

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmakognozie



Diplomová práce

Lucie Urbanová

**Produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách *Trichocereus pachanoi* (Cactaceae)**

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

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

Oponent: Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Hradec Králové, 2016

Datum zadání: 21.11.2014

## **Poděkování**

Děkuji PharmDr. Janu Martinovi, Ph.D. za trpělivost, pomoc, rady a odborné vedení při zpracovávání této diplomové práce a též celému kolektivu katedry farmakognozie. Děkuji také rodině a mým blízkým přátelům za vyjadřovanou 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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 19.8.2016

Lucie Urbanová

## OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. CÍL PRÁCE .....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
3.1 <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	9
3.1.1 <i>Cactaceae</i> .....	9
3.1.2 Historie .....	10
3.1.3 Botanická klasifikace .....	10
3.1.4 Botanický popis .....	10
3.1.5 Výskyt a růst .....	11
3.1.6 Droga a rituál.....	11
3.1.7 Obsahové látky.....	12
3.1.8 Meskalin .....	13
3.1.9 Biosyntéza meskalinu .....	14
3.1.10 Použití.....	15
3.2 Explantátové kultury .....	16
3.2.1 Definice pojmů a charakteristika .....	16
3.2.2 Kategorie explantátových kultur .....	17
3.2.3 Kultivace .....	18
3.2.4 Podmínky a faktory ovlivňující růst a průběh kultivace .....	20
3.2.5 Živná média .....	22
3.2.6 Způsob a možnosti využití explantátových kultur.....	27
3.2.7 Výhody a nevýhody .....	29
3.3 Sekundární metabolity .....	29
3.3.1 Sekundární metabolismus.....	29

3.3.2	Možnosti ovlivnění sekundárních metabolitů .....	30
3.4	HPLC.....	32
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
4.1	Použité vybavení.....	33
4.1.1	Chemikálie.....	33
4.1.2	Přístroje a pomůcky .....	34
4.2	Kultivace <i>in vitro</i> kultury <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	35
4.2.1	Rostlinný materiál a odvození suspenzní kultury .....	35
4.2.2	Živné médium.....	35
4.2.3	Pasážování a kultivace.....	37
4.3	Vliv prekurzorů a elicitorů na produkci sekundárních metabolitů.....	37
4.3.1	Příprava požadovaných koncentrací sledovaných látek .....	37
4.3.2	Přidání látek ke kulturám .....	39
4.4	Stanovení obsahu meskalinu.....	40
4.4.1	Sušení a extrakce vzorků .....	40
4.4.2	HPLC analýza .....	40
4.4.3	Validace HPLC analýzy.....	41
4.4.4	Statistické zpracování výsledků.....	42
5.	VÝSLEDKY.....	44
5.1	Působení kyseliny skořicové na produkci meskalinu v explantátových kulturách <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	44
5.2	Působení skořicanu sodného na produkci meskalinu v explantátových kulturách <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	45
5.3	Působení tryptofanu na produkci meskalinu v explantátových kulturách <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	46

5.4	Působení ozonu na produkci meskalinu v explantátových kulturách <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	47
5.5	Působení methylenové modři na produkci meskalinu v explantátových kulturách <i>Trichocereus pachanoi</i> .....	48
6.	DISKUSE .....	49
7.	ZÁVĚR .....	51
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	52
9.	SEZNAM TABULEK .....	52
10.	SEZNAM GRAFŮ .....	52
11.	CITOVANÁ LITERATURA.....	53
12.	ABSTRAKT .....	58
13.	ABSTRACT .....	59

# 1. ÚVOD

Příroda skrývá neuvěřitelné množství pokladů, které dokáže člověk různými způsoby využít. Záludnost občas spočívá v získání daného přírodního bohatství. Rostliny jsou zdrojem mnoha aktivních, často léčivých nebo třeba průmyslově využívaných substancí. Mnohdy jsou tyto látky, převážně sekundární metabolity, produkovány pouze v malém množství nebo dokonce i celá matečná rostlina roste jen v omezeném počtu. K získání většího množství metabolitů je tedy potřeba obrovské kvantum přírodního materiálu. Řešení přinesly biotechnologické metody, které dokáží vhodnou kultivací ušetřit velké množství materiálu a navíc byly objeveny i metody, jak zvýšit produkci metabolitů v kultivovaných kulturách. (1)

Existuje řada možností, jak rostlinné explantáty *in vitro* kultivovat a několik způsobů, jak zvýšit jejich výtěžnost. Pěstováním v umělých podmínkách se zajistí ideální přísun potřebných živin a vhodných podmínek, které stimulují růst kultury. Přidáním některých rostlinných regulátorů a jiných aktivních látek nebo změnou určitých podmínek pak může dojít i k ovlivňování chování kultur, včetně produkce metabolitů. Pro tento účel je neustále zkoumán vliv nových a nových látek na chování rostlin a rostlinných kultur. Pro pozitivní výsledek je třeba dopátrat se i konkrétní optimální koncentrace, která dokáže ovlivnit danou kulturu požadovaným a nejvýhodnějším způsobem. (2)

V této diplomové práci je pozornost věnována jihoamerickému druhu sukulentu *Trichocereus pachanoi*, který produkuje velmi silně účinnou halucinogenní látku meskalin. Rostlina nenalezla uplatnění ani tak ve farmaceutickém průmyslu, ale je velmi vyhledávána a využívána domorodými obyvateli, především šamany z indiánských kmenů. Tato diplomová práce se zabývá explantátovými kulturami *T. pachanoi*. (3)

## 2. CÍL PRÁCE

Úkolem této diplomové práce bylo provést kultivaci explantátových kultur *Trichocereus pachanoi*. Důležitou částí bylo také odvodit z kalusových kultur rostoucích na pevné agarové půdě kultury suspenzní.

Hlavním úkolem bylo stanovení vlivu vybraných prekurzorů a elicitorů (kyselina skořicová, skořican sodný, tryptofan, ozon, methylenová modř) na produkci sekundárních metabolitů v suspenzních kulturách *Trichocereus pachanoi*. Tyto látky byly použity v několika různých koncentracích a byl sledován i vliv délky jejich působení na dané kultury *in vitro*.

K určení kvantitativního a kvalitativního stanovení sekundárních metabolitů, s důrazem na meskalin, byla použita metoda HPLC, s jejímž fungováním se bylo třeba také seznámit.

Veškerá práce byla spojena s vyhledáváním informací a seznamováním se se zdroji, které se daným tématem zabývají.



### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 *Trichocereus pachanoi*

„Člověk omámený kaktusem San Pedro může nechat svého ducha  
vznášet se všemi nebeskými směry a přece zůstane, stejně jako  
kaktus v pouštní bouři, pevně zakořeněn v Zemi.“

(cit. Rätsch, 2008) (4)

##### 3.1.1 *Cactaceae*

Čeleď *Cactaceae* zahrnuje přes 2000 druhů rostlin. Kaktusy se vyskytují v rozličných velikostech a podobách. Jejich domácím prostředím byla původně převážně Severní a Jižní Amerika a západní Indie, ale postupem času byly lidmi rozšířeny do mnoha dalších států i kontinentů. (5) (6)

V reakci na extrémní podmínky se kaktusy přizpůsobily svými fyziologickými vlastnostmi. Většina kaktusů roste na poušti a jsou to sukulentní rostliny. Své zdužnatělé stonky a listy využívají k zadržování vody. Stonek je kromě rezervoáru vody také hlavní orgán fotosyntézy, která je pro kaktusy specifická. Průduchy nefungují tak jako u ostatních rostlin ve dne, kaktusy je v tuto dobu přivírají. Oxid uhličitý je přijímán až v noci a následná fotosyntéza probíhá další den. V noci také mnoho kaktusů kvete a využívají při tom opylování nočním hmyzem nebo malými zvířaty, například netopýry. (5) (6) (7)

Sukulenty našly své využití v mnoha oblastech lidského života. Nalezneme je v potravinářském průmyslu k přímé konzumaci (*Opuntia ficus-indica*), ve stavebnictví jako konstrukční materiál a také jako topivo (*Trichocereus* sp.), šťáva lze využít jako lepidlo (*Stenocereus thurberi*). Výsadbou se ochraňuje půda před erozivními vlivy (*Opuntia stricta*) a četné kaktusy jsou pěstovány pro okrasné účely. Někteří zástupci se vyznačují léčivými účinky a řada dalších motivovala vědce k syntéze nového léčiva. (8)

Čeledi *Cactaceae* náleží také několik druhů rostlin s kulturním využitím, kam můžeme zařadit *Lophophora williamsii* (Peyotl) nebo *Trichocereus pachanoi* (San

Pedro). Oba kaktusy propojuje obsažený meskalin, halucinogenní účinky a šamanské obřady. Ty se však odehrávají geograficky odděleně. Peyotl je využíván indiány v Mexiku a severním Texasu a San Pedro v Jižní Americe. (9)

### 3.1.2 Historie

Existence a určitý vztah k *Trichocereus pachanoi* jsou spojeny už k 13. století př. n. l.. Z této doby byla nalezena jeho rytina v peruánských horách. A z doby o tři století později pocházejí artefakty zobrazující kaktus ve spojení s jaguárem a kolibříkem. (3)

Není přesně známo, proč tento kaktus pojal označení „San Pedro“ dle katolického světce Svatého Petra (San Pedro ve španělském jazyce). Ale je zde vysoká pravděpodobnost propojení účinku kaktusu, jež podle léčitelů otevírá dveře do světa nadpřirozených sil, a svatého Petra, který hlídá nebeskou bránu. (4) (10) (11)

### 3.1.3 Botanická klasifikace

Říše: *Plantae*

Oddělení: *Magnoliophyta*

Třída: *Magnoliopsida*

Řád: *Caryophyllales*

Čeleď: *Cactaceae*

Podčeleď: *Cactoideae*

Rod: *Trichocereae*

Druh: *Trichocereus pachanoi*, *Echinopsis pachanoi*, kaktus San Pedro

(5) (12) (13) (14)

### 3.1.4 Botanický popis

Jedná se o téměř beztrnného zástupce sukulentních rostlin. *T. pachanoi* je tvarem do výšky rostoucí, někdy rozvětvený sloup, který dosahuje výše až šesti metrů. Může se lišit počty žeber. Nejčastěji jich má šest až osm, občas dvanáct a

vzácně jen čtyři. Čtyřžebrové jsou považovány Indiány za nejsilnější kusy, dle jejich vysvětlení symbolizují čtyři světové strany. Jeho pokožka je zprvu šedozelená, postupem stárnutí se její zbarvení mění na tmavozelené. (3) (10)

Na kaktusech vyrůstají zašpičatělá poupata, která rozkvétají v noci. Nálevkovité květy jsou 20 - 25 cm veliké a mají silně pronikavou vůni, která vábí včely. Vnitřní okvětní lístky mají bílou barvu, vnější lístky hnědočervenou a střed tvoří dlouhé nazelenalé tyčinky. Ojediněle se může vyvinout i chutný červený plod. (4) (10) (15)

### **3.1.5 Výskyt a růst**

Domácí oblastí pro *Trichocereus pachanoi* je střední část And. Nejčastěji jej nalezneme v nadmořské výšce 1800 až 3000 metrů, ale někdy též u moře. Velmi rozšířen je kromě Peru také v Ekvádoru, Bolívii a severním Chile. (3) (15) (16)

Potkat se s ním můžeme i ve vybraných botanických zahradách a u některých kaktusářských pěstitelů po celém světě. Daří se mu ve vlhkých oblastech a prosperuje na místech, kde netrpí nedostatkem slunce. (10) (15)

*Trichocereus pachanoi* roste oproti Peyotlu (*Lophophora williamsi*) relativně rychle. Přibližně půlmetrový exemplář může za půl roku zvýšit svoji výšku o deset centimetrů. Důležitou podmínkou pro růst je dostatečný příjem vody. Tato skutečnost je podmíněna původem kaktusu. Nejedná se o pouštní sukulent, ale o rostlinu pocházející z vlhkých, teplých, na déšť bohatých And. Kaktus je tedy zvyklý přijímat velké množství vody. A právě díky tomu může přežít i suché období trvající několik měsíců. (10) (15)

### **3.1.6 Droga a rituál**

Zelená pokožka kaktusu se zpracovává na suchý prášek obsahující meskalin. Prášek je světle zelené barvy a velmi hořké chuti. Využívá se i kaktusová dužina, a to buď čerstvá nebo též sušená. (4) (10)

