

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakognozie**

Petra Čabelková

**Explantátové kultury *Trichocereus pachanoi***

Diplomová práce



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

**Vedoucí diplomové práce:** PharmDr. Jan Martin, Ph.D.

**Oponent:** PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

**Datum zadání:** 25.10.2013

**Datum odevzdání:** 15.5.2015

## **Poděkování**

Děkuji PharmDr. Janu Martinovi, Ph.D za odborné vedení diplomové práce a poskytování důležitých rad. Dále děkuji Ing. Jindřichu Rejtharovi a Ing. Ivě Viehmannové, Ph.D. z Fakulty tropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze, za poskytnutí kalusových kultur *Trichocereus pachanoi*. Děkuji také své rodině a přátelům za podporu.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15.5.2015

Petra Čabelková

## OBSAH

Obsah.....	4
1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	8
3.1.1 Botanické zařazení do systému.....	8
3.1.2 Popis rostliny.....	8
3.1.3 Obsahové látky.....	9
3.1.4 Meskalin.....	12
3.2 Explantátové kultury.....	13
3.2.1 Charakteristika.....	13
3.2.2 Odvození explantátové kultury z rostliny.....	14
3.2.3 Kultivace explantátových kultur.....	15
3.2.4 Faktory ovlivňující růst kultury.....	18
3.2.5 Média.....	19
3.2.6 Využití explantátových kultur.....	24
3.3 Sekundární metabolity a ovlivnění jejich produkce.....	25
3.3.1 Sekundární metabolity.....	25
3.3.2 Metody ovlivnění produkce sekundárních metabolitů.....	26

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
4.1 Materiál, pomůcky a přístroje.....	29
4.1.1 Rostlinný materiál .....	29
4.1.2 Přístroje a vybavení .....	29
4.1.3 Chemikálie a pomocné látky.....	30
4.2 Kultivace explantátové kultury <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	32
4.2.1 Nádoby a nástroje použité ke kultivaci.....	32
4.2.2 Živné médium.....	32
4.2.3 Kultivace a pasážování kultur <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	34
4.3 Ovlivnění produkce pomocí prekurzorů.....	36
4.3.1 Příprava roztoků prekurzorů.....	36
4.3.2 Průběh ovlivňování produkce.....	37
4.4 Stanovení obsahu.....	39
4.4.1 Postup stanovení.....	39
4.5 Statistické hodnocení.....	42
5. VÝSLEDKY.....	44
5.1 Vliv dopaminu na obsah meskalinu v suspenzní kultuře <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	44
5.2 Vliv tyrosinu na obsah meskalinu v suspenzní kultuře <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	45
5.3 Vliv hydrolyzátu kaseinu na obsah meskalinu v suspenzní kultuře <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	46
5.4 Vliv kyseliny šikimové na obsah meskalinu v suspenzní kultuře <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	47

6. DISKUSE.....	48
7. ZÁVĚR.....	50
8. SEZNAM TABULEK.....	51
9. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	52
10. SEZNAM GRAFŮ.....	53
11. LITERATURA.....	54
12. ABSTRAKT.....	60
13. ABSTRACT.....	61

# 1. ÚVOD

Velká část vyšších rostlin je pro člověka zdrojem zajímavých organických sloučenin jako jsou oleje, vosky, esenciální oleje, barviva, pesticidy nebo farmaceutika. Většina těchto metabolitů je rostlinou produkována jen v malém množství. Pro průmyslové zpracování metabolitů jsou často potřebné tuny rostlinného materiálu. Pokroky v biotechnologii a metodách kultivace explantátových kultur znamenají snížení nároků na množství rostlinného materiálu a vyšší podíl obsažených metabolitů pro extrakci. Díky těmto technikám jsou rostliny dostupným zdrojem chemických substancí.

(1)

Aby podíl sekundárních metabolitů *in vitro* co nejvyšší, byly vypracovány metody na zvýšení jejich produkce. Mezi tyto metody patří imobilizace, elicítace či přidávání prekurzorů do média. U těchto metod je nutné najít individuální hranici citlivosti dané explantátové kultury. Pro kýžené výsledky extrakce je nutno najít optimální koncentraci a dobu působení přidávaných elicitorů či prekurzorů.

Meskalin, jehož obsah v explantátových kulturách byl v této diplomové práci studován, je halucinogenní látka obsažená na příklad v kaktusech *Lophophora williamsii* či *Trichocereus pachanoi*. V souvislosti s přítomností meskalinu v rostlinách nastal problém jejich nelegálního pěstování v České republice. Bylo ale zjištěno, že kaktusy vypěstované v Evropě nemají patřičný obsah alkaloidů, aby mohly být zneužity jako přírodní droga (2)

## 2. CÍL PRÁCE

Dílčím cílem diplomové práce bylo zvládnout kultivaci kalusových kultur *Trichocereus pachanoi* darovaných Českou zemědělskou univerzitou v Praze. Následně pak z kalusu zvládnout založit a kultivovat suspenzní kultury *Trichocereus pachanoi*.

Hlavním cílem diplomové práce bylo testovat vybrané prekurzory a elicitory (dopamin, D, L-tyrosin, kasein a kyselina šikimová) v různých koncentracích na suspenzních kulturách *Trichocereus pachanoi* a to vzhledem k produkci dusíkatých látek.

Dalším cílem této diplomové práce bylo zvládnout metodu HPLC pro kvantitativní a kvalitativní stanovení meskalinu v kulturách *in vitro*.



## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 *TRICHOCEREUS PACHANOI*

#### 3.1.1 Botanické zařazení do systému

Oddělení : *Magnoliophyta*, krytosemenné rostliny

Třída : *Magnoliopsida*, dvouděložné rostliny

Řád : *Caryophyllales*, hvozdíkotvaré

Čeleď : *Cactaceae*, kaktusovité

Rod, druh : *Trichocereus pachanoi*, kaktus San Pedro

(3), (4), (5)

#### 3.1.2 Popis rostliny

*Trichocereus pachanoi* je sukulentní rostlina z čeledi kaktusovitých. Charakteristickým rysem sukulentů je schopnost zadržet ve speciálních zásobních pletivech vodu, a to jak pro nezbytné biochemické děje, tak i pro přečkání suchých období. Díky této schopnosti vegetují sukulenty na okrajích pouští a v polopouštích. Většina zástupců čeledi *Cactaceae* se řadí mezi bezlisté stonkové sukulentny. Fotosyntéza probíhá jen v silně zdužnatělém stonku kaktusu pomocí asimilačního pletiva, které se nachází pod pokožkou. Pro čeleď kaktusovitých jsou charakteristické areoly, ve kterých jsou umístěny cévy. Z areol vyrůstají květy či trny. (2), (6), (7)

*Trichocereus pachanoi* se hojně vyskytuje ve Střední Americe. Teritoriem kaktusu jsou především Andy. Vegetuje zde v nadmořských výškách

1800 až 3000 metrů nad mořem. Díky svému sukulentnímu charakteru není *Trichocereus pachanoi* náročný na půdu a prostředí. (2), (3), (8)

*Trichocereus pachanoi* je sloupovitý kaktus šedozelené barvy. Výška tohoto kaktusu může dosáhnout až 6 metrů. Tělo je pravidelně rozděleno 4 až 8 svislými žebry. Z areol v horní polovině stonku vyrůstají bílé květy s omamnou vůní. Květy, které dosahují v průměru až 20 cm, se otevírají po západu slunce. Kaktus nemá žádné trny. (3)

### 3.1.3 Obsahové látky

*Trichocereus pachanoi* je znám halucinogenním působením na člověka. Tento efekt je způsoben přítomností alkaloidu meskalinu v rostlině. Alkaloidy jsou zásadité organické sloučeniny obsahující dusík. Prekurzory alkaloidů bývají aminokyseliny, jako na příklad tyrosin, tryptofan či histidin. (3), (9)

Meskalin patří mezi alkaloidy odvozené od tyrosinu. Je derivátem fenylethylaminu. Rostlina obsahuje i další látky, které jsou deriváty fenylethylaminu, jako lofofin či lobivin. (9), (10)

Biosyntetické děje v rostlině jsou provázané. Z látek produkovaných glykolýzou a pentózovým cyklem vychází tak zvaná šikimátová biosyntetická cesta. Mezi konečné produkty této syntetické dráhy patří i meskalin. (9)

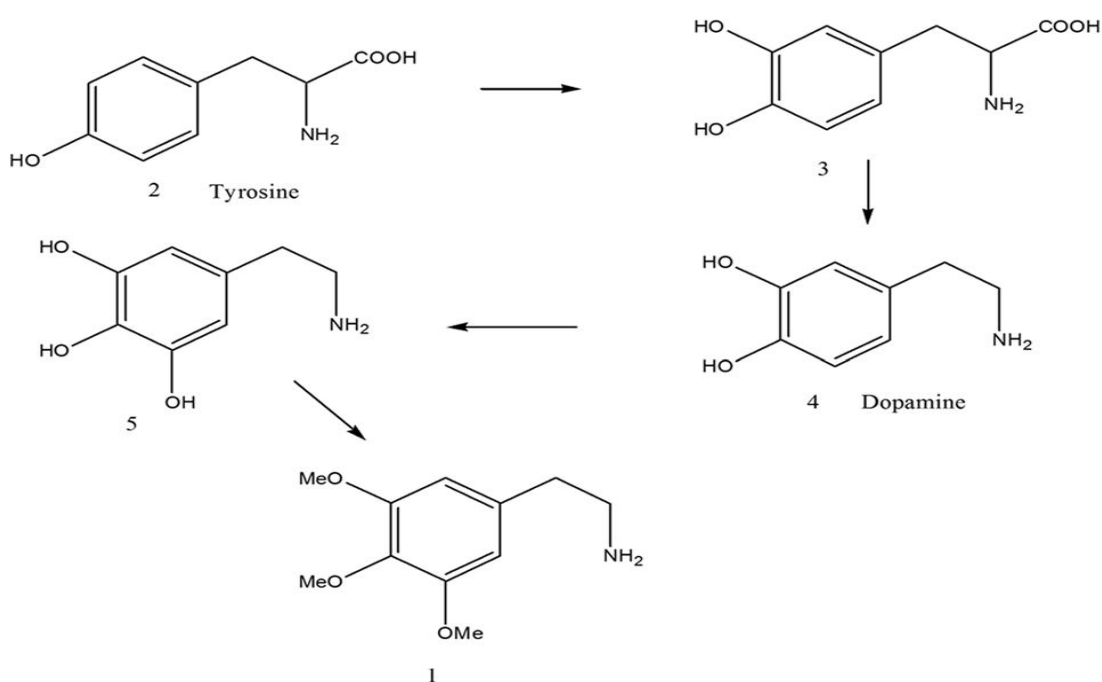
Biosyntéza meskalinu vychází z aminokyseliny tyrosinu. Tyrosin je oxidován pomocí enzymu tyrosin-hydroxylázy na L-DOPA, který je zbaven karboxylové skupiny enzymem DOPA-dekarboxylázou za vzniku dopaminu. Dopamin je oxidován na 3,4,5-trihydroxy- $\beta$ -fenylethylamin, který je O-methylací přeměněn na meskalin neboli  $\beta$ -(3,4,5-trimethoxyfenyl)ethylamin (viz. Obrázek č.1). Alternativní cesta biosyntézy meskalinu vychází z látky tyramin. Tyramin, který vzniká dekarboxylací, je

hydroxylován na dopamin. Biosyntéza dále pokračuje výše popsáním způsobem. (3), (11), (12)

