

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Rostlinné explantátové kultury jako potenciální zdroj
fenylpropanoidů I**

**Plant tissue cultures as a potential source of
phenylpropanoids I**

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

Pověřen vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Hradec Králové, září 2019

Gabriela Dohnalová

Úvodem své diplomové práce bych ráda poděkovala PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení v celém průběhu vypracování diplomové práce. Zvláště děkuji za poskytnutí odborné literatury, ochotu, připomínky a cenné rady.

Poděkovat bych chtěla také PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za analytické zpracování vzorků metodou HPLC.

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

Gabriela Dohnalová

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE	3
3	TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1	Jalovec virginský (<i>Juniperus virginiana</i> L., <i>Cupressaceae</i>)	4
3.1.1	Výskyt rostliny	4
3.1.2	Botanický popis rostliny	4
3.1.3	Využití	5
3.1.4	Obsahové látky	6
3.1.5	Podofylotoxin	6
3.1.5.1	Zdroje podofylotoxinu	6
3.1.5.2	Biologická aktivita	7
3.1.5.3	Mechanismus účinku	8
3.1.5.4	Chemická struktura	10
3.1.5.5	Biosyntéza	11
3.2	Explantátové kultury rostlin	13
3.2.1	Základní pojmy	14
3.2.2	Odvození a udržování kultury	15
3.2.2.1	Buněčné suspenzní kultury	16
3.2.3	Kultivační podmínky	17
3.2.3.1	Živné médium	17
3.2.3.2	Růstové regulátory	18
3.2.3.3	Fyzikální podmínky kultivace	20
3.2.4	Biotechnologické využití	20
3.3	Elicitace	22
3.3.1	Klasifikace elicitorů	22
3.3.2	Charakteristika elicitorů	23
3.3.3	Mechanismus elicitace	23
3.3.4	Fytoalexiny	25
3.3.5	Těžké kovy	26
3.3.5.1	Olovo	27
3.3.5.2	Železo	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29

4.1 Materiál, přístroje, pomůcky	29
4.1.1 Rostlinný materiál	29
4.1.2 Chemikálie	29
4.1.3 Přístroje a pomůcky	30
4.2 Kultivace explantátové kultury.....	31
4.2.1 Kultivační nádoby a nástroje.....	31
4.2.2 Příprava živného média.....	31
4.2.3 Pasážování a kultivace	32
4.3 Elicitace	33
4.3.1 Příprava roztoků elicitorů.....	33
4.3.2 Elicitace a odběr kultur	33
4.4 Stanovení obsahu podofylotoxinu.....	35
4.4.1 Příprava vzorku	35
4.4.2 Podmínky HPLC analýzy.....	35
4.5 Statistické zpracování výsledků.....	37
5 VÝSLEDKY	39
5.1 Tabulky	39
5.2 Grafy	43
6 DISKUZE	47
7 ZÁVĚR.....	52
8 SEZNAM LITERATURY	53
9 ABSTRAKT	57
10 ABSTRACT	58

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: 2 – větvička <i>Juniperus virginiana</i> , 2a – část větvičky, 2b – galbulus.....	5
Obr. 2: Mechanismus a místa působení podofylotoxinu a jeho derivátů.....	9
Obr. 3: Chemická struktura podofylotoxinu a jeho derivátů etoposidu a teniposidu.....	10
Obr. 4: Pravděpodobná biosyntetická dráha podofylotoxinu.....	12
Obr. 5: Schematické znázornění možných odpovědí buněk na elicitaci.....	25
Obr. 6: Kalibrační křivka podofylotoxinu.....	36
Obr. 7: Příklady HPLC záznamů analyzovaných vzorků.....	36

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře <i>Juniperus virginiana</i> (varieta Hetzii) elicitované roztokem síranu železnatého.....	39
Tabulka č. 2: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře <i>Juniperus virginiana</i> (varieta Hetzii) elicitované roztokem chloridu olovnatého.....	40
Tabulka č. 3: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře <i>Juniperus virginiana</i> (varieta Glauca) elicitované roztokem síranu železnatého.....	41
Tabulka č. 4: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře <i>Juniperus virginiana</i> (varieta Glauca) elicitované roztokem chloridu olovnatého.....	42

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře <i>Juniperus virginiana</i> (varieta Hetzii) elicitované roztokem síranu železnatého.....	43
Graf č. 2: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře <i>Juniperus virginiana</i> (varieta Hetzii) elicitované roztokem chloridu olovnatého.....	44
Graf č. 3: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře <i>Juniperus virginiana</i> (varieta Glauca) elicitované roztokem síranu železnatého.....	45
Graf č. 4: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře <i>Juniperus virginiana</i> (varieta Glauca) elicitované roztokem chloridu olovnatého.....	46

1 ÚVOD

Rostliny tvoří důležitou součást naší každodenní stravy a rostlinné složky a jejich výživová hodnota byla intenzivně studována po celá desetiletí. Vyšší rostliny jsou bohatým zdrojem bioaktivních složek nebo fytofarmaceutik používaných ve farmaceutickém průmyslu. Uvádí se, že za posledních 20 let 61 % nových chemických entit (nových aktivních substancí) pochází z přírodních produktů nebo jejich příprava byla přírodními produkty inspirována. [1, 2]

Vedle základních primárních metabolitů (např. sacharidů, lipidů a aminokyselin) jsou vyšší rostliny také schopny syntetizovat širokou škálu sloučenin s nízkou molekulovou hmotností, tzv. sekundární metabolity. Sekundární metabolity rostlin mohou být definovány jako sloučeniny, které nemají uznatelnou roli při udržování základních životních procesů v rostlinách, které je syntetizují, ale hrají důležitou roli v interakci rostliny s okolím. Produkce těchto sloučenin je často nízká (méně než 1 % suché hmotnosti) a velmi závisí na fyziologickém a vývojovém stavu rostliny. [1]

Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky únosnou chemickou syntézou, a musí proto být získávány izolací z volně rostoucích nebo pěstovaných rostlin. Tento způsob má však svá omezení, jako jsou např. sezónnost, závislost na podmínkách prostředí, nebo choroby a škůdci. Jednou z možností, jak získat požadované rostlinné látky, je využití rostlinných explantátových kultur. Charakteristickým problémem kultivace rostlinných explantátů je nízká produkce sekundárních metabolitů v kulturách *in vitro*. Existuje mnoho faktorů, jež mohou vést ke zvýšení produkce, např. složení kultivačního média, typ a koncentrace růstových regulátorů, prekursorů, světelné podmínky, teplota, imobilizace, elicitace. [3, 4]

Tento problém se týká i aryltetralinového lignanu podofylotoxinu, který byl původně získán z rostlin rodu *Podophyllum* a stejně jako jeho kongenery a deriváty, vykazuje výraznou biologickou aktivitu hlavně jako silné antivirové činidlo a jako antineoplastická látka. Zatímco tradičního zdroje podofylotoxinu, ohroženého druhu indického *P. emodi*, stále ubývá, poptávka po této sloučenině se zvyšuje. Proto je nutné zabývat se vývojem kratších syntetických cest, využitím biotechnologických a enzymatických přístupů, manipulací s biosyntetickou cestou, a především hledat alternativní a obnovitelné přírodní zdroje. Potenciálním zdrojem podofylotoxinu může být mimo jiné *Juniperus virginiana* L. (Jalovec virginský), u kterého byla rovněž prokázána produkce tohoto sekundárního metabolitu. [5-7]

V této diplomové práci je sledován vliv abiotických elicitorů síranu železnatého a chloridu olovnatého na produkci sekundárního metabolitu podofylotoxinu v suspenzních kulturách *Juniperus virginiana* L., var. *Glauca* a var. *Hetzii*.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je:

1. Seznámení se s metodikou kultivace a elicitace rostlinných explantátových kultur *in vitro*.
2. Stanovení obsahu podofylotoxinu po působení abiotických elicitorů síranu železnatého a chloridu olovnatého v závislosti na jejich koncentraci a délce působení v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* L., var. *Glauca* a var. *Hetzii*.

3 TEORETICKÁ ČÁST

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

3.1.1 Výskyt rostliny

Jalovec virginský (*Juniperus virginiana* L.) pochází z východních oblastí Severní Ameriky, od jižní Kanady po Floridu. Je to velmi proměnlivý druh, rostoucí jak na suchých skalnatých půdách, tak na bažinatých místech. V přírodě se vyskytuje v několika geografických varietách: jednak se široce kuželovitými tvary korun a rozložitými až převislými větvemi (v jižní části svého areálu), jednak s korunou úzce kuželovitou až sloupovitou a s vystoupavými větvemi; tato varieta se vyskytuje na severu východní části USA a pochází z ní většina zahradních kultivarů. Do Evropy byl jalovec virginský zaveden již před rokem 1664. V Evropě se pěstuje hlavně v zahradách a parcích. [8-10]

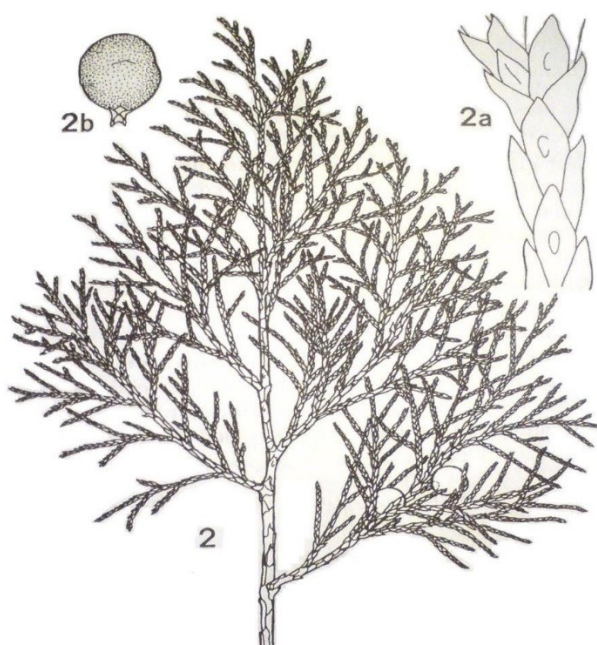
3.1.2 Botanický popis rostliny

Jalovec virginský je strom se štíhlou sloupovitou korunou, dorůstá výšky až 30 m (kultivary jsou nižší), má hnědočervenou, v dlouhých pruzích se odlupující borku. Střední část kmene (jádro) má v čerstvém stavu charakteristickou červenofialovou barvu. Díky tomuto zbarvení je znám také jako červený cedr. Větvičky jsou čtyřhranné, velmi tenké, o průměru sotva 1 mm. Listy jsou u mladších větví jehlicovité jen asi 6 mm dlouhé, ostnitě zakončené, sivé, vstřícné, jen ojediněle po 3 v přeslenu, na líci šedozelené, na rubu stříbřité. Starší větve mají listy přitisklé, šupinovité, asi 1,5 až 2 mm dlouhé, obvykle zelené až modrozelené. Na konci šupinovitých přišpičatělých listů šupiny mírně odstávají a na hřbetě mají malou žlázku. Samčí květy jsou žluté, samičí zelené, v malých chomáčích na konci výhonků. Tento strom je zpravidla dvoudomý, zřídka jednodomý, kvete na jaře. Dozrávají v bobulovité, šedozelené, ojíňené nepravé plody (tzv. galbulus), 5-6 mm velké. Plody dozrávají v prvním roce a obsahují 1-2 semena. [8-12]

Existuje kolem 40 vnitrodruhových 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. V této práci byla suspenzní kultura odvozena z následujících variet [13]:

- *Juniperus virginiana*, var. *Glauca* – výška 5-10 m; sloupovitý, rychle rostoucí, hustě větvený; šedomodré až šedozelené listy, šupinaté, malé, přitisklé, uvnitř rostlin ojediněle také jehlicovité.

- *Juniperus virginiana*, var. *Hetzii* – výška 3 m, šířka 6 m; keřovitý s rozložitými větvemi, na konci někdy mírně převislými; modrozelené listy, šupinovité vzácně pentlicovité.



Obr. 1: 2 – větvíčka *Juniperus virginiana*, 2a – část větvíčky, 2b – galbulus [12]

3.1.3 Využití

Američtí indiáni používali galbuly a listy jalovce při léčbě nachlazení, revmatismu, bronchitidy, aftů. Dále sloužili jako diaforetikum, antiparazitikum, či k očištným rituálům. Mladé olistěné větvíčky byly uvedeny v americkém lékopisu 1820-1894 jako diuretikum. Jalovec virginský dříve tvořil ve své domovské oblasti rozsáhlé porosty, avšak oblíbenost jeho červeného a vonného dřeva (tzv. červený cedr), citelně poznamenala jeho současné rozšíření.

Dřevo je velmi vhodné pro výrobu tužek, protože se při ořezávání neláme a má velmi stejnou strukturu, která se snadno opracovává. Dále se využívá k obkládání stěn či k výrobě nábytku. Dřevo z východního červeného cedru bylo po celé generace

využíváno pro svou schopnost odpuzovat hmyz, který poškozují oděv. Destilací dřeva získaný éterický olej se používá jako složka při výrobě kosmetiky, parfémů, mýdel a leštidel. Oblíbené jsou však různé kultivary, pěstované v zahradách, a to jak sloupovité tvary, tak rozsochaté či převislé keře. [9, 10, 14-17]

3.1.4 Obsahové látky

Juniperus virginiana L. obsahuje dva důležité přírodní produkty: esenciální olej a podofylotoxin. Jejich obsah je odlišný v různých částech rostliny. Bylo prokázáno, že jádro jalovce obsahuje podstatně vyšší množství oleje než dřevo. Starší stromy mají v jádru více oleje než mladší stromy a jalovcová kůra a listy obsahují podstatně nižší obsah oleje než jalovcové dřevo. Významné rozdíly v listovém oleji *Juniperus virginiana* L. byly hlášeny také mezi pohlavími a mezi stanovišti v rámci jedné zeměpisné oblasti. Silice jalovce se skládá až z 200 složek, tvořených 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 - a β - peltatin a další. Přítomnost podofylotoxinu byla dokázána v listech. Vyšší podíl této substance byl zaznamenán u starších jedinců bez ohledu na pohlaví. [14-16, 18, 19]

3.1.5. Podofylotoxin

Podofylotoxin je nejčastěji používaný aryltetralinový lignan mezi stovkami přírodních rostlinných lignanů. Lignany jsou biosynteticky odvozeny z fenylpropanoidové biosyntetické dráhy. Dostupnost tohoto lignanu se stává stále omezenější vzhledem k vzácnému výskytu jeho přírodních zdrojů a také proto, že syntetické přístupy k jeho výrobě jsou stále komerčně nepřijatelné. [6, 7, 20]

3.1.5.1 Zdroje podofylotoxinu

Hlavním zdrojem podofylotoxinu je rod *Podophyllum* čeledi *Berberidaceae*. Oddenky této rostliny jsou hlavním zdrojem pryskyřice zvané podofyllin. Podofyllin je směs několika lignanů, jehož hlavní složkou je podofylotoxin. Mezi dalšími obsaženými

lignany jsou 5-methoxypodofylotoxin, podofylotoxon, 4'-demethylpodofylotoxin a α - a β -peltatin. Podofylotoxin je také syntetizován v rostlinách jiných rodů, včetně *Jeffersonia*, *Diphylleia*, *Dysosma*, *Catharanthus*, *Polygala*, *Anthriscus*, *Linum* a *Juniperus*. [5, 20, 21]

Dostupnost podofylotoxinu izolovaného z rostlin je omezena z důvodu vzácného výskytu rostliny v důsledku intenzivní sklizně z přírody a nedostatku organizované kultivace. Rostliny mají navíc dlouhou juvenilní fázi, špatnou produkci ovoce a pomalou regeneraci, která je zodpovědná za „kriticky ohrožený“ stav rostliny. Chemická syntéza podofylotoxinu a jeho derivátů je velmi komplikovaná a poněkud obtížná. [6]

Průběžný výzkum lignanů v rodu *Podophyllum* je v současné době zaměřen na optimalizaci struktury s cílem generovat deriváty s vynikajícími farmakologickými profily a širším terapeutickým rozsahem a vývojem alternativních a obnovitelných zdrojů podofylotoxinu. [7]

