anticancer leads podophyllotoxin and paclitaxel: an overview. *J. Biol. Sci.*, 2009, 1: 46-69.
- [10] Hejný, S., Slavík, B.: *Květena ČSR I*, Academia, Praha, 1988, s. 333, 336-338.
- [11] Jahodář, L.: *Farmakobotanika*, Karolinum, Praha, 2006, s. 34-35.
- [12] DeGraaf, R. M.: *Trees, shrubs and vines for attracting birds*, University Press of New England, Lebanon, 2002, s. 32.
- [13] Dunford, N. T., Hiziroglu, S., Holcomb, R.: Effect of age on the distribution of oil in Eastern redcedar tree segments. *Biores. Technol.*, 2007, 98: 2636-2640.
- [14] <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=29091>, 17. 2. 2014.
- [15] Foster, S., Duke, J. A.: *A Field Guide to Medicinal Plants and Herbs of Eastern and Central North America*, Houghton Mifflin Harcourt, Boston, 2000, s. 293.

- [16] Gawde, A. J., Cantrell, Ch. L., Zheljzkov, V. D.: Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from *Juniperus virginiana*. *Ind. Crop Prod.*, 2009, 30: 276-280.
- [17] Kindscher, K.: *Medicinal wild plants of the prairie*, University Press of Kansas, Lawrence, 1992, s. 130-135.
- [18] http://www.hort.purdue.edu/newcrop%20/duke_energy/Juniperus_virginiana.html, 17. 1. 2014.
- [19] Hădărugă, N. G. et al.: Comparative Study of *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* Essential Oils: TLC and GC analysis. *J. Planar Chromatogr.*, 2011, 24: 130-135.
- [20] Trifunči, S., Ardelean, D.: Studies on the optimal extraction of flavonoids from the fruit of *Juniperus virginiana* L.). *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 2010, 119: 127-133.
- [21] Maqbool, M., Cushman, K. E.: Podophyllotoxin Content in Leaves of Eastern Red Cedar (*Juniperus virginiana*). *Acta Hort.*, 2004, 629: 87-92.
- [22] Farkya, S., Bisaria, V. S., Srivastava, A. K.: Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 65: 504-519.
- [23] Schmidt, T. J., Klaes, M., Sendker, J.: Lignans in seeds of *Linum* species. *Phytochemistry*, 2012, 82: 89-99.
- [24] Petersen, M., Alfermann, A. W.: The production of cytotoxin lignans by plant cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 55: 135-142.
- [25] Damayanthi, Y., Lown, J. W.: Podophyllotoxins: Current Status and Recent Developments. *Curr. Med. Chem.*, 1998, 5: 205-252.
- [26] Kováč, J.: *Explantátové kultury rostlin*, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc, 1995, s. 13-21, 26-27, 50-95.
- [27] George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J. (Eds.): *Plant Propagation by Tissue Culture*, Springer, Dordrecht, 2008, s. 1-20.
- [28] Hradílek, J.: *Rostlinné explantáty*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 2008, s. 17-38.
- [29] Stewart, C. N. (Ed.): *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*, Wiley, Hoboken, 2008, s. 113-128.
- [30] Neumann, K. H., Kumar, A., Imani, J.: *Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology: Basics and Application*, Springer, Berlin, 2009, s. 139-158.

- [31] Sathyanarayana, B. N., Varghese, D. B.: *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*, I. K. International, New Delhi, 2007, s. 29-55.
- [32] Ponmurugan, P., Kumar Suresh, K.: *Applications of Plant Tissue Culture*, New Age International, Daryaganj, 2012, s. 31-59.
- [33] Jha, T. B., Ghosh, B.: *Plant Tissue Culture: Basic and Applied*, Universities Press, Hyderabad, 2005, s. 19-22.
- [34] Hota, D.: *Synthetic Plant Growth Regulators*, Global Media, Delhi, 2007, s. 1-21.
- [35] Friml, J.: Auxin-univerzální vývojový signál v životě rostlin. *Živa*, 2007, 1: 8-12.
- [36] Sikyta, B.: *Techniques in Applied Microbiology*, Elsevier, Amsterdam, 1995, 33-37
- [37] Yuan Kun, L. (Ed.): *Microbial Biotechnology: Principles and Applications*, World Scientific Publishing, Singapore, 2006, s. 25.
- [38] Sikyta, B.: *Biotechnologie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha, 2001, s. 75-82.
- [39] Hussain, M. S. et al.: Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm. Bioallied Sci.*, 2012, 1: 10-20.
- [40] Mulabagal, V., Tsay, H. S.: Plant Cell Cultures – An Alternative and Efficient Source of for the Production Of Biologically Important Secondary Metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.*, 2004, 2: 29-48.
- [41] Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C.: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 1972, 50 (1): 199-204.
- [42] Šnajdrová, J.: Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2006.
- [43] Kolektiv autorů: *Český lékopis 2009*, Grada, Praha, 2009, s. 393.
- [44] Muranaka, T., Miyata, M., Ito, K., Tachibana, S.: Production of Podophyllotoxin in *Juniperus Chinensis* Callus Cultures Treated with Oligosaccharides and a Biogenetic Precursor. *Phytochemistry*, 1998, 28: 491-496.
- [45] Kocer, Z. A., Gozen, A. G., Onde, S., Kaya, Z.: Indirect organogenesis from bud explants of *Juniperus communis* L.: Effects of genotype, gender, sampling time and growth regulator combinations. *Dendrobiology*, 2011, 66: 33-40.
- [46] Zaidi, M, A. et al.: A.: Micropropagation and conservation of three *Juniperus* species (Cupressaceae). *Pakistan J. Bot.*, 2012, 44: 301-304.