V čerstvé rostlině *Trichocereus pachanoi* tvoří obsah meskalinu 0,12%, zatímco v usušené rostlině dosahuje podíl látky až 2%. Uvedené množství meskalinu v kaktusu se ovšem může značně odlišovat od této maximální hodnoty. Množství alkaloidů obsažených v rostlině totiž závisí na různých faktorech, jako jsou vlastnosti půdy, nadmořská výška, klima či vegetační období, ve kterém se kaktus nachází. (2), (3), (8), (13)

Meskalin obsahuje fenylethylaminové jádro podobně jako molekuly LSD či serotoninu. Účinky těchto látek jsou si tedy v mnohých aspektech podobné. (11), (14)

### Obrázek č.1 Biosyntéza meskalinu



Zdroj: Kovacic P., Somanathan R., Novel, unifying mechanism for mescaline in the central nervous systém (11)

### 3.1.4 Meskalin

Meskalin je halucinogenní látka působící jako neselektivní agonista serotoninových a částečně také dopaminových a adrenergických receptorů. Interakcí meskalinu se serotoninovými receptory je ovlivněna řada fyziologických procesů i nálada a stav mysli. Vzhledem k polárnímu charakteru molekuly prochází meskalin přes hematoencefalickou bariéru do mozku jen minimálně. K dosažení psychotropního efektu jsou v porovnání s jinými halucinogeny potřeba vyšší dávky této látky. (15), (16), (17)

Vzhledem k hydrofilnímu charakteru molekuly meskalinu dochází k jeho poměrně rychlému vyloučení z těla. Bylo prokázáno, že po perorálním podání drogy dochází k exkreci až 87% dávky už během prvních 24 hodin. Psychotropní účinek může trvat až 12 hodin. (17)

Účinek meskalinu na lidský organismus je následovný. Během první hodiny po požití drogy dochází k vegetativním projevům, jako jsou nevolnost, zvracení, pocení, slinění či bolest hlavy. Postupně tyto nepříjemné reakce organismu na drogu ustávají a střídají je halucinace spojené se značnou euforií. Meskalin účinkuje na zrakový a sluchový aparát. Vizuelní vjemy bývají rozličně barevné světelné záblesky, spirály či šachovnice. Sluch bývá zbystřený. Lidé, kteří pozřeli drogu, dokonce popisují tak zvanou synestezii, kdy došlo k propojení všech pěti smyslů. Jako příklad synestezie lze uvést rytmus evokující určité vizuelní vjemy. S požitím meskalinu jsou spojovány také prožitky mimo čas a prostor, tedy opouštění těla či létání. (3), (8)

Droga nebyla využívána pouze pro své halucinogenní účinky. Indiánům sloužila jako širokospektré léčivo, které využili na astma, spáleniny či revmatické bolesti. (18)

Meskalin není návyková látka. Jeho častá konzumace ale poškozují játra, kde dochází k jeho metabolizaci. (3), (8)

## **3.2 EXPLANTÁTOVÉ KULTURY**

### **3.2.1 Charakteristika**

Explantátové kultury vznikají *in vitro* kultivací rostliných buněk, tkání či orgánů na definovaném pevném nebo tekutém médiu v aseptickém prostředí. Kultivace probíhá za předem určených a kontrolovaných podmínek – osvětlení, teploty a vlhkosti. Rostlinná buňka má schopnost totipotence - každá buňka v rostlině, diferencovaná i nediferencovaná, obsahuje genetickou informaci pro stavbu celé rostliny. Když tedy jakákoli buňka v rostlině dostane patřičný signál, je schopna nové diferenciaci. Tuto schopnost využívá rostlina k regeneraci. Totipotence umožňuje existenci explantátových kultur. (19), (20), (21)

Explantátové kultury se rozmnožují vegetativně. Pochází z jedné matečné rostliny a mají stejný genotyp. Explantátové kultury lze tedy označit jako klony. (22)

Rozdělení explantátových kultur podle diferenciaci, původu a charakteru pletiva:

- ***Buněčné kultury***

Kultura je tvořena samostatnými rostlinnými buňkami. (22)

- ***Protoplastové kultury***

Explantátová kultura je tvořena protoplasty, což jsou rostlinné buňky, ze kterých byla enzymaticky odstraněna buněčná stěna. (23)

- ***Kalusové kultury***

Kalus je tvořen nediferencovanými proliferujícími parenchymatickými buňkami. Je kultivován na tuhých médiích. V rostlinném organismu se kalus formuje jako ochranné pletivo reagující na poranění rostliny. (23)

- ***Suspenzní kultury***

Kultura je tvořena jednotlivými rostlinnými buňkami či jejich drobnými shluky suspendovanými v tekutém médiu. Tato kultura vzniká rozdrobněním kultury kalusové. Aby nedocházelo k sedimentaci buněk, bývá kultura umístěna na pomaloběžný roller či třepací stroj.(20), (21)

- ***Orgánové kultury***

Kultura je tvořena celými rostlinnými orgány nebo jejich částmi. Nejčastěji jsou orgánové kultury tvořeny kořeny nebo pupeny. Zůstává tedy zachována jejich stavba a funkce. (21)

### **3.2.2 Odvození explantátové kultury z rostliny**

Explantátovou kulturu lze získat mechanickým vyjmutím parenchymatické tkáně z nadzemní či podzemní části rostliny. Odebraná část rostliny se nazývá explantát. Explantát se skládá z jednotlivých buněk či jejich agregátů. Povrch explantátu je podroben sterilizaci a takto ošetřený materiál je přenesen na pevnou živnou půdu. Kultivace probíhá při teplotě od 23 do 28 °C. Buňky na takto naočkované půdě se rozrůstají. Když dosáhnou dostatečného množství, vzniká kalus. Kalus průběžně čerpá z půdy živiny, a tak je potřeba ho opakovaně přenášet na půdy nové, aby se kultura udržela v aktivním stavu. Tento proces se nazývá subkultivace neboli pasážování. Pro vznik homogenní kultury lze kalus rozmělnit a přenést do tekutého média. Vzniká tak

suspenzní kultura, která obsahuje rostlinné buňky samostatné i v drobných shlucích. (20), (21)

### **3.2.3 Kultivace explantátových kultur**

Suspenzní kultury jsou náročné na podmínky kultivace. Musí být zajištěno optimální promíchávání celé soustavy. Metabolické procesy v kultuře nemohou probíhat bez dostatečného okysličování zajištěného promícháváním na třepačce či rolleru. Dalším problémem vznikajícím při nesprávném nastavení kultivačních podmínek je sedimentace buněk suspendovaných v kultuře.

Z důvodu poměrně dlouhé doby kultivace rostlinných explantátových kultur, kde se doba buněčného cyklu pohybuje od 15 hodin výše, klade tento proces vysoké nároky na sterilitu a její udržení. Nejčastějšími kontaminanty kultur jsou bakterie a houby, které jsou běžnou součástí životního prostředí. Když přijdou do styku s kulturou, najdou zde velmi příhodné prostředí pro vegetování a rostou mnohem rychleji než explantát samotný. V důsledku této kontaminace explantát zaniká. Dále mohou kultuře škodit také toxické metabolity produkované kontaminanty. Pro úspěšnou kultivaci explantátových kultur je naprosto nezbytné udržení aseptického prostředí uvnitř kultivační nádoby. (20), (21), (24)

Sterilita explantátové kultury je udržována těmito metodami :

- ***Laminární proudění vzduchu***

Laminární proudění vzduchu snižuje riziko kontaminace kultury při práci s ní. V uzavřené místnosti či boxu plynule cirkulující vzduch prochází vysoce účinným vzduchovým filtrem – HEPA filtrem. HEPA filtr nepropouští částice větší než 0,3  $\mu\text{m}$ . Proudění vzduchu v boxu je horizontální a neturbulentní. Před prací s kulturou je nutno alespoň na 15 minut zapnout UV germicidní lampu v boxu či místnosti. Dojde tak k usmrcení přítomných biologických kontaminantů. (21), (25)

- ***Sterilizace skleněného nádobí***

Pomocí sterilizace je nádobí kompletně zbaveno přítomných mikroorganismů. Před každým experimentem je nutno skleněné nádobí takto ošetřit. Sterilizace se provádí pomocí horkého vzduchu. Sklo je vloženo do horkovzdušného sterilizátoru a zahřáto na patřičnou teplotu. Teplota ve sterilizátoru je nepřímou úměrná času potřebnému pro sterilizaci. Na příklad sterilizace při 180°C bude trvat 20 minut, oproti 480 minutám při 120°C. Takto se sklo zbaví přítomných mikroorganismů i jejich spór.

- ***Jiné způsoby sterilizace***

- *Sterilizace vodní parou – autoklávem*

Sterilizace vodní parou probíhá v autoklávu, což je zařízení, ve kterém dochází k tvorbě vodní páry za zvýšeného tlaku. Výhodou sterilizace vodní parou je vysoká teplota, které pára může dosáhnout a také její schopnost penetrovat do materiálu. Působením vysokých teplot dochází k denaturaci proteinů a důsledkem toho i k usmrcení mikroorganismů.

- *Sterilní filtrace*

Roztoky obsahující termolabilní látku jsou zbavovány kontaminantů pomocí sterilní filtrace. Filtr zachytí částice větší než 0,22  $\mu\text{m}$ .(21)

- *UV záření*

UV záření o vlnové délce 185 až 254 nm je běžně používáno ke sterilizaci aseptických prostor. DNA mikroorganismů absorbuje UV záření, což způsobí její poškození a zánik mikroorganismů. UV záření působí tedy germicidně. UV zářivky používané ke sterilizaci se proto nazývají germicidní lampy. (26), (27)



➤ Mikrovlny

Mikrovlny jsou druh elektromagnetického vlnění o frekvenci 300 – 30 000 MHz a vlnové délce 1 - 1000 nm. Polární látky jako voda jsou mikrovlnami významně zahřívány, a proto jsou mikroorganismy obsahující vodu mikrovlnami ničeny.(26)

➤ Ethylenoxid

Ethylenoxid je plyn, kterým jsou sterilizovány pevné materiály s nízkou odolností vůči vysokým teplotám jako plasty. (21)

• ***Sterilizace média a explantátových kultur***

Živné půdy jsou sterilizovány v autoklávu při 121°C. Čas sterilizace závisí na množství média. Zde platí přímá úměra, čím větší bude objem sterilizovaného média, tím déle bude celý proces trvat. Na příklad objem média 25 ml musí být sterilizován v autoklávu minimálně 20 minut, oproti 4000 ml média, které bude muset setrvat v autoklávu minimálně 63 minut. Sterilizované půdy je nutné vystavit vysoké teplotě jen po nezbytný čas, jinak totiž dochází k destrukci složek zde obsažených a růst explantátu je v takto znehodnocených médiích minimální.

Termolabilní látky lze zbavit kontaminantů filtrací přes sterilní filtr. Takto upravený roztok lze přidat k chladnému sterilnímu médiu v aseptickém prostředí.