Tato rostlina má hlavní význam v andském šamanismu. Odvar z *T. pachanoi* hraje nejdůležitější roli v indiánských rituálech. Užívaný nápoj se připraví povařením nakrájených plátků kaktusu ve vodě (cca 200 g/1 l) po několik hodin. Tekutina se

vyvaří až na čtvrtinu původního objemu vody. Občas se do nápoje přidávají ještě další rostliny pro zvýšení některých účinků. Těmito bylinami může být např. koka (*Erythroxylum coca*), durman (*Datura* sp.) či tzv. andělské trubky (*Brugmansia candida*). (4) (11) (17)

Pacient i léčitel vypijí připravený nápoj a poté léčitel pod vlivem kaktusu a za doprovodu písní a modliteb diagnostikuje onemocnění. Samotný kaktus zde neslouží k přímému léčení nemoci, ale k předpovědění další bylinné léčby, kterou léčitel na základě vizí pacientovi doporučí. (17)

### 3.1.7 Obsahové látky

V *Trichocereus pachanoi* je nalezeno velké množství sekundárních metabolitů. Některé z těchto látek jsou totožné se zastoupením v příbuzném druhu *Lophophora williamsii*, ale celkové chemické složení a farmakologické vlastnosti těchto dvou kaktusů nejsou zcela totožné. *Trichocereus pachanoi* obsahuje hlavně meskalin a související fenylethylaminy, zatímco *Lophophora williamsii* nabízí směs meskalinu a řady tetrahydroisochinolinových alkaloidů. (18)

Nalezenými alkaloidy jsou například tyramin, 3-methoxytyramin, anhalonidin, 3,4-dimethoxyfenylethylamin a 4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenylethylamin. Objevené byly také některé triterpeny jako pachanol A, B a C a bridgesigenin C. (19) (20)

V *Trichocereus pachanoi* se vyskytuje alkaloid hordenin, který je zajímavý svým antimikrobiálním působením. Má vliv na široké spektrum bakterií a s pravděpodobností je při podání drogy příčinou rychlého hojení ran. Další alkaloid pellotin se vyznačuje sedativními účinky, způsobuje ospalost, sníženou chuť k činností, bradykardii a hypotenzi. (15) (19) (21)

Obsah sekundárních látek zahrnuje také lophophin, 3,4-dimethoxyfenylethylamin (DMPEA, homopiperonylamin) a ve stopovém množství lobivin. Účinky lophophinu jsou popisovány jako nenásilné zvednutí nálady, navození euforie a zlepšení vizuálního vnímání, především barvocitu. Předběžné pokusy ukázaly, že lophophin vykazuje i určitou psychoaktivitu. (18)

Některé z obsažených sloučenin jsou sympatomimetika. Ostatní látky při samostatném užití nekorespondují zřejmým účinkem. Není však vyloučen synergický vliv na kvalitativní stránku halucinací v kombinaci s meskalinem. (11)

### 3.1.8 Meskalin

Meskalin je alkaloid známý pro vizuální halucinace a změněný stav vědomí. Strukturou se řadí mezi protokaloidy. Tyto látky nemají dusík začleněný do heterocyklu, ten je u nich součástí postranního řetězce. Patří mezi fenylalkylaminy, konkrétně fenylethylaminové deriváty. (11) (22)

Methoxylový postranní řetězec je patrně zodpovědný za halucinogenní účinky a byl nalezen i v dalších známých halucinogenech. Bylo také dokázáno, že po přidání dalších methoxylových skupin se halucinogenní účinky meskalinových analogů zvyšují. (23)

Bylo zjištěno, že *Trichocereus pachanoi* může obsahovat od 0,33 % do 2,375 % meskalinu v sušině. Rozdíly v obsahu mohou být důsledkem různých faktorů, které na rostliny působí. Na ovlivnění se ve velké míře podílí prostředí, ve kterém kaktusy vyrůstají. Prostředí se může lišit teplotami, intenzitou srážek, nadmořskou výškou i půdními podmínkami. Tyto faktory úzce souvisí s geografickým výskytem kaktusů. Bezvýznamné není ani rozlišení mezi volně rostoucími a kultivovanými rostlinami. Velký dopad má rozhodně také vegetační období. (8) (11) (24) (25)

Vzhledem k nízké rozpustnosti molekuly v lipidech prochází meskalin do mozku skrz hematoencefalickou bariéru špatně, přibližně jen kolem 2 % podané dávky. Z toho plyne potřeba vyššího množství látky k vyvolání účinku. (15) (21)

V centrálním nervovém systému působí meskalin jako vysoce selektivní agonista serotoninových receptorů 5-HT<sub>2</sub>, konkrétně podtypů 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> a 5-HT<sub>2C</sub>. Působení na tyto receptory je příčinou halucinogenních a psychotických účinků. Brzy po aplikaci meskalinu nastupuje nevolnost, závrať a zvracení. Po 2 - 4 hodinách po užití se tyto účinky vytratí a následují halucinogenní účinky, které trvají obvykle několik hodin. Halucinace jsou doprovázeny změnou vnímání času a prostoru, špatně identifikovatelnou emoční kondicí a depersonifikací. Často je tento

stav popisován znečitlivěním, pocitem odloučení od těla a létáním. U osob se dostavuje paranoia bez zaznamenaného záchvatu, často parestézie. Jsou prokázány změny ve vnímání barev, tvarů a hlášené jsou i bolesti hlavy, některé s několikadenním trváním. (3) (15) (26)

Na periferní nervový systém působí svou sympatomimetickou aktivitou. Tato aktivita zahrnuje mydriázu, pocení a psychomotorickou agitaci, včetně příležitostných křečí a třesu. S periferním systémem souvisí též výskyt hypertenze a tachykardie. (26)

Čtyřnásobně zvyšuje uvolňování prolaktinu a stimuluje sekreci růstového hormonu. V malé míře snižuje glomerulární filtraci a zadržuje v těle organický fosfor. Tento účinek však nezpůsobuje dlouhodobou renální insuficienci. Po požití se projevuje světloplachost. V průběhu těhotenství hrozí teratogenní účinky. (11) (21) (26)

### **3.1.9 Biosyntéza meskalinu**

V mnoha biosyntézách alkaloidů jsou jako prekurzory využity aromatické aminokyseliny, které jsou vytvořeny šikimátovou cestou z cukerných metabolitů. (27) (28)

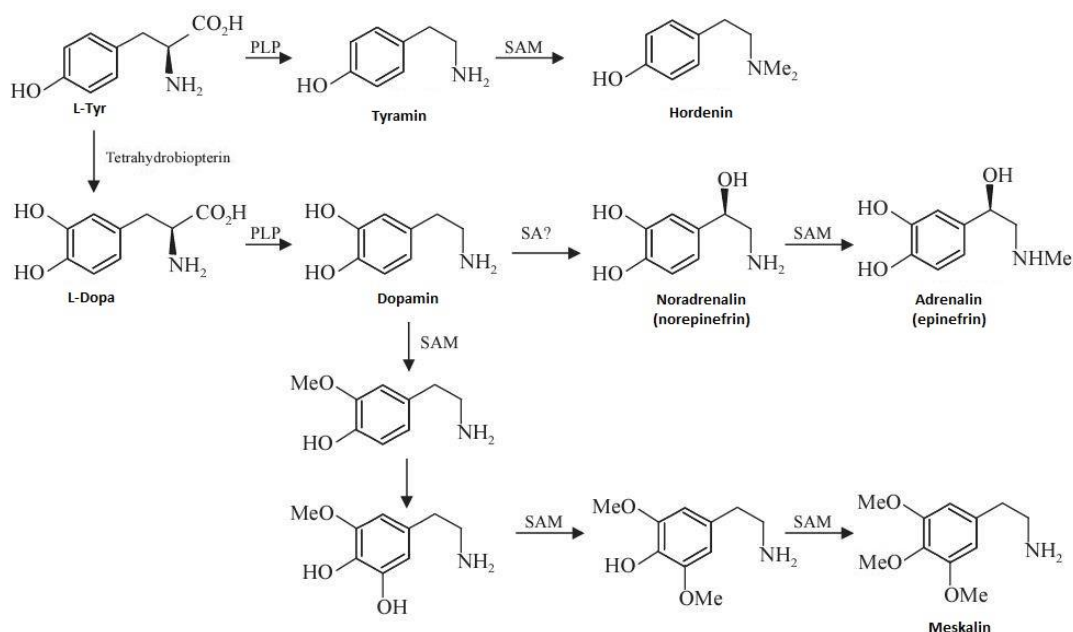
Základním prekurzorem pro biosyntézu meskalinu je aminokyselina tyrosin. Tyrosin prochází oxidačním dějem a vzniká L-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Tento intermediát se za pomoci koenzymu pyridoxalfosfátu dekarboxyluje na dopamin, který je hydroxylován na 3,4,5-trihydroxyfenylethylamin. Následuje O-methylace s využitím S-adenosylmethioninu. Přes meziprodukty 3-methoxy-4-hydroxyfenylethylamin, 3,4-dihydroxy-5-methoxyfenylethylamin a 3,5-dimethoxy-4-hydroxyfenylethylamin vzniká meskalin (3,4,5-trimethoxyfenylethylamin). (19) (29) (30) (31)

Jinou možností biosyntézy je využít jako výchozí prekurzor tyramin, který je do řetězce začleněn lépe než L-DOPA a z něhož se také tvoří intermediát dopamin. Tyramin vzniká dekarboxylací tyrosinu a pokračování dráhy od dopaminu je stejné jako v předchozí dráze. (31)

Meskalin jako psychedelická látka byl extrahován a izolován prvně v roce 1896. Jeho první chemická syntéza se připisuje k roku 1919. Meskalin v čistě

krystalické podobě patří k nejvzácnějším psychedelikům, často se lze setkat s klamným podáním jiné substance místo meskalinu. (9)

Obrázek 1 - Biosyntéza hordeninu a meskalinu



Zdroj: Kar Ashutosh, *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology* (29) – provedena oprava u vzorce meskalinu a překlad biosyntézy

### 3.1.10 Použití

Kaktus je využíván především při šamanských rituálech. V těch slouží k účelům diagnózy onemocnění a předepsání vhodné léčby, k lokalizaci lidí a věcí v čase a prostoru a k věštění. V peruánském lidovém léčitelství našel částečné uplatnění jako afrodisiakum, tonikum a jako léčba některých nemocí včetně alkoholismu a šílenství. Využití v západní medicíně či v homeopatických přípravcích zatím nenašel. (3) (10) (11)

Lze ho však najít na četných amerických zahradách, kde je ho využíváno jako živých plotů a okrasných rostlin. (4) (24)

Domorodci se dokázali 500 let bránit léčebným praktikám západní medicíny a tím zachovali zmíněnou peruánskou tradici léčby. (14)

## 3.2 Explantátové kultury

### 3.2.1 Definice pojmů a charakteristika

Explantátem je označena izolovaná část rostliny, která je asepticky kultivována za definovaných a řízených podmínek *in vitro*. Jedná se o vyjmuté celé rostlinné orgány či jejich části, meristemická pletiva, rostlinné buňky nebo protoplasty. Rostlina může být pro potřebný odběr již sterilně vypěstována nebo minimálně povrchově ošetřena a zbavena choroboplodných zárodků a mikroorganismů. Kultivace explantátových kultur probíhá za využití pevného či kapalného média. Podmínky musí zajistit dostatečný přísun živin a přístup plynů (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>), ideální pH média a vhodnou teplotu, vlhkost a osvětlení. (1) (2) (32)

Při kultivaci se využívá nepohlavního neboli vegetativního rozmnožování rostlin. V *in vivo* podmínkách dochází k této reprodukci oddenky, cibulkami, výhonky, hlízami nebo pupeny. Nové rostliny vznikají dotvořením chybějících orgánů. V *in vitro* podmínkách se využívá explantátových kultur. Díky totipotenci rostlinných buněk může dojít k regeneraci rostliny. Tato schopnost umožňuje i diferencovaným buňkám obsahujícím kompletní genetickou informaci vývoj jakéhokoliv pletiva nebo i celého organismu rostliny. Jedná se o rozdílné využití genetického materiálu, kde jsou určité oblasti genomu aktivovány a inaktivovány. Pro aktivaci neprojevené vlastnosti je často potřeba dosáhnout specifických podmínek. V *in vitro* kultivaci lze docílit různě náročných podmínek, projít dediferenciací a umožnit tak obnovu dělení buněk a případně vývin nové organizované struktury. Tímto postupem se vždy zachová genotyp původní rostliny. Jedná se tedy o klony matečné rostliny. (1) (33) (34)



### 3.2.2 Kategorie explantátových kultur

Explantátové kultury lze morfologicky charakterizovat a roztřídit do následujících pěti kategorií:

- **Orgánová kultura**

Tato *in vitro* kultivovaná kultura je zastoupena celými orgánovými systémy, jednotlivými orgány nebo jen jejich částmi. Je podpořena jejich diferenciací a v podstatě zachována stavba a funkce. (35)