Byla popsána produkce podofylotoxinu pomocí biotechnologie, která zahrnuje tkáňovou a orgánovou kulturu, buněčnou suspenzní kulturu a transgenní chlupatou kořenovou kulturu. Tyto biotechnologické metody však vyžadují zlepšení kultivačních podmínek a obsah podofylotoxinu je výrazně nižší ve srovnání s přírodními rostlinami. [6]

3.1.5.2 Biologická aktivita

Lignany vyskytující se v podofylinu vykazují výraznou biologickou aktivitu hlavně jako silná antivirová činidla a jako antineoplastické látky. Jelikož je podofylotoxin příliš toxický pro léčbu neoplastických onemocnění u lidí, používá se jako prekurzor pro chemickou syntézu semisyntetických antineoplastických léčiv, etoposidu, etopofosu (etoposid fosfátu) a teniposidu, které jsou úspěšně aplikovány. [7, 20-22]

Počáteční očekávání týkající se klinického využití podofylotoxinu byla snížena převážně díky jeho nepříjemné gastrointestinální toxicitě. Výzkumní vědci dlouho spekulovali o tom, že nesteroidní terapeutický index podofylotoxinu může být výsledkem jeho nerozpustnosti a nepředvídatelného systémového chování. Tyto vlastnosti vedly vědeckou obec k tomu, aby prozkoumala možnost, že by se podofylotoxinové lignany mohly vyskytovat přirozeně jako glukosidy. Jelikož jsou glukosidy více hydrofilní, jsou méně toxické než aglukony, ale jejich cytostatická aktivita se také snižuje ve stejném stupni. Proto byly provedeny četné modifikace základní kostry podofylotoxinu, a to mělo

za následek klinické zavedení etoposidu a teniposidu, což jsou cytostatické (antimitotické) glukosidy. [20]

Tyto semisyntetické deriváty podofylotoxinu hrají důležitou roli v léčbě rakoviny plic, různých leukemických a jiných solidních nádorů. Etoposid se používá v kombinační terapii u refrakterních, testikulárních, lymfoidních a myeloidních leukémií a u karcinomů žaludku, vaječníků, mozku, prsu, pankreatu a malých i velkých buněk. Teniposid se používá méně často než etoposid, a to hlavně k léčbě lymfomů. Další deriváty podofylotoxinu (etopofos, NK611, TOP 53, GL 311) vykazují také antirevmatické, projímavé, antioxidační, antitrypanozomální, insekticidní vlastnosti a účinky proti receptoru pro melanokortin-4. [7, 20-22]

I když je podofylotoxin sám o sobě příliš toxický pro terapeutické použití, je používán lokálně na topickou léčbu genitálních bradavic (Condyloma acuminata), perianálních a dalších typů bradavic. Terapeutická hodnota podofylotoxinu jako inhibitoru mitózy má i jiné léčebné aplikace, včetně použití jako antimalarických a antifungálních činidel s imunitní modulátorovou aktivitou. Používá se také k léčbě choriových karcinomů, Kaposiho sarkomu, lymfomů a maligních melanomů. [7, 20-22]

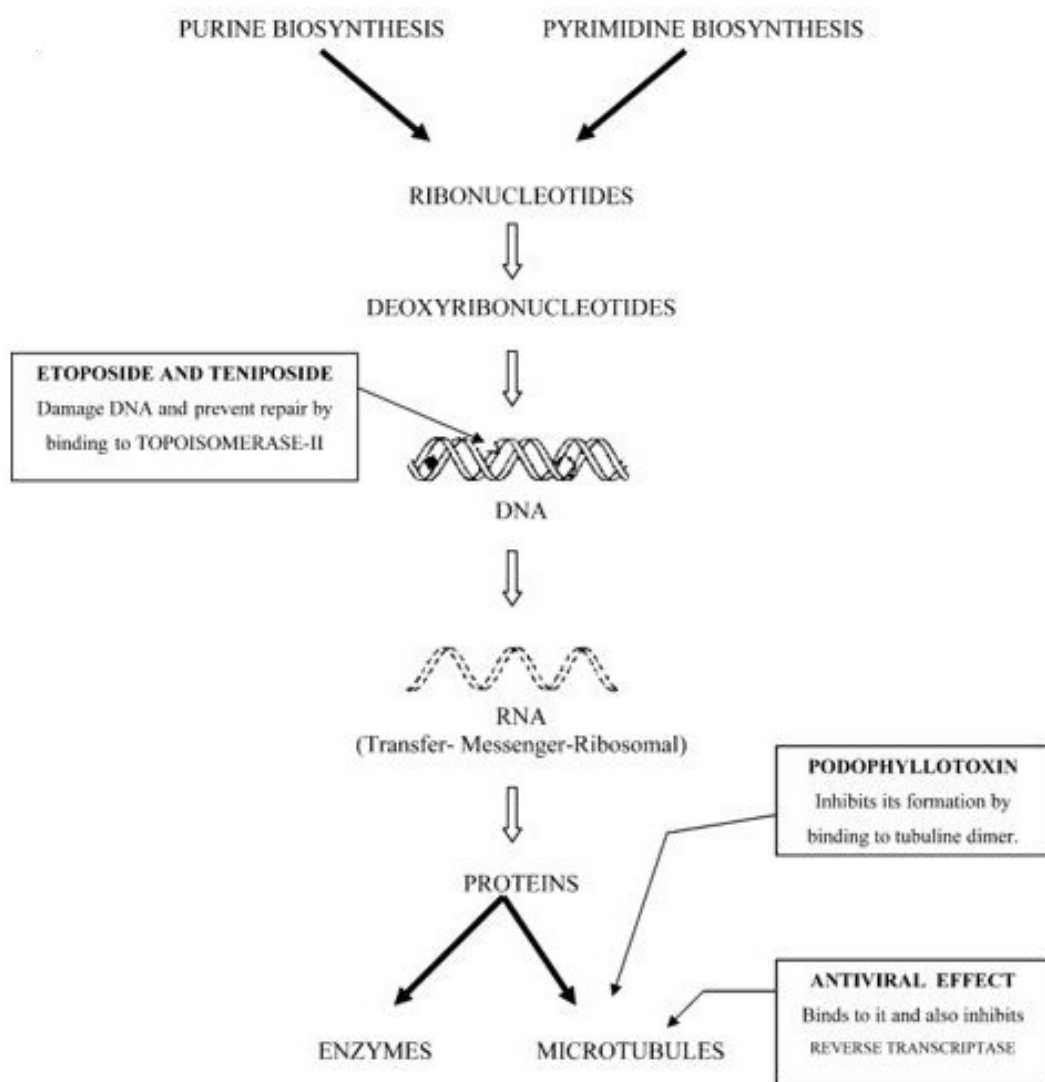
Podobnost mezi způsobem působení aryltetralinových lignanů jako protinádorových a antivirových činidel je pozoruhodná. Díky své schopnosti vázat tubulin tyto lignany narušují buněčný cytoskelet, a tak interferují s replikací viru. Kromě vazby na tubulin vykazují syntetické analogy podofylotoxinu inhibiči reverzní transkriptázy, která může být využita k selektivnímu potlačení virů RNA, jako je virus lidské imunodeficiency (HIV). [7, 20]

3.1.5.3 Mechanismus účinku

Podofylotoxin působí jako jed dělicího vřeténka, váže mikrotubuly a způsobuje mitotickou zástavu v metafázi, což má za následek jeho protivirový účinek. Dělicí vřeténko, složené z mikrotubulů, je důležitou složkou pro buněčné dělení. Mikrotubuly jsou utvářeny polymerizací α a β tubulinových jednotek. Podofylotoxin zhoršuje tvorbu mikrotubulů vazbou na dimer α/β -tubulinu. Tím se zastaví tvorba mikrotubulů, zatímco depolymerace stále pokračuje. Rovnováha mezi dimery tubulinu a mikrotubuly je narušena, a proto je buněčné dělení inhibováno. [7, 20, 23, 24]

Méně toxické semisyntetické deriváty podofylotoxinu vykazují jiný mechanismus účinku než podofylotoxin. Deriváty neinterferují s tvorbou mikrotubulů, ale inhibují

topoizomerázu II a vedou ke dvojláknovým zlomům DNA. 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 DNA. Předpokládá se, že deriváty podofylotoxinu se nejprve váží na DNA, což zlepšuje vaznost k topoizomeráze II a tím vzniká komplex vytvářející dvojláknové zlomy DNA. To nakonec vede k zástavě buněčného cyklu v pozdní S a rané G2 fázi a smrti buňky předtím, než vstoupí do meiózy. [7, 20, 23, 24]

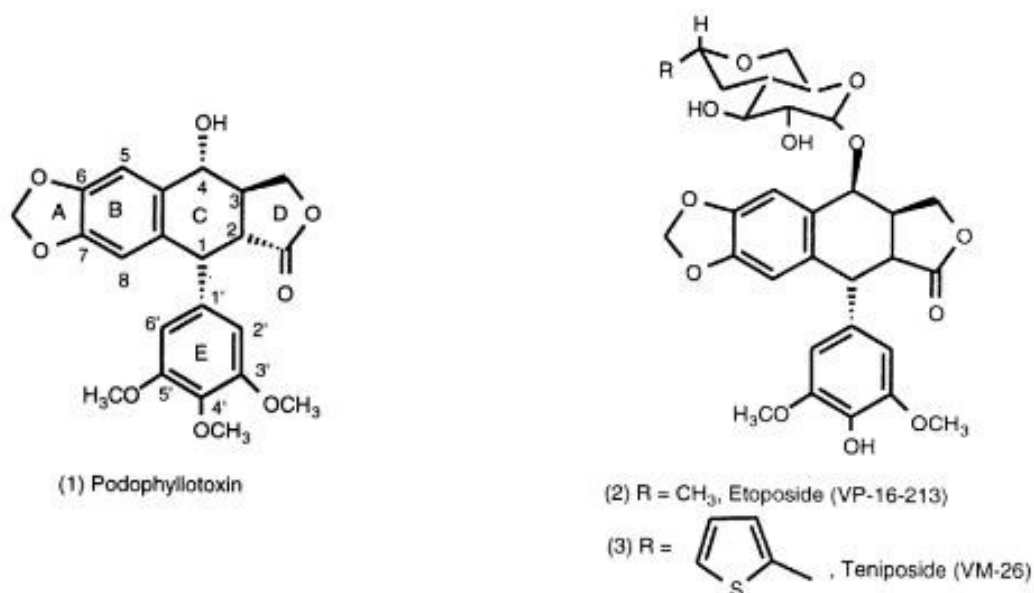


Obr. 2: Mechanismus a místa působení podofylotoxinu a jeho derivátů. [20]

3.1.5.4 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. [21]

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 zásadní význam pro biologickou aktivitu. 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, 21]

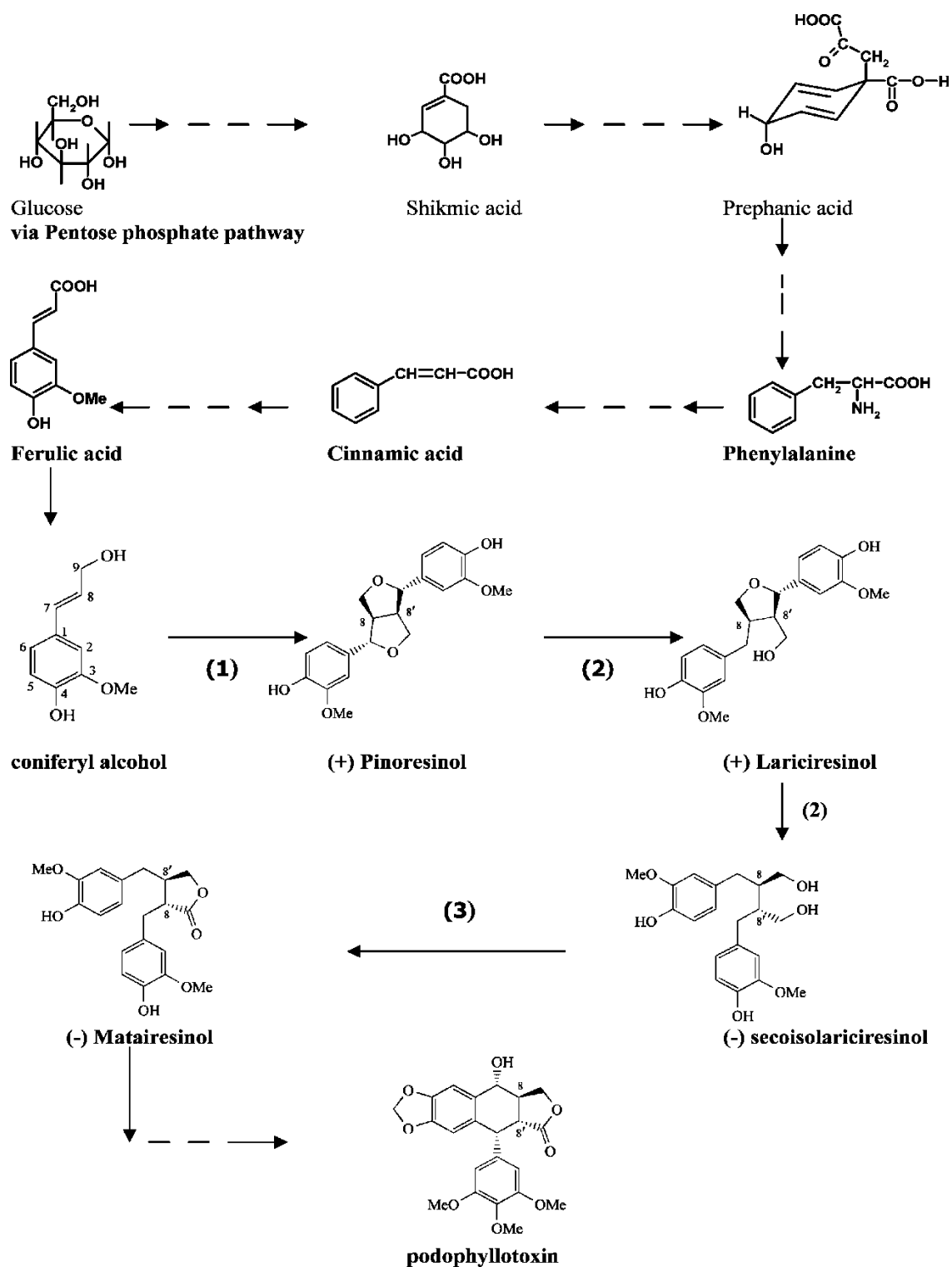


Obr. 3: Chemická struktura podofylotoxinu a jeho derivátů etoposidu a teniposidu [24]

3.1.5.5 Biosyntéza

Lignany jsou dimerizační produkty meziproductů fenylypropanoidové dráhy spojené centrálními uhlíky jejich postranního řetězce. Biosyntéza lignanů pochází z fenylyalaninu, tyrosinu, kyseliny skořicové a kyseliny kumarové atd., které jsou přeměněny na koniferylalkohol, kumarylalkohol a cinnapylalkohol metabolizací fenylypropanoidů prostřednictvím různých meziproductů. [20]

Na základě studií bylo zjištěno, že koniferylalkohol, vznikající fenylypropanoidovou cestou přes dráhu kyseliny šikimové, je pravděpodobně klíčovým prekurzorem biosyntetické dráhy podofylotoxinu. Dvě molekuly koniferylalkoholu se převádí dimerizací na β -uhlíku na (+)-pinoresinol. Sekvenční stereoselektivní redukcí (+)-pinoresinolu se pak postupně vytváří (+)-lariciresinol následovaný (-)-secoisolariciresinolem. Poté dochází ke stereoselektivní dehydrogenaci a cyklizaci (-)-secoisolariciresinolu za vzniku (-)-matairesinolu. Další kroky vedoucí až k prvnímu aryltetralinovému derivátu, deoxypodofylotoxinu, nejsou doposud známy. (-)-matairesinol je pravděpodobně dále přeměněn na yatein nebo 4'-demethylyatein, které jsou příslušně transformovány na podofylotoxin nebo β -peltatin prostřednictvím příslušných chinomethanových meziproductů. [7, 20, 21, 23]



Obr. 4: Pravděpodobná biosyntetická dráha podofylotoxinu. [20]

- (1) Pinoresinol syntáza
- (2) pinoresinol / lariciresinol reduktáza
- (3) sekoisolariciresinol dehydrogenáza

3.2 Explantátové kultury rostlin

Explantátové kultury rostlin (kultury rostlinných explantátů) znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny (intaktní rostliny) určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek. [25]

Technologie buněčných kultur rostlin byly zavedeny na konci šedesátých let minulého století jako možný nástroj pro studium a produkci rostlinných sekundárních metabolitů. Systémy rostlinných buněčných kultur představují potenciální obnovitelný zdroj cenných léčivých sloučenin. Možnost produkovat tyto látky pomocí explantátových kultur vychází ze skutečnosti, že každá somatická (tělní) buňka více či méně specializovaných rostlinných pletiv je totipotentní. To znamená, že obsahuje kompletní genetickou výbavu celé rostliny. Avšak aby bylo možné vytvářet explantátové kultury, které by produkovaly žádané látky, je třeba vyřešit mnoho náročných problémů. [26, 27]

Ve srovnání se získáváním těchto látek z intaktních rostlin má jejich produkce rostlinnými buňkami pěstovanými *in vitro* některé přednosti [26, 27]:

- Užitečné sloučeniny mohou být produkovány za řízených podmínek nezávisle na klimatických a půdních podmínkách.
- Jsou vyloučeny negativní biologické vlivy, které ovlivňují produkci sekundárních metabolitů v přírodě. Kultivované buňky jsou prosté mikroorganismů i hmyzu, které napadají rostliny.
- Mohou být pěstovány buňky rostlin libovolného původu, a to kontinuálně po celý rok.
- Ke zvýšení produkce žádaných látek lze využít metod selekce na buněčné úrovni.
- Získaný materiál dosahuje uniformity, jaké nelze v přírodních podmínkách nikdy dosáhnout.
- Kultury buněk mohou produkovat i sloučeniny, které se v rostlině nevyskytují. Tak byly např. nalezeny nové látky s antimikrobní aktivitou nebo nový inhibitor proteáz. Často jde o sloučeniny zatím neznámé struktury a s neznámou biologickou aktivitou.