Sterilizace explantátů před jejich kultivací v médiu zabrání okamžité kontaminaci celé kultury. Povrchová sterilizace explantátů může být provedena ethanolem či isopropylalkoholem. (21)

### 3.2.4 Faktory ovlivňující růst kultury

Aspekty ovlivňující růst explantátu jsou druh média, pH, vlhkost, světlo a teplota.

- ***Médium***

Konzistence média hraje důležitou roli při růstu a diferenciaci explantátu. V tuhé půdě s obsahem agaru 0,6 – 1% je růst explantátu pomalý a odehrává se především na okrajích kalusu. Suspenzní kultura vykazuje oproti kalusu velmi rychlý růst.

Růst suspenzní kultury vykazuje typickou růstovou křivku. Tato křivka se dělí na pět úseků, kde je zanesen objem suspenze v závislosti na čase. První stádium růstu kultury se nazývá lag fáze, kdy je suspenze přenesena do čerstvého média. Suspendované rostlinné buňky znovu získají schopnost dělení. Dalším stádiem je

exponenciální fáze, kdy probíhá masivní buněčné dělení. Tato fáze bývá nejkratší. Trvá většinou jen po tři generace buněk, ale závisí především na stavu suspendovaných buněk a výživnosti média. Pozvolna buněčné dělení ustává a objem suspenze se přestává měnit. Růst kultury postupně klesá od fáze lineární přes fázi zpomalení a ustálí se ve fázi stacionární. Během lineární fáze čerpají rostlinné buňky z média dostupné sacharidy a tvoří z nich buněčné membrány a škroby. V dalších fázích buňky čerpají energii z utvořených zásob a zvětšují se. Nakonec veškeré utilizovatelné sacharidy zcela mizí a kultura zaniká.

Tyto informace jsou důležité pro vystihnoutí správné doby pasážování kultury.

- ***pH***

Čisté médium má hodnoty pH mezi 5,0 a 6,5. V průběhu růstu kultury se hodnoty pH mění v závislosti na utilizaci složek média explantátem

- ***Světlo***

Světlo je významným faktorem ovlivňujícím vývoj kultury. Klíčové jsou dílčí faktory jako intenzita, denní světelná perioda a kvalita světla. Kultivace explantátových kultur probíhá zpravidla pod rozptýleným světlem žárovek.

- ***Teplota***

Kultury jsou běžně udržovány při teplotě mezi 20 až 30°C. Velmi nízké teploty způsobí výrazné zpomalení růstu kultury. (21), (23), (28), (29)

### **3.2.5 Média**

První pokusy o vytvoření kultur z rostlinných buněk provedl německý botanik G.Haberlandt na počátku 20.století. Nicméně první kombinovaná kultivační média byla vytvořena na základě poznatků z mikrobiologických experimentů až o několik desítek let později. Média obsahují vždy zdroj uhlíku, anorganické soli, organické látky a stopové prvky. Zmíněné skupiny látek jsou nezbytné pro úspěšnou kultivaci explantátových kultur *in vitro* a to z důvodu, že jen velmi málo pěstovaných kultur má schopnost autotrofie. Dodaný zdroj energie je tedy klíčem k úspěšné kultivaci. Neustálý pokrok vědy a technologií má za důsledek i zdokonalování médií. Je snaha poskytnout pěstované kultuře co nejlepší kultivační prostředí, a proto se uvedený výživový základ stále rozšiřuje o specifické substance. V současné době jsou nejpoužívanější média definovaná podle formulací Gamborga, Hellera, Whitea nebo Murashigo a Skooga. Poslední zmíněné médium bylo použito ke kultivaci *Trichocereus pachanoi* v této diplomové práci. (19)

Složkami kultivačních půd jsou :

- ***Minerály***

Rostliny přejímají anorganické látky z půdy ve formě iontů. Do média jsou anorganické látky přidávány jako soli rozpuštěné ve vodných roztocích, kde disociují na kationty a anionty. Příjem látek rostlinou je úměrný jejich koncentracím v médiu. (30)

- *Makroelementy*

Makroelementy jsou pro rostlinné buňky nezbytné. Musí je tedy obsahovat každé živné médium. (30)

Dusík se řadí mezi esenciální prvky. Bez esenciálních prvků je rostlina neschopná dokončit vývojový cyklus. Pro rostlinu jsou nenahraditelné jinými prvky. Dusík je naprosto nezbytný prvek pro růst rostlin. Větší část dusíku je rostlinou přeměněna na aminokyseliny. Je přítomen v chlorofylu. Pomocí dusíku lze udržet kulturu v nediferencovaném stavu. Do média se dusík přidává ve formě anorganických solí jako nitrátový nebo amonný iont. Médium je většinou pro kulturu úrodnější, pokud obsahuje ionty oba. Nitrátový iont je obsažen v médiu v koncentraci 20 až 25 mM, amonný iont v koncentraci 2 až 20 mM. Dusík je do média možno přidat také v podobě organických sloučenin jako jsou aminokyseliny prolin, glutamin nebo kaseinový hydrolyzát.

Mezi makroelementy dále patří draslík, vápník, hořčík a sodík. Zmíněné prvky jsou do média dodávány ve formě kationtů. Vápník je důležitým kofaktorem enzymů. Nezbytný je také při stavbě buněčné stěny. Nedostatek vápníku v rostlinách se projevuje nekrózou vrcholových meristémů. Hořčík je v rostlině esenciální pro průběh enzymatických reakcí. Je také součástí struktury chlorofylu.

Fosfor a síra jsou důležitými prvky pro stavbu rostliny. Fosfor je nezbytnou složkou nukleových kyselin, síra aminokyselin. Oba prvky jsou do média dodávány v podobě aniontů – fosforečnanů a síranů. (21), (30)

➤ Mikroelementy

Mezi mikroelementy se řadí železo, které je nezbytné pro syntézu chlorofylu a průběh redoxních reakcí v rostlinném organismu. Železnaté ionty musí být přidány do média v roztoku s chelatační přísadou. Jinak dochází k precipitaci iontů a to především v alkalickém prostředí.

Prvky jako mangan, zinek a bor jsou velmi důležité pro průběh enzymatických reakcí. Kobalt a jod jsou prvky pro rostlinu neesenciální. Je ovšem prokázáno, že v jejich přítomnosti kultura lépe roste a prospívá. Metabolickému stresu kultury lze zabránit přidáním niklu do média. (21), (31)

• ***Organické látky***

Sacharidy jsou pro růst explantátových kultur i rostlin absolutně nezbytné jako zdroj uhlíku. Většina kultur nemá schopnost autotrofie, a proto musí být dodány jako zdroj energie a uhlíku sacharidy. Nejčastěji používaným zdrojem uhlíku v médiích je sacharóza. Méně frekventovanou látkou vyskytující se v médiích je glukóza. Sacharidy podporují růst kultury. Ve většině případů ovšem není přílišný růst kultury žádoucí. Sekundární metabolity jsou produkovány kulturou především ve stacionární fázi. Přílišným růstem dochází k vyčerpání zásob sacharidů mohutnou exponenciální a lineární růstovou fází. Stacionární fáze proběhne jen velmi rychle a to je pro vznik sekundárních metabolitů nežádoucí. Koncentrace sacharidů v médiu se pohybuje mezi 20 – 40 g/l. (21), (23)

Z vitaminů je pro explantátové kultury esenciální jen vitamin B1, thiamin. Thiamin je nezbytný pro metabolismus sacharidů a biosyntézu některých aminokyselin.

Médium Murashigeho a Shooga obsahuje také kyselinu nikotinovou a pyridoxin. Koncentrace vitaminů v médiích jsou obvykle velmi nízké.

Myo–inositol je cukerný alkohol. A i přesto, že není esenciální složkou média, kultury s přídavkem myo–inositolu vykazují výrazně lepší růstové vlastnosti. (21)

- ***Aktivní uhlí***

Aktivní uhlí je do médií přidáváno za účelem adsorpce toxických látek produkovaných kulturou. Není používáno často. (21)

- ***Zpevňující látky***

Tyto látky jsou používány pro tvorbu tuhých médií. Rostlinná kultura je kultivována na jejich povrchu.

Agar je nejčastěji používanou zpevňující látkou. Tento polysacharid je izolován z červených mořských řas zvaných ruduchy. Po smíchání s tekutým médiem se musí zahřát na 100°C, aby došlo k jeho roztužení. Gelace takto upraveného média nastává při 45 °C. Výhodou tuhého média s agarem je, že agar nereaguje se složkami média a není ničen ani enzymy kultury. (21)

- ***Rostlinné hormony – regulátory růstu***

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou důležité pro iniciaci a regulaci vývoje celé rostliny. Ze všech zmíněných fytohormonů se v kultivačních médiích nachází obvykle jen auxiny a cytokininy. Pomocí správné koncentrace auxinů a cytokininů lze v kultuře docílit organogeneze nebo udržet rostlinné buňky v nediferencovaném stavu. Důležitý je také poměr koncentrací těchto fytohormonů. (21), (23)

➤ Auxiny

V rostlině auxiny stimulují prodlužování buněk. Způsobují také apikální dominanci - podporují růst hlavního pupenu a inhibují růst a větvení postranních částí rostliny. Na podzemní orgány působí auxiny protichůdně. Působí stimulačně na tvorbu nových kořenů a jejich větvení. Mezi do média nejčastěji přidávané auxiny patří kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (se zkratkou 2,4-D), kyselina naftyloctová (NAA) a kyselina indolyl-3-octová (IAA). Poslední zmíněná látka je přírodního původu, zbylé dvě jsou vytvořeny chemickou syntézou a v kultuře napodobují přirozené působení auxinů. Auxiny jsou přidávány do dlouhodobě kultivovaných kultur především kvůli schopnosti udržet kulturu v dediferencovaném stavu. Vysoký podíl auxinů v suspenzní kultuře má negativní vliv na produkci sekundárních metabolitů. (23), (32), (33), (34), (35), (36)

➤ Cytokininy

Cytokininy stimulují dělení buněk a morfogenezi rostlinných orgánů. V nadzemní části rostliny působí protichůdným mechanismem než auxin. Stimulují růst postranních pupenů a ruší tím apikální dominanci. Nejpoužívanějším cytokininem v živných médiích je látka známá pod triviálním názvem kinetin. Mezi méně používané cytokininy patří zeatin či 6-benzylaminopurin (se zkratkou BAP). (23), (35)

➤ Gibberelliny

Gibberelliny podporují prodlužování stonku stimulací dělení a prodlužování buněk. Stimulují kvetení u dlouhodenních rostlin a také podporují klíčení pylového zrna a růst pylové láčky. (21)

➤ Abcisová kyselina

Kyselina abcisová pomáhá vyšším rostlinám ke zvýšení odolnosti vůči stresu, který je způsoben nízkým obsahem vody, nízkými teplotami, patogeny nebo poraněním

rostliny. Kyselina abscisová reguluje uzavírání průduchů a brání tím ztrátám vody. (21), (34)

➤ Ethylen

Ethylen je na rozdíl od ostatních fytohormonů plyn. Ethylen ovlivňuje stárnutí rostliny. Stimuluje zrání plodů či opad listů. Tak zvanou trojí reakcí podporuje růst a diferenciaci vzrostných vrcholů.(21)

### 3.2.6 Využití explantátových kultur

- ***Produkce sekundárních metabolitů***

Z explantátových kultur lze izolací získávat sekundární metabolity dané rostliny. Velké využití nachází tato metoda u obtížně pěstovatelných rostlin. Přínos izolace sekundárních metabolitů z explantátových kultur je vysoký, protože umožňuje dosáhnout vyšší koncentrace metabolitu než by bylo možné získat z matečné rostliny. Výtěžek lze zvýšit pomocí elicítace. (20), (37), (38)

- ***Biotransformace***

Explantátové kultury dokáží transformovat exogenně dodané substance. Z probíhajících chemických reakcí jsou jedinečné především hydroxylace či glykozylace a to proto, že je nelze provést mikrobiologickou ani chemickou cestou.