- **Kalusová kultura**

Kalus je neorganizovaně rostoucí protoplazmatická buněčná hmota na pevné či kapalně živné půdě. Rostlinou je tvořený jako hojivé pletivo a využíváný při regeneraci. Tato kultura je odvozována z rozličných explantátů, kupříkladu z části stonku, listu, kořenu apod. Za využití třepačky může být použita k vytvoření suspenzní kultury v kapalném médiu. (2) (34) (36)

- **Suspenzní kultura**

Suspenzní kultura vzniká přenesením malých částí kalusu do tekutého média. Suspenze je tvořena jednotlivými oddělenými buňkami nebo buněčnými agregáty. Vyžaduje dobré míchání a provzdušňování, k čemuž se využívá třepačka nebo roller. Pohyb média zajišťuje také rozpad buněčných shluků. Díky lepšímu kontaktu s médiem je u ní obvyklý rychlejší růst buněk. (2) (32)

- **Buněčná kultura**

Kultura je tvořena samostatnými a identifikovatelnými buňkami. (35)

- **Protoplastová kultura**

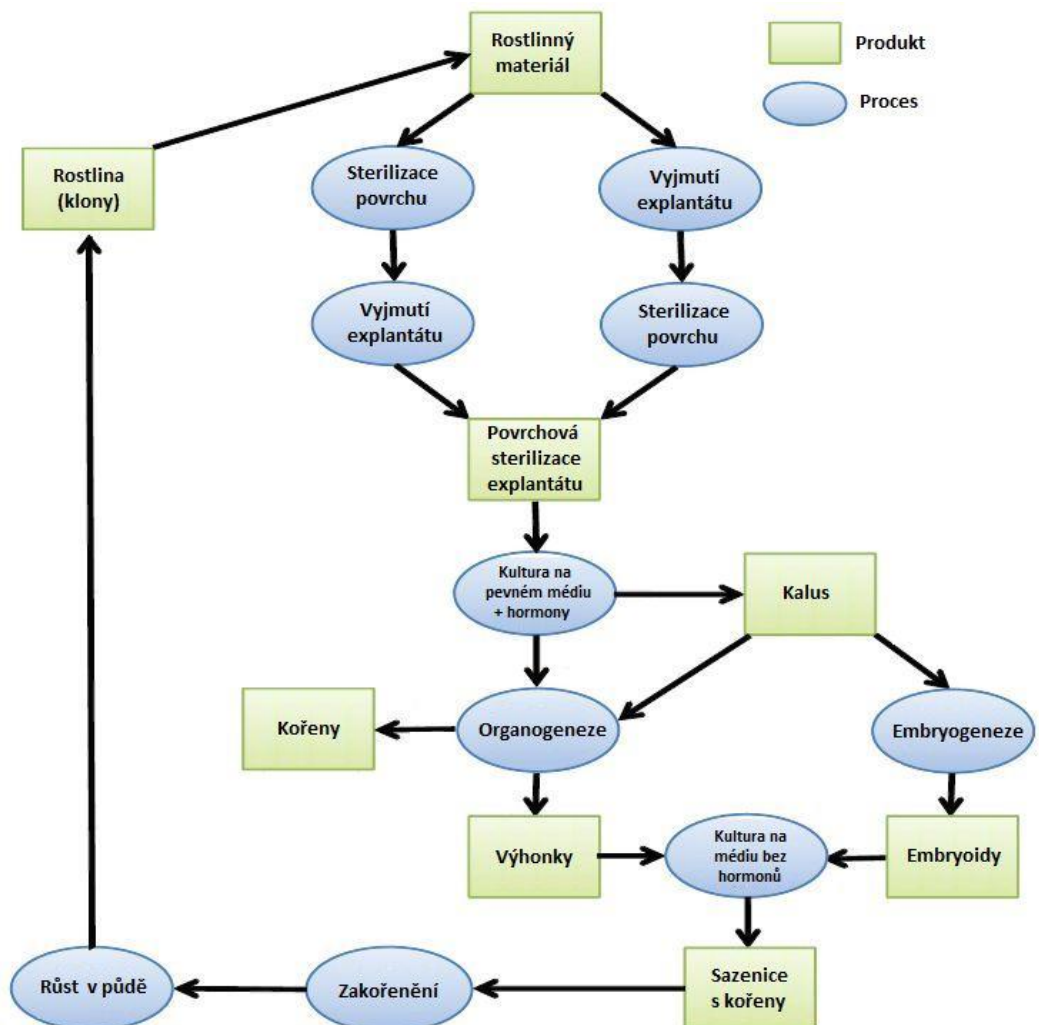
Protoplast je buňka zbavená buněčné stěny. Buněčný obsah je tedy od vnějšího prostředí oddělen pouze plazmatickou membránou. Buněčná stěna je odstraněna mechanicky, častěji však enzymaticky. Protoplasty jsou nejčastěji izolovány z buněk listového mezofylu, kalusu či buněčné suspenze. (2) (35)

- **Embryonální kultura**

Jedná se o druh tkáňové kultury, která se používá pro vývoj embrya v médiu z oplozeného vajíčka, tedy zygoty. V případě somatické embryogeneze je užito pylových zrn, endospermu či částí klíčících rostlin. Rostlina se poté vyvíjí přímo z embrya nebo nepřímo prostřednictvím produkce kalusu s následným vývojem výhonků a kořenů. (2) (32)

### 3.2.3 Kultivace

Obrázek 2 - Proces kultivace



Přeloženo z: Hussain Altaf, a další, *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (32)

V první řadě je potřeba zajistit kvalitní matečnou rostlinu, ze které je odebrán výchozí materiál pro explantátovou kulturu. Mělo by se jednat o zdravou silnou rostlinu, nejvhodněji pěstovanou *ex vitro* v optimálních podmínkách. Tím se minimalizuje riziko kontaminace *in vitro* kultury a zvyšuje pravděpodobnost úspěchu. (2) (32)

Abychom získali vhodnou primokulturu, musí odebíraný explantát projít sterilizací. Ke sterilizačnímu procesu se využívá tekoucí voda a povrchově desinfekční přípravky, někdy také termoterapie. Termoterapie eliminuje viry a pracuje na principu několikadenní až několikátýdenní kultivace za zvýšené teploty. Používané desinfekční roztoky mají bakteriocidní a fungicidní vlastnosti a nesmějí poškozovat rostlinná pletiva. Explantát se nejprve omyje v saponátu, následně se řádně 10-30 minut proplachuje pod tekoucí vodou a poté se ponoří do desinfekčního roztoku. Mezi nejčastěji používané prostředky patří chlornan sodný (savo), chlornan vápenatý, etanol nebo chlorid rtuťnatý. Po potřebné době působení se roztok slije a explantát se minimálně třikrát propere ve sterilní destilované vodě. K efektivnějšímu propírání se využije třepačky. (2) (32) (37)

V případě endogenní kontaminace nejsou výše uvedené postupy účinné a je potřeba zahrnout do ošetření explantátu antibiotika. Ta jsou aplikována přímo na povrch explantátu nebo do média primokultury. (2)

Ošetřené explantáty jsou přeneseny na povrch tuhého média, případně do tekutého média. Inkubace probíhá při teplotě 23 až 28°C. (1) (2)

Buňky v médiu se množí, narůstají a vytvářejí tzv. kalus (neorganizovanou buněčnou hmotu). Rostlinný materiál vyčerpává z živné půdy obsažené látky a je potřeba jej opakovaně přenášet na média čerstvá. Tento proces je označen jako pasážování. (1) (2)

Z kalusové kultury může být snadno odvozena kultura suspenzní. Vzniká přenesením části rozdrobněného kalusu do tekutého média pro kalusové kultury. To má obvykle stejné složení s výjimkou nepřítomnosti zpevňujících látek. (38)

### 3.2.4 Podmínky a faktory ovlivňující růst a průběh kultivace

K úspěšné a výnosné kultivaci požadovaných explantátových kultur je nutno zajistit obecné i specifické podmínky.

- **Zajištění sterilních podmínek**

Mezi kontaminující činitele jsou zahrnuty bakterie, viry, plísně, kvasinky, roztoči a některé druhy hmyzu. Převážná část bakteriální kontaminace *in vitro* podmínkách je způsobena nedostatečnou sterilizací explantátů, médií, kultivačních nádob a nástrojů nebo vzniká při manipulaci s rostlinným materiálem v daném prostředí. Důsledkem kontaminace může být například změna fyziologických nebo reprodukčních funkcí a v případě pomíjení může vést k chybným závěrům studií. Dojde tedy k znehodnocení materiálu. (39)

Naprosto automaticky se mezi preventivní činnosti řadí důkladné mytí a oplachování skla, vysoušení v horkovzdušném sterilizátoru a nakonec i jeho vhodné skladování. Horkovzdušný sterilizátor se využívá také ke sterilizaci kovových nástrojů zabalených do alobalu a to při vystavení teplotě 130 - 170°C po několik hodin. Sterilizovat předměty je možné také v mikrovlnné troubě. (2) (40)

Autokláv patří neodmyslitelně mezi vybavení laboratoře. Je využit ke sterilizaci různých laboratorních pomůcek, ale především ke sterilizaci médií. Proces probíhá za teploty 121°C a přetlaku 100 kPa. Trvá v závislosti na objemu média, většinou 15 - 20 minut. Sterilizace živných roztoků je možné dosáhnout také filtrací. Filtrace se užívá u tekutých médií obsahujících termolabilní složky jako například proteiny nebo některé vitamíny. Pracuje se se speciálními membránovými filtry s póry menšími než 0,2  $\mu\text{m}$ . (2)

Je zapotřebí zajistit též čistotu a sterilitu prostředí, ve kterém dochází k práci s rostlinným materiálem a explantátovými kulturami. Očkovací box je nejvhodnější sterilizovat prostřednictvím ultrafialového záření použitím germicidní zářivky. UV světlo je škodlivé pro lidské oči, při jeho působení nesmí být v místnosti přítomni lidé. V dosahu záření se nesmí nacházet ani žádné kultury, neboť rostliny poté hynou. Stěny očkovací místnosti se omývají bakteriocidními a fungicidními prostředky. Nejprve se spustí laminární proudění vzduchu přes HEPA filtry, které

zachycují částice od velikosti 0,3  $\mu\text{m}$  a 15 minut před začátkem práce se otře vnitřek boxu 95% etanolem. (2) (40)

- **Teplota**

Teplota pro kultivaci rostlin se pohybuje v rozmezí 23 až 28°C. Při nadměrně nízké nebo naopak příliš vysoké teplotě se růst zastaví. Výše teploty má vliv i na relativní vlhkost. Regulace musí být zajištěna pomocí klimatizačních zařízení a ventilátorů. Otevření okna v kultivační místnosti je naprosto vyloučené kvůli hrozící kontaminaci prostor v letním období a vlhkostním problémům v období zimním. (1) (33) (40)

- **Světlo**

Důležitou roli hraje intenzita, kvalita a fotoperioda světla. Některé rostliny jsou úmyslně kultivovány ve tmě, většina však potřebuje osvětlení. Dodržování určité fotoperiody, střídání určitých časových úseků světla, se zajistí automatickými časovači. (33) (34) (40)

- **pH**

Hodnota pH média je také důležitá. Ovlivňuje růst rostlin i aktivitu rostlinných regulátorů. Hodnota pH živné půdy nebo roztoku se upraví mezi hodnoty 5,4 - 5,8. (32)

- **Explantát**

Kromě předchozích podmínek se na kultivaci odráží i samotný explantát. Záleží na celkové kvalitě matečné rostliny a orgánu, ze kterého explantát pochází, na období odběru a stádiu rostliny, na genotypu i velikosti explantátu. (34)

- **Médium**

Živná půda nebo roztok jsou důležitým zdrojem živin potřebných pro úspěšný růst a vývoj rostlin. Médium je složeno převážně z makroelementů, mikroelementů, vitaminů, dusíku, růstových regulátorů a dalších látek. Podrobnějšímu popisu jsou věnovány následující řádky. (32)

### 3.2.5 Živná média

Média patří mezi nejdůležitější faktory zasahující do růstu a morfogeneze tkáňových kultur. Jejich složení ovlivňuje celý proces kultivace. Pro maximální rychlost růstu je potřeba zajistit optimální koncentrace jednotlivých živin. Tyto hodnoty se mezi jednotlivými rostlinnými druhy liší. (2) (41)

Ve srovnání s kultivací na pevné agarové půdě poskytuje suspenzní kultura v tekutém médiu mnohem rychlejší růst. Růst je navíc rovnoměrný, protože médium obklopuje buňky ze všech stran. (29)

K nejčastěji využívaným médiím se řadí médium podle Whitea, Gamborga, Murashigeho a Skooga či Shenkovo a Hildebrantovo medium.