3.2.1 Základní pojmy

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

Kultivace *in vitro* – pěstování rostlinného materiálu v podmínkách co nejúplněji definovatelných po stránce chemické i fyzikální a zabraňujících nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organismy a buňkami.

Kultura rostlinných explantátů – rostlinné explantáty pěstované po určitou dobu *in vitro*. Tyto kultury lze podle morfologické charakteristiky zařadit do některé z následujících pěti kategorií:

1. **Kultura orgánová** – orgánové systémy, orgány, resp. jejich základy či části, pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje jejich diferenciaci a v celku zachovává jejich stavbu a funkci.
2. **Kultura tkáňová** – do různého stupně soudržné, morfologicky desorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně, pomnožované buď na polotuhých či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě.
3. **Kultura suspenzní** – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendované v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.
4. **Kultura buněčná** – volné jednotlivé a identifikované buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotekuté půdě nebo na nosiči nasyceném půdou.
5. **Kultura protoplastů** – kultura buněk zbavených buněčných stěn, kde buněčný obsah není obalen pevnou buněčnou stěnou, ale jen pružnou, elastickou plasmolemou.

Primární explantát – rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny.

Primární kultura – kultura primárních explantátů.

Subkultivace, pasážování – přenos celé kultury nebo její části do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat či zesílit růst kultury po další subkultivační interval.

Subkultivační interval – období mezi dvěma po sobě následujícími subkultivacemi kultury.

Subkultivační číslo – pořadové číslo, udávající, kolikrát byla kultura pasážována od svého založení z primárního explantátu či již existující kultury.

Rozpadavost kultur – schopnost tkáňových či suspenzních kultur spontánně se rozpadat na buněčné shluky a volné buňky, schopné dalšího růstu, resp. pomnožování.

Kalus (zával, svalec) – v původním významu neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny, v přeneseném významu pletivo, které vzniká na povrchu nenádorových primárních explantátů a je schopné subkultivace.

Kalusová kultura – kultura kalusu *in vitro*.

Diferenciace – chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech, jimiž se odlišily od tzv. eumeristematického stavu a získaly jinou specializaci. Opačný proces se nazývá dediferenciace. [28]

3.2.2 Odvození a udržování kultury

Byla vypracována metodologie pro vytváření a pěstování buněčných kultur odvozených z tkání vyšších rostlin. Používají se dva typy buněčných kultur – kalusové a suspenzní. Základním předpokladem pro vytvoření buněčné kultury je výběr vhodné matečné rostliny. K odvození primárních explantátů je výhodné použít odlišných částí různých rostlin, získaných z několika lokalit, a plně využít možností buněčného klonování. Je nutné vyčlenit výkonné buněčné klony s vysokou produkcí metabolitu a mající přijatelně vysokou rychlost růstu. [27, 28]

Tvorba kalusové kultury je většinou počátečním stadiem pro oba typy kultur rostlinných buněk. Vychází se z rozřezaných kousků z poraněných sterilních částí rostlin, které se inkubují na pevném živném médiu (agar). Vzniká nepravidelný výrůstek buněk, zvaný kalus. Přes řadu subkultur lze pak založit nezávisle rostoucí kalusovou kulturu. Změnou kombinace fytohormonů v kultivačním médiu se sníží vzájemná přilnavost buněk; pak lze třepáním kalusu v kapalném médiu uvolnit jednotlivé buňky, které rostou a vytvářejí suspenzní kulturu. Hlavní výhodou suspenzní kultury je velmi rychlý růst buněk, což je způsobeno lepším kontaktem s živným médiem. [27]

Suspenzní kulturu rostlinných buněk lze udržet dlouho. Běžně se přenáší 5-10 % inokula do čerstvého média po 2-4 týdnech. Růst v suspenzi je obvykle rychlejší než v agaru, trvá několik dní, kdežto ve ztuženém médiu lze plného vývoje dosáhnout až po řadě týdnů. K delšímu přechovávání kmene kultivovaných buněk se běžně používá forma kalusu. Je možno jej udržovat kultivací na agarem ztuženém médiu bez rizika

kontaminace. Vyrůstající kalus se po převedení do míchaného kapalného média opět rychle rozpadá a kultura se vrací do původní formy buněčné suspenze. [27]

3.2.2.1 Buněčné suspenzní kultury

Buněčné suspenzní kultury představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujiícím se tekutém živném médiu. Hlavní výhodou suspenzní kultury je velmi rychlý růst buněk, což je způsobeno přímým kontaktem s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou jim rychle přístupné.

Ke kultivaci buněčných suspenzí se používají různé kultivační systémy. Pro všechny je společné používání pohybujiících se tekutých živných médií. Pohybem média se dosahuje jeho aerace, zajišťuje se lepší přístup živin k jednotlivým buňkám a napomáhá se rozpadu buněčných shluků, které vznikají při dělení buněk. Pohyb je zajišťován umístěním kultivačních nádob na roller (v šikmé rovině se otáčející plocha) nebo na třepačku (pohyb baněk je v horizontální rovině). Pro kontinuální kultivace buněčných suspenzí se používají různé typy bioreaktorů, kde je pohyb média zajišťován buď míchadlem anebo probubláváním sterilního vzduchu.

Růst buněčné suspenze v uzavřeném systému probíhá v několika fázích. Tyto fáze jsou charakterizovány tzv. růstovou křivkou, kterou získáme grafickým znázorněním závislosti některé z růstových charakteristik suspenze (čerstvá hmotnost, počet buněk, sušina atd.) na čase [25]:

1. **Lag fáze** – pomalý růst buněčné suspenze těsně po naočkování (období přizpůsobení se naočkovaných buněk novému prostředí)
2. **Exponenciální fáze** – velmi intenzivní nárůst buněk v suspenzi (buňky rostou stále stejnou maximální rychlostí)
3. **Stacionární fáze** – pokles, popřípadě úplné zastavení růstu buněk, které je limitováno nedostatkem živin vyčerpaných z média během exponenciálního růstu.
4. **Fáze odumírání** – postupné odumírání buněk (snížení pH a hromadění toxických produktů buněčného metabolismu)

3.2.3 Kultivační podmínky

3.2.3.1 Živné médium

Pro optimalizaci kultivace rostlinných kultur byly zkoumány a následně stanoveny optimální podmínky, které jsou zajištěny složením živného média, většinou voleného tak, aby podporovalo růst a dělení buněk. Pro zdravý a energický růst je třeba, aby rostliny přijaly z půdy [25, 27-29]:

1. Makronutrienty

Představují směs anorganických látek jako hlavní živiny rostlin. Jedná se o ionty dusíku (N), draslík (K), vápník (Ca), fosfor (P), hořčík (Mg) a síru (S). Ionty se do živného média přidávají nejčastěji ve formě solí.

2. Mikronutrienty

Jsou to stopové prvky vyživující kultury. Mezi esenciální mikronutrienty patří železo (Fe), bór (B), mangan (Mn), molybden (Mo), měď (Cu), zinek (Zn), jod (I) a chlór (Cl).

3. Zdroje organického uhlíku

Rostlinné tkáně kultivované *in vitro* využívají uhlík jako základní stavební jednotku pro nově vznikající tkáň. Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána sacharóza. V některých případech je možné sacharózu nahradit glukózou či fruktózou. Obvykle používaná koncentrace sacharózy v kultivačním médiu je 2-3 %.

4. Vitamíny

Většina rostlinných tkáňových kultur může sama syntetizovat všechny potřebné vitamíny, ale jejich množství často není dostačující. Vitamíny jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Největší význam mají vitamíny skupiny B (především thiamin), bios faktory (myo-inositol, biotin), vitamín C a kyselina nikotinová.

5. Regulátory růstu rostlin

6. Nedefinované směsi přírodních látek

Do tkáňových kultur mohou být přidávány další přírodní látky, jako je kokosové mléko, extrakty z koňského kaštanu, vlašského ořechu, kukuřice, pšenice atd., které obsahují aminokyseliny, organické kyseliny, cukry, inositol a další látky.

3.2.3.2 Růstové regulátory

Každá rostlina vytváří jak látky stimulující, tak i látky inhibující růst svých orgánů. Tyto látky označované jako fytohormony jsou pak komplexem podmínek prostředí nezbytné k dosažení harmonické celistvosti rostlinného těla. Většina fytohormonů je syntetizována na více místech v rostlině. Fytohormony jsou výrazně méně specifické než hormony živočišné: každý z fytohormonů ovlivňuje několik často odlišných procesů a naopak, týž proces bývá ovlivněn větším počtem různých látek. [30, 31]

Mechanismus účinku hormonu spočívá ve vazbě na receptor (protein). Fytohormon se může vázat na receptor umístěný na membráně a signál je pak dále do buňky přenášen systémy „druhých posílů“ (*second messenger*) nebo fytohormon proniká do buňky, váže se na vazebné místo v cytoplasmě a takto vzniklý komplex proniká do buněčného jádra, kde vyvolá změnu v expresi některých genů. [30, 31]

Růstové regulátory používané v kultivačních médiích můžeme rozdělit do čtyř základních skupin: [25]

1. Auxiny

Při metabolismu proteinů vzniká růstová látka nazvaná auxin. Mezi její hlavní fyziologické účinky patří stimulace prodlužovacího růstu, stimulace zakořeňování a dělení buněk a má vliv i na apikální dominanci. Díky těmto vlastnostem se auxiny používají ke stimulaci zakořeňování řízků. V kultivačním médiu jsou používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk. [25, 30, 31]

Auxiny lze rozdělit na přirozené a syntetická analoga. Mezi přirozené se v rostlinách vyskytující patří kyselina indolyl-3-octová, kyselina indolyl-3-máselná, kyselina 4-chlor-indolyl-3-octová a kyselina fenyl-octová. Syntetické auxiny s účinky podobnými účinkům kyseliny indolyl-3-octové zahrnují [30]:

- Naftalenové kyseliny: α -naftyl-octová kyselina
- Chlorfenoxykyseliny: kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
- Benzoové kyseliny
- Deriváty kyseliny pikolinové: picloram

2. **Cytokininy**

Jejich nejbohatším zdrojem je autoklávovaná DNA, ze které byl jako účinná látka izolován a identifikován 6-furfurylaminopurin (6-furfuryladenin, kinetin). Na základě výsledků testování biologické aktivity kinetinu byly cytokininy definovány jako látky, které v přítomnosti auxinů indukují buněčné dělení neboli cytokinezi. Výrazně podporují diferenciaci pupenů, umožňují regeneraci orgánů, potlačují apikální dominanci a zpomalují stárnutí. V současné době známe více než 30 přirozených cytokininů mezi něž kromě kinetinu patří zeatin, benzylaminopurin a adenin. Cytokininy se používají v kultivačních médiích za účelem stimulace buněčného dělení a při morfogenezi tkáňových kultur, kde spolu s auxiny umožňují regenerační proces. [25, 30, 31]

3. **Gibereliny**

Gibereliny jsou terpenoidní sloučeniny s charakteristickým giberelinovým skeletem. Tvoří se pravděpodobně ve všech rostlinných orgánech. Nejvyšší hladiny giberelinů nacházíme v místech aktivního růstu a nově se tvořících orgánů. Stimulují prodlužovací růst, ale na rozdíl od auxinů pouze u nadzemních částí rostlin. Dále indukují kvetení u dlouhodobých rostlin a stimulují klíčení. Nejvíce se využívají v ovocnářství, aby se zvýšilo nasazení plodů. Do média se přidávají za účelem stimulace růstu buněčných kultur při nízké hustotě suspenze a ke stimulaci růstu kalusu. [25, 30, 31]

4. **Kyselina abscisová**

Kyselina abscisová patří k terpenoidním inhibitorům. V rostlinách inhibuje růstové a vývojové procesy, jako je prodlužování růstu, urychluje stárnutí listů, jejich opad a vstup do vegetačního klidu. [30, 31]

Mezi rostlinné hormony patří také etylen. Etylen má mezi fytohormony zvláštní postavení, protože ve fyziologické koncentraci může působit jako stimulant i jako inhibitor. Je to plynný hormon, který se rozpouští v cytoplazmě, kde má svá specifická vazebná místa. Inhibuje prodlužovací růst, a naopak stimuluje růst radiální. Může být uvolněn do atmosféry a ovlivnit tak rostliny ve svém okolí. Toho se využívá pro urychlení zrání plodů.

Mimo tyto fytohormony existuje v rostlinách množství látek s růstově regulační aktivitou, které mezi hormony řazeny nejsou, neboť jsou účinné ve vyšších koncentracích nebo neznáme dostatečně obecnost jejich působení. Jsou to zejména brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová, oligosacharidy a velká skupina fenolických látek. [30, 31]

3.2.3.3 Fyzikální podmínky kultivace

Na explantáty mají vliv i další faktory, které je možno *in vitro* snadno regulovat, a které vytváří podmínky kultivace [28, 30]:

1. Světlo

V závislosti na světlo dochází často v kulturách ke změně intenzity biosyntézy a akumulace sekundárních metabolitů, což je v mnoha případech spojeno s anatomickou diferenciací. Světlo může být také indukčním faktorem některých biosyntetických pochodů např. syntézy flavonoidů, anthokyanů atd. Na produkci sekundárních metabolitů má vliv vlnová délka světla, jeho kvalita, intenzita a fotoperioda. Světlo rovněž může ovlivňovat organovou diferenciaci.

2. Teplota

Kultivační teplota je jedním z faktorů ovlivňujících průběh kultivace. Každá metabolická reakce je charakterizována teplotním koeficientem, který uvádí o kolik se změní rychlost reakce, změníme-li teplotu. Teplota kultivace je většinou zvolena v těsném rozmezí kolem 25 °C. Její hodnota má vliv na dobu znásobení počtu buněk a její zvýšení může indukovat organogenezi kultur.

3. Acidita živného média

U rostlinných tkáňových kultur není bezpodmínečně nutná přesná hodnota pH živného média. Optimální hodnota pH živného média je závislá na typu kultury. Roztoky bývají obvykle slabě kyselé (5,5 – 6,0). Na tyto hodnoty se v případě potřeby upravují půdy přidáním hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové.