- ***Mikropropagace rostlin***

Pomocí explantátových kultur lze rostliny vegetativně rozmnožovat. Metoda mikropropagace využívá technik explantátových kultur, kdy z malého množství rostlinného materiálu, explantátu, je ve sterilních podmínkách kultivováno velké množství rostlin. Takto získané rostliny jsou většinou používány v zemědělství. Metoda je oproti klasickému způsobu množení výhodná pro svou prostorovou nenáročnost



a nezávislost na ročním období. Nevýhodou je obtížnost technologie a její cena. (20), (35)

- ***Klonové rozmnožování***

Jde o rozmnožování rostlin *in vitro* se zachováním genetické stability. Riziko neúspěchu této metody nastává při přenesení rostlin do nesterilních podmínek a jejich přesazení do zeminy. (20)

### **3.3 SEKUNDÁRNÍ METABOLITY A OVLIVNĚNÍ JEJICH PRODUKCE**

#### **3.3.1 Sekundární metabolity**

Rostliny produkují velké množství nízkomolekulárních sloučenin. Menší část z nich je nepostradatelná pro metabolické pochody v rostlině. Tyto látky se řadí mezi primární metabolity. Ostatní rostlinou produkované sloučeniny se nazývají sekundární metabolity. V minulosti byly tyto látky považovány za odpadní produkty, toto tvrzení bylo ale po určité době vyvráceno. Sekundární metabolity slouží rostlinám ke specifickým účelům jako ochrana proti býložravcům či patogenům, lákají opylovače a zvyšují tím možnost oplodnění nebo potlačují růst okolních rostlin. (39)

Sekundární metabolity se hromadí především v mladých vyvíjejících se tkáních nebo reprodukčních orgánech rostliny. Tyto metabolity lákají hmyz k opylování nebo býložravce k jejich pozření. Systém tvorby sekundárních metabolitů může být dynamický, reagující na stresové podněty. V tomto případě jsou sekundární metabolity součástí obranného systému rostliny. V suspenzních kulturách se sekundární metabolity kumulují během stacionární fáze růstu kultury nebo v již diferenciovaných tkáních. Výhodou explantátové kultury je rychlá proliferace buněk a zkrácený biosyntetický cyklus. (23), (36), (40)

V rostlinách jsou sekundární metabolity většinou produkovány pouze v malých koncentracích, které nedostačují pro potřeby průmyslového využití. Proto byly vyvinuty techniky, pomocí kterých je dosaženo vyššího podílu kýžených substancí. Tyto techniky využívají explantátové kultury jako *in vitro* prostředí, které lze ovlivnit a zvýšit tak produkci sekundárních metabolitů. Obrovským negativem je vysoká nákladnost těchto technik. (41)

### 3.3.2 Metody ovlivnění produkce sekundárních metabolitů

- ***Elicitace***

Elicitace je metoda zvýšení produkce sekundárních metabolitů rostliny jako reakce na určitý stresor. Sekundární metabolity zde působí jako ochrana rostliny před stresorem. Stresor, tak zvaný elicitor, může být dvojího charakteru – biotický či abiotický. (37), (42)

Abiotické faktory jsou fyzikálně-chemického charakteru. Řadí se mezi ně světlo, UV záření, teplota a chemické látky (na příklad peroxid vodíku).

Mezi biotické faktory elicítace lze zařadit interakce rostliny s mikroorganismy, houbami či herbivorními živočichy. Biotickým faktorem je také tak zvaná fenologie, tedy závislost rostliny na čase, ročním období a klimatu. (43), (44)

- ***Genetické inženýrství***

Genetické inženýrství je metoda, kde dochází k izolaci genetického materiálu z rostlinného organismu, jeho charakterizaci, úpravě a včlenění do organismu cizího, zde explantátové kultury. Cílem této metody je získání kultury či organismu o požadovaných vlastnostech. (36), (45)

- ***Imobilizace***

Imobilizace je metoda, která spočívá na principu fázového oddělení substrátu od biologicky aktivních substancí. Mezi oběma fázemi je možná látková výměna.

Techniky imobilizace jsou :

- *imobilizace bez použití nosiče* – buňky substrátu agregují za pomoci krátkodobě zvýšené teploty
- *imobilizace s použitím nosiče* – substrát je uchycen na organický nebo anorganický materiál adsorpcí nebo pomocí iontových, kovalentních či koordinačně kovalentních vazeb
- *zachycení do polymeru* – buňky substrátu vcestují do připraveného polymeru. Používají se přírodní polymery jako agar a želatina nebo syntetické polymery jako polyvinylchlorid.
- *enkapsulace a zakotvení ve struktuře membrány* – pro enkapsulaci jsou nejčastěji používány deriváty celulózy, které poskytnou enkapsulovanému materiálu ochrannou semipermeabilní membránu (20)

Technika imobilizace je využívána pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů, které jsou nejčastěji uchovávány ve vakuolách uvnitř rostlinných buněk. Sekrece sekundárních metabolitů do média obklopujícího nosič probíhá pasivní difuzí nebo aktivním transportem. Proces lze urychlit permeabilizací membrán. (36)

- ***Biotransformace***

Rostlinné kultury mají schopnost transformovat exogenně dodané sloučeniny. Reakcemi se mohou vytvořit zajímavé modifikace přírodních a synteticky vyrobených

molekul. Rostlinné enzymy jsou schopny katalizovat regio- a stereoselektivní reakce, kultury tedy mohou být využity k produkci kýžených struktur. (36), (46)

- ***Prekurzory***

Přidáváním prekurzorů do buněčných kultur lze stimulovat syntézu sekundárních metabolitů. Důležitá je koncentrace přidávaného prekurzoru a doba, po kterou na kulturu působí. Musí se přidávat jen takové prekurzory, pro jejichž reakce je daná kultura enzymaticky vybavena. Jinak reakce neproběhnou. Hrozí také negativní ovlivnění jiných biosyntetických drah jejich inhibicí. (38), (45), (46)

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 MATERIÁL, POMŮCKY A PŘÍSTROJE

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

Pro vypracování zadaných experimentů byla použita kalusová a suspenzní kultura rostliny *Trichocereus pachanoi*. Kalusovou kulturu poskytla Fakulta tropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze (katedra tropických plodin a agrolesnictví).

#### 4.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy A 200S, SARTORIUS, Německo

Autokláv PS 20, CHIRANA, ČR

Box s laminárním prouděním Fatran LF, VÝROBNÉ DRUŽSTVO POKROK, Slovensko

HPLC chromatograf JASCO, JASCO INTERNATIONAL, Japonsko

- čerpadlo PU – 2089
- detektor MD – 2015
- autosampler AS – 2055
- DAD detektor

Chromatografická kolona LiChrospher RP - 18 (250 x 4 mm, 5 µm) s ochranou předklonkou, MERCK, Německo

Mikrofiltr, TESSEK, ČR;

Sušárna MEMMERT model 500, SCHWABACH, Německo

Těsnění na vialky, LABICOM, ČR

Třepačka UNIMAX 2010, HEIDOLPH INSTRUMENTS, Německo

Vialky, LABICOM, ČR

Vodní lázeň, typ 1042, GFL, Německo

### **4.1.3 Chemikálie a pomocné látky**

Acetonitril for HPLC – gradient grade, MERCK, Německo

Ajatin, PROFARMA - PRODUKT, ČR

Destilovaná voda, katedra analytické chemie, FaF UK HK, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný p.s., LACHEMA, ČR

Dopamin, SIGMA-ALDRICH, ČR

Dusičnan amonný, p.a., PENTA, ČR

Dusičnan draselný p.a., LACH-NER, ČR

Ethanol 96%, LACHEMA, ČR

Glycin, ALDRICH, USA

Hydrolyzát kaseinu, IMUNA, Slovensko

Chlorid kobaltnatý p.a., ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), LACHEMA, ČR

Chlorid vápenatý p.a., PENTA, ČR

Jodid draselný p.a., LACHEMA, ČR

Kyselina boritá p.a., LACHEMA, ČR

Kyselina nikotinová, LACHEMA, ČR

Kyselina šikimová, SIGMA-ALDRICH, ČR

Meskalin, CERRILANT CORP., USA

Methanol p.a., LACHEMA, ČR

Molybdenan sodný, LACHEMA, ČR

Myo - inositol, FLUKA, Švýcarsko

Octan amonný, LACHEMA, ČR

Pyridoxin puriss, KOCH – LIGHT LABORATORIES, Velká Británie

Sacharosa čistá, LACHEMA, ČR

Síran hořečnatý p.a., LACHEMA, ČR

Síran manganatý p.a., LACHEMA, ČR

Síran měďnatý p.a., LACHEMA, ČR

Síran zinečnatý ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), LACHEMA, ČR

Síran železnatý čistý ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ), LACHEMA, ČR

Tyrosin, SIGMA-ALDRICH, ČR

## **4.2 KULTIVACE EXPLANTÁTOVÉ KULTURY *TRICHOCEREUS PACHANOI***

### **4.2.1 Nádoby a nástroje použité ke kultivaci**

Kultivace kalusových i suspenzních kultur *Trichocereus pachanoi* probíhala v širokohrdlých Erlenmeyerových baňkách o objemu 100ml. Tyto Erlenmeyerovy baňky jsou zhotoveny z varného skla typu SIAL, které je vysoce odolné vůči výkyvům teplot a působení chemikálií. Příprava sterilních médií probíhala následovně. Médium bez nebo s přísadkou agaru bylo umístěno do Erlenmeyerovy baňky. Hrdlo baňky bylo překryto hliníkovou fólií. Takto připravená sada baněk byla vložena do autoklávu a sterilizována při 121°C, 100 kPa po dobu 15 minut.

Při pasážování a zakládání suspenzní kultury byla použita keramická třenka s těrkou, kovová lžička a kovová pinzeta. Před použitím bylo toto nádobí očištěno 96% ethanolem, obaleno hliníkovou fólií a podrobena sterilizaci v autoklávu za již uvedených podmínek.

K práci s kulturami za sterilních podmínek byl využíván box s laminárním prouděním vzduchu, který byl před použitím očištěn 96% ethanolem a poté vysvícen germicidní lampou.

### **4.2.2 Živné médium**

Živné médium poskytuje rostoucí explantátové kultuře potřebnou výživu. Pro kultivaci kalusové a suspenzní kultury *Trichocereus pachanoi* bylo použito MS médium, tedy živné médium podle Murashigeho a Skooga.