V médiích jsou zpravidla obsaženy následující složky:

#### Minerální látky

- **Makroelementy**

Dusík, draslík, hořčík, vápník, fosfor a síra jsou pro živná média nejdůležitější prvky a řadí se mezi nejvíce zastoupené prvky nutné pro vývoj rostliny. Média by měla obsahovat minimálně 25 - 60 mM anorganického dusíku. Nejlepších výsledků je dosaženo, pokud je v médiu přítomen dusík jak v podobě amonných solí nebo dusičnanů, tak organických aminokyselin, kterými je například prolin, glutamin nebo kaseinový hydrolyzát. (2) (40)

Vápník je kofaktorem velké části enzymů a také je nepostradatelný v syntéze buněčné stěny. Jeho nedostatek má za následek nekrózu konečků výhonků. Enzymatická funkce je ovlivňována též hořčíkem. Síra a fosfor se podílejí na struktuře rostlinných sloučenin. Síra je součástí několika aminokyselin, fosfor nukleových kyselin. (2) (40)

- **Mikroelementy**

Mezi nezbytné stopové prvky pro vývoj rostlinných buněk a tkání řadíme železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Mohou být zastoupeny i kobalt, jód, sodík a chlór, ale tyto prvky nejsou pro růst vždy nutné. Železo má podstatnou

úlohu v syntéze chlorofylu a v mnoha oxidačně - redukčních reakcích. Při přípravě médií se však vyskytují problémy s jeho obtížným rozpouštěním a sklonem k tvorbě sraženin. Tato reakce je podmíněna zásaditým pH. Řešením je užití železa v podobě chelátů, které železo stabilizují a rozšiřují pracovní rozsah pH. Nejpoužívanějším je železnatý komplex ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), protože není toxický a nabízí široký rozsah pH. (2) (40) (41)

Mangan, zinek a měď jsou podstatné pro enzymatickou činnost. Bor se uplatňuje v biosyntéze ligninu a metabolismu fenolických kyselin. Molybden se činí v přeměně dusičnanů na amonné ionty. (40)

### **Organické látky**

- **Zdroj uhlíku a energie**

Převážná část tkáňových kultur se vyživuje heterotrofně, autotrofní schopnost výživy je značně redukována. Explantátové kultury tudíž musí přijímat potřebný uhlík z přítomných organických sloučenin. Pro tento účel jsou do média přidávány sacharidy. Nejběžněji je to sacharóza, případně fruktóza nebo glukóza. Ostatní sacharidy jsou méně účinné. Koncentrace sacharidů v médiu se pohybuje kolem 20 - 40 g.l<sup>-1</sup>. Sterilizace média se sacharózou je výhodnější autoklavováním než filtrací, protože se sacharóza částečně hydrolyzuje na glukózu a fruktózu. Tyto cukry jsou kulturami efektivněji využitelné. Navíc sacharidy v médiu působí jako osmotické činidlo. (2) (40) (41)

- **Vitaminy a myo-inositol**

Vitaminy rostliny využívají v řadě metabolických procesů jako katalyzátory. Potřebné vitaminy si umí běžná rostlina sama vyrobit. Do médií se musí nezbytné vitaminy dodat. Jediný thiamin (vitamin B<sub>1</sub>) je pro vývoj tkáňových kultur zcela nezbytný. Je zapojený v metabolismu sacharidů a v biosyntéze některých aminokyselin. Ostatní vitaminy, kterými jsou například niacin (kyselina nikotinová) a pyridoxin (vitamin B<sub>6</sub>), jsou do některých médií také přidávány, ale nejsou tak důležité. Výsledné koncentrace vitaminů jsou obvykle velmi nízké. (2) (40)

Myo-inositol je strukturou cukerný alkohol, který není podstatný pro růst explantátů. Je však do většiny médií přidáván, protože může *in vitro* reakce podporovat. Pravděpodobně se uplatňuje v buněčném dělení. (40) (41)

- **Aminokyseliny**

Všechny potřebné aminokyseliny jsou buňkami normálně syntetizovány. Pokud se však jedná o buněčnou suspenzi nebo protoplasty, je vhodné některé aminokyseliny dodat. Jejich přítomnost může podněcovat růst explantátů. Aminokyseliny mají pro buňky funkci rychlejšího zdroje dusíku. Nejpoužívanější směsí aminokyselin je hydrolyzát kaseinu. Příliš vysoké koncentrace aminokyselin ale mohou růst naopak inhibovat, takže je třeba stanovit správné dodávané množství. (2)

- **Aktivní uhlí**

Příležitostně se do živných médií přidává aktivní uhlí, které se může projevat jak stimulačním, tak inhibičním účinkem na růst explantátových kultur. Stimulace je způsobena schopností vázat vyprodukované toxické sloučeniny explantátu. Inhibice růstu závisí na pohlčení růstových regulátorů. (2)

### **Zpevňující látky**

Pro přípravu tuhých živných půd se využívají gelující látky. Nevýhodou pevných médií je pomalejší růst buněk oproti suspenzní kultuře, protože explantátová kultura nepřichází do kontaktu s médiem celým svým povrchem. Výhodou jsou nižší nároky na podmínky, protože nemusí docházet k nepřetržitému provzdušňování a míchání tak jako u médií tekutých. (2) (32)

Nejčastěji je používán polysacharid agar produkovaný mořskými řasami nazývanými ruduchy. Agar získává po přidání vody při 60 - 100°C tekutou podobu a při 45°C tuhne na gel. Ohlídat se musí také acidobazické podmínky, protože při hodnotě pH nižší než 4,5 ztrácí pevnou podobu. Obrovskou výhodou je jeho inertnost vůči ostatním složkám média a odolnost vůči rostlinným enzymům. Musí se však zajistit správná tuhost média. Při vytvoření příliš měkké půdy mohou



explantáty zeskelnatět z důvodu vysoké hydratace, naopak příliš tvrdé médium zpomalí růst. (40)

Dalšími možnými substancemi mohou být látky syntetické, které zastupuje agaróza, gelrit nebo phytigel. Lze také využít kultivace explantátů na můstcích z filtračního papíru. V takovém případě není využito pevného média. (2)

### **Regulátory rostlinného růstu**

Regulátory růstu jsou rostlinné hormony, které ovlivňují chování explantátových kultur. Působit mohou odděleně nebo mohou vzájemně spolupracovat. Efekt závisí nejen na vybraném regulátoru, ale též na jeho koncentraci a vzájemném poměru s dalšími regulátory. Tyto regulátory jsou určeny pouze pro laboratorní účely, přípravu tkáňových kultur a rostlinný výzkum. Na vyspělých rostlinách se neužívají. (40) (42)

Růstové regulátory lze zařadit do několika skupin:

- **Auxiny**

Auxiny jsou obvykle využívány v tkáňových kulturách k zvýšení kalusové produkce a buněčného růstu. Podporují vývoj nových výhonků a kořenů, růst apikálních meristémů a podněcují somatickou embryogenezi. Mezi nejčastěji přidávané auxiny se řadí kyselina dichlorfenoxycetová (2,4-D), kyselina indolylaceticá (IAA), kyselina naftylaceticá (NAA) a kyselina indolylmáslá (IBA). (2) (41)

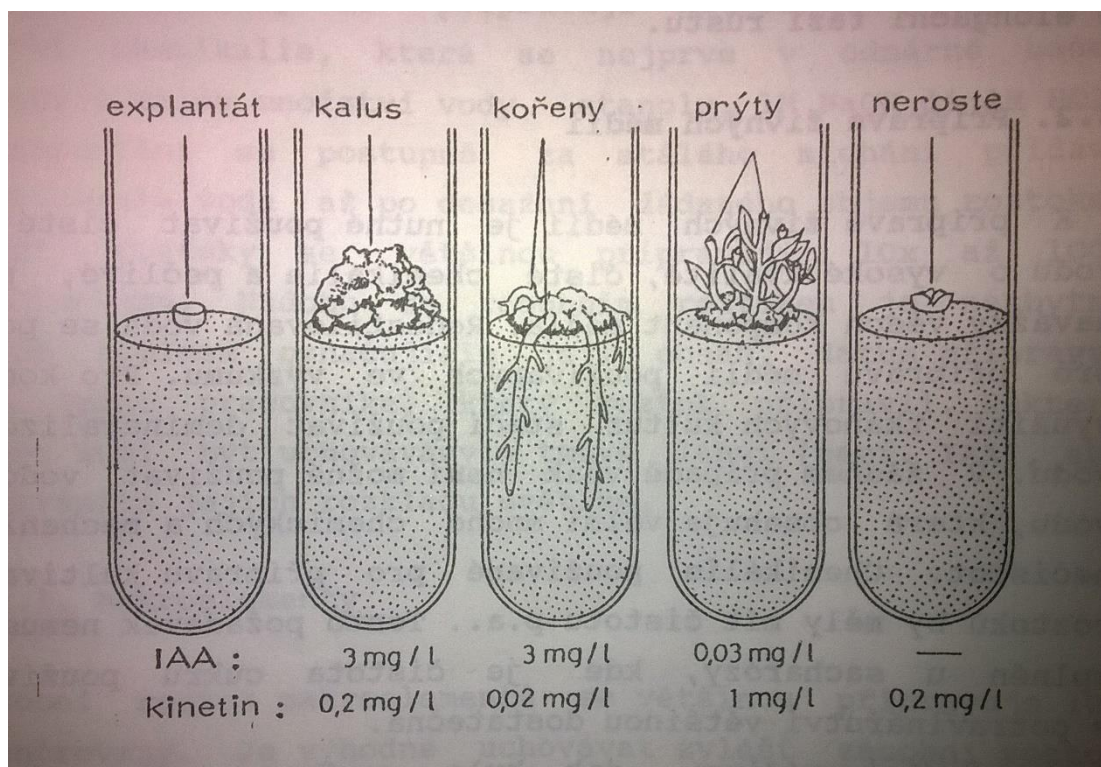
- **Cytokininy**

Využívají se díky schopnosti stimulovat buněčné dělení, podnítit tvorbu prýtlů a naopak inhibovat tvorbu kořenů. Nejběžnější cytokininy jsou nativní zeatin a 6-dimethylaminopurin (2iP) a synteticky připravený benzylaminopurin (BAP) a furfurylaminopurin (kinin). (2)

Do médií je přidávána většinou kombinace auxinů a cytokininů. Poměr auxinů a cytokininů určuje charakter vyvolané organogeneze, tvorby kořenů nebo prýtlů. Pokud množství auxinu převyšuje přítomný cytokinin, dochází v explantátu

k tvorbě kalusu. V případě ještě vyššího poměru se v explantátové kultuře objevují kořeny. Jestliže je však poměr opačný a převažují cytokininy, je stimulována tvorba prýtlů. Pokud není auxin přítomen vůbec, nedochází k žádné změně, explantát neroste (viz obrázek 3). Jejich spolupráce má vliv jak na dediferenciaci, tak novou diferenciaci. Ovlivňují především apikální dominanci. To v případě auxinů znamená, že vrcholový pupen je stimulován k růstu a vývoj postranních pupenů je inhibován, zatímco cytokininy fungují přesně opačně. Je prokázáno, že hladiny auxinů a cytokininů se vzájemně regulují. (2) (33) (42) (43)

Obrázek 3 - Vliv různých koncentrací auxinu a cytokininu na vývoj explantátu



Zdroj: Kováč Jaroslav, *Explantátové kultury rostlin* (2)

- **Gibereliny**

Gibereliny nepatří mezi regulátory růstu, jejichž přítomnost v médiu by byla nutná. Všeobecně je jim vlastní zastavení organogeneze i somatické embryogeneze, urychlují prodlužování buněk a podporují buněčné dělení. Využití nacházejí v suspenzích s nízkou hustotou, protože stimulují buněčný růst kalusu. Zástupci jsou kyselina giberelová 3 a 7. (2) (33) (42) (44)

- **Kyselina abscisová**

U kyseliny abscisové (ABA) je pro účinek podstatné, o jaký druh rostliny se jedná. Dle toho může růst kalusu jak stimulovat, tak inhibovat. (2)

- **Etylen**

Etylen je regulátor růstu v plynné podobě. Je produkován samotnými explantáty, může být tvořen pryžovými uzávěry, případně vycházet přímo ze složek média. Zdrojem může být CEPA (kyselina 2-chlorethylfosfonová) nebo metabolický prekurzor kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová. Úměrná koncentrace podporuje tvorbu kalusu. Endogenně tvořený etylen je ovlivňován některými fytohormony, například auxiny. (42)