3.2.4 Biotechnologické využití

Výše popsané metody vsádkové kultivace ve formě kalusu na tuhém médiu či suspenze buněk v baňkách na třepačce nebo rolleru jsou však málo vhodné pro získání

dostatečného množství biomasy pro biotechnologické zpracování. Pro biotechnologické využití biomasy získané pěstováním explantátových kultur přichází v úvahu především produkce různých průmyslově využitelných sloučenin, především sekundárních metabolitů. [27]

Kromě významné role v základním výzkumu mají explantátové kultury další využití v zemědělství a průmyslu. V zemědělství slouží k množení, šlechtění a ozdravování rostlin. Rostlinná biomasa by v zemědělství mohla být využita i pro krmení, což ale znemožňuje její pomalý růst. Z různých aplikací jsou důležité zejména [28]:

1. Vegetativní množení umožňující rychlé získání tisíců shodných rostlinných jedinců.
2. Meristémové kultury, které umožňují získání ozdravených bezvirových rostlin.
3. Pylové kultury umožňující získání haploidních rostlin a od nich odvozených čistých linií pro šlechtitelské účely.
4. Fúze protoplastů téhož nebo různého druhu umožňující tvorbu somatických hybridů (buněk nebo celých rostlin) s vlastnostmi epigenetické povahy z jiného druhu (přenos samčí cytoplasmatické sterility, rezistence apod.).
5. Tvorba různých regenerovaných rostlin, což umožňuje využití polymorfismu ve šlechtitelském programu a selekce produkčních klonů na úrovni izolované buňky.
6. Genové inženýrství u izolovaných buněk nebo protoplastů pro zavedení nových vlastností do rostliny.

Rostlinné buňky obsahují mnoho enzymů využitelných pro specifické biotransformace přirozených i nepřirozených prekurzorů. Proto je problematika aplikace rostlinných buněčných kultur při získávání terapeuticky významných látek přírodního původu perspektivní oblastí farmaceutické biotechnologie. [28]

3.3 Elicitace

Rostliny a rostlinné buňky *in vitro* vykazují fyziologické a morfologické reakce na mikrobiální, fyzikální nebo chemické faktory, které jsou známé jako "elicitory". Elicitor může být definován jako látka, která při zavádění v malých koncentracích do systému živých buněk iniciuje nebo zlepšuje biosyntézu specifických sloučenin. [1]

Rostliny syntetizují rozmanité strukturně komplexní chemické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, obecně známé jako sekundární metabolity. Sekundární metabolity mají velmi důležitou roli v interakci rostlin s prostředím a umožňují jejich existenci a výživu. Elicitace je technika, která zahrnuje exogenní přidání stopových množství elicitorů (abiotických nebo biotických) do růstového média, což následně vyvolává stresovou reakci se současným zvýšením produkce sekundárního metabolitu. [1, 32, 33]

3.3.1 Klasifikace elicitorů

Rostliny často rostou v drsném prostředí ovlivněném biotickými a abiotickými faktory. V těchto podmínkách zůstávají naživu díky široké škále obranných strategií, které jsou obecně spouštěné po rozpoznání elicitoru buněčným prostředím. Tradičně jsou elicitory rozděleny do dvou typů, jako chemické sloučeniny z abiotických a biotických zdrojů. [5, 33, 34]

1. **Abiotické elicitory** obsahují látky, které jsou nebiologického původu a jsou seskupeny ve fyzikálních, chemických a hormonálních faktorech.
 - Fyzikální
 - UV záření
 - Osmotický stres
 - Salinita
 - Sucho
 - Tepelný stres
 - Chemické
 - Těžké kovy
 - Minerální soli
 - Toxické plyny

2. **Biotické elicitory** jsou látky biologického původu, které zahrnují polysacharidy pocházející ze stěn rostlinných buněk (např. chitin, pektin a celulóza) a mikroorganismy.

- Polysacharidy
- Kvasinkové extrakty
- Houbové
- Bakteriální
- Hormonální

Biotické elicitory se dále dělí podle svého původu na exogenní biotické elicitory a endogenní biotické elicitory.

- **Exogenní biotické elicitory** jsou látky, které vznikly vně buňky, jako polysacharidy, polyaminy a mastné kyseliny.
- **Endogenními biotickými elicitory** se rozumí látky vzniklé uvnitř buňky, jako jsou např. fytohormony, galakturonidy nebo hepta-beta-glukosidy. [1, 34]

3.3.2 Charakteristika elicitorů

Zvýšená produkce sekundárních metabolitů z rostlinných buněčných kultur elicitační je novou oblastí výzkumu, která by mohla mít významný ekonomický přínos pro farmaceutický průmysl. Základním předpokladem úspěšné elicítace je nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby jeho působení na rostlinnou kulturu *in vitro*. Mezi další parametry, které mají vliv na produkci sekundárních metabolitů, patří věk kultury, buněčná linie nebo klon použitých mikrobiálních elicitorů, regulace růstu, složení živin, kvalita buněčných stěn, podstatné zvýšení akumulace produktu atd. [1, 3]

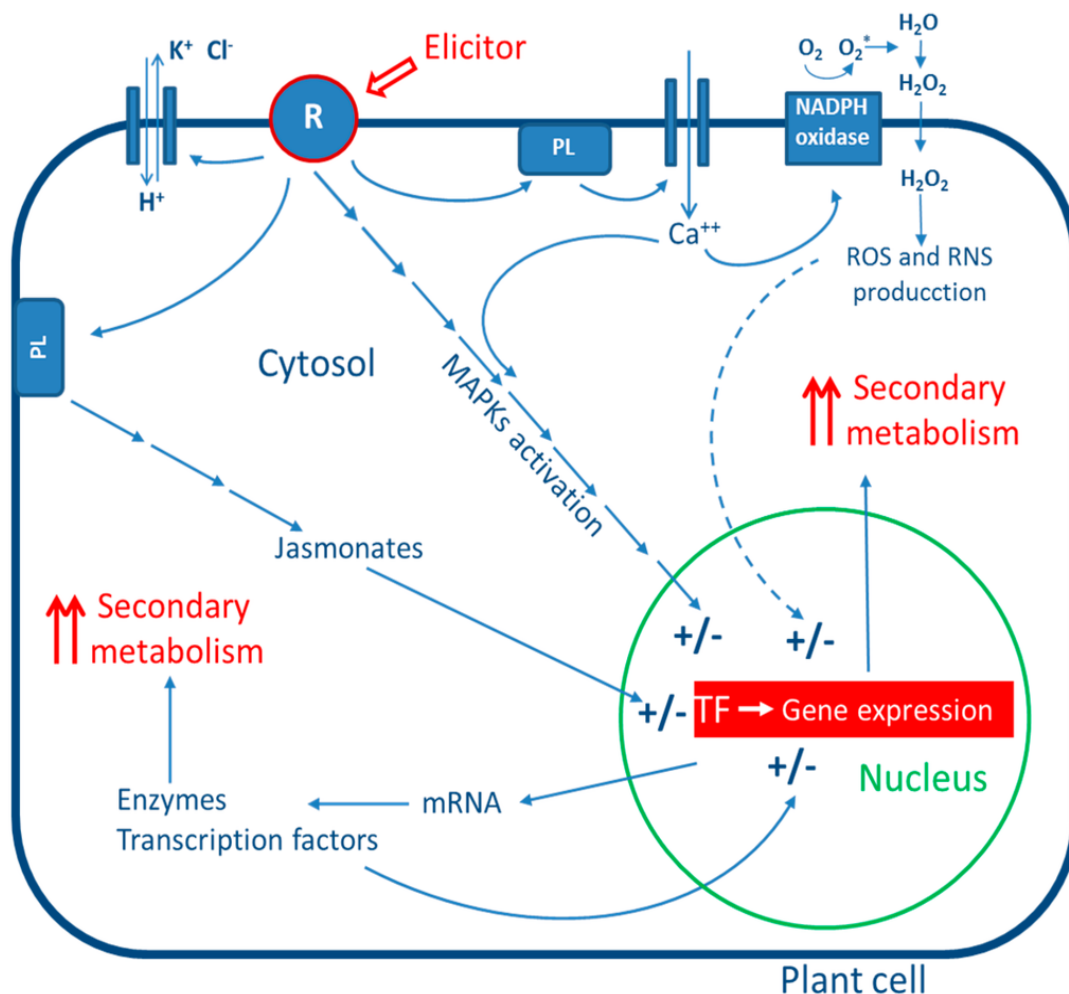
3.3.3 Mechanismus elicítace

Elicitory jsou pro rostlinu chemické látky z různých zdrojů, které mohou vyvolat fyziologické a morfologické odezvy a akumulaci fytoalexinů. Je známo, že ošetření rostlin elicitory nebo napadení neslučitelným patogenem způsobuje řadu obranných reakcí, včetně akumulace řady sekundárních metabolitů chránících rostlinu. [1]

Elicitory mohou regulovat velký počet kontrolních bodů a spouštět expresi klíčových genů se zvýšenou buněčnou aktivitou na biochemické a molekulární úrovni zahrnující signální sloučeniny. Odpověď rostlin na stres indukovaný elicitorem obvykle začíná na buněčné plazmatické membráně. Existuje ale i několik receptorů v cytosolu, spojených jak s jádrem, tak s cytoplasmatickou membránou. V buněčných plazmatických membránách bylo nalezeno několik vazebných míst pro řadu elicitorů různých chemických struktur. [5, 33]

Transdukce signálu elicitoru je vícekomponentní síť, která vytváří účinnou obranu různými sekvenčními reakcemi. Tyto vícenásobné komponenty se skládají z paralelních nebo zesilujících signalizačních cest vedoucích k různým cílovým reakcím. Signalizační cesta elicitoru se může lišit ve vnímání různých signálů elicitoru nebo v cílových obranných reakcích. Může také probíhat hypertenzní odezva, charakterizovaná rychlou smrtí buněk v bezprostřední blízkosti místa expozice patogenu, stejně jako tvorba strukturních defenzivních bariér, jako je například ukládání ligninu pro zpevnění buněčných stěn. Transdukce signálu elicitoru, který receptory vnímají, vyvolává působení druhých posílů, kteří dále zesilují signál pro následné reakce. Sekvenčně se vyskytující události v obranných reakcích indukované elicitorem mohou být shrnuty následovně [5]:

percepce elicitoru receptorem (R) → reverzibilní fosforylace a defosforylace proteinů plazmatické membrány a cytosolických proteinů → zvýšení cytosolového $[Ca^{2+}]$ → přítok Cl^- a K^+ /influx H^+ → extracelulární alkalizace a cytoplasmatické okyselení → aktivace mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) → aktivace NADPH oxidázy a produkce reaktivních atomů a molekul kyslíku a dusíku (ROS a RNS) → exprese časného obranného genu → vznik jasmonanu → pozdní exprese genové obranné odpovědi a akumulace sekundárního metabolitu



Obr. 5: Schematické znázornění možných odpovědí buněk na elicitaci. [5]

Systemové reakce používané rostlinami k prevenci napadení vedou k produkci antimikrobiálních sloučenin, jako jsou fytoalexiny a proteiny související s patogenezí, které společně hrají klíčovou roli při odmítnutí patogenů. Vnímání elicitoru může také zvýšit úroveň odolnosti rostlin proti budoucímu patogennímu útoku. [5]

3.3.4 Fytoalexiny

V současné době je známo více než 300 fytoalexinů, které po chemické stránce patří mezi velmi různorodé typy sloučenin. U systematicky příbuzných druhů se obvykle vyskytují také podobné druhy fytoalexinů. Např. u rostlin čeledi *Fabaceae* převažují isoflavonoidy, u jiných čeledí to mohou být seskviterpeny (*Solanaceae*), diterpeny (*Poaceae*), furanokumariny (*Apiaceae*) či stilbeny (*Vitaceae*). U téže rostliny se někdy mohou tvořit dva i více různých fytoalexinů.

Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanismům toxického působení fytoalexinů. [30]

3.3.5 Těžké kovy

Těžké kovy se staly jedním z hlavních abiotických stresových činitelů pro živé organismy, protože rostle jejich využití v průmyslových a agrotechnických oblastech a mají vysokou bioakumulaci a toxicitu. Podstata toxicity těžkých kovů pro rostliny spočívá v jejich vysoké afinitě k chemickým skupinám obsahujícím redukované formy síry, takže inaktivují enzymy s volnými skupinami SH-. Rostliny reagují na látky znečišťující životní prostředí, spouštěním exprese genů, které kódují proteiny zapojené do stresové reakce. V reakci na tyto nepříznivé podmínky, rostliny vyvíjejí komplexní molekulární a fyziologické mechanismy pro lepší adaptabilitu, toleranci a přežití. [25, 30, 34, 35]

Těžké kovy jako zinek (Zn), měď (Cu), molibden (Mo), mangan (Mn), kobalt (Co), **železo (Fe)** a nikl (Ni) jsou nezbytné pro klíčové biologické procesy a vývojové cesty. Nicméně tyto kovy spolu se čtyřmi dalšími vysoce toxickými těžkými kovy – arsenem (As), **olovem (Pb)**, kadmíem (Cd) a rtuť (Hg), mohou do značné míry snížit produktivitu plodin, když jejich koncentrace překračuje nadlimitní hodnoty. Tyto toxické prvky způsobují morfologické abnormality a metabolické poruchy, které vedou k redukci výnosu rostlin. Na druhé straně, rostlinné buňky vyvinuly nesčetné množství adaptivních mechanismů pro řízení nadbytku kovových iontů a využívají detoxikační mechanismy, aby zabránily jejich účasti na nežádoucích toxických reakcích. Rostliny se mohou chránit již omezením absorpce těžkých kovů, jejich hromaděním ve vakuole, omezením transportu do nadzemních orgánů apod. Podstatou tolerance k iontům těžkých kovů, které se hromadí v buňkách, je jejich inaktivace vazbou na nízkomolekulární bílkoviny mající vysoký podíl cysteinu, které se označují jako fytochelatiny nebo metalotioneiny a mimo to dochází také k aktivaci různých antioxidantů a dalších sekundárních metabolitů. [30, 34-36]

Těžké kovy mohou ovlivnit produkci fotosyntetických pigmentů, cukrů, proteinů a thiolů. Tyto účinky mohou vyplývat z inhibice enzymů podílejících se na produkci těchto přírodních produktů, pravděpodobně díky narušení využití substrátu. Tyto abnormality také vedou k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), např. radikálu superoxidového aniontu (O_2^-), H_2O_2 a hydroxylového radikálu (OH^\cdot), což má za následek

narušení redoxní homeostázy buněk. Toxické ionty kovů dále podporují poškození DNA anebo zhoršují mechanismy opravy DNA a brání membránové funkční integritě. [34-36]

3.3.5.1 Olovo

Olovo je jedním z nejrozšířenějších stopových kovů, které v přírodních zdrojích existují v různých formách. Ke znečištění půdy, flóry a fauny může docházet z olovnatých paliv, prachu, starých olovených vodovodních trubek nebo různých průmyslových areálů. Pb^{2+} je biologicky nerozložitelný a jeho dlouhodobá expozice je akutně toxická pro rostliny i zvířata a má několik škodlivých účinků na biologické systémy včetně vlastností půdy. Olovo zhoršuje různé biologické procesy v rostlinách, včetně klíčení semen, vývoje semenáčků, prodloužení kořenů, transpirace, biosyntézy chlorofylu a buněčného dělení. Také mění permeabilitu buněčné membrány reakcí s aktivními skupinami různých metabolických enzymů, fosfátovými skupinami ADP nebo ATP a nahrazením esenciálních iontů, což způsobuje fytotoxicitu. Toxicita olova vede k inhibici produkce ATP, indukuje peroxidaci lipidů a poškození DNA přes produkci ROS. [35]

Vlivu olovnatých iontů jako stresového faktoru spouštějícího obranné reakce rostlin se věnuje značná pozornost – jeho množství v ekosystému se totiž neustále zvyšuje. Jsou známy některé mechanismy, kterými těžké kovy ovlivňují (v kladném i záporném smyslu) intenzitu biosyntetických dějů. Olovo kompetuje převážně s kalcium, blokuje jeho transport nejen nescifickými vápenatými kanály, ale i přes Na^+/Ca^{2+} ATPázu. Místo vápníku vstupuje do mitochondrií, narušuje i úlohu Ca^{2+} iontů při transdukci signálu, je tedy příčinou pozměněné regulace buněčného metabolismu. Při optimalizaci podmínek lze tedy elicitacních účinků iontů těžkých kovů využít k cílené produkci sekundárních metabolitů. Nevýhodou olovnatých iontů je výrazné toxické působení na rostlinné buňky, které se projevuje úbytkem biomasy a následně i útlumem produkce. [30]

3.3.5.2 Železo

Železo je esenciálním stopovým prvkem rostlin. Je zapojeno do základních procesů, jako je fotosyntéza, dýchání, fixace dusíku, syntéza DNA a tvorba hormonů. Železo je nezbytné pro syntézu chlorofylu a tvoří součást hemových skupin cytochromů. Je obsaženo v enzymech peroxidáze a kataláze, tvoří součást feredoxinu apod. Železo je

rostlinami přijímáno nejčastěji ve formě komplexů. Hlavní úloha železa v těchto biologických procesech vychází převážně z jeho redoxních vlastností ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$), které umožňují jeho účast na reakcích přenosu elektronů při fyziologickém pH. V aerobním buněčném médiu může nerozpustnost železa způsobovat jeho toxicitu. Toxicky působí železo vyskytující se ve velkém množství vzhledem k přírodním a průmyslovým procesům. Navíc vysoká koncentrace železa v půdě může vést k nerovnováze živin omezením absorpce jiných živin. Všechny živé organismy vyvinuly strategie pro zachování homeostázy železa. Tyto strategie zahrnují chelataci železa na organické kyseliny nebo transferin pro transport, kompartmentaci železa v apoplastovém prostoru a vakuolách, skladování železa ve feritinu a zamezení reakce mezi železem a peroxidy. V buňkách je volný Fe^{2+} toxický, protože je schopen katalyzovat rozklad H_2O_2 na extrémně reaktivní hydroxylový (OH) radikál. Toxicita železa může mít za následek poškození oxidačních procesů buněk doprovázené indukcí antioxidačních obranných mechanismů. [30, 37, 38]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál, přístroje, pomůcky

4.1.1 Rostlinný materiál

Veškeré experimenty uvedené v této diplomové práci byly prováděny na suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* L., *Cupressaceae* (varieta *Glauca* a *Hetzii*). Elicitace těžkým a esenciálním kovem byla provedena v 8. pasáži suspenzní kultury.