Příprava živného média probíhala následovně. Tuhé substance byly naváženy na analytických vahách. Látky nebo jejich komplexy dostupné v zásobních roztocích byly odpipetovány v potřebném množství. Vše bylo přemístěno do odměrné baňky o objemu 1000 ml a po rozpuštění tuhých komponent bylo doplněno destilovanou vodou po



rysku. Shodným způsobem byly připraveny půdy tekuté i tuhé, které obsahovaly malé množství agaru. Půda obohacena o agar byla po rozpuštění a doředění v odměrné baňce umístěna do vodní lázně a vařena po dobu 10 minut. Tekuté médium bylo rozděleno po 50 ml do čistých širokhrdlých Erlenmeyerových baněk, médium obsahující agar bylo rozděleno po 30ml. Hrdlo baněk bylo překryto hliníkovou folií. Takto připravená sada baněk byla podrobena sterilizaci v autoklávu za výše uvedených podmínek.

- ***Jednotlivé složky na 1l MS média:***

- *Roztoky:*

- 100 ml makroelementy
- 10 ml železnatý komplex
- 1 ml mikroelementy
- 1 ml glycin
- 1 ml vitamíny pro MS médium
- 1 ml BAP (6-benzylaminopurin)
- 1ml 2,4 D (kyselina dichlorfenoxyoctová)

- *Tuhé substance*

- 30,00 g sacharóza
- 0,10 g myo-inositol
- 1,00 g hydrolyzát kaseinu
- 9,00 g agar pro přípravu tuhého MS média

- ***Přesné složení MS média (mg/l)***

- *Makroelementy:*

KNO <sub>3</sub>	1900,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440,000
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	370,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	170,000

➤ Mikroelementy:

Na <sub>2</sub> EDTA	37,340
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,840
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,300
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	11,500
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
KI	0,830
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,250
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025

➤ Vitamíny a organické sloučeniny:

hydrolyzát kaseinu	1000,000
myo-inositol	100,000
sacharóza	30,000
glycin	2,000
kyselina nikotinová	0,500
pyridoxin hydrochlorid	0,500
thiamin hydrochlorid	0,100

#### **4.2.3 Kultivace a pasážování kultur *Trichocereus pachanoi***

Pasážování kalusových kultur *Trichocereus pachanoi* bylo prováděno za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Kalusy byly pravidelně pasážovány v intervalu 30 dní. Kalusy byly děleny kovovou pinzetou na menší zelené vegetující části a přenášeny na novou tuhou živnou půdu.

Suspenzní kultury byly připraveny rozmělněním kalusů v keramické třence a takto upravená kultura byla kovovou lžičkou přenesena do tekutého média. Jeden

rozmělněný kalus byl rozdělen do tří suspenzí. Pasážování starších suspenzních kultur, které nebyly využity pro experiment, bylo prováděno nepravidelně, ale vždy do 30 dní existence kultury. Probíhalo dvěma způsoby a to přelitím části staré suspenze do nového živného média nebo odpipetováním části obsahu staré kultury a přenesením do nové sterilní živné půdy. Při prvním způsobu pasážování byla část média staré suspenze odlita do odpadu, aby bylo hrdlo Erlenmeyerovy baňky očištěno od bakterií a vytvořila se tak cesta pro další odlévání suspenze. Následně byla suspenzní kultura krouživým pohybem promíchána, aby došlo k rovnoměrnému rozmístění suspendovaných buněk v kultuře. Takto byla 1 stará suspenzní kultura rozdělena do 3 nových médií. Při objemu suspenzní kultury 50 ml bylo tedy do každého čistého média přelito přibližně 10 ml suspenzní kultury. Pasážování suspenzní kultury pomocí sterilní pipety probíhalo následovně. Stará suspenzní kultura byla promíchána krouživými pohyby, následně bylo odpipetováno a přemístěno do nového živného média 10 ml suspenze. To vše probíhalo za aseptických podmínek boxu s laminárním prouděním vzduchu.

Všechny Erlenmeyerovy baňky musí být při kultivaci dobře uzavřené hliníkovou fólií. Kultivace explantátových kultur *Trichocereus pachanoi* probíhala v kultivační místnosti při teplotě 25°C a světelném režimu v poměru 16 hodin světla, 8 hodin tmy. Suspenzní kultury byly po dobu kultivace umístěny na třepačku s rychlostí pohybu 120 otáček za minutu.

## 4.3 OVLIVNĚNÍ PRODUKCE POMOCÍ PREKURZORŮ

### 4.3.1 Příprava roztoků prekurzorů

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda dojde k ovlivnění produkce meskalinu v suspenzní kultuře *Trichocereus pachanoi* prekurzory. Použity byly prekurzory dopamin, D, L-tyrosin, kyselina šikimová hydrolyzát kaseinu.

Koncentrace zásobních roztoků prekurzorů byla následovná :

- dopamin

$$c_1 = 500 \text{ mg/100ml}$$

$$c_2 = 1000 \text{ mg/100ml}$$

$$c_3 = 2500 \text{ mg/100ml}$$

- D, L-tyrosin

$$c_1 = 500 \text{ mg/100ml}$$

$$c_2 = 1000 \text{ mg/100ml}$$

$$c_3 = 2500 \text{ mg/100ml}$$

- hydrolyzát kaseinu

$$c_1 = 3000 \text{ mg/100ml}$$

$$c_2 = 6000 \text{ mg/100ml}$$

$$c_3 = 9000 \text{ mg/100ml}$$

- kyselina šikimová

$$c_1 = 3 \text{ mg/100ml}$$

$$c_2 = 150 \text{ mg/100ml}$$

$$c_3 = 300 \text{ mg/100ml}$$

Každá koncentrace uvedených prekurzorů byla připravena rozpuštěním v 7 ml a u hydrolyzátu kaseinu v 10 ml destilované vody. Mimo uvedených koncentrací bylo v každém pokusu pracováno s kontrolním roztokem, který obsahoval pouze destilovanou vodu. Sterility roztoků bylo dosaženo v případě dopaminu a tyrosinu, termolabilních substancí, sterilní filtrací v aseptickém prostředí boxu s laminárním prouděním vzduchu. Roztoky hydrolyzátu kaseinu a kyseliny šikimové byly sterilizovány v Erlenmeyerových baňkách uzavřených hliníkovou fólií v prostředí autoklávy.

#### 4.3.2 Průběh ovlivňování produkce

Do suspenzních kultur *Trichocereus pachanoi* byly přidávány různě koncentrované roztoky prekurzorů biosyntézy meskalinu (dopamin, tyrosin, kyselina šikimová a hydrolyzát kaseinu).

Byly připraveny 3 koncentrace použitých látek a jeden kontrolní roztok skládající se z destilované vody. Z těchto roztoků byl za aseptických podmínek odebrán sterilní pipetou nebo pomocí sterilní filtrace 1 ml a ten byl přemístěn do suspenzní kultury. Pro každý prekurzor bylo takto připraveno celkem 24, pro kyselinu šikimovou 20 suspenzních kultur. Pro každou z koncentrací bylo tedy použito 6 Erlenmeyerových baňek se suspendovanou kulturou *Trichocereus pachanoi*. Výjimkou byly skupiny o 5 baňkách u kyseliny šikimové. Takto ošetřené kultury byly uzavřeny hliníkovou fólií a umístěny opět do kultivační místnosti na třepačku.

Konečné koncentrace v médiích :

- dopamin

$$c_1 = 10 \text{ mg}/100\text{ml}$$

$$c_2 = 20 \text{ mg}/100\text{ml}$$

$$c_3 = 50 \text{ mg}/100\text{ml}$$

- D, L-tyrosin

$$c_1 = 10 \text{ mg}/100\text{ml}$$

$$c_2 = 20 \text{ mg}/100\text{ml}$$

$$c_3 = 50 \text{ mg}/100\text{ml}$$

- hydrolyzát kaseinu

$$c_1 = 60 \text{ mg}/100\text{ml}$$

$$c_2 = 120 \text{ mg}/100\text{ml}$$

$$c_3 = 180 \text{ mg}/100\text{ml}$$

- kyselina šikimová

$$c_1 = 0,06 \text{ mg}/100\text{ml}$$

$$c_2 = 3,00 \text{ mg}/100\text{ml}$$

$$c_3 = 6,00 \text{ mg}/100\text{ml}$$

Ze suspenzí byly odebrány vzorky po 48 a 168 hodinách kultivace. Oddělení suspendovaných buněk od média proběhlo prostou filtrací přes skládaný filtr. Takto

získané vzorky byly na filtračním papíru usušeny pomocí sušárny při 60 °C po dobu 48 hodin.

## **4.4 STANOVENÍ OBSAHU**

### **4.4.1 Postup stanovení**

- ***Příprava vzorku extrakcí***

Usušený materiál byl rozdrobněn v třecí misce a následně zvážen na analytických vahách. Materiál získaný z každého experimentu byl poté co nejpřesněji s pomocí vah rozdělen na dva vzorky o stejné hmotnosti. Vzorky byly přemístěny do varné baňky a zde smíseny s roztokem 10 ml 70% metanolu upraveným kyselinou chlorovodíkovou na pH 3. Takto připravený vzorek byl po dobu 15 minut vařen pod zpětným chladičem. Poté byl obsah varné baňky přefiltrován přes vatu do odměrného válce. Vata s ulpělou drogou byla znovu vložena do varné baňky a opět extrahována 10 ml roztoku methanolu s pH 3. Tentokrát byl vzorek vařen pod zpětným chladičem po dobu 10 minut. Obsah byl opět zfiltrován přes vatu do odměrného válce a spojil se tak s extraktem předešlým. Získaný extrakt byl doplněn do 20 ml 70% roztokem methanolu o pH 3. Po vychladnutí a důkladném promísání obsahu odměrného válce byl každý takto získaný vzorek přefiltrován přes mikrofiltr do vialky. Označené a dobře uzavřené vialky byly použity pro stanovení obsahu meskalinu pomocí HPLC.

- ***Parametry HPLC***

HPLC analýzy byly prováděny pomocí chromatografické sestavy Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), která byla vybavena předkolumnovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5µm) s ochrannou předkolumnkou.

Mobilní fáze obsahovala dva eluenty - eluent A (8% acetonitril + 30mM octanu amonného ve vodě) a eluent B (100% acetonitril). Složení mobilní fáze probíhalo gradientově: v čase 0 min 100% eluentu A, do t=25 min 75% eluentu A a 25% eluentu B.

Průtok byl 1,1 ml/min. Teplota kolony 25 °C. Nastříkovaný objem vzorku byl 20 µl.

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 - 450 nm. Obsah sledované látky byl vypočten z píků při vlnové délce 210 nm. Obsah byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

Standard meskalinu byl zakoupen od LGC Standards Sp.z.o.o., ČR a jeho roztoky byly vytvořeny přímým rozpouštěním v methanolu s obsahem pufru (30 mM octan amonný).

- ***Validace HPLC analýzy***

Validace, neboli ověření platnosti zvoleného analytického postupu. Instrumentální validace je zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco) normou ISO 9001 (International Organization for Standardization).

Způsobilost chromatografických systémů byla ověřena testem opakovaného nástřiku - tzv. test na přesnost (jedním vzorkem bylo provedeno vždy 6 nástřiků a následně vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a testem linearity (na základě 5 různých koncentrací standardu byla zjištěna lineární regresní analýzou hodnota korelačního koeficientu r, která musí být větší než 0,9900).