### **3.2.6 Způsob a možnosti využití explantátových kultur**

Explantátové kultury našly uplatnění v mnoha rozličných odvětvích. Potkat se s nimi můžeme v zemědělské oblasti v rámci produkce zdravých rostlin a ve šlechtitelství. Také při potřebě zachovat genofond rostliny, v klonovém rozmnožování a v genetickém inženýrství. V průmyslové výrobě přírodních produktů a produkci sekundárních metabolitů se výrazně pojí s farmaceutickým průmyslem. (1) (2) (36)

### **Omezení zdravotní závadnosti rostlin**

Díky možnosti pěstování v umělých podmínkách můžeme docílit zisku rostlin viruprostých a taktéž nenapadených bakteriemi a houbami. Prvním krokem je již desinfekční ošetření matečné rostliny, ze které se explantát získává. Dále samotná kultivace meristémů, které zabraňují šíření některých patogenů díky chybějícím cévním svazkům. V případě velké nouze lze užít i antibiotická opatření. Velmi účinná metoda k odstranění virů je také termoterapie nebo přímá aplikace antivirozní látky do média. (2)

Takto ošetřené a vypěstované rostliny získaly využití převážně u vegetativně množených rostlin. Pěstitelé díky těmto vlastnostem nepřicházejí o stále lepší a produktivnější hospodářsky významné rostliny. Využitelné jsou také v mezinárodní

výměně genetických materiálů. Explantátové kultury jsou zdravé, skladné pro převoz a déle vydrží naživu. (2)

### **Zachování rostlinných druhů**

Genetická informace představuje základ pro existenci konkrétního rostlinného druhu. Existují však rostliny, kterým hrozí vymizení, protože jsou ničeny přírodní podmínky, ve kterých jsou schopny vyrůstat. Případně se může jednat o důležité a využitelné rostliny z hlediska ekonomiky, které se ale rozmnožují pouze vegetativně. (2)

Proces je založen na prodloužení subkultivační doby, tedy na zpomalení celkového růstu, ale za podmínky pozdějšího bezproblémového použití explantátu. Tohoto cíle je možné dosáhnout změnou kultivačních podmínek, například snížením teploty či omezením média. Avšak musí být dodržena sterilita a částečně omezené základní podmínky pro přežití. Efektivní metodou je také zmrazení tkáňových kultur, tzv. kryoprezervace. (2) (36)

### **Šlechtitelství**

Tento obor využívá rychlého vegetativního množení nebo křížení za vzniku nové rostlinné odrůdy, somatického hybridu. Hybridizace se s efektem používá u protoplastických kultur. Ty jsou také vhodným materiálem pro užití v genetickém inženýrství. (2) (36)

### **Produkce sekundárních metabolitů**

Rostliny produkují četné množství různých látek. Některé z nich mají specifické vlastnosti, řadí se většinou mezi sekundární metabolity. Tyto látky jsou velmi výhodně využívány ve farmacii, potravinářském průmyslu, kosmetice a dalších odvětvích. Vzhledem k časté nemožnosti zařídit ideální podmínky pro růst a výtěžnost rostlin či nerealizovatelnosti chemické syntézy, se s výhodou využívá tkáňových kultur. (2)

### **3.2.7 Výhody a nevýhody**

Jako řada záležitostí, i tato činnost nese své klady a zápory. Mezi plusy využití tkáňových kultur patří malá spotřeba rostlinného materiálu a malá plocha potřebná k vypěstování velkého množství rostlin. Rostliny jsou kvalitním postupem chráněny před chorobami a úhynem a lze ovlivnit řadu jejich funkcí vybranými podmínkami růstu. Jedná se o možnost rychlého množení různých, i pomalu se množících, botanických zástupců. A to po celý rok, bez ohledu na roční období a klimatické podmínky. Tímto se také zkracuje šlechtitelský proces. Mezi přesazováním do nového média navíc není třeba téměř žádná péče o rostliny. A díky možnosti zpomalení růstu lze naplánovat časový vývoj dalších fází. (2) (35)

Největším minusem je poměrně vysoká finanční nákladnost laboratorního vybavení a médií a také indispozice využít mechanizace kvůli náročnosti metody. Starostí může být počáteční heterotrofie rostlin. Hrozí také komplikace s nutnou opatrnou aklimatizací rostlin při jejich vyjmutí z kultivačních nádob. A je třeba zmínit, že nejsou vyloučeny ani genetické aberace rostlin. (1) (35)

## **3.3 Sekundární metabolity**

### **3.3.1 Sekundární metabolismus**

Rostliny dokážou produkovat rozmanité druhy látek. Pro rostlinu nepostradatelné substance jsou nazývány primárními metabolity, které zajišťují především stavební látky a energii pro rostlinu. Zastupují je převážně bílkoviny, sacharidy, lipidy, chlorofyl atd. Rostlinný metabolismus však syntetizuje i látky, jež nejsou pro rostlinný organismus životně důležité. Takovéto látky vznikají specializovanými biochemickými pochody. Složitost pochodů se stupňuje s vývinem rostliny. (2) (28) (33)

Biogeneze sekundárních látek vychází z omezeného množství počátečních látek. Základními zdroji jsou aminokyseliny, acetylkoenzym A, mevalonová kyselina a meziprodukty dráhy kyseliny šikimátové. Přítomnost sekundárních metabolitů v rostlinách je specifická pro konkrétní botanické druhy. (2) (33)

Sekundární metabolity přináší rostlinám určitou evoluční výhodu. Slouží jim zejména k ochraně před změnami vnějších podmínek, k obraně před patogeny a škůdci (bakterie, viry, houby, hmyz, býložravci atd.) či k lákání opylovačů a přenašečů semen. Tyto látky se často hromadí ve vakuolách, sekrečních kanálcích apod. (2) (33)

### **3.3.2 Možnosti ovlivnění sekundárních metabolitů**

Sekundární látky se často hromadí v rostlinách, které jsou vystaveny působení jiných látek nebo stresovým vlivům, které někdy dokáží stimulovat produkci těchto látek. Tohoto principu je využíváno ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů. Může se jednat o různé elicitory, prekuzory, stresové podmínky či signální molekuly. (45)

- **Elicitace**

Pro produkci iniciovanou elicitory je důležité pochopit signální dráhy metabolitů. Řada rostlin produkuje sekundární metabolity jako obranný mechanismus proti patogenním vlivům, reagují tedy na stresové situace. Elicitory fungují jako spouštěcí signál pro novou tvorbu metabolitů. Můžou jimi být chemické nebo fyzikální faktory, které způsobují rostlinné buňce stres, popřípadě jinak stimulují signální dráhy, které se podílejí na stresem způsobené reakci rostlinné buňky. Dle chemické povahy a původu se rozdělují na biotické a abiotické elicitory. (45) (46) (47)

Abiotické elicitory jsou převážně látky anorganické nebo fyzikální faktory. Řadíme k nim toxické látky, soli a kovové ionty, z fyzikálních faktorů pak extrémní teploty, nedostatek vody, kyslíku, nepřiměřené záření či vítr. Jedná se tedy o nebiologické původce. Biotické elicitory mají biologický původ a jsou většinou rozpoznány specifickými receptory, které vyšlou signál do buňky. Dojde ke změnám, které mohou završit vznikem metabolitů. Patří k nim samotné patogenní organismy, případně také sloučeniny jimi uvolněné či nacházející se na jejich površích. (46) (48)

- **Permeabilizace**

Metabolické produkty jsou často uloženy ve vakuolách rostlinných buněk, ale ne vždy jsou schopny se odsud dostat ven. Určité látky dokáží ovlivnit tyto membránové bariéry tak, aby se díky vytvořeným pórům staly pro tyto metabolity propustné. Mezi využívané látky patří některá organická rozpouštědla jako isopropanol či dimethylsulfoxid, polysacharid chinositán nebo může být využito permeabilizace ultrazvukem. (47)

- **Biotransformace**

Explantátové kultury umí transformovat některé exogenně podané látky. Svými metabolickými pochody dané látky například oxidují, redukují, nebo hydroxylojí, metylují či demethylují. Pro úspěšný proces však musí být splněny určité podmínky. Důležitým faktorem je přítomný enzymový aparát, který dokáže přidanou látku transformovat. Látka nesmí být pro kulturu nijak škodlivá a toxická a musí být schopná se do buněk dostat. Důležitou podmínkou je také rychlost syntézy nového produktu, která musí být rychlejší než jeho metabolizace. Je to významné zvláště pro syntézu těch látek, které nelze transformovat chemicky ani pomocí mikroorganismů. Navíc kultury dokážou zachovat i stereospecifitu produkované látky. (1) (47)

- **Prekurzory**

Dodáním prekurzoru do tkáňových kultur lze vytvořit navazující dráhou určitou sloučeninu, sekundární metabolit. Princip je založen na představě, že pokud je přidána látka vystupující v průběhu biosyntézy jako počáteční nebo jako meziproduct, může tím být zvýšeno množství konečného produktu. Aby přeměna proběhla, je podmínkou biokonverze přítomnost konkrétních enzymů, dostačující koncentrace prekurzoru a doba působení na explantát. (47) (49)

- **Genetické inženýrství**

Produkce významných látek není ponechána jen vhodnému výběru buněčné linie, ale je zasahováno také do genetické informace rostliny. Je umožněna

inkorporace cizích genů do rostlinných kultur, které pak produkují látky s upravenými požadovanými vlastnostmi. (47)

- **Imobilizace**

Organizace a diferenciacie rostlinných buněk je spojená s lepší produkci sekundárních metabolitů. Tato metoda napodobuje jejich přirozené rozmístění. Katalyticky aktivní enzymy a buňky jsou přichyceny na pevné fázi a je zabráněno jejich vstupu do fáze kapalné, kterou jsou omývány. Imobilizované buňky mohou jako biokatalyzátory transformovat prekurzory nebo mohou vyrábět nové sekundární metabolity. Nejčastější pevnou matricí bývá alginát vápenatý. (47)

### **3.4 HPLC**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography) je jedna z velice účinných a využívaných separačních metod. Tato metoda umožňuje analyzovat látky ve směsi a stanovit jejich kvalitativní i kvantitativní vlastnosti. Tedy nejen identitu, ale i koncentraci přítomných látek. Efektivnost separace vychází z velikosti částic stacionární fáze. Zvyšuje se s vyšší stejnoměrností a menší velikostí částic stacionární fáze. Navíc je využitelná i pro látky netěkavé, termolabilní či polymery. (50)

Mobilní fází HPLC je kapalina, která prochází kolonou za působení vysokého tlaku. Při tomto procesu dochází k separaci látek. Díky možnosti různých separačních mechanismů, je možno analyzovat téměř všechny organické látky rozpustné ve vodě, organických sloučeninách nebo zředěných kyselinách. Mechanismy jsou absorpční, rozdělovací nebo využívají síťového efektu gelu či iontové výměny. (50) (51)

Stanovení látky patří mezi nepřímou metodu, ke které je třeba k porovnání standard zjišťované látky. (51)



## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité vybavení

#### 4.1.1 Chemikálie

- 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina *p.a.*, Lachema, ČR
- 6-benzylaminopurin *p.a.*, Lachema, ČR
- Acetonitril pro HPLC - gradient grade, Merc, Německo
- Ajatin plus roztok 10%, Profarma - Produkt s.r.o., ČR
- Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK, ČR
- Dihydrogenosforečnan draselný *p.a.*, Lachema, ČR
- Dimethylsulfoxid *p.a.*, Sigma - Aldrich, USA
- Disodná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové *p.a.*
- Dusičnan amonný *p.a.*, Penta, ČR
- Dusičnan draselný *p.a.*, Lach-Ner, ČR
- Ethanol 96%, Lachema, ČR
- Glycin, Sigma - 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 chlorovodíková 25% *p.a.*, Lach-Ner, ČR
- Kyselina nikotinová, Lachema, ČR
- Kyselina skořicová, Sigma - Aldrich, USA
- Meskalin, Cerilliant Corp., USA
- Methanol *p.a.*, Lachema, ČR
- Methylenová modř, Penta, ČR
- Molybdenan sodný, Lachema, ČR
- Myo-inositol, Fluka, Švýcarsko
- Octan amonný, Lachema, ČR
- Ozon

- 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
- Skořican sodný, Sigma – Aldrich, USA
- Thiamin, Koch - Light Laboratories, Velká Británie
- Tryptofan, Penta, ČR

#### 4.1.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy A 200S, Sartorius, Göttingen, Německo
- Autokláv PS 20A, Chirana, Brno, ČR
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, Výrobné družstvo Pokrok, Žilina, Slovensko
- Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko
- Přenosný ozonový generátor ES550, Aquapure CN Ltd., Čína
- HPLC chromatograf Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), Jasco International, Tokyo, Japonsko
- Předkolonový filtr a chromatografická kolona LiChrospher RP-18 250x4 ( $5\mu m$ ) s ochrannou předkolkou, Merck, Darmstadt, Německo
- Sušárna HS 61A, Chirana, Brno, ČR
- Třepačka Unimax 2010, Heidolph Instruments, Německo
- Vodní lázeň, typ 1042, GFL, Německo
- Hliníková fólie
- Filtrační papír, vata
- Laboratorní pomůcky (lžičky, pinzety, atd.)
- Laboratorní sklo (baňky, nálevky, kádinky, chladič, atd.)
- Mikrofiltry ( $0,22\ \mu m$ ), Tessek, ČR
- Pipetovací balónek, Filip, Německo
- Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, ČR

## **4.2 Kultivace *in vitro* kultury *Trichocereus pachanoi***

### **4.2.1 Rostlinný materiál a odvození suspenzní kultury**

K experimentům byla využita kalusová kultura *Trichocereus pachanoi*, která byla udržována na katedře farmakognozie FaF UK za potřebných podmínek na pevné agarové půdě dle Murashigeho a Skooga.