4.1.2 Chemikálie

- Ajatin plus roztok 10%, Profarma – produkt s.r.o., ČR
- Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR
- Dihydrogenfosforečnan amonný *p. a.*, Lachema, ČR
- Dusičnan draselný *p. a.*, Lachema, ČR
- Edetan sodný *p. a.*, Sigma–Aldrich, USA
- Etanol 96%, Lachema, ČR
- Chlorid kobaltnatý hexahydrát *p. a.*, Lachema, ČR
- Chlorid olovnatý *p. a.*, Lachema, ČR
- Chlorid pyridoxinia *p. a.*, Sigma–Aldrich, USA
- Chlorid thiaminia *p. a.*, Sigma–Aldrich, USA
- Chlorid vápenatý dihydrát *p. a.*, Penta, ČR
- Jodid draselný *p. a.*, Penta, ČR
- Kinetin *p. a.*, Sigma–Aldrich, USA
- Kyselina askorbová *p. a.*, Sigma–Aldrich, USA
- Kyselina α -naftyloctová *p. a.*, Sigma–Aldrich, USA
- Kyselina fosforečná *p. a.*, Sigma–Aldrich, USA
- Kyselina nikotinová, *p. a.*, Sigma–Aldrich, USA
- Metanol *p. a.*, Penta, ČR
- Molybdenan sodný dihydrát *p. a.*, Penta, ČR
- Myo-inositol, Sigma–Aldrich, USA
- Podofylotoxin - standard pro HPLC analýzu, Sigma–Aldrich, USA
- Sacharóza *p. a.*, Penta, ČR

- Síran hořečnatý heptahydrát *p. a.*, Penta, ČR
- Síran manganatý monohydrát *p. a.*, Lachema, ČR
- Síran měďnatý pentahydrát *p. a.*, Lachema, ČR
- Síran zinečnatý heptahydrát *p. a.*, Penta, ČR
- Síran železnatý heptahydrát *p. a.*, Lachema, ČR
- Thiamin, *p. a.*, Sigma–Aldrich, USA

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
- Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko
- Třepačka VKS 75A, Edmund Buehler GmbH, Hechingen
- Centrifuga MPW 342, Mechanika precyzyjna, Varšava
- Ultrazvuková lázeň RK 100H, Bandelin electronic GmbH, Berlín
- Chromatografická soustava Shimadzu Prominence 20 A, Tokyo
- Mikrofiltry (0,20 μm), Corning NY 14831, Německo
- Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc ČR.

4.2 Kultivace explantátové kultury

4.2.1 Kultivační nádoby a nástroje

Kultivace suspenzních kultur probíhala v 100 ml Erlenmeyerových baňkách z varného skla značky SIAL. Toto sklo je dostatečně odolné vůči vodě, chemikáliím a rozdílům teplot, a proto je vhodné pro práci s explantátovými kulturami.

Použité kovové nástroje (pinzety) byly opláchnuty 96% ethanolem, zabaleny do hliníkové fólie a následně sterilizovány 2 hodiny při teplotě 200 °C v horkovzdušném sterilizátoru.

Pro elicitaci byly použity pipety sterilizované v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa po obalení hliníkovou fólií.

4.2.2 Příprava živného média

Pro kultivaci suspenzních kultur *Juniperus virginiana* bylo použito živné médium podle Schenka a Hildebrandta (SH), které má následující složení [39]:

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

Živné médium bylo připraveno ze substancí a předem připravených zásobních roztoků, které obsahovaly látky s nízkou koncentrací. Substance byly odváženy na analytických vahách a zásobní roztoky byly pipetovány do 1000 ml odměrné baňky. Všechny složky byly v odměrné baňce rozpuštěny v destilované vodě a následně byl objem doplněn destilovanou vodou po značku.

K médiu byly přidány růstové regulátory a kyselina askorbová v koncentracích: 3,0 mg.l⁻¹ kyselina α -naftyloctová; 0,2 mg.l⁻¹ kinetin a 15 mg.l⁻¹ kyselina askorbová. [40]

Připravená půda pro kultivaci suspenzní kultury byla rozlita po 30 ml do Erlenmeyerových baněk. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa po dobu 15 minut.

4.2.3 Pasážování a kultivace

Suspenzní kultury byly získány z rozpadavé kalusové kultury mechanickým roztřepáním na třepačce v Erlenmeyerově baňce s živným médiem. Pasážování suspenzní kultury bylo prováděno v aseptickém boxu s laminárním prouděním. Prostor boxu byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen nejméně 1 hodinu germicidní zářivkou. Při práci bylo používáno sterilní sklo a nástroje a vždy byly zachovány přísné aseptické podmínky. Pasážování bylo prováděno vždy po 14 dnech subkultivace přenesením části narostlé suspenze (2 ml) do baněk s čerstvým médiem.

Kultivace suspenzní kultury probíhala na rotační třepačce (115 otáček za minutu) v kultivační místnosti při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

4.3 Elicitace

4.3.1 Příprava roztoků elicitorů

K elicitaci byly použity dva abiotické elicitory ve čtyřech koncentracích:

1. **FeSO₄ · 7 H₂O (esenciální kov)**

koncentrace I = 1 μmol.l⁻¹

koncentrace II = 10 μmol.l⁻¹

koncentrace III = 100 μmol.l⁻¹

koncentrace IV = 1000 μmol.l⁻¹

2. **PbCl₂ (těžký kov)**

koncentrace I = 0,1 μmol.l⁻¹

koncentrace II = 1 μmol.l⁻¹

koncentrace III = 10 μmol.l⁻¹

koncentrace IV = 100 μmol.l⁻¹

Roztoky elicitorů byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa po dobu 15 minut.

4.3.2 Elicitace a odběr kultur

Elicitace suspenzní kultury byla provedena za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním ve 14. dni kultivace.

K experimentu bylo použito 72 kultivačních baněk se suspenzní kulturou. Do 8 z nich nebyl přidán elicitor a sloužily jako kontrolní kultura. Ke kontrolním kulturám byl přidán 1,0 ml destilované vody a do ostatních baněk byl přidán 1,0 ml elicitoru o příslušné koncentraci. Baňky byly následně uzavřeny hliníkovou fólií a kultivovány za výše uvedených podmínek.

Elicitované kultury 4 koncentracemi elicitorů byly postupně odebírány po 6, 24, 48 a 168 hodinách. Kontrolní kultury byly odebrány po 6 a 168 hodinách. Buňky byly od kultivačního média odděleny filtrací za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou a sušeny při laboratorní teplotě.

U každého vzorku bylo provedeno stanovení obsahu podofylotoxinu pomocí HPLC.

4.4 Stanovení obsahu podofylotoxinu

Stanovení obsahu podofylotoxinu bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

4.4.1 Příprava vzorku

Odvážilo se asi 0,3000-0,5000 g usušené upráškované suspenzní kultury *Juniperus virginiana*. Navážený vzorek se smíchal v 10,0 ml odměrné baňce s 10,0 ml methanolu a extrahoval se v ultrazvuku 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následně se extrakt převedl do centrifugační zkumavky a odstředoval se při 4 500 otáčkách po dobu 5 minut. Supernatant se převedl do vialek a dále se analyzoval metodou HPLC.

Data byla shromážděna a vypočítána pomocí chromatografického softwaru LabSolution v. 5.32 (Shimadzu, Japonsko).

4.4.2 Podmínky HPLC analýzy

Pro měření obsahu podofylotoxinu ve vzorcích byl použit kapalinový chromatograf (systém Shimadzu Prominence 20 A s vakuovým odplyňovačem, binárním čerpadlem, autosamplerem, UV/VIS detektorem a komunikačním modulem).

Parametry chromatografu:

- Kolona: LichroCart 250 × 4 mm, RP – 18 endcapped (5 μm) (Merck)
- Teplota na koloně: 30 °C
- Nástřik na kolonu: 30 μl
- UV detekce: 280 nm

Mobilní fáze:

A – methanol/voda/kyselina fosforečná (60:39,7:0,3; v/v/v)

B – methanol/kyselina fosforečná (99,7:0,3; v/v)

Gradientová eluce:

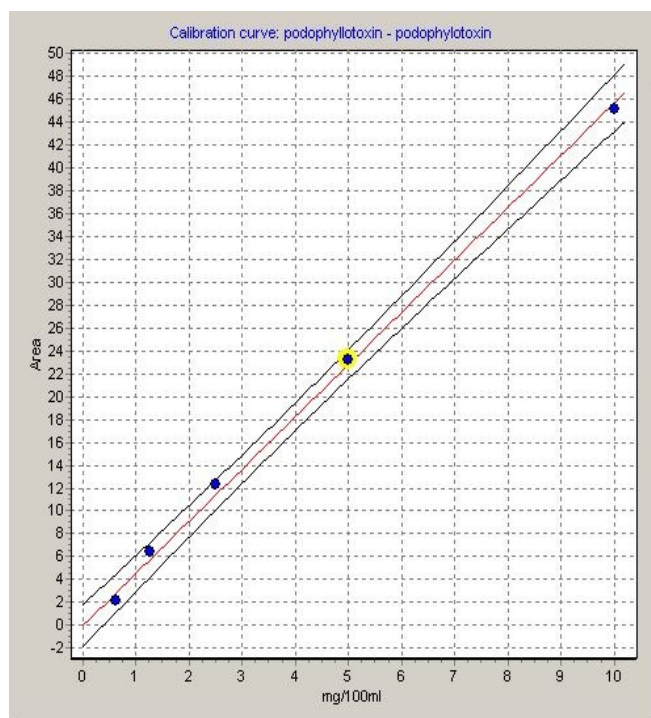
0 – 6 min koncentrace B 0 → 90%

6 – 7 min koncentrace B 90 → 0%

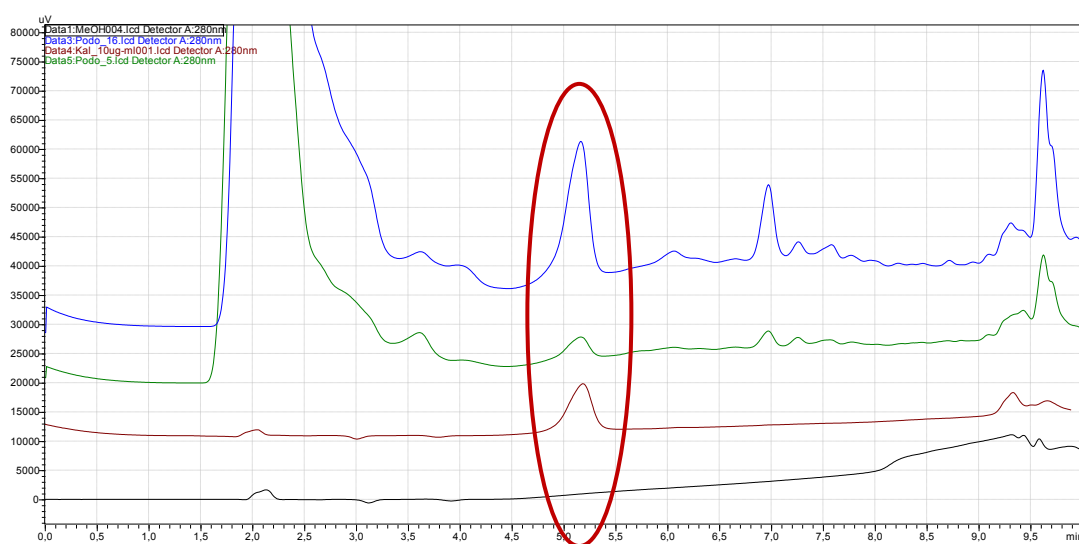
7 – 10 min koncentrace B 0%

Průtok mobilní fáze: 1 ml/min [41]

Pro kvantifikaci podofylotoxinu byla připravena pětibodová kalibrační křivka (r^2 0,9963) s čistým standardem.



Obr. 6: Kalibrační křivka podofylotoxinu



Obr. 7: Příklady HPLC záznamů analyzovaných vzorků

Legenda: Černá – nástřik rozpouštědla vzorků – průkaz selektivity
 Hnědá – standard podofylotoxinu (koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$)
 Zelená – vzorek č. 5 (Fe III – 6 hod)
 Modrá – vzorek č. 16 (Fe IV – 24 hod)

4.5 Statistické zpracování výsledků

Experimentem získané výsledky obsahu podofylotoxinu v suspenzních kulturách *Juniperus virginiana* L. var. *Glauca* a var. *Hetzii* byly vyhodnoceny statisticky na základě T-testu. Jedná se o test významnosti rozdílu dvou průměrů pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$.

- Aritmetický průměr:

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

- Směrodatná odchylka:

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

n – rozsah souboru

x_i – naměřené hodnoty

\bar{x} – aritmetický průměr

s – směrodatná odchylka

- T-test:

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

t – testovací kritérium

\bar{x}_1 – aritmetický průměr kontrolního souboru

\bar{x}_2 – aritmetický průměr pokusného souboru

n_1 – počet členů kontrolního souboru

n_2 – počet členů pokusného souboru

s_1 – směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 – směrodatná odchylka pokusného souboru

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

Vypočtená hodnota testovacího kritéria (t) se porovná s kritickou hodnotou $t(v)_p$ pro vypočtený stupeň volnosti (v) a zvolenou hladinu významnosti (p). Je-li hodnota (t) větší než $t(v)_p$, je rozdíl $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ statisticky významný na hladině významnosti (p).

Pro vypočtený počet stupňů volnosti $v = 2$ a pro $p(0,05)$ je kritická hodnota $t(v)_p = 3,182$. [42]

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

5 VÝSLEDKY

5.1 Tabulky

Tabulka č. 1: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* (varieta Hetzii) elicitované roztokem síranu železnatého.

Koncentrace elicitoru ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Doba aplikace elicitoru (h)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	
I 1	6	0,026	0,000	0,039	0,004	3,250
	24	0,051	0,002	0,039	0,004	2,683
	48	0,057	0,001	0,039	0,004	4,366
	168	0,088	0,002	0,063	0,002	8,839
II 10	6	0,040	0,003	0,039	0,004	0,120
	24	0,054	0,003	0,039	0,004	3,000
	48	0,069	0,001	0,039	0,004	7,376
	168	0,099	0,003	0,063	0,002	9,985
III 100	6	0,024	0,001	0,039	0,004	3,638
	24	0,030	0,002	0,039	0,004	2,012
	48	0,075	0,003	0,039	0,004	7,200
	168	0,092	0,002	0,063	0,002	10,253
IV 1000	6	0,080	0,001	0,039	0,004	9,944
	24	0,110	0,001	0,039	0,004	17,220
	48	0,116	0,001	0,039	0,004	18,675
	168	0,062	0,000	0,063	0,002	0,500

Tučně zvýrazněné hodnoty označují nejvyšší stanovený obsah podofylotoxinu v jednotlivých koncentracích. Žlutě zvýrazněná hodnota označuje nejvyšší stanovený obsah podofylotoxinu. Jedná se o statisticky významné zvýšení oproti kontrole; $p = 0,05$

Tabulka č. 2: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* (varieta Hetzii) elicitované roztokem chloridu olovnatého.