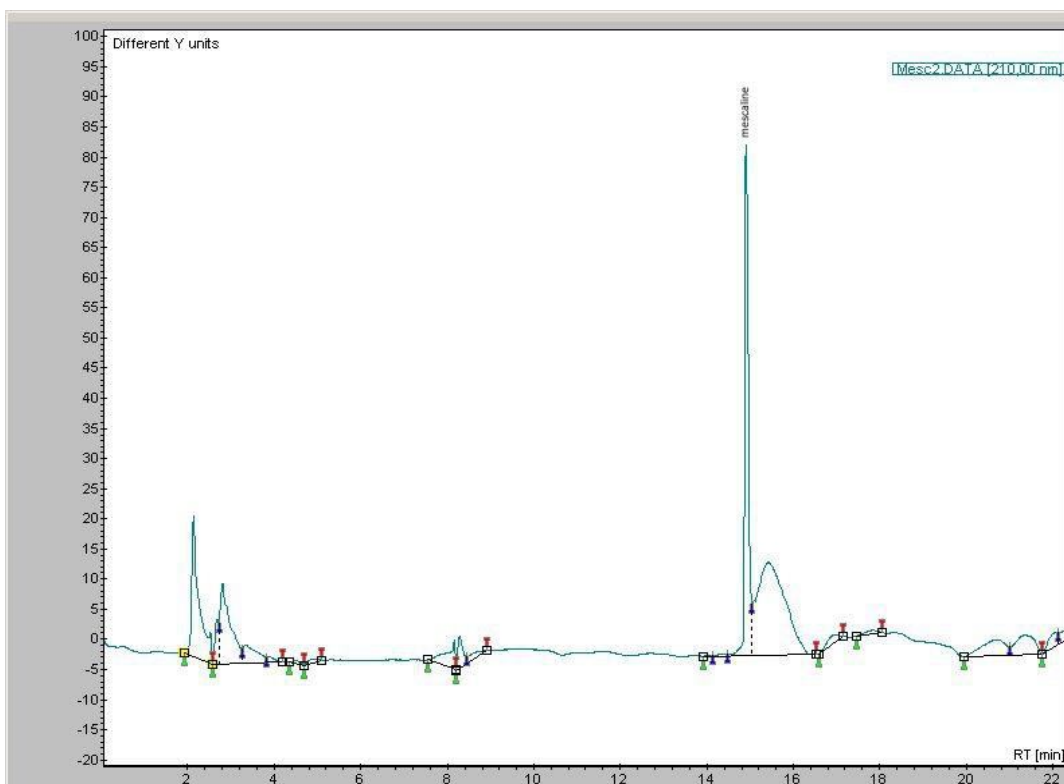
Analytického měření bylo dále vyhodnoceno pomocí převzatých metod z Evropského lékopisu, 3. vydání: Asymetrie píku a Počet teoretických pater.



Celá metoda byla vyhodnocena pomocí následujících validačních parametrů:

- Správnost metody – tedy statisticky významná rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřených hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem)
- Kvantitativní limit - tedy nejmenší hodnota měřitelná s přijatou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %) (47)

Obrázek č.2 Chromatografický záznam standardu meskalinu



## 4.5 STATISTICKÉ HODNOCENÍ

Statistické vyhodnocení získaných výsledků bylo provedeno pomocí t-testu. K výpočtu byly použity následující rovnice

- **Aritmetický průměr**

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

X- aritmetický průměr

n – rozsah souboru

X<sub>i</sub>- naměřené hodnoty

- **Směrodatná odchylka**

Směrodatná odchylka určuje odchýlení jednotlivých hodnot od průměru celého souboru.

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

x - aritmetický průměr

x<sub>i</sub> - naměřené hodnoty

n - rozsah souboru

S – směrodatná odchylka

- **T – test**

T- test je používán pro testování statistických hypotéz. Jedná se o rozdíl dvou průměrů.

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

$\bar{X}_1$  – 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

$t$  – testovací kritérium

Stupeň volnosti se vypočítá vztahem  $v = n_1 + n_2 - 2$ . Podle stupně volnosti je vypočítáno testovací kritérium  $t$ . Testovací kritérium  $t$  je porovnáno s kritickou hodnotou  $t(v)_p$  pro vypočítaný stupeň a zvolenou hladinu významnosti  $p$  (zde  $p=0,05$ ). Pokud je hodnota  $t$  vyšší než kritická hodnota, je rozdíl statisticky významný na hladině  $p$ . (48)

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2010. Statisticky významné údaje byly v tabulkách vyznačeny tučným písmem.

## 5. VÝSLEDKY

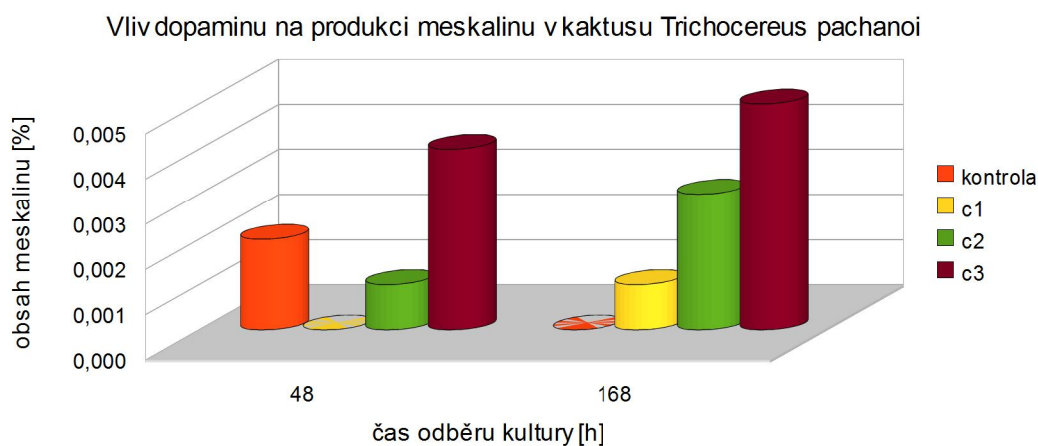
Výsledky stanovení obsahu meskalinu v suspenzní kultuře *Trichocereus pachanoi* po přidání vybraných prekurzorů. Měření obsahu proběhlo pomocí HPLC chromatografu.

### 5.1 VLIV DOPAMINU NA OBSAH MESKALINU V SUSPENZNÍ KULTUŘE *TRICHOCEREUS PACHANOI*

Tabulka č.1

koncentrace prekurzoru (mg/100ml)	čas odběru (h)	obsah meskalinu (%)
kontrola	48	0,002
	168	0,000
C <sub>1</sub> (10 mg/100ml)	48	0,000
	168	0,001
C <sub>2</sub> (20 mg/100ml)	48	0,001
	168	0,003
C <sub>3</sub> (50 mg/100ml)	48	<b>0,004</b>
	168	<b>0,005</b>

Graf č.1

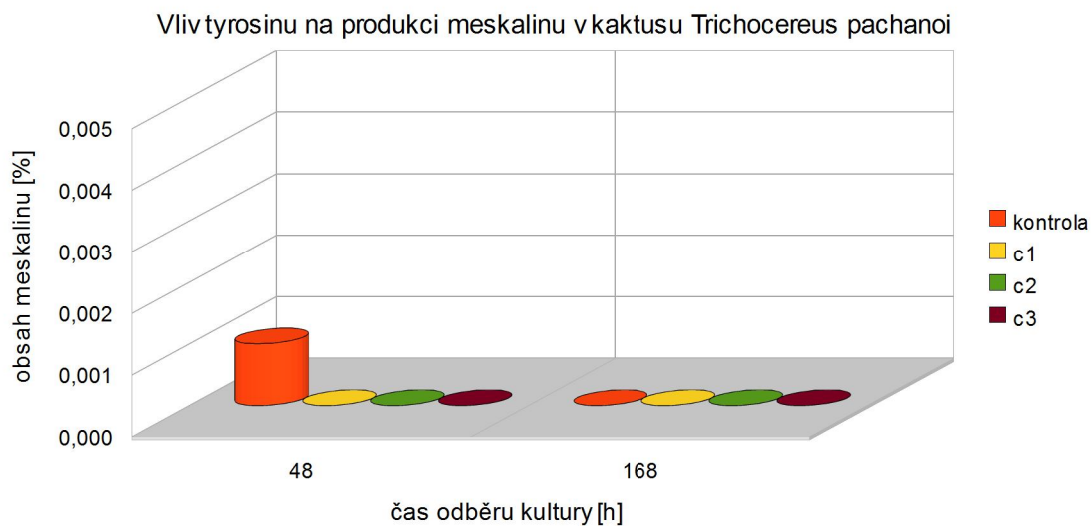


## 5.2 VLIV TYROSINU NA OBSAH MESKALINU V SUSPENZNÍ KULTUŘE *TRICHOCEREUS PACHANOI*

Tabulka č.2

koncentrace prekursoru (mg/100ml)	čas odběru (h)	obsah meskalinu (%)
kontrola	48	0,001
	168	0,000
C <sub>1</sub> (10 mg/ml)	48	0,000
	168	0,000
C <sub>2</sub> (20 mg/ml)	48	0,000
	168	0,000
C <sub>3</sub> (50 mg/ml)	48	0,000
	168	0,000

Graf č.2

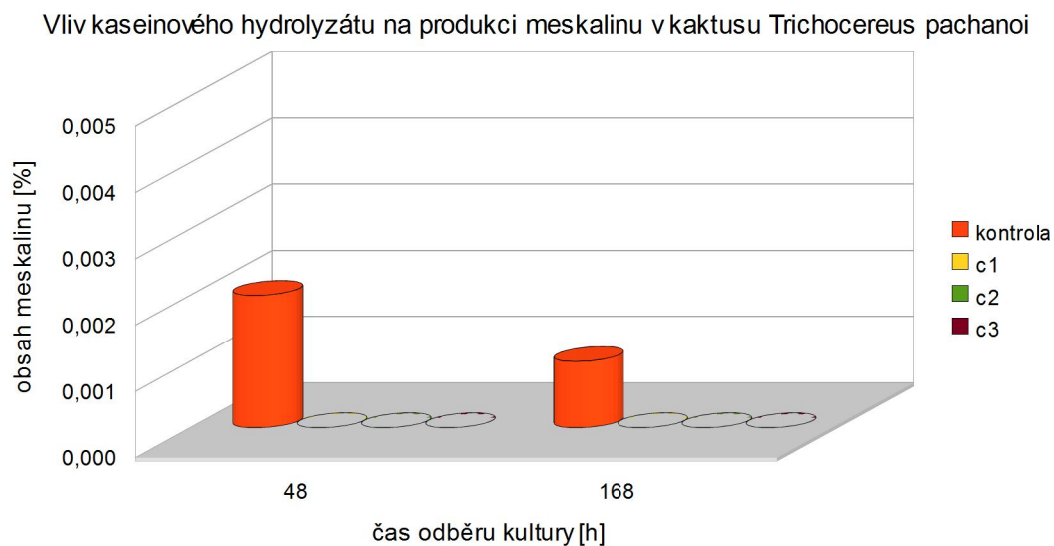


### 5.3 VLIV HYDROLYZÁTU KASEINU NA OBSAH MESKALINU V SUSPENZNÍ KULTUŘE *TRICHOCEREUS PACHANOI*

Tabulka č.3

koncentrace prekurzoru (mg/100ml)	čas odběru (h)	obsah meskalinu (%)
kontrola	48	0,002
	168	0,001
C <sub>1</sub> (60 mg/ml)	48	0,000
	168	0,000
C <sub>2</sub> (120 mg/ml)	48	0,000
	168	0,000
C <sub>3</sub> (180 mg/ml)	48	0,000
	168	0,000