K odvození suspenzní podoby bylo využito tekutého média stejné receptury, ale bez přidaného agaru. Do tohoto média byly za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu přenášeny části kalusové kultury vypěstované na agarovém podkladu. Části byly za pomoci pinzety rozdrobněny mechanickým působením o stěny baněk na menší shluky buněk.

### **4.2.2 Živné médium**

Jako kapalně kultivační médium byla použita živná půda dle Murashigeho a Skooga (MS médium) s přidanými růstovými regulátory 2,4-D a BAP (viz tabulka 1). Před každým přesazením bylo smísením všech nezbytných komponent připraveno čerstvé médium. Zásobní roztoky byly odměřeny a odpipetovány, k navážení pevných látek bylo využito analytických vah a v závěru byla do odměrné baňky doplněna destilovaná voda do požadovaného objemu. Po rozpuštění všech substancí a kvalitním promísení, bylo médium rozděleno po 40 ml do 100 ml Erlenmeyerových baněk, které byly ihned uzavřeny hliníkovou fólií. Nakonec byla provedena po dobu 15 minut, při teplotě 121°C a tlaku 100 kPa sterilizace v autoklávu. (52)

Tabulka 1 - MS médium

Médium dle Murashigeho a Skooga			Využitý zdroj pro konečnou koncentraci
	Konkrétní látka	Koncentrace [mg·l <sup>-1</sup> ]	
Makroelementy	KNO <sub>3</sub>	1 900,00	zásobní roztok 100 ml·l <sup>-1</sup>
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650,00	
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440,00	
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370,00	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	
Mikroelementy	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,30	zásobní roztok 1 ml·l <sup>-1</sup>
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,60	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	
	KI	0,83	
	NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	
Železnatý komplex	Na <sub>2</sub> EDTA	37,30	zásobní roztok 10 ml·l <sup>-1</sup>
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,80	
Vitaminy a myo-inositol	thiamin HCl	0,10	zásobní roztok 1 ml·l <sup>-1</sup>
	pyridoxin HCl	0,50	
	kyselina nikotinová	0,50	
	myo - inositol	100,00	100 mg·l <sup>-1</sup>
Zdroj uhlíku a energie	sacharosa	30 000,00	30 000 mg·l <sup>-1</sup>
Zdroj aminokyselin	hydrolyzát kaseinu	1 000,00	1000 mg·l <sup>-1</sup>
	glycin	2,00	zásobní roztok 1 ml·l <sup>-1</sup>
Růstové regulátory	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina	1,00	zásobní roztok 1 ml·l <sup>-1</sup>
	6-benzaminopurin	0,001	zásobní roztok 1 ml·l <sup>-1</sup>

### **4.2.3 Pasážování a kultivace**

Pasážování kultur probíhalo v boxu s laminárním prouděním vzduchu, k čemuž bylo potřeba zajistit nejprve vhodné aseptické prostředí. To bylo zajištěno omytím stěn 96% ethanolem, ozářením celé místnosti s boxem germicidní zářivkou a zapnutím laminárního proudění vzduchu k dosažení jeho ustálení s minimálně 15 minutovým předstihem. Celá práce poté musela probíhat aseptickým způsobem, za dodržení co nejvyšší možné bezpečnosti, včetně omytí rukou mýdlem a desinfekčním prostředkem. Hliníkové uzávěry baněk obsahujících narostlé kultury musely být před jejich použitím očištěny ethanolem, aby nebyl materiál po otevření kontaminován usazenými bakteriemi a nečistotami.

Přímá práce v boxu spočívala v přenášení části narostlých kultur do nových baněk s 40 ml předem připraveného a vysterilizovaného média. Vlastní pasážování bylo provedeno nalitím přibližně 10 ml narostlé suspenzní kultury do baňky s novým médiem. V případě velkých kusů suspenzní kultury bylo provedeno rozmělnění v předem vysterilizované třecí misce. Baňky byly opět opatrně a pečlivě uzavřeny hliníkovou fólií a označeny jménem a datem.

Kultivace takto připravených explantátových kultur probíhala v kultivační místnosti při stálé teplotě 25°C, ve světelném režimu 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Baňky se suspenzní kulturou byly umístěny na třepačku, která zajišťovala krouživým pohybem 120 otáček za minutu důležité provzdušňování živného média. Kultury byly pasážovány v přibližných intervalech 30 dní, kdy končila exponenciální fáze růstu a byla potřeba obnova živného média.

## **4.3 Vliv prekurzorů a elicitorů na produkci sekundárních metabolitů**

### **4.3.1 Příprava požadovaných koncentrací sledovaných látek**

Cílem experimentu bylo zjistit, zda některá z přidaných látek pozitivně ovlivňuje produkci meskalinu v *Trichocereus pachanoi*. K prozkoumání byly zvoleny prekurzory kyselina skořicová, skořican sodný a tryptofan a z elicitorů ozon a methylenová modř.

Ze všech tří prekurzorů (kyseliny skořicové, skořicanu sodného a tryptofanu) byly připraveny roztoky tak, aby výsledné koncentrace působící na suspenzní kultury byly následující:

$$C_1 = 50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_2 = 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_3 = 500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_0 = 0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ (kontrolní roztok)}$$

Vzhledem k počítanému zředění 50 ml média přítomného u suspenzní kultury, byly připraveny roztoky následujících koncentrací:

$$C_1 = 2,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_2 = 5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_3 = 25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_0 = 0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ (kontrolní roztok)}$$

Do Erlenmeyerových baněk bylo odváženo takové množství látky, aby vznikl dostatečný objem roztoku požadované koncentrace. Objem byl s určitým nadbytkem odvozen od počtu Erlenmeyerových baněk, do kterých měla být konkrétní koncentrace po 1 ml přidána. Bylo zapotřebí zvolit vhodné rozpouštědlo, ve kterém se daná látka skutečně rozpustí nebo alespoň nevysráží. Kyselina skořicová byla rozpuštěna v 60% dimethylsulfoxidu, skořican sodný vytvořil vodný roztok a z tryptofanu byla odvozena suspenze s 96% ethanolem. Všechny vytvořené roztoky včetně kontrolních, byly následně po dobu 20 minut podrobeny sterilizaci v autoklávu při 121°C a 100 kPa. Ethanolicke suspenze nebylo třeba sterilizovat.

Methylenová modř jako generátor singletového kyslíku byla do kultur přidávána v odlišných koncentracích než prekurzory. Použité výsledné koncentrace v médiu vycházely z předchozích prací. (53)

$$C_1 = 1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_2 = 10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_3 = 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_0 = 0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ (kontrolní roztok)}$$

Připravený vodný roztok odpovídal této koncentraci:

$$C_1 = 0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_2 = 0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_3 = 5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$C_0 = 0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ (kontrolní roztok)}$$

Ozon byl zaváděn do baněk hadičkou generátoru v časových intervalech 5 a 10 sekund. Produkce ozonu generátorem je dle výrobce uváděna  $600 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ . Do kultur bylo tedy přidáno 0,83 mg, respektive 1,67 mg ozonu. Kontrolní kultury byly ponechány beze změny. Odběr vzorků byl proveden rovněž po 24 a 168 hodinách působení ozonu.

#### **4.3.2 Přidání látek ke kulturám**

K jednotlivým suspenzním kulturám byly přidány roztoky či suspenze prekurzorů a elicitorů různých koncentrací. Přidání látek proběhlo za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Za pomoci vysterilizovaných pipet bylo přidáno vždy po 1 ml daného roztoku požadované koncentrace do několika baněk, které byly následně uzavřeny a označeny. Do určených baněk byly

přidány také kontrolní roztoky, které prošly stejnými podmínkami a obsahovaly stejné rozpouštědlo, ale nebyl v nich přítomen prekurzor či elicitor. Počet baněk určených pro jednu koncentraci se vždy odvíjel od množství narostlé kultury v baňkách.

Připravené baňky byly opět umístěny do kultivační místnosti na třepačku a ponechány vlivu přidaných látek po 24 a 168 hodin. Pouze kyselina skořicová byla ponechána jen 168 hodinovému působení.

## **4.4 Stanovení obsahu meskalinu**

### **4.4.1 Sušení a extrakce vzorků**

Vzorky byly odebírány vždy po 24 a 168 hodinách od přidání prekurzoru či elicitoru ke kultuře. Kultury byly přes filtrační papír promyty destilovanou vodou, zfiltrovány a následně usušeny v sušárně při 40°C. Po usušení byly vzorky sejmuty z papíru, rozmělněny v třecí misce a získaný prášek zvážen na analytických váhách.

Následně byla provedena dvojitá extrakce methanolem. Celý vzorek či 0,2 g v případě vyššího výtěžku byl vložen do varné baňky s 10 ml methanolu. Za okyselení několika kapkami koncentrované kyseliny chlorovodíkové byla baňka vložena na 90°C vodní lázeň a vařena 15 minut pod zpětným chladičem. Výluh byl zfiltrován přes chomáček vaty do odměrného válce, vata byla poté vrácena zpět do baňky, kam bylo přidáno nových 10 ml methanolu, a varný proces byl opakován po dobu dalších 10 minut. Druhý výluh se spojil přes nový chomáček vaty s prvním výluhem a po vychladnutí byl doplněn methanolem do odměrné baňky na 20 ml.

Výluh byl poté dobře promíchán a do vialky bylo zfiltrováno stříkačkou přes mikrofiltr (0,22 µm) přibližně 1,5 ml extraktu. Vialky byly dobře uzavřeny, označeny názvem, koncentrací a datem a připraveny k HPLC analýze.

### **4.4.2 HPLC analýza**

HPLC analýza byla provedena na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055). Tato sestava je vybavena předkolonovým filtrem a kolonou LiChristopher RP-18 250x4 (5 µm) s ochrannou předkolonkou.



Mobilní fáze byla složena ze dvou eluentů. Eluent A se skládal z 8% acetonitrilu a 30 mM octanu amonného ve vodě a eluent B byl 100% acetonitril. Složení mobilní fáze postupovalo gradientově, jak je uvedeno v tabulce 2 níže:

*Tabulka 2 - Eluce mobilní fáze*

Čas [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
25	75	25

Rychlost průtoku mobilní fáze byla  $1,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a teplota kolony  $25^\circ\text{C}$ . Objem nástřiku byl  $20 \mu\text{l}$ .

Detekce látek proběhla v rozmezí vlnových délek  $200 - 400 \text{ nm}$  na DAD detektoru. Obsah zkoumané látky byl vypočten z píků při vlnové délce  $210 \text{ nm}$ . Matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou získanou pomocí externě měřeného standardu téže látky byl obsah kvantifikován.

Standart meskalinu byl vyroben firmou Cerilliant Corp. (USA) a zakoupen od LGC Standards Sp.z.o.o. (ČR). Roztoky standardu byly vytvořeny přímým rozpouštěním v methanolu s 30 mM octanu amonného.