Koncentrace elicitoru ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Doba aplikace elicitoru (h)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	
I 0,1	6	0,076	0,001	0,039	0,004	8,974
	24	0,081	0,001	0,039	0,004	10,186
	48	0,082	0,002	0,039	0,004	9,615
	168	0,071	0,004	0,063	0,002	1,789
II 1	6	0,045	0,001	0,039	0,004	1,455
	24	0,081	0,004	0,039	0,004	7,425
	48	0,047	0,003	0,039	0,004	1,600
	168	0,043	0,000	0,063	0,002	10,000
III 10	6	0,060	0,002	0,039	0,004	4,696
	24	0,092	0,000	0,039	0,004	2,287
	48	0,076	0,003	0,039	0,004	7,400
	168	0,064	0,003	0,063	0,002	0,277
IV 100	6	0,076	0,004	0,039	0,004	6,541
	24	0,105	0,006	0,039	0,004	9,153
	48	0,071	0,006	0,039	0,004	4,438
	168	0,040	0,004	0,063	0,002	5,143

Tučně zvýrazněné hodnoty označují nejvyšší stanovený obsah podofylotoxinu v jednotlivých koncentracích. Žlutě zvýrazněná hodnota označuje nejvyšší stanovený obsah podofylotoxinu. Jedná se o statisticky významné zvýšení oproti kontrole; $p = 0,05$

Tabulka č. 3: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* (varietu Glauca) elicitované roztokem síranu železnatého.

Koncentrace elicitoru ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Doba aplikace elicitoru (h)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	
I 1	6	0,037	0,001	0,027	0,001	7,071
	24	0,034	0,001	0,027	0,001	4,950
	48	0,032	0,004	0,027	0,001	1,213
	168	0,055	0,003	0,043	0,001	3,795
II 10	6	0,029	0,001	0,027	0,001	1,414
	24	0,035	0,001	0,027	0,001	5,567
	48	0,034	0,001	0,027	0,001	4,950
	168	0,062	0,006	0,043	0,001	3,124
III 100	6	0,037	0,000	0,027	0,001	10,000
	24	0,030	0,001	0,027	0,001	2,121
	48	0,048	0,001	0,027	0,001	14,850
	168	0,069	0,001	0,043	0,001	18,385
IV 1000	6	0,032	0,003	0,027	0,001	1,581
	24	0,025	0,001	0,027	0,001	1,414
	48	0,043	0,002	0,027	0,001	7,155
	168	0,032	0,001	0,043	0,001	7,778

Tučně zvýrazněné hodnoty označují nejvyšší stanovený obsah podofylotoxinu v jednotlivých koncentracích. Žlutě zvýrazněná hodnota označuje nejvyšší stanovený obsah podofylotoxinu. Jedná se o statisticky významné zvýšení oproti kontrole; $p = 0,05$

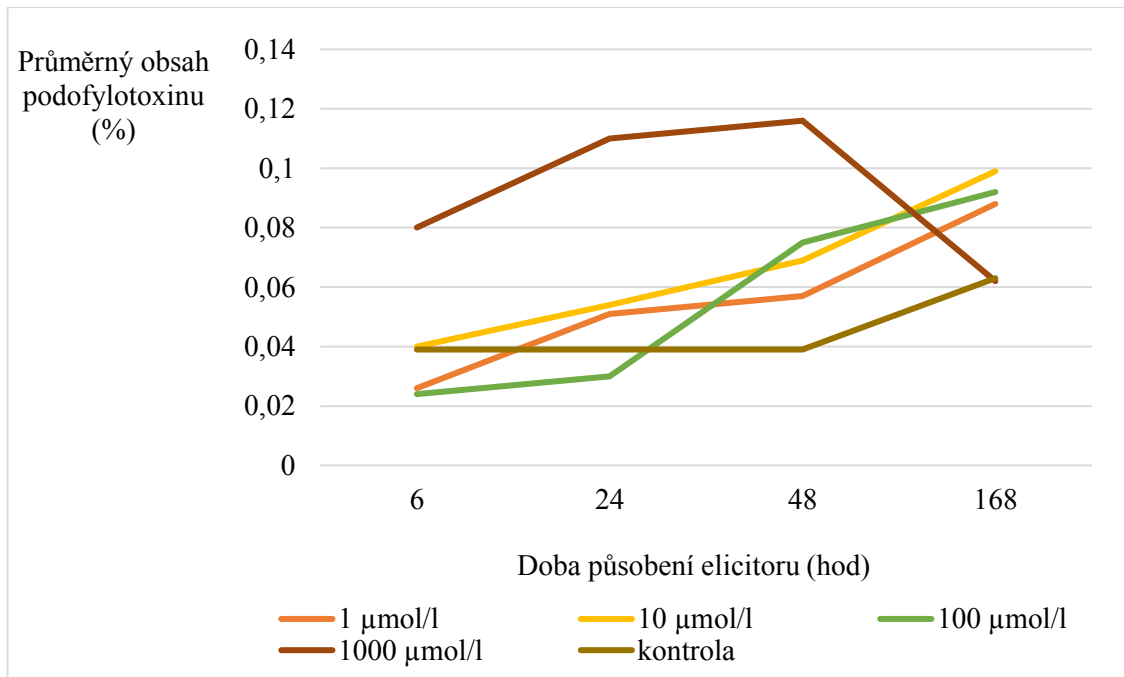
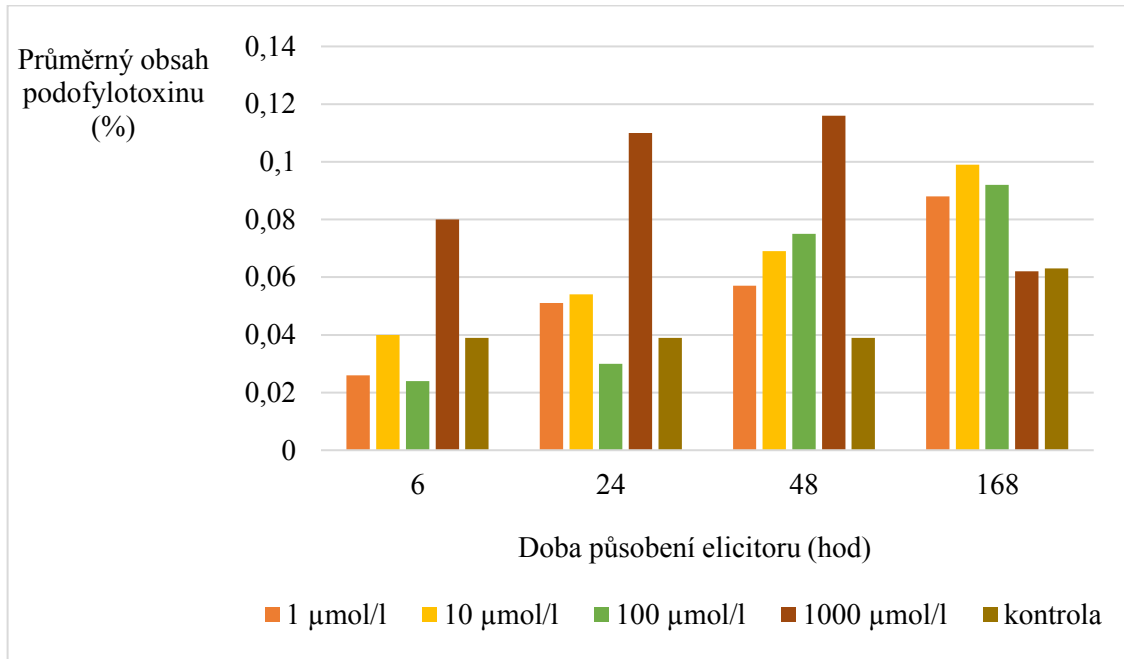
Tabulka č. 4: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* (varieta Glauca) elicitované roztokem chloridu olovnatého.

Koncentrace elicitoru ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Doba aplikace elicitoru (h)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah podofylotoxinu (%)	Směrodatná odchylka	
0,1	6	0,025	0,000	0,027	0,001	2,000
	24	0,035	0,003	0,027	0,001	2,530
	48	0,042	0,002	0,027	0,001	6,708
	168	0,055	0,004	0,043	0,001	2,910
1	6	0,030	0,002	0,027	0,001	1,142
	24	0,040	0,002	0,027	0,001	5,814
	48	0,052	0,001	0,027	0,001	17,678
	168	0,066	0,001	0,043	0,001	16,263
10	6	0,021	0,002	0,027	0,001	2,683
	24	0,034	0,001	0,027	0,001	4,950
	48	0,039	0,001	0,027	0,001	8,485
	168	0,082	0,001	0,043	0,001	27,577
100	6	0,027	0,001	0,027	0,001	0,000
	24	0,030	0,004	0,027	0,001	0,728
	48	0,059	0,002	0,027	0,001	14,311
	168	0,050	0,001	0,043	0,001	4,950

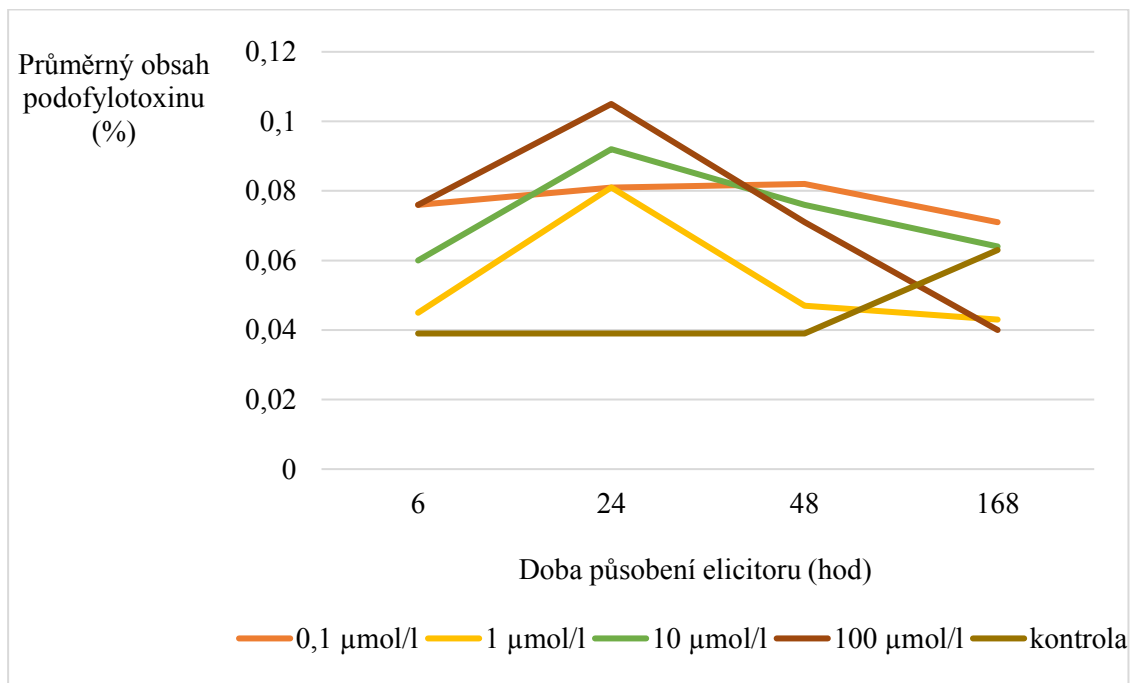
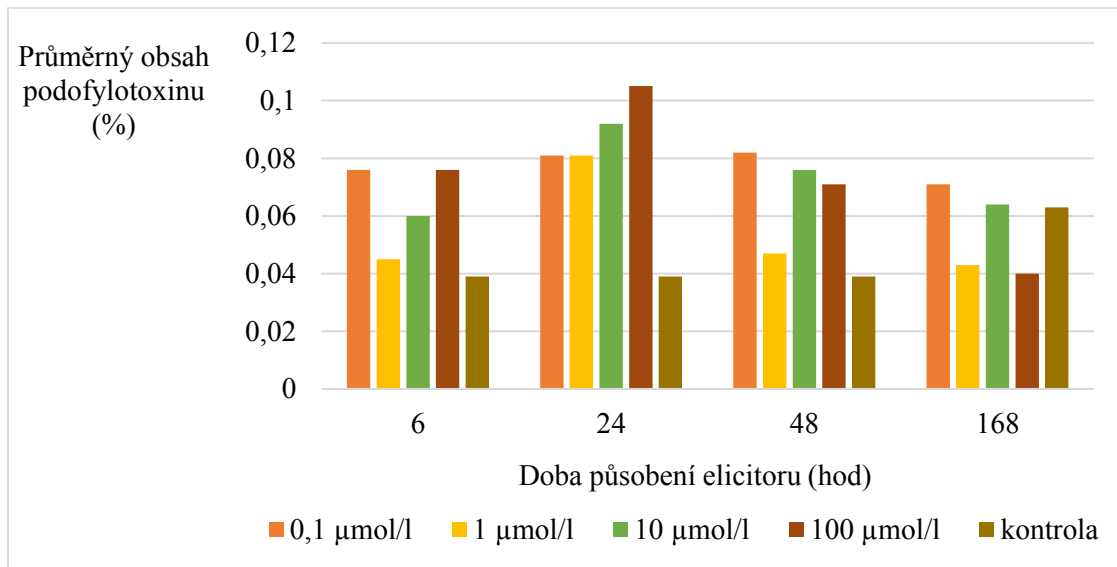
Tučně zvýrazněné hodnoty označují nejvyšší stanovený obsah podofylotoxinu v jednotlivých koncentracích. Žlutě zvýrazněná hodnota označuje nejvyšší stanovený obsah podofylotoxinu. Jedná se o statisticky významné zvýšení oproti kontrole; $p = 0,05$