Graf č.3

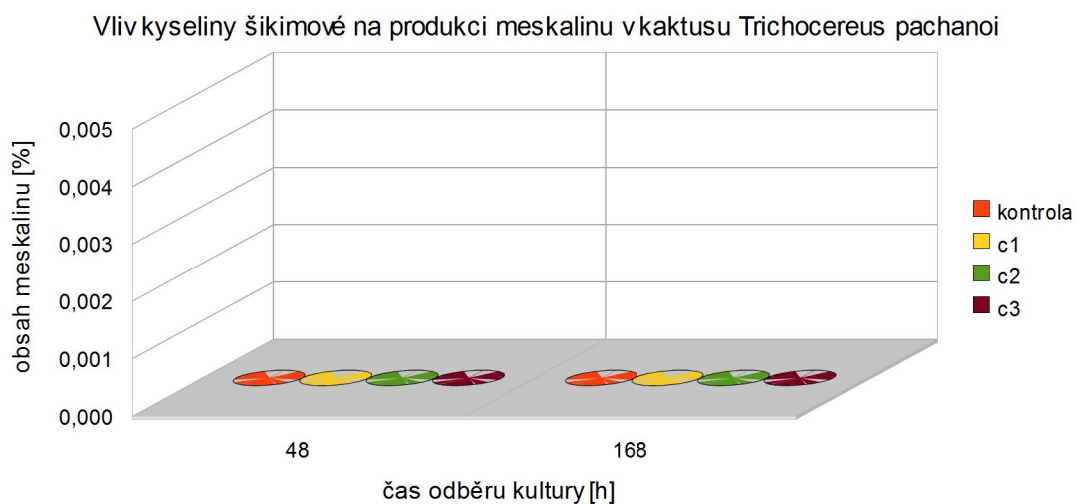


## 5.4 VLIV KYSELINY ŠIKIMOVÉ NA OBSAH MESKALINU V SUSPENZNÍ KULTUŘE *TRICHOCEREUS PACHANOI*

Tabulka č.4

koncentrace prekursoru (mg/100ml)	čas odběru (h)	obsah meskalinu (%)
kontrola	48	0,000
	168	0,000
C <sub>1</sub> (0,06 mg/100ml)	48	0,000
	168	0,000
C <sub>2</sub> (3,00 mg/100ml)	48	0,000
	168	0,000
C <sub>3</sub> (6,00 mg/100ml)	48	0,000
	168	0,000

Graf č.4



## 6. DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo seznámit se s technikami kultivace kalusových a suspenzních kultur *Trichocereus pachanoi*. Přidáním vybraných prekurzorů (dopaminu, D, L-tyrosinu, kaseinu a kyseliny šikimové) v různých koncentracích do suspenzních kultur *Trichocereus pachanoi* bylo pomocí metody HPLC následně zjištěno, zda dojde k ovlivnění produkce meskalinu *in vitro*.

Látky byly do suspenzní kultury přidávány vždy ve třech koncentracích a zároveň byla ke kontrolním kulturám přidávána voda. Vzorčky na analýzu byly odebírány po 48 a 168 hodinách.

Po přidání dopaminu do suspenzní kultury *Trichocereus pachanoi* bylo v porovnání s kontrolními roztoky pozorováno zvýšení obsahu meskalinu v kultuře. Dopamin jako prekurzor meskalinu tedy vykazoval pozitivní vliv na produkci sekundárních metabolitů. Z tabulky a grafu číslo 1 je patrná přímá úměra mezi zvyšující se koncentrací dopaminu přidaného do suspenzní kultury a vzrůstajícím obsahem meskalinu v kultuře. Nejvyšší obsah meskalinu vykazovaly kultury *Trichocereus pachanoi* s *in vitro* koncentrací dopaminu 50 mg/100ml, kde došlo ke statisticky významnému nárůstu produkce meskalinu v porovnání s kontrolními vzorky. Tato koncentrace dopaminu se tedy jeví jako nejefektivnější pro výtěžnost izolace meskalinu z kultury. Je však nutno registrovat fakt, že v kulturách s *in vitro* koncentrací dopaminu 20 mg/100ml nastal nejvyšší naměřený skokový nárůst obsahu meskalinu mezi sběrem kultury po 48 a 168 hodinách. Obsah meskalinu v kulturách analyzovaných po 168 hodinách vzrostl v porovnání s kulturami analyzovanými po 48 hodinách o 67%. Zřetelný je také obsah meskalinu v kulturách *Trichocereus pachanoi* analyzovaných po 168 hodinách kultivace s *in vitro* koncentrací dopaminu 10 mg/100ml. V porovnání s výše zmíněnými koncentracemi je však obsah meskalinu v kultuře činící 0,001% a tedy i praktický přínos této koncentrace dopaminu na ovlivnění produkce meskalinu



zanedbatelný. Lze sledovat také vztah mezi dobou kultivace suspenze kaktusu a obsahem meskalinu v kultuře. U kultur, s dobou sběru po 168 hodinách, byly chromatografem vyhodnoceny vyšší obsahy meskalinu než u kultur vyhodnocených po 48 hodinách růstu. Čím déle působí dopamin na suspenzní kulturu *Trichocereus pachanoi*, tím vyšší je obsah meskalinu *in vitro*.

Pozitivní vliv L-DOPA, prekurzoru dopaminu, na metabolismus alkaloidů byl pozorován také ve studii s kalusovou kulturou *Cephaelis ipheacacuana*. L-DOPA byl do kultury přidán v koncentraci 40 mg/l. V této kultuře byl analyzován významný nárůst produkce alkaloidu emetinu. Emetin je stejně jako L-DOPA tvořen biosyntézou kyseliny šikimové. (49)

U ostatních prekurzorů (viz. tabuky a grafy číslo 2-4) není patrné zvýšení obsahu meskalinu v kultuře. Tyrosin, hydrolyzát kaseinu a kyselina šikimová mají na kulturu *Trichocereus pachanoi* spíše inhibiční vliv, jak lze soudit z nulového obsahu meskalinu v kultuře. U hydrolyzátu kaseinu lze polemizovat o negativním ovlivnění produkce meskalinu v důsledku zvýšené koncentrace dusíku v médiu. Hydrolyzát kaseinu je totiž velmi bohatý zdroj organického dusíku. V MS médiu je však dusík pro kulturu suplementován v dostatečném množství. Mohlo tak dojít k inhibici růstu kultury. (50), (51)

Existuje studie, kde byl studován vliv hydrolyzátu kaseinu na produkci skopolaminu a hyosciaminu v explantátové kultuře *Hyoscyamus niger*. Byly použity koncentrace 0,5 g/l, 1,0 g/l a 3,0 g/l. Na produkci alkaloidů nevykazoval hydrolyzát kaseinu statisticky významný vliv. Byl ovšem pozorován významný úbytek biomasy kultury. (49)

## 7. ZÁVĚR

- Byla zvládnuta kultivace kalusových kultur *Trichocereus pachanoi*.
- Byla zvládnuta kultivace a založení suspenzních kultur *Trichocereus pachanoi* z kultur kalusových.
- Byla zvládnuta metoda HPLC pro kvantitativní a kvalitativní stanovení meskalinu v kulturách *in vitro*.
- Byly testovány vybrané prekurzory (dopamin, D,L-tyrosin, kasein a kyselina šikimová) v různých koncentracích na suspenzních kulturách *Trichocereus pachanoi* a to vzhledem k produkci meskalinu.
- HPLC analýzou suspenzních kultur *Trichocereus pachanoi* byl prokázán pozitivní vliv prekurzoru na produkci meskalinu a to pouze v případě dopaminu. Ostatní prekurzory jako D, L-tyrosin, hydrolyzát kaseinu a kyselina šikimová vykazovaly na produkci meskalinu suspenzní kulturou negativní vliv.
- Nejvyšší nárůst produkce meskalinu byl analyzován u suspenzní kultury s *in vitro* koncentrací dopaminu 50 mg/100ml po 168 h kultivace.
- U kultur kultivovaných 48 h byl analyzován nejvyšší obsah meskalinu suspenzím s *in vitro* koncentrací dopaminu 50 mg/100ml.
- Nejvyšší skokový nárůst obsahu meskalinu byl pozorován u suspenzí s *in vitro* koncentrací dopaminu 20 mg/100ml. Obsah meskalinu suspenzí kultivovaných 168 h v porovnání se suspenzemi kultivovanými 48 h zde vzrostl o 67%.
- Prekurzory D, L-tyrosin, hydrolyzát kaseinu a kyselina šikimová vykazovaly negativní vliv na produkci meskalinu. Lze jim tedy přisoudit inhibiční vliv na *in vitro* biosyntézu meskalinu.

## 8. SEZNAM TABULEK

Tabulka č.1 *Vliv dopaminu na obsah meskalinu v suspenzní kultuře Trichocereus pachanoi*..... str.44

Tabulka č.2 *Vliv tyrosinu na obsah meskalinu v suspenzní kultuře Trichocereus pachanoi*..... str.45

Tabulka č.3 *Vliv hydrolyzátu kaseinu na obsah meskalinu v suspenzní kultuře Trichocereus pachanoi*..... str.46

Tabulka č.4 *Vliv kyseliny šikimové na obsah meskalinu v suspenzní kultuře Trichocereus pachanoi*..... str.47

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č.1 *Biosyntéza meskalinu*..... str.11

Obrázek č.2 *Chromatografický záznam standardu meskalinu*..... str.41

## 10. SEZNAM GRAFŮ

Graf č.1 <i>Vliv dopaminu na obsah meskalinu v suspenzní kultuře Trichocereus pachanoi</i> .....	str.44
Graf č.2 <i>Vliv tyrosinu na obsah meskalinu v suspenzní kultuře Trichocereus pachanoi</i> .....	str.45
Graf č.3 <i>Vliv hydrolyzátu kaseinu na obsah meskalinu v suspenzní kultuře Trichocereus pachanoi</i> .....	str.46
Graf č.4 <i>Vliv kyseliny šikimové na obsah meskalinu v suspenzní kultuře Trichocereus pachanoi</i> .....	str.47