#### **4.4.3 Validace HPLC analýzy**

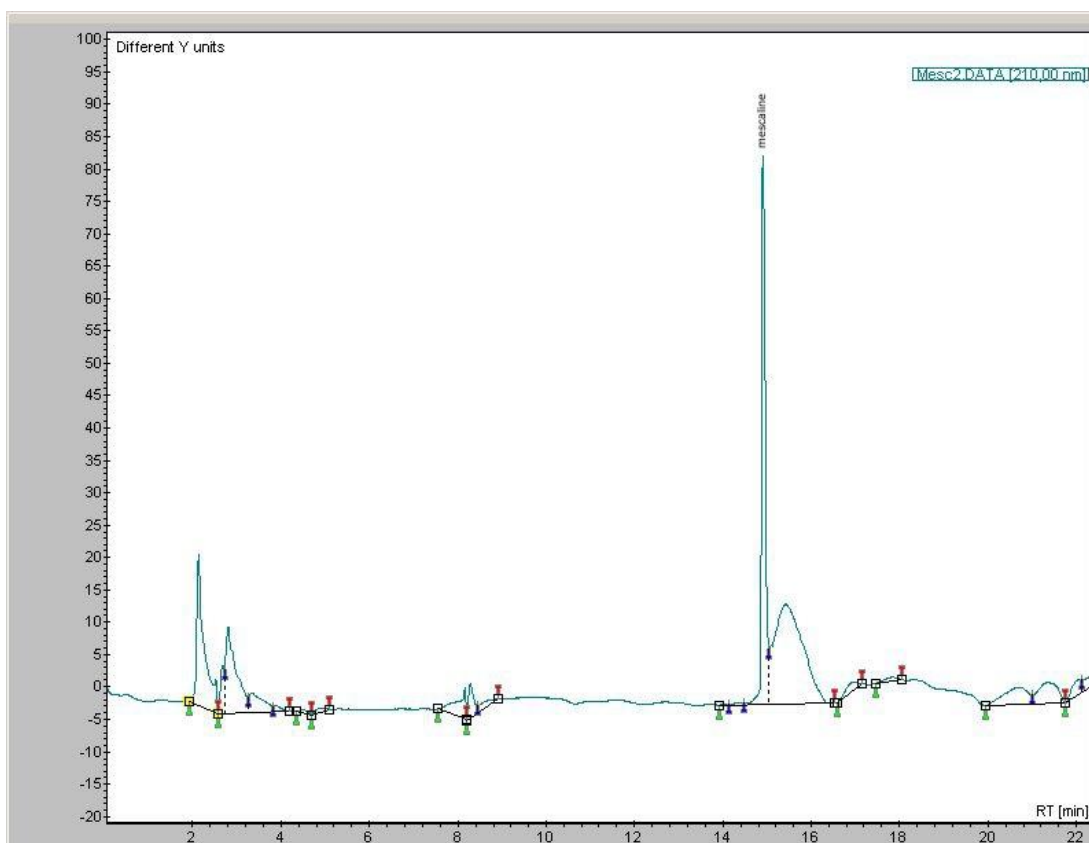
Validací se rozumí ověření platnosti zvolené analytické metody. Instrumentální validaci obstarává výrobce HPLC sestavy (Jasco) dle normy ISO 9001 (International Organization for Standardization).

K ověření přesnosti chromatografických systémů byl využit test opakovaného nástřiku. Z jednoho vzorku bylo realizováno pokaždé šest nástřiků a relativní směrodatná odchylka vypočtená z výsledků musela být menší než 1,5 %. Další kontrolou chromatografu byl test linearity, při němž musí být hodnota korelačního koeficientu  $r$ , jež byla odhalena lineární regresivní analýzou 5 různých koncentrací standardu, větší než 0,9900.

Analytické měření využilo také vyhodnocení prostřednictvím metod z Evropského lékopisu. Jednalo se o metodu Asymetrie píku a Počet teoretických pater.

K vyhodnocení celé metody bylo použito validačních parametrů správnosti metody a kvantitativního limitu. Správnost metody zastupuje statisticky významný rozdíl mezi naměřenou a skutečnou hodnotou, jehož je získáno porovnáním naměřených hodnot se standardem či s jinou dostatečně spolehlivou metodou nebo porovnáním s referenčním materiálem. A kvalitativní limit označuje nejmenší hodnotu, která je ještě možná naměřit s přijatelnou přesností a správností. (49)

Obrázek 4 - HPLC Chromatogram standardu meskalinu



#### 4.4.4 Statistické zpracování výsledků

Statistické vyhodnocení naměřených výsledků bylo provedeno T-testem. Využito bylo následujících matematických vztahů.

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

$n$  ... rozsah souboru

$x_i$  ... naměřené hodnoty

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

$n$  ... rozsah souboru

$\bar{x}$  ... aritmetický průměr

$x_i$  ... naměřené hodnoty

Směrodatná odchylka vyjadřuje rozdíl jednotlivých naměřených hodnot od aritmetického průměru celého souboru.

T-test: 
$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{a_1 s_1^2 + a_2 s_2^2}{a_1 + a_2}}} \cdot \sqrt{\frac{a_1 a_2 (a_1 + a_2 - 2)}{a_1 + a_2}}$$

$t$  ..... testovací kritérium

$\bar{x}_1$  ... aritmetický průměr kontrolního souboru

$\bar{x}_2$  ... aritmetický průměr experimentálního souboru

$a_1$  ... počet členů kontrolního souboru

$a_2$  ... počet členů experimentálního souboru

$s_1$  ... směrodatná odchylka kontrolního souboru

$s_2$  ... směrodatná odchylka experimentálního souboru

Stupeň volnosti: 
$$v = (a_1 + a_2 - 2)$$

$v$  ..... stupeň volnosti

$a_1$  ... počet členů kontrolního souboru

$a_2$  ... počet členů experimentálního souboru

Na základě stupně volnosti je vypočteno testovací kritérium  $t$ . Hodnota testovacího kritéria je porovnána s kritickou hodnotou  $t_p(v)$  pro vypočítaný stupeň volnosti a zvolenou hladinu významnosti  $p$ . Zvolená hladina významnosti se rovnala  $p = 0,05$ . Je-li hodnota testovacího kritéria  $t$  vyšší než kritická hodnota  $t_p(v)$ , jedná se o statisticky významný rozdíl na hladině významnosti  $p$ . (49) (54)

## 5. VÝSLEDKY

V následujících tabulkách a grafech jsou zaznamenány výsledné hodnoty stanoveného obsahu meskalinu v explantátových kulturách *Trichocereus pachanoi* po přidání konkrétních látek. Statisticky významné výsledky jsou zvýrazněny tučně.

### 5.1 Působení kyseliny skořicové na produkci meskalinu v explantátových kulturách *Trichocereus pachanoi*

Tabulka 3 – Kyselina skořicová

Kyselina skořicová		
koncentrace prekurzoru [mg·l <sup>-1</sup> ]	čas odběru [h]	obsah meskalinu [%]
c <sub>0</sub> = 0	168	0,000
c <sub>1</sub> = 50		0,000
c <sub>2</sub> = 100		0,000
c <sub>3</sub> = 500		0,000

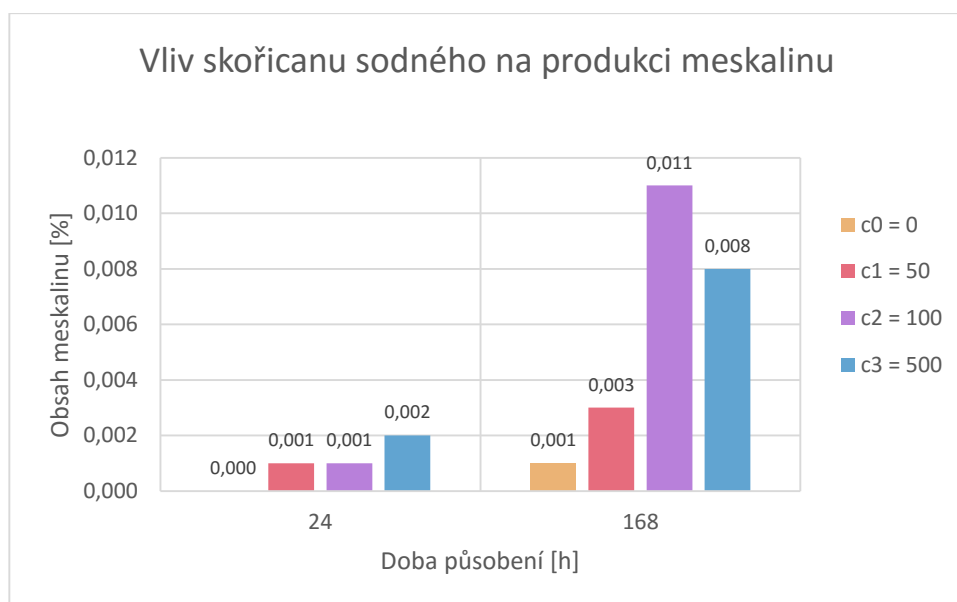
Vzhledem k nulovým hodnotám u všech koncentrací nemá uvedení grafu smysl.

## 5.2 Působení skořicanu sodného na produkci meskalinu v explantátových kulturách *Trichocereus pachanoi*

Tabulka 4 – Skořican sodný

Skořican sodný		
koncentrace prekurzoru [mg·l <sup>-1</sup> ]	čas odběru [h]	obsah meskalinu [%]
c <sub>0</sub> = 0	24	0,000
c <sub>1</sub> = 50		0,001
c <sub>2</sub> = 100		0,001
c <sub>3</sub> = 500		0,002
c <sub>0</sub> = 0	168	0,001
c <sub>1</sub> = 50		0,003
c <sub>2</sub> = 100		<b>0,011</b>
c <sub>3</sub> = 500		<b>0,008</b>

Graf 1 – Skořican sodný

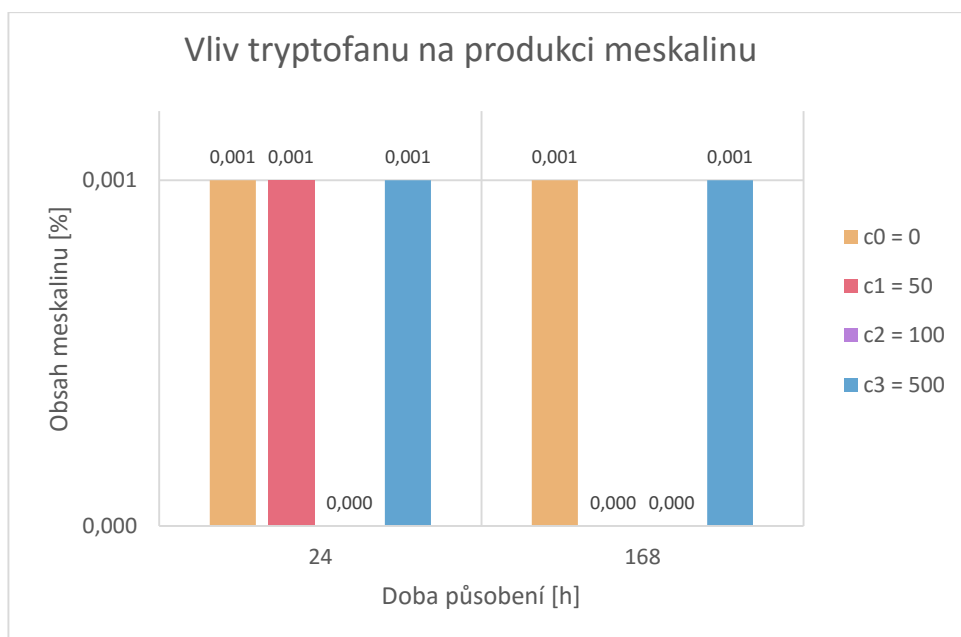


### 5.3 Působení tryptofanu na produkci meskalinu v explantátových kulturách *Trichocereus pachanoi*

Tabulka 5 – Tryptofan

Tryptofan		
koncentrace prekurzoru [mg·l <sup>-1</sup> ]	čas odběru [h]	obsah meskalinu [%]
c <sub>0</sub> = 0	24	0,001
c <sub>1</sub> = 50		0,001
c <sub>2</sub> = 100		0,000
c <sub>3</sub> = 500		0,001
c <sub>0</sub> = 0	168	0,001
c <sub>1</sub> = 50		0,000
c <sub>2</sub> = 100		0,000
c <sub>3</sub> = 500		0,001