5.2 Grafy

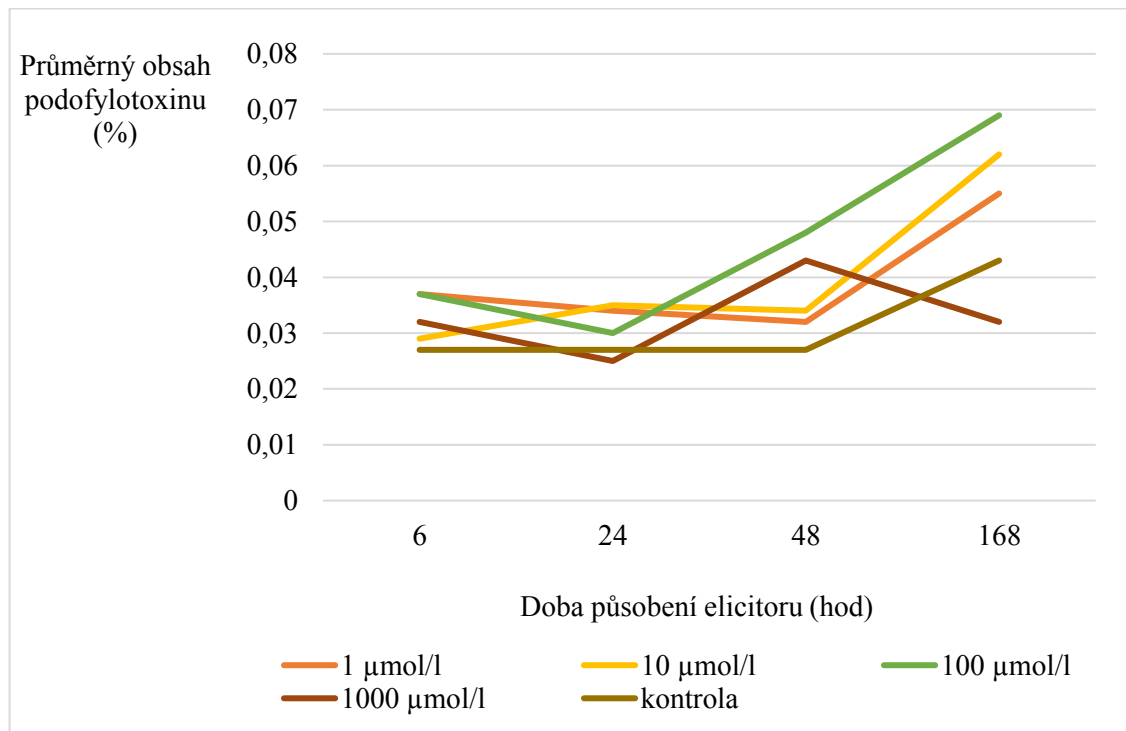
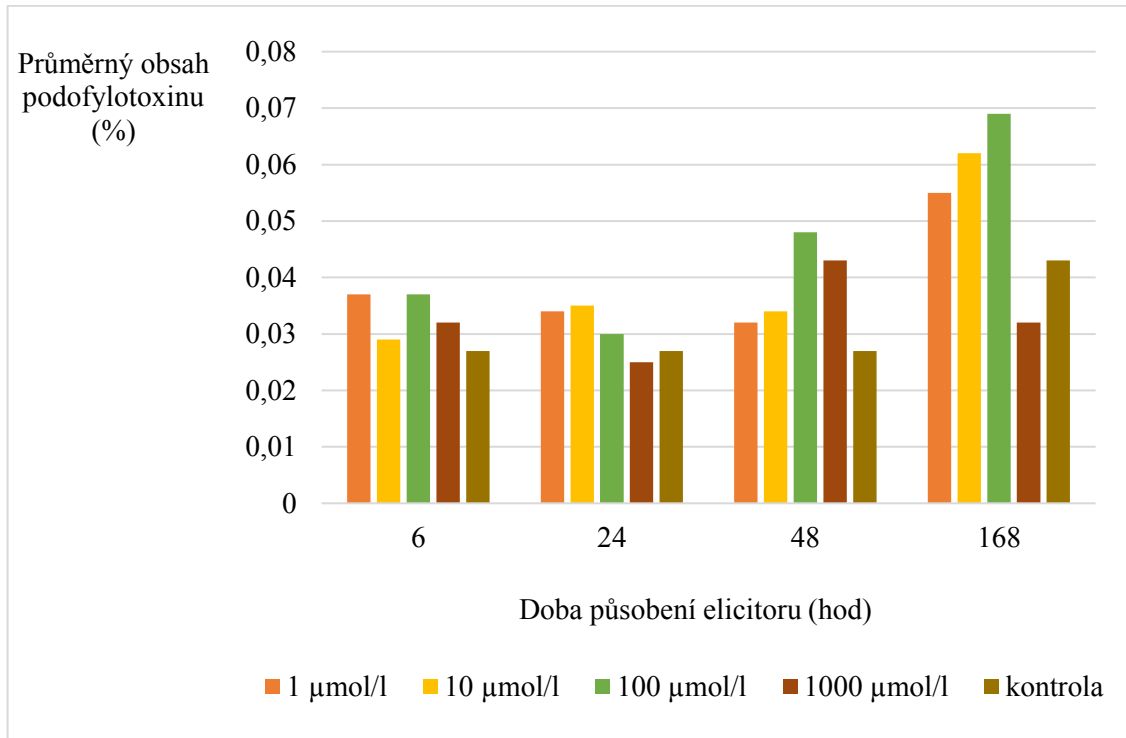
Graf č. 1: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* (varieta Hetzii) elicitované roztokem síranu železnatého.



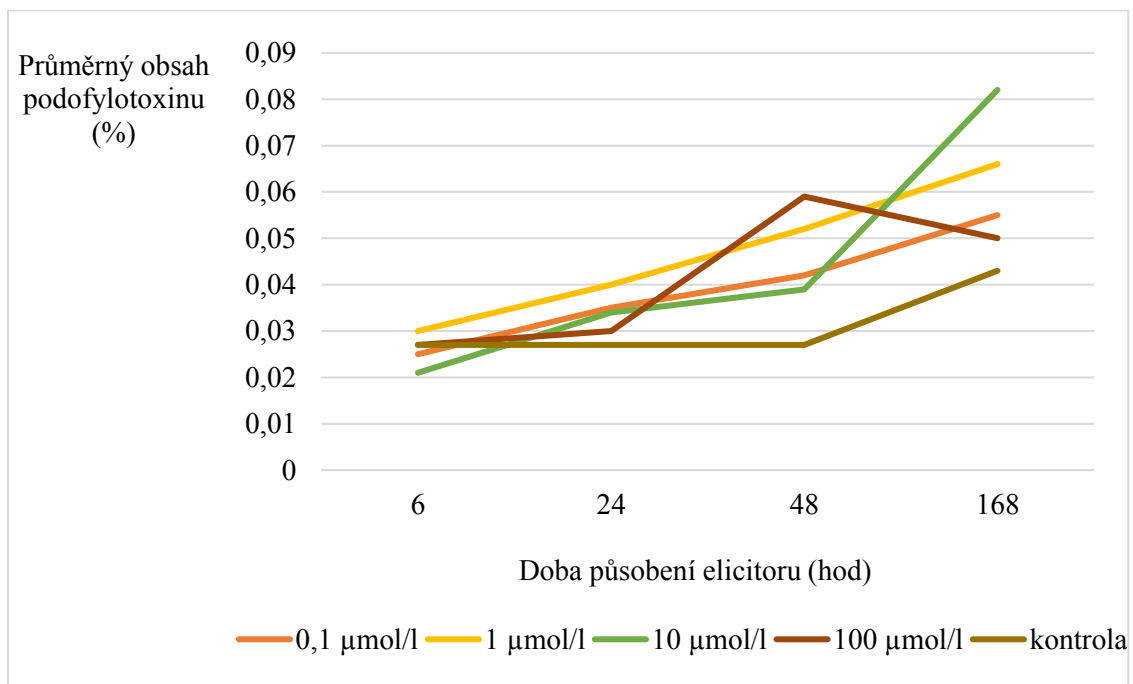
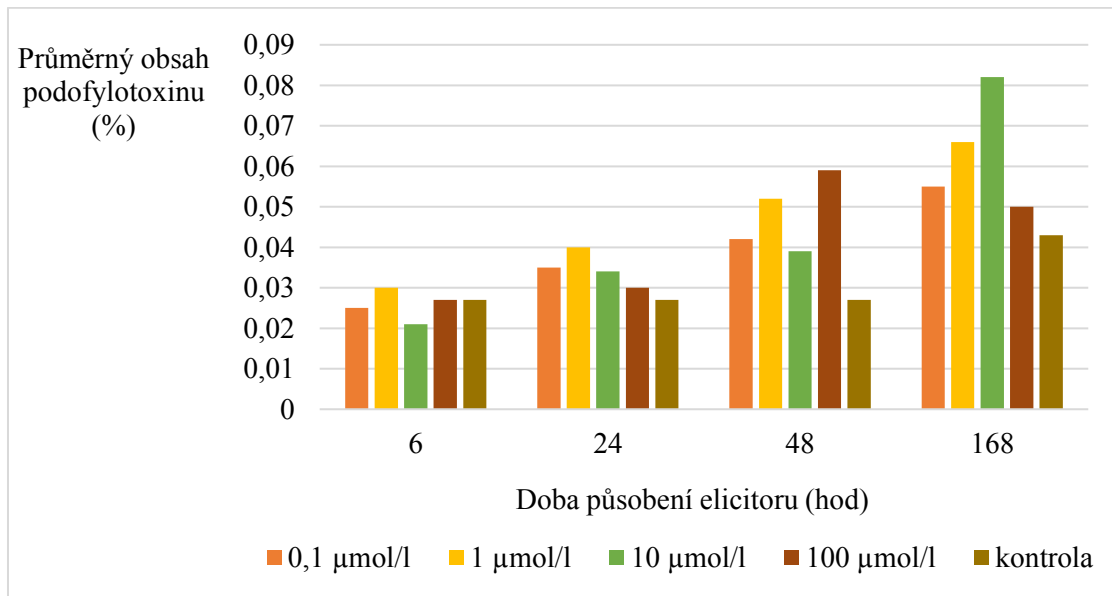
Graf č. 2: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* (varieta Hetzii) elicitované roztokem chloridu olovnatého.



Graf č. 3: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* (varieta *Glauca*) elicitované roztokem síranu železnatého.



Graf č. 4: Produkce podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* (varieta *Glauca*) elicitované roztokem chloridu olovnatého.



6 DISKUZE

Vyšší rostliny jsou nejen důležitým zdrojem potravin, dřeva, vlákniny a olejů, ale také poskytují nejbohatší výběr přírodních látek, z nichž mnohé jsou využívány ve farmacii a medicíně. Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky schůdnou chemickou syntézou, a musí proto být získávány izolací z volně rostoucích nebo pěstovaných rostlin. Tento způsob má však svá omezení. Slibnou alternativu představují rostlinné explantátové kultury. [3, 4]

Jedním z hlavních problémů kultivace rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* je nízká produkce sekundárních metabolitů. Sekundární metabolity hrají důležitou roli v interakci rostliny s okolím a zároveň jsou často využívány jako léčivé látky. Rostliny anebo rostlinné buňky *in vitro* vykazují fyziologické a morfologické reakce na mikrobiální, fyzikální nebo chemické faktory, které jsou známy jako elicitory. Jejich využití je jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšené produkce sekundárních látek. Tato metoda, která stále nabývá na významu, se nazývá elicítace. [1, 3, 4]

Cílem této práce bylo sledovat vliv abiotických elicitorů síranu železnatého a chloridu olovnatého jako esenciálního a těžkého kovu na produkci sekundárního metabolitu podofylotoxinu v suspenzních kulturách *Juniperus virginiana* L., var. *Glauca* a var. *Hetzii*.

Explantátové kultury byly kultivovány na živném médiu podle Schenka a Hildebrandta s přidavkem růstových regulátorů a kyseliny askorbové v koncentracích: 3,0 mg.l⁻¹ kyselina α -naftyloctová; 0,2 mg.l⁻¹ kinetin a 15 mg.l⁻¹ kyselina askorbová. Kultivace probíhala při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

Obě variety suspenzní kultury *Juniperus virginiana* L. byly vystaveny působení roztoku síranu železnatého a chloridu olovnatého ve čtyřech různých koncentracích. Síran železnatý byl použit v koncentraci 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Chlorid olovnatý byl použit v koncentraci 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Elicitované kultury byly postupně odebrány po 6, 24, 48 a 168 hodinách. Kontrolní kultury byly odebrány po 6 a 168 hodinách.

Po elicítaci explantátové kultury *Juniperus virginiana* L. var. *Hetzii* abiotickým elicitem síranem železnatým (tabulka č. 1, graf č. 1) byly zjištěny nejlepší elicitační účinky při aplikaci nejvyšší koncentrace elicitoru. Nejvyšší produkce podofylotoxinu (0,116 %) byla zjištěna u vzorku odebraném po 48 hodinách, na který působil elicitor v koncentraci 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Za těchto podmínek došlo ke statisticky významnému

zvýšení obsahu podofylotoxinu o 197 % oproti kontrolní kultuře. Kladně můžeme hodnotit také vzorek odebraný po 24 hodinách působení elicitoru o nejvyšší koncentraci. Zde byl zjištěn obsah podofylotoxinu 0,110 %, což představuje zvýšení obsahu podofylotoxinu o 182 % oproti kontrolní kultuře.

Z výsledků elicítace explantátové kultury *Juniperus virginiana* L. var. Hetzii abiotickým elicítorem chloridem olovnatým (tabulka č. 2, graf č. 2) je patrné, že k nejvýznamnějšímu zvýšení obsahu podofylotoxinu došlo ve vzorku odebraném po 24 hodinách působení elicitoru o nejvyšší použité koncentraci. Obsah podofylotoxinu za těchto podmínek činil 0,105 %, což představuje zvýšení obsahu o 169 % oproti kontrolnímu vzorku. Za pozitivní výsledek můžeme považovat také obsah podofylotoxinu 0,092 %, který byl zjištěn ve vzorku odebraném opět po 24 hodinách s elicítorem o koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Tato hodnota představuje zvýšení obsahu podofylotoxinu o 136 %.

Další výsledky byly získány z explantátové kultury *Juniperus virginiana* L. var. Glauca elicítované síranem železnatým (tabulka č. 3, graf č. 3). Maximální hodnoty obsahu podofylotoxinu (0,069 %) byly zjištěny odběrem po 168 hodinách ve vzorku s elicítorem o koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Oproti kontrolní kultuře došlo ke statisticky významnému zvýšení obsahu podofylotoxinu o 60 %. K významnému zvýšení obsahu podofylotoxinu došlo také ve vzorku s koncentrací elicitoru 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ odebraném po 168 hodinách. Při obsahu podofylotoxinu 0,062 %, došlo ke zvýšení proti kontrole o 44 %.

V případě explantátové kultury *Juniperus virginiana* L. var. Glauca elicítované chloridem olovnatým (tabulka č. 4, graf č. 4) byly naměřeny nejvyšší hodnoty podofylotoxinu (0,082 %) při koncentraci elicitoru 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ve vzorku odebraném po 168 hodinách. Obsah se zvýšil o 91 % proti kontrole. Druhou významnou hodnotu v této kultuře představuje vzorek s obsahem podofylotoxinu 0,066 % odebraný opět po 168 hodinách s elicítorem o koncentraci 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Obsah podofylotoxinu byl za těchto podmínek zvýšen o 53 % proti kontrolnímu vzorku.

Porovnáme-li působení obou abiotických elicitorů (síranu železnatého a chloridu olovnatého) na suspenzní kulturu *Juniperus virginiana* L. obou variet (Hetzii a Glauca), je patrné, že varieta Hetzii celkově produkuje více podofylotoxinu než varieta Glauca.

V případě explantátové kultury *Juniperus virginiana* L. var. Hetzii, byly shodně naměřeny nejvyšší hodnoty podofylotoxinu u obou elicitorů v nejvyšší koncentraci (IV). Přestože maximální hodnota byla zaznamenána po elicítaci síranem železnatým po 48

hodinách, bylo ve stejné koncentraci dosaženo podobně vysoké hodnoty obsahu i po 24 hodinách elicitace. Tento čas odběru se shoduje s odběrem vzorku s maximální hodnotou po elicitaci chloridem olovnatým.

Nejlepších výsledků v explantátové kultuře *Juniperus virginiana* L. var. *Glauca* bylo shodně u obou elicitorů dosaženo po 168 hodinách kultivace s přítomností elicitoru o koncentraci III.

Produkce sekundárního metabolitu podofylotoxinu byla sledována v mnoha výzkumech a publikována v odborných periodících. Vědcům se podařilo najít tento metabolit v několika rostlinách a s využitím elicitorů zvýšit jeho produkci.