9. PŘÍLOHA

Obr. 1: Iniciační kalus u variety Hetzii



Obr. 2: Kalusy variety Hetzii



Obr. 3 : Hnědnutí kalusů variety Hetzii



Obr. 4: Zahnědlé kalusy variety Hetzii



Obr. 5: Inicijalne kaluse varieteta Glauca



Obr. 6: Kaluse varieteta Glauca



Obr. 7: Zahnědlé kalusy variety Glauca



Obr. 8: Zahnědlé kalusy variety Glauca



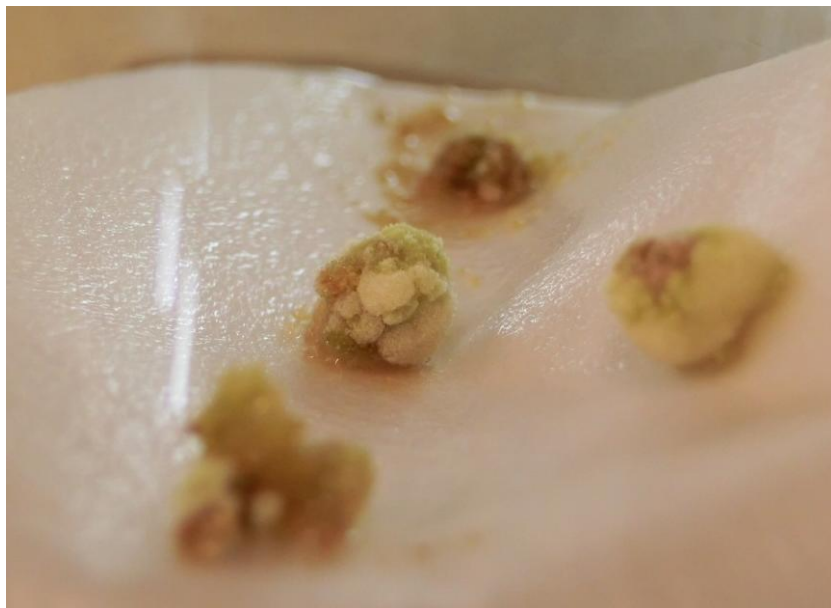
Obr. 9: Inicialne kalusu variety Grey Owl



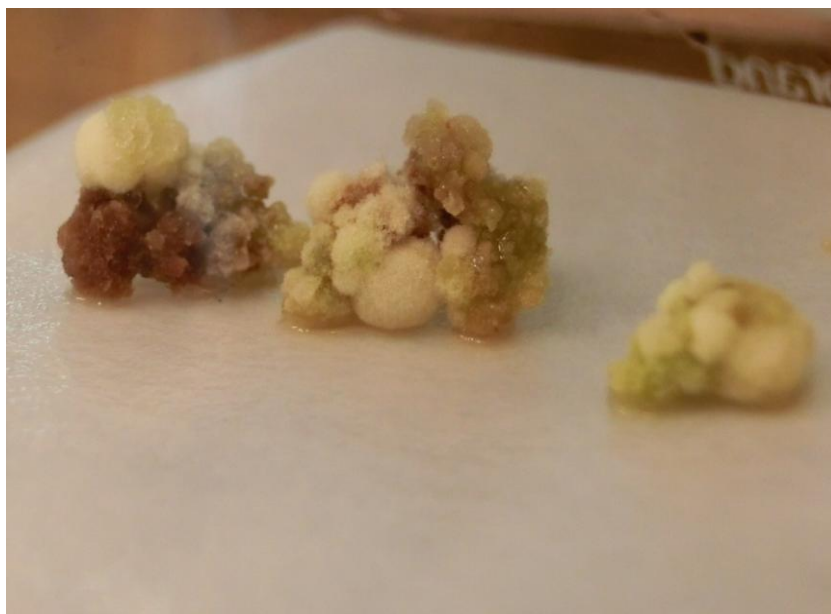
Obr. 10: Inicialne kalusu variety Grey Owl



Obr. 11: Kalusy variety Grey Owl



Obr. 12: Hnědnutí kalusů variety Grey Owl



ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Student: Václav Předota

Školitel: PharmDr. Marie Kašparová, PhD.

Název diplomové práce: Explantátová kultura *Juniperus virginiana*

Tato práce se zabývá odvozením kalusových kultur z listů *Juniperus virginiana* (variet Hetzii, Glauca a Grey Owl) a stanovením jejich růstových křivek.

Kultury byly kultivovány při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/8 hodin tma na médiu dle Schenka a Hildebrandta s přídatkem 3,0 mg.l⁻¹ α-NAA a 0,2 mg. l⁻¹ kinetinu. Z růstových křivek vyplývá, že všechny tři variety dosahují maxima růstu v 35. dnu kultivace. Nejlepšího růstu dosahovaly kultury variety Glauca.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of pharmacy in Hradec Králové

Department of pharmacognosy

Student: Václav Předota

Supervisor: PharmDr. Marie Kašparová, PhD.

Title of diploma thesis: Plant tissue culture of *Juniperus virginiana*

The derivation of callus cultures from leaves of *Juniperus virginiana* (varieties Hetzii, Glauca and Grey Owl) and determination of their growth curves were studied in this work.

The cultures were cultivated at the temperature of 25 °C and light period of 16 hours light/8 hours dark on the Schenk and Hildebrandt medium with the addition of 3.0 mg.l⁻¹ α-NAA and 0.2 mg. l⁻¹ kinetin. It is clear from the growth curves, that all three varieties reached their maximum in growth on 35th day of the cultivation. The best results were achieved by variety Glauca.