Graf 2 – Tryptofan

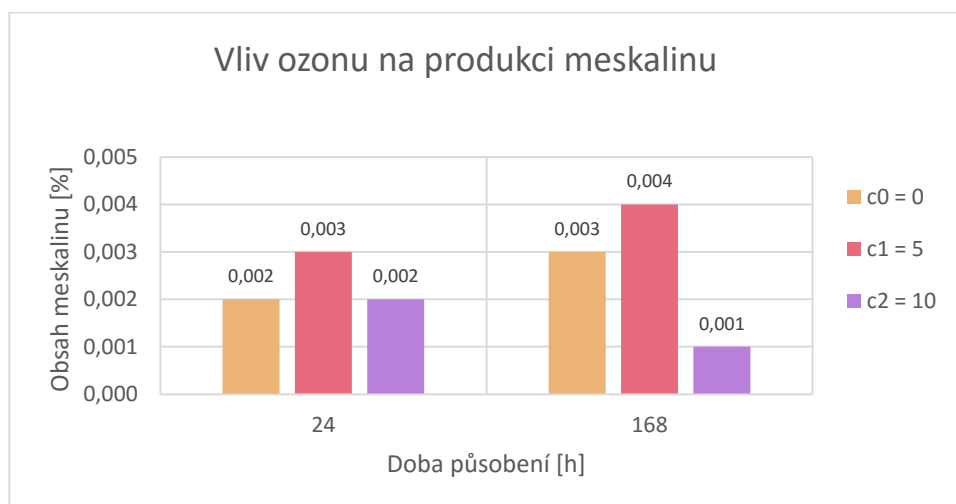


## 5.4 Působení ozonu na produkci meskalinu v explantátových kulturách *Trichocereus pachanoi*

Tabulka 6 – Ozon

Ozon		
Doba expozice [s]	čas odběru [h]	obsah meskalinu [%]
$c_0 = 0$	24	0,002
$c_1 = 5$		0,003
$c_2 = 10$		0,002
$c_0 = 0$	168	0,003
$c_1 = 5$		0,004
$c_2 = 10$		0,001

Graf 3 – Ozon

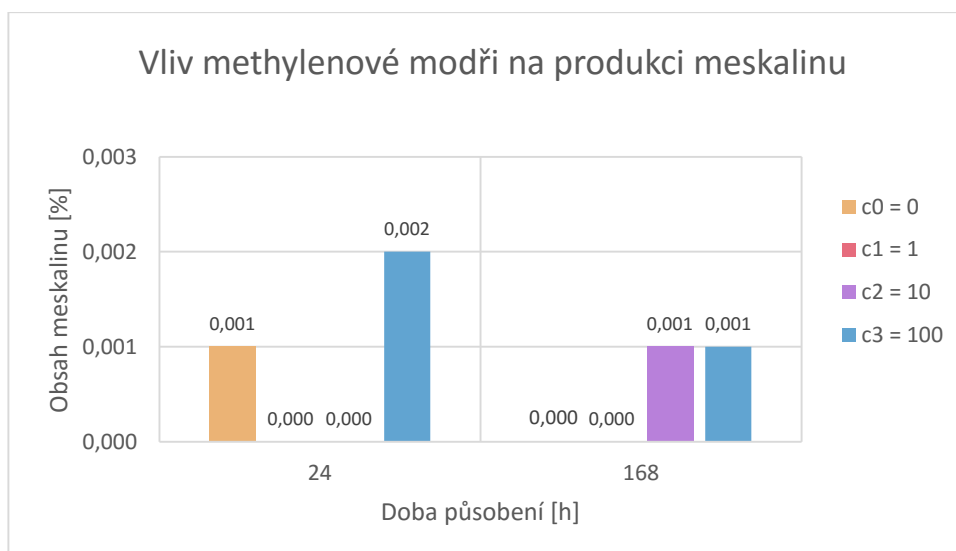


## 5.5 Působení methylenové modři na produkci meskalinu v explantátových kulturách *Trichocereus pachanoi*

Tabulka 7 – Methylenová modř

Methylenová modř		
koncentrace elicitoru [mg·l <sup>-1</sup> ]	čas odběru [h]	obsah meskalinu [%]
c <sub>0</sub> = 0	24	0,001
c <sub>1</sub> = 1		0,000
c <sub>2</sub> = 10		0,000
c <sub>3</sub> = 100		0,002
c <sub>0</sub> = 0	168	0,000
c <sub>1</sub> = 1		0,000
c <sub>2</sub> = 10		0,001
c <sub>3</sub> = 100		0,001

Graf 4 – Methylenová modř





## 6. DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo provedení kultivace rostlinných explantátových kultur *Trichocereus pachanoi* a zjištění vlivu vybraných látek v různých koncentracích na produkci sekundárních metabolitů v těchto kulturách. Z kalusových kultur bylo potřebné odvodit kulturu suspenzní, naučit se správné technice pasážování a kultivace. Nedílnou součástí bylo zvládnutí HPLC analýzy, která vedla ke stanovení obsahu meskalinu v kultuře.

Suspenzní kultury byly kultivované v tekutém médiu dle Murashigeho a Skooga s přidavkem růstových regulátorů kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 6-benzylaminopurinu.

K ovlivnění produkce meskalinu byly zvoleny tyto látky. Z prekurzorů to byla kyselina skořicová, skořican sodný a tryptofan, jež byly jednotlivě připraveny ve třech různých koncentracích. Jednalo se o přípravu takových roztoků či suspenzí, jejichž konečná koncentrace po přidání do kultur byla 50, 100 a 500 mg·l<sup>-1</sup>. Těmto koncentracím byly kultury vystaveny po dobu 24 a 168 hodin, po jejímž uplynutí byla provedena extrakce vzorku a HPLC analýza.

Po přidání tří připravených koncentrací 60% dimethylsulfoxidového roztoku kyseliny skořicové do suspenzních kultur nedošlo ani po 168 hodinové expozici k žádné produkci meskalinu (viz tabulka 3). Avšak meskalin se neobjevil ani v kontrolním vzorku. Vysvětlením může být to, že použitá pasáž kultur vůbec neprodukovala meskalin. U ostatních pasáží byla produkce meskalinu v kontrolních kulturách minimální, ale měřitelná. Popřípadě mohlo dojít k chybě při zpracování vzorků. Není vyloučen ani vliv dimethylsulfoxidu jako rozpouštědla.

Vodný roztok skořicanu sodného přinesl výsledky pozitivnější. Po jeho přidání do kultur se projevil pozitivní vliv u obou vyšších koncentrací působících po dobu 168 hodin. Po 24 hodinovém působení nebyl zaznamenán významně znatelný nárůst. Avšak po týdenní expozici koncentrací 100 mg·l<sup>-1</sup> se projevil nárůst obsahu meskalinu 11x vyšší a v koncentraci 500 mg·l<sup>-1</sup> 8x vyšší než v kontrolním vzorku. V tabulce 4 a grafu 1 je vidět mírný náznak zahájení produkce meskalinu už po 24 hodinách, i když není statisticky významný. Lze tedy předpokládat jistá úměra

mezi dobou působení skořičanu sodného na kulturu a výsledným obsahem meskalinu. Čím déle bude kultura tomuto prekurzoru ve vhodné koncentraci vystavena, tím vyšší obsah meskalinu bude *in vitro* kulturách *Trichocereus pachanoi* vyprodukován.

Využití aminokyseliny tryptofanu se neosvědčilo jako vhodné k podnícení vyšší produkce sekundárních metabolitů. Ze získaných výsledků (viz tabulka 5 a graf 2) je patrné, že tryptofan zásadně neovlivňuje produkci meskalinu v žádné z použitých koncentrací. Zaznamenané výkyvy ve výsledcích jsou zanedbatelné.

Ze zkoumaných elicitorů byly jemné náznaky ovlivnění u ozonu, jemuž byly kultury vystaveny po dobu 5 a 10 sekund. Pouze u 10 sekundového působení ozonu a následné kultivaci 168 hodin je patrný mírný úbytek meskalinu (viz tabulka 6 a graf 3). Avšak i zde jsou výkyvy jen minimální a jsou statisticky zanedbatelné.

Methylenová modř byla použita ve třech konečných odlišných koncentracích vodného roztoku, a to v koncentracích 1, 10 a 100 mg·l<sup>-1</sup>. Jejímu působení byly kultury vystaveny také 24 a 168 hodin. Bohužel ale ani methylenová modř nepřinesla pozitivní výsledky. Její působení se neprojevovalo žádnými statisticky významnými hodnotami, jednalo se pouze o zanedbatelné mírné výkyvy (viz tabulka 7 a graf 4).

Skořičan sodný v koncentraci 100 mg·l<sup>-1</sup> se tedy jeví jako nejvýhodnější pro vyšší obsah produkovaného meskalinu. Ostatní zkoušené látky svými výsledky nevykázaly významné změny v produkci. U kyseliny skořičové by se však mělo pamatovat na možnost neproduktivní pasáže kultur či negativního ovlivnění rozpouštědlem a do budoucna zkusit využít jiné pomocné látky a pokus znovu ověřit.

V dříve zpracované diplomové práci, která se také věnovala vlivu látek na explantátové kultury *T. pachanoi*, zjistila autorka pozitivní vliv na produkci meskalinu u prekurzoru dopaminu v koncentraci 50 mg·100 ml<sup>-1</sup>. V porovnání s nově zjištěnými výsledky je užití skořičanu sodného výhodnější. (49)

## 7. ZÁVĚR

V průběhu činnosti na této diplomové práci bylo zvládnuto založení a kultivace suspenzních kultur *Trichocereus pachanoi* odvozených z kalusových kultur. Zároveň byl sledován vliv vybraných přidaných prekurzorů (kyselina skořicová, skořican sodný, tryptofan) a elicitorů (ozon, methylenová modř) v určitých koncentracích a po určitou dobu působení na produkci meskalinu v *in vitro* kulturách *Trichocereus pachanoi*. Bylo zvládnuto kvalitativní a kvantitativní stanovení obsahu meskalinu v kulturách separační metodou HPLC.

Pomocí HPLC analýzy získaných vzorků, byl prokázán statisticky významný vliv na produkci meskalinu v suspenzní kultuře pouze u skořicanu sodného. Zvýšení proběhlo u koncentrací 100 mg·l<sup>-1</sup> a 500 mg·l<sup>-1</sup> při 168 hodinové době působení. Obsah meskalinu se oproti kontrolní kultuře zvýšil z 0,001 % na 0,011 % u 100 mg·l<sup>-1</sup> koncentrace a na hodnotu 0,008 % u 500 mg·l<sup>-1</sup> koncentrace skořicanu sodného v kultuře. Došlo tedy k osmi až jedenáctinásobnému zvýšení za použití tohoto prekurzoru.

Ostatní sledované látky nevykazovaly žádné významné změny v produkci.

## 8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Biosyntéza hordeninu a meskalinu .....	15
Obrázek 2 - Proces kultivace .....	18
Obrázek 3 - Vliv různých koncentrací auxinu a cytokininu na vývoj explantátu.....	26
Obrázek 4 - HPLC Chromatogram standardu meskalinu .....	42

## 9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - MS médium .....	36
Tabulka 2 - Eluce mobilní fáze.....	41
Tabulka 3 – Kyselina skořicová.....	44
Tabulka 4 – Skořican sodný.....	45
Tabulka 5 – Tryptofan .....	46
Tabulka 6 – Ozon.....	47
Tabulka 7 – Methylenová modř .....	48

## 10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Skořican sodný.....	45
Graf 2 – Tryptofan .....	46
Graf 3 – Ozon .....	47
Graf 4 – Methylenová modř.....	48

## 11. CITOVANÁ LITERATURA

1. **Sikyta, Bohumil a Dušek, Jaroslav.** *Biotechnologie pro farmaceuty.* Praha : Univerzita Karlova, 2001. stránky 75-83. 80-246-0211-3.
2. **Kováč, Jaroslav.** *Explantátové kultury rostlin.* Ústí nad Labem : Univerzita J.E. Purkyně, 1992. stránky 1-95. 80-7044-036-8.
3. **Valíček, Pavel a kolektiv.** *Rostlinné omamné drogy.* Benešov : Start, 2000. stránky 93-98, 142-143. 80-86231-09-7.
4. **Rätsch, Christian.** *Psychoaktivní rostliny: Historie, léčení, účinky, příprava, rituály.* Olomouc : Fontána, 2008. stránky 137, 174-178, 179-183. 978-80-7336-625-4.
5. **Shetty, A.A., Rana, M.K. a Preetham, S.P.** Cactus: a medicinal food. *Journal Of Food Science And Technology.* 2012, Sv. 49, 5, stránky 530–536.
6. **Berg, Linda R.** *Introductory botany - plants, people, and the environment.* Fort Worth : Saunders College Publishing, 1997. stránky 418-421. 0-03-075453-4.
7. **Novák, Jan a Skalický, Milan.** *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika.* Praha : Powerprint, 2012. stránky 215-216. 978-80-87415-53-5.
8. **Kunte, Libor, Gratias, Jan a Pavelka, Petr.** *Encyklopedie kaktusů a jiných sukulentů.* Brno : Computer Press, 2011. 978-80-251-3536-5.
9. **Turner, D.M.** *The Essential Psychedelic Guide.* San Francisco, CA : Panther Press, 1994. 0964263610.
10. **Rätsch, Christian.** The encyclopedia of psychoactive plants: ethnopharmacology and its applications. 2005. stránky 1227-1238.
11. **De Feo, Vincenzo.** Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. *Journal of Ethnopharmacology.* 2003, Sv. 