Jedním z příkladů úspěšné elicitace v kalusových a suspenzních kulturách *Juniperus virginiana* L. je experiment zveřejněný v roce 2017. Ke stimulaci produkce podofylotoxinu byl použit fenylalanin, jako jeho biogenetický prekurzor. Nejlepší účinek fenylalaninu na produkci podofylotoxinů se projevil ve tříletých kulturách kalusu po 21denní aplikaci elicitoru o koncentraci 10 mmol/l. Za daných podmínek byl stanoven obsah podofylotoxinu 0,15 mg/g suché hmotnosti, což představovalo o 400 % vyšší množství ve srovnání s kontrolou. Maximální obsah (0,48 mg/g suché hmotnosti) v nově získaných suspenzních kulturách (4. pasáž) byl indukován 14denní aplikací elicitoru o koncentraci 1 mmol/l. Tato hodnota byla o 243 % vyšší než kontrola. V jednoletých suspenzních kulturách byl nejvyšší obsah podofylotoxinů (0,56 mg/g suché hmotnosti) zaznamenán opět po 14denní aplikaci koncentrace 1 mmol/l, což představovalo o 211 % vyšší obsah než v kontrolních kulturách. [41]

Za zmínku stojí i studie z roku 2018, ve které byly zkoumány účinky kyseliny skořicové, kyseliny jasmonové a kyseliny salicylové na produkci podofylotoxinu v suspenzních kulturách *Juniperus virginiana*. Kyselina skořicová představuje biogenetický prekurzor podofylotoxinu a kyselina salicylová a kyselina jasmonová jsou fytohormony. Pokud jsou přidány exogenně do kultivačního média, mohou být účinné i jako elicitory. Výsledky studie ukazují, že kyselina skořicová a kyselina salicylová vykazuje nejlepší účinek po 24 hodinách aplikace koncentrace 10 mmol/l. Naopak nejlepší účinek kyseliny jasmonové se projevil po nejdelsí 168 hodinové aplikaci koncentrace 5 mmol/l. Nejvyšších hodnot dosáhla elicitace kyselinou skořicovou za výše uvedených podmínek, kdy došlo k významné stimulaci o 444 % ve srovnání s kontrolou. [43]

Úspěšná elicitace, která vedla ke zvýšení produkce podofylotoxinu byla provedena také v suspenzní kultuře *Juniperus chinensis* pěstované v živném médiu podle

Schenka a Hildebrandta. Jako elicitory byly použity: fenylalanin, coniferyl alkohol a chito-oligosacharid v koncentracích 5, 10, 15, 25 a 50 ml/l, methyljasmonát v koncentraci 10 ml/l a kombinace chytopenaózy (5 ml/l) a methyljasmonátu (10 ml/l). Elicitované kultury byly odebírány postupně po 7, 14, 21 a 28 dnech. Zvýšení produkce bylo pozorováno po přidání všech jednotlivých elicitorů, avšak nejvýznamnějších hodnot dosáhla kombinace elicitorů chitopentaózy a methyljasmonátu po 14denní elicitaci. Toto zvýšení bylo 15násobné oproti kontrole. [44] V dalším úspěšném experimentu prováděném na kultuře *Juniperus chinensis* byly jako elicitory použity chito-oligosacharidy a fenylalanin. [45]

Další rostlinou, ve které se podofylotoxin nachází je *Linum album*. To nám mimo jiné dokazuje i sledování indukce podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Linum album*, kde byly jako elicitory použity živé kultury dvou mykorhizních hub, *Piriformospora indica* a *Sebacina vermifera*. Kultivační filtráty obou hub byly rozděleny do dvou částí: jedna část byla autoklávována a další část byla filtrována přes 0,22 um membránový filtr. Tyto dva fungální elicitorové přípravky byly přidány v různých koncentracích (1, 2,5, 5, 7,5 a 10 % obj./obj.) 10. den do rostoucích kultur *Linum album*. Kultury byly sklizeny 12. den a analyzovány na růst, životaschopnost buněk, produkci lignanu a obsah fenolů. Výsledkem studie byla maximální koncentrace podofylotoxinu 152,1 mg/l ve 12. dni kultivace. [46] Fungální extrakty jako elicitory pro zvýšení produkce lignanu v buněčné kultuře *Linum album* byly použity i v dalších studiích. [47]

Akumulace podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Linum album* ve dvou různých liniích byla sledována také ve studii z roku 2005. Výsledky ukázaly přibližně dvojnásobné zvýšení těchto metabolitů po přidání methyljasmonátu do kultivačního média *Linum album* linie 2-5 aH. Obsah podofylotoxinu dosahoval $7,69 \pm 1,45$ mg/g suché hmotnosti. Po přidání methyljasmonátu do suspenzních buněk linie *Linum album* X4SF byla akumulace podofylotoxinu zvýšena přibližně desetinásobně na $0,49 \pm 0,10$ mg/g suché hmotnosti. Maximální aktivita fenylalaninamonium-lyázy byla zaznamenána mezi 4 hodinami a 1 dnem po elicitaci methyljasmonátem. [48]

V buněčných kulturách *Linum album* bylo pozitivních výsledků dosaženo také elicítací kyselinou salicylovou. [49]

Podofylotoxin byl studován také v rostlinách rodu *Podofylum*. Cílem studie z roku 2012 bylo zkoumat změny v suspenzní kultuře *Podofylum hexandrum*, která je potenciálně spojena s akumulací podofylotoxinu v reakci na elicitaci methyljasmonátem. Výsledky HPLC analýzy ukázaly přibližně 7 až 8násobnou změnu akumulace

podofylotoxinu po 9 dnech elicitace vyvolané $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ methyljasmonátu ve srovnání s kontrolou. [50]

Na základě všech uvedených studií a také výsledků této diplomové práce lze potvrdit, že je možné stimulovat produkci sekundárního metabolitu podofylotoxinu vhodným elicitorem v rostlinných explantátových kulturách.

7 ZÁVĚR

V této práci byl sledován vliv abiotických elicitorů síranu železnatého jako esenciálního kovu a chloridu olovnatého jako těžkého kovu na produkci podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* L., varieta Glauca a Hetzii.

Výsledky práce mohou být shrnuty následovně:

1. Nejvyšší obsah podofylotoxinu po elicitaci roztokem síranu železnatého v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* L. varieta Hetzii (0,116 %) byl dosažen po 48 hodinové aplikaci elicitoru o koncentraci 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 197 % oproti kontrolní kultuře.
2. Nejvyšší obsah podofylotoxinu po elicitaci roztokem chloridu olovnatého v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* L. varieta Hetzii (0,105 %) byl dosažen po 24 hodinové aplikaci elicitoru o koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 169 % oproti kontrolní kultuře.
3. Nejvyšší obsah podofylotoxinu v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* L. varieta Glauca byl u obou elicitorů dosažen shodně po 168 hodinové aplikaci elicitoru o koncentraci III. Po elicitaci roztokem síranu železnatého došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 60 % oproti kontrolní kultuře při obsahu podofylotoxinu 0,069 % a po elicitaci roztokem chloridu olovnatého došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 91 % oproti kontrolní kultuře při obsahu 0,082 % podofylotoxinu.
4. *Juniperus virginiana* L. varieta Hetzii produkuje vyšší množství podofylotoxinu než varieta Glauca, a to shodně v nejvyšší koncentraci (IV) u obou aplikovaných elicitorů. Nejvyšší hodnota produkce byla zaznamenána v koncentraci 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po elicitaci síranem železnatým, odběrem po 48 hodinách. Vysokých hodnot u obou elicitorů bylo dosaženo také odběrem po 24 hodinách.

8 SEZNAM LITERATURY

- [1] Namdeo, A. G.: Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews*. 2007; 1, 69-79.
- [2] Jahodář, L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Praha: Karolinum 2011; s. 9.
- [3] Tůmová, L., Tůma, J.: Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat. *Chemické Listy*. 2009; 103, 503-510.
- [4] Siatka, T., Sklenářová, H., Kašparová, M. et al.: Vliv chloridu rtuťnatého na produkci kumarinů v suspenzní kultuře *Angelica archangelica* L. *Chemické Listy*. 2011; 105, 367-370.
- [5] Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon H., Hidalgo D. et al.: Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*. 2016; 21, 182-205.
- [6] Li, M. F., Li, W., Yang, D. L. et al.: Relationship between podophyllotoxin accumulation and soil nutrients and the influence of Fe²⁺ and Mn²⁺ on podophyllotoxin biosynthesis in *Podophyllum hexandrum* tissue culture. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013; 71, 96-102.
- [7] Canel, C., Moraes, R. M., Dayan, F. E. et al.: Podophyllotoxin. *Phytochemistry*. 2000; 54, 115-120.
- [8] Větvicka, V.: *Evropské stromy*. Praha: Aventinum 1999.
- [9] Štursa, J.: *Stálezelené dřeviny*. Praha: Aventinum 2000.
- [10] Spohn, M., Spohn, R.: *Stromy: Nový průvodce přírodou*. Praha: Knižní klub 2008, s. 56.
- [11] Coombes, A. J.: *Stromy*. Praha: Knižní klub 2006, s. 48.
- [12] Hejný, S., Slavík, B.: *Květena ČSR 1*. Praha: Academia 1988, s. 333.
- [13] <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=29091>, 5. 4. 2019.
- [14] Maqbool, M., Cushman, K. E.: Podophyllotoxin Content in Leaves of Eastern Red Cedar (*Juniperus virginiana*). *Acta Horticulturae* 2004; 629, 87-92.
- [15] Dunford, N. T., Hiziroglu, S., Holcomb, R.: Effect of age on the distribution of oil in Eastern redcedar tree segments. *Bioresource Technology*. 2007; 98, 2636-2640.
- [16] Gawde, A. J., Cantrell, Ch. L., Zheljzakov, V. D.: Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from *Juniperus virginiana*. *Industrial Crops and Products*. 2009; 30, 276-280.

- [17] Spohn, M., Spohn, R.: *Stromy Evropy: 680 stromů, 2600 ilustrací*. Praha: Beta-Dobrovský 2013.
- [18] Cantrell, Ch. L., Zheljazkov, V. D., Osbrink, W. L. A. et al.: Podophyllotoxin and essential oil profile of *Juniperus* and related species. *Industrial Crops and Products*. 2013; 43, 668-676.
- [19] Hădărugă, N., Branic, A., Hădărugă, D. et al.: Comparative study of *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* essential oils: TLC and GC analysis. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*. 2011; 24, 130-135.
- [20] Farkya, S., Bisaria, V.S., Srivastava A.K.: Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004; 65, 504-519.
- [21] Guerram, M., Jiang, Z.-Z., Zhang, L.-Y.: Podophyllotoxin, a medicinal agent of plant origin: past, present and future. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2012; 10, 161-169.
- [22] Mohammadreza, S.-A., Shiva, H., Abdolali, M.: Effect of elicitors on the enhancement of podophyllotoxin biosynthesis in suspension cultures of *Linum album*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005; 13, 56-60.
- [23] Petersen, M., Alfermann, W. A.: The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001; 55, 135-142.
- [24] Damayanthi, Y., Lown, J. W.: Podophyllotoxins: Current Status and Recent Developments. *Current Medicinal Chemistry* 1998; 5, 205-252.
- [25] Kováč, J.: *Explantátové kultury rostlin*. Olomouc: Univerzita Palackého 1995.
- [26] Mulabagal, V., Tsay, H-S.: Plant Cell Cultures – An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*. 2004; 2, 29-48.
- [27] Vodrážka, Z.: *Biotechnologie*. Praha: Academia 1992.
- [28] Sikyta, B., Dušek, J.: *Biotechnologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum 1992.
- [29] George, E. F. et al.: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Dordrecht, The Netherlands: Springer 2008.
- [30] Procházka, S. et al.: *Fyziologie rostlin*, Praha: Academia 1998.
- [31] Kincl, M., Krpeš, V.: *Základy fyziologie rostlin*. Ostrava: Montanex 2000.

- [32] Narayani, M., Srivastava, S.: Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry Reviews*. 2017; 16, 1227-1252.
- [33] Giri, Ch. Ch., Zaheer, M.: Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2016; 126, 1-18.
- [34] Naik, P. M., Al-Khayri J. M.: Abiotic and Biotic Elicitors – Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives*. 2016; 10, 247-277.
- [35] Tiwari, S., Lata, Ch.: Heavy Metal Stress, Signaling, and Tolerance Due to Plant-Associated Microbes: An Overview. *Frontiers in Plant Science*. 2018; 9, 1-12.
- [36] Hasan, Md. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K. et al.: Responses of Plant Proteins to Heavy Metal Stress – A Review. *Frontiers in Plant Science*. 2017; 8, 1-16.
- [37] Becana, M., Moran, J. F., Iturbe-Ormaetxe, I.: Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil*. 1998; 201, 137-147.
- [38] Zhang, J., Chen, K., Pang, Y. et al.: QTL mapping and candidate gene analysis of ferrous iron and zinc toxicity tolerance at seedling stage in rice by genome-wide association study. *BMC Genomics*. 2017; 18, 1-15.
- [39] Schenk R. U., Hildebrandt, A. C.: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 1972; 50, 199-204.
- [40] Kašparová M., Spilková J., Cvak L. et al.: Plant tissue cultures of *Juniperus virginiana*. *Natural Product Communications*. 2016; 11, 681-683.
- [41] Kašparová M., Martin J., Tůmová L., et al.: Production of Podophyllotoxin by Plant Tissue Cultures of *Juniperus virginiana* L. *Natural Product Communications*. 2017; 12, 101-103.
- [42] Klemra, P., Klemrová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. Praha: Karolinum, 1999.
- [43] Kašparová, M., Pilařová, P., Tůmová, L. et al.: Effect of Precursor and Phytohormones on Podophyllotoxin Production in *Juniperus virginiana* Suspension Cultures. *Natural Product Communications*. 2018; 13, 1527-1529.

- [44] Premjet, D., Itoh, K., Tachibana, S.: Enhancement of podophyllotoxin production by biogenetic precursors and elicitors in cell suspension cultures of *Juniperus chinensis*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2002; 5, 1267-1271.
- [45] Muranaka, T., Miyata, M., Ito, K. et al.: Production of Podophyllotoxin in *Juniperus Chinensis* Callus Cultures Treated with Oligosaccharides and a Biogenetic Precursor in Honour of Professor G. H. Neil Towers 75th Birthday. Phytochemistry. 1998; 49, 491-496.
- [46] Baldi, A., Farkya, S., Jain, A. et al.: Enhanced production of podophyllotoxins by co-culture of transformed *Linum album* cells with plant growth-promoting fungi. Pure and Applied Chemistry. 2010; 82, 227-241.
- [47] Bahabadi, S. E., Sharifi, M., Safaie, N. et al.: Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. Plant Biotechnology Report. 2011; 5, 367-373.
- [48] Fürden, V. B., Humburg, A., Fuss, E.: Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. Plant Cell Reports. 2005; 24, 312-317.
- [49] Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M. et al.: Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis. Biotechnology Letters. 2010; 32, 1739-1743.
- [50] Bhattacharyya, D., Sinha, R., Ghanta S. et al.: Proteins differentially expressed in elicited cell suspension culture of *Podophyllum hexandrum* with enhanced podophyllotoxin content. Proteome Science. 2012; 10, 1-13.

9 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Kandidát: Gabriela Dohnalová

Školitel: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Název diplomové práce: Rostlinné explantátové kultury jako potenciální zdroj fenylypropanoidů I

Explantátové kultury jsou zdrojem sekundárních metabolitů rostlin. Avšak produkce sekundárních metabolitů bývá u explantátových kultur nízká. Produkce může být zvýšena metodou zvanou elicítace. Základním předpokladem úspěšné elicítace je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby působení elicitoru na rostlinnou kulturu *in vitro*.

Cílem této práce bylo sledování vlivu roztoku chloridu olovnatého a síranu železnatého (ve čtyřech koncentracích) na produkci podofylotoxinu v suspenzních kulturách *Juniperus virginiana* L. (varieta Hetzii a Glauca).

Kultura byla kultivována na živném médiu dle Schenka a Hildebrandta s přídavkem 3,0 mg.l⁻¹ kyseliny α -naftyloctové, 0,2 mg.l⁻¹ kinetinu a 15 mg.l⁻¹ kyseliny askorbové. Kultivace probíhala při 25 °C a fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Následně bylo provedeno stanovení obsahu podofylotoxinu metodou HPLC.

Juniperus virginiana L. varieta Hetzii produkuje vyšší množství podofylotoxinu než varieta Glauca, a to shodně v nejvyšší koncentraci u obou aplikovaných elicitorů. Nejlepší elicitační účinek na produkci podofylotoxinu byl zaznamenán po elicítaci roztokem síranu železnatého v suspenzní kultuře *Juniperus virginiana* L. varieta Hetzii (0,116 %) po 48 hodinové aplikaci elicitoru o koncentraci 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o 197 % oproti kontrolní kultuře.

10 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Gabriela Dohnalová

Supervisor: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Plant tissue cultures as a potential source of phenylpropanoids I

Explant cultures are the source of plant secondary metabolites. However, the production of secondary metabolites is usually low in explant cultures. Production can be increased by a method called elicitation. The basic prerequisite for successful elicitation is, among other things, finding a suitable elicitor, its concentration and optimal time of elicitor action on plant culture *in vitro*.

The aim of this study was to observe the influence of lead chloride and ferrous sulfate (in four concentrations) on the production of podophyllotoxin in the suspension cultures of *Juniperus virginiana* L. (variety Hetzii and Glauca).

The culture was cultured on Schenk and Hildebrandt nutrient medium with addition of 3.0 mg.l⁻¹ α -naphthylacetic acid, 0.2 mg.l⁻¹ kinetin and 15 mg.l⁻¹ ascorbic acid. Cultivation proceed in 25 °C temperature and 16 hours light/8 hours dark period. Subsequently, the determination of the content of podophyllotoxin by HPLC was performed.

Juniperus virginiana L. variety Hetzii produces a higher amount of podophyllotoxin than the Glauca variety, at the highest concentration for both applied elicitors. The best elicitation effect on podophyllotoxin production was observed after elicitation with ferrous sulfate solution in the suspension culture of *Juniperus virginiana* L. variety Hetzii (0.116 %) after 48 hours of elicitor application with concentration of 1000 μ mol.l⁻¹, with a statistically significant increase of 197 % over control culture.