## 11. LITERATURA

- (1) **Balandrin, M., Klocke, J., Wurtele, E., Bollinger, W.:** Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, 228 (4704), 1985, s. 1154 – 1160
- (2) **Kunte, L., Gratias, J., Pavelka, P.:** *Encyklopedie kaktusů a jiných sukulentů*, Computer Press, Brno, 2011, s. 7 - 27, 205
- (3) **Valíček, P.:** *Rostlinné omamné drogy*, Start, Benešov, 2000, s. 92 – 100, 142 – 143
- (4) **Jahodář, L.:** *Farmakobotanika: semenné rostliny*, Karolinum, Praha, 2011, s. 15 - 26
- (5) **Halpern, J.H., Pope, H.G.:** Hallucinogens on the Internet: A Vast New Source of Underground Drug Information, *American Journal of Psychiatry*, 158 (3), 2001, s. 481 – 483
- (6) **Boke, N.H.:** Leaf and Areole Development in *Coryphantha*, *American Journal of Botany*, 39 (2), 1952, s. 134
- (7) **Kubitzki, K., Rohwer, J.G., Bittrich, V.:** *Flowering plants - dicotyledons: magnoliid, hamamelid and caryophyllid families*, Springer, Berlin, 1993, s. 161 – 197
- (8) **Stafford, P.:** *Encyklopedie psychedelických látek*, Volvox Globator, Praha, 1997, s. 186 – 237
- (9) **Dewick, P.M.:** *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, Wiley, Hoboken, 2008, s. 311 – 420
- (10) **Bruhn, J.G., Ei-Seedi, R.H., Stephanson, N., Beck, O., Shulgin, T.A.:** Ecstasy Analogues Found in Cacti, *Journal of Psychoactive Drugs*, 40 (2), 2008, s. 219 - 222

- (11) **Kovacic, P., Somanathan, R.:** Novel, Unifying Mechanism for Mescaline in The Central Nervous System: Electrochemistry, Catechol Redox Metabolite, Receptor, Cell Signaling and Structure Activity Relationships, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2 (4), 2009, s. 181 - 190
- (12) **Lundström, J., Agurell, S.:** A complete biosynthetic sequence from tyrosine to mescaline in two cactus species, *Tetrahedron Letters*, 10 (39), 1969, s. 3371 - 3374
- (13) **Ogunbodede, O., McCombs, D., Trout, K., Daley, P., Terry, M.:** New mescaline concentrations from 14 taxa/cultivars of *Echinopsis* spp. (Cactaceae) (“San Pedro”) and their relevance to shamanic practice, *Journal of Ethnopharmacology*, 131 (2), 2010, s. 356 - 362
- (14) **Barceloux, G.D.:** *Medical toxicology of drug abuse: synthesized chemicals and psychoactive plants*, Wiley, Hoboken, 2012, s. 944 - 949
- (15) **Ahrendt, K.A., Bergman, R.G., Ellman, J.A.:** Synthesis of a Tricyclic Mescaline Analogue by Catalytic C–H Bond Activation, *Organic Letters*, 5 (8), 2003, s. 1301 – 1303
- (16) **Hoyer, D., Clarke, E.D., Fozard, R.J., Hartig, R.P., Martin, R.G., Mylecharane, E.J., Saxena, R.P., Humprey, P.P.:** International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin), *Pharmacological Reviews*, 46 (2), 1994, Abstract
- (17) **Páleníček, T., Balíková, M., Bubeníková-Valešová, V., Horáček, J., Woertgen, C., Rotherl, D.R., Brawanski, A.:** Mescaline effects on rat behavior and its time profile in serum and brain tissue after a single subcutaneous dose, *Psychopharmacology*, 196 (1), 2007, s. 371 – 373
- (18) **Dobkin, M.:** *Trichocereus pachanoi* — A mescaline cactus used in folk healing in Peru, *Economic Botany*, 22 (2), 1968, s. 191 – 194

- (19) **Dagla, R.H.:** Plant tissue culture. *Resonance*, 17 (8), 2012, s. 759 - 767
- (20) **Sikyta, B., Dušek, J.:** *Biotechnologie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha:, 1992, s. 75 - 83
- (21) **Ponmurugan, P , Kumar, K.:** *Applications of plant tissue culture*, New Age International, New Delhi:, 2012, s. 1 – 67
- (22) **Kyte, L., Kleyn, G.J.:** *Plants from test tubes: an introduction to micropropagation*, Timber Press, Portland, 1996, s. 13 - 20
- (23) **Pollard, J.W., Walker, M.J.:** *Plant cell and tissue culture*, Humana Press, Clifton, 1990, s. 1 – 28, 49 – 56
- (24) **Reed, B.M., Tanpraser, P.:** Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures: A review of recent literature, *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1 (3), 1995, s. 137 - 142
- (25) **Waaij, D. van der, Andreas, H.A.:** Prevention of airborne contamination and cross-contamination in germ-free mice by laminar flow, *Journal of Hygiene*, 69 (1), 1971, s. 83 - 89
- (26) **Iwaguch, S., Matsumura, K., Tokuoka, Y., Wakui, S., Kawashima, N.:** Sterilization system using microwave and UV light, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25 (4), 2002, s. 299 - 304
- (27) **Chang, Ch.P., Liu, H.H., Peng, Ch.Y., Shieh, J.Y., Lan, Ch.H.:** UVR measurement of a UV germicidal lamp, *Health Physics*, 92 (3), 2007, s. 242 - 250
- (28) **University of Guelph, Plant Cell Culture Center.:** *Application of Plant Cell and Tissue Culture To Agriculture & Industry*, The University of Guelph, Guelph, 1982, s. 60 – 64



- (29) **Bhojwani, S.S., Razdan, M.K.:** *Plant Tissue Culture Theory and Practice*, Elsevier Science, Oxford, 1986, s. 511
- (30) **Edwin, F.G., Edwin, F.M.A.:** *Plant propagation by tissue culture*, Springer, Dordrecht, 2007, s. 65 - 113
- (31) **Davies, H.V., Taylor, M.A., Tiller, S.A., Witte, C.P.:** Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68 (1), 2002, s. 103-104
- (32) **Novák, F.J.:** *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*, Academia, Praha, 1990, s. 47 - 93
- (33) **Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M., Sakakibara, H.:** Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin, *Journal of Experimental Botany*, 62 (4), 2010, s. 1399 - 1409
- (34) **Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K., Sandberg, G.:** Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (21), 2004, s. 8039 - 8044
- (35) **Jaskowiak, M.A.:** Reviews of Science for Science Librarians: The Conservation of Endangered Plants Using Micropropagation, *Science*, 33 (1), 2014, s. 58 - 70
- (36) **Bentley, R.:** Secondary metabolite biosynthesis: the first century, *Critical Reviews in Biotechnology*, 19 (1), 1999, s. 1 - 40
- (37) **Dörnenburg, H., Knorr, D.:** Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, 17 (8), 1995, s. 674 - 684

- (38) **Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E.:** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science*, 161 (5), 2001, s. 839 – 851
- (39) **Pichersky, E., Gang, R.D.:** Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective, *Trends in Plant Science*, 5 (10), 2000, s. 439-445
- (40) **Bennett, N.R., Wallsgrove, M.R.:** Secondary metabolites in plant defence mechanisms, *New Phytologist*, 127 (4), 1994, s. 617-633
- (41) **Liu, J.R., Choi, D.W., Chung, H.J., Woo, S.S.:** Production of useful secondary metabolites in plants: Functional genomics approaches, *Journal of Plant Biology*, 45 (1), 2002, s. 159 - 175
- (42) **Ziaratnia, S.M., Kunert, K.J., Lall, N.:** Elicitation of 7-methyljuglone in *Drosera capensis*, *South African Journal of Botany*, 75 (1), 2009, s. 97 – 103
- (43) **Pavarini, D.P., Pavarini, S.P., Niehues, M., Lopes, N.P.:** Exogenous influences on plant secondary metabolite levels, *Animal Feed Science and Technology*, 176 (1-4), 2012, s. 5 - 16
- (44) **Świeca, M.:** Elicitation with abiotic stresses improves pro-health constituents, antioxidant potential and nutritional quality of lentil sprouts, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 2015, s. 1 – 8
- (45) **Verpoorte, R., Memelink, J.:** Engineering secondary metabolite production in plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2), 2002, s. 181 – 187
- (46) **Matkowski, A.:** Plant in vitro culture for the production of antioxidants- A review, *Biotechnology Advances*, 26 (6), 2008, s. 548 – 560
- (47) **Ptáčnicková, L.:** *Obsah alkaloidů a flavonoidů v prameničiče obecné*, Hradec Králové: Diplomová práce, FaF UK, 2012

- (48) **Klemera, P., Klemerová, V.:** *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*, Karolinum, Praha, 1997. s. 23 – 30
- (49) **Vetrichelvan, T., Kavimani, S., Elango, R., Jaykar, B.:** Effect of L-DOPA and L- methionine supplementation on bioproduction of ementine in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*, *Ancient Science of life*, 16 (1), 1996, s. 74 – 78
- (50) **Nielsen, D.R., MacDonald, J.:** *Soil-plant-nitrogen relationships*, Academic Press, New York, 1978, s. 20 - 35
- (51) **Keng, Ch.L., Ping, N.S., Bhatt, A., Hong, K.L.M.:** Detection of elicitation effect on *Hyoscyamus niger* L. root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids, *Romanian Biotechnological Letters*, 17 (3), 2012, s. 7340 - 7351

## 12. ABSTRAKT

Jednou z metod zvýšení produkce sekundárních metabolitů *in vitro* je ovlivnění explantátových kultur prekurzory. V této diplomové práci byl studován vliv prekurzorů na suspenzní kultury *Trichocereus pachanoi* vzhledem k produkci meskalinu. Jako prekurzory byly využity dopamin, D, L- tyrosin, hydrolyzát kaseinu a kyselina šikimová, které byly přidány do živného média ve třech různých koncentracích. Suspenzní kultury *Trichocereus pachanoi* s přidávanými prekurzory byly pomocí HPLC metody analyzovány na přítomnost a obsah meskalinu po 48 a 168 hodinách. Kultury byly kultivovány na médiu definovaném dle Murashigeho a Skooga.

Dopamin vykazoval pozitivní vliv na *in vitro* biosyntézu meskalinu. Nejvyšší produkce meskalinu byla analyzována u suspenzní kultury s *in vitro* koncentrací dopaminu 50 mg/100ml po 168 h kultivace. U kultur kultivovaných 48 h byl analyzován nejvyšší obsah meskalinu suspenzím s *in vitro* koncentrací dopaminu 50 mg/100ml.

Ostatní prekurzory (D, L-tyrosin, hydrolyzát kaseinu a kyselina šikimová) vykazovaly na *in vitro* biosyntézu meskalinu inhibiční vliv.

### 13. ABSTRACT

Affecting tissue cultures with precursors is one of methods that increases the production of secondary metabolites *in vitro*. This thesis deals with precursors affecting production of mescaline in suspension tissue cultures of *Trichocereus pachanoi*. As precursors dopamine, D, L-tyrosine, casein hydrolysate and shikimic acid were used. Three concentrations of these precursors were prepared. Suspension cultures with different concentrations of precursors were analysed by HPLC method after 48 and 168 hours. Murashige and Skoog medium was used for cultivation.

Mescaline biosynthesis was most affected by dopamine. The largest amount of mescaline was produced in suspension culture with the highest concentration of dopamine 50 mg/100 ml. The culture was cultivated for 168 hours. Suspension cultures that were cultivated for 48 hours produced the highest amount of mescaline with the highest concentration of dopamin 50 mg/100 ml.

The biosynthesis of mescaline was inhibited by other precursors (D, L-tyrosine, casein hydrolysate, shikimic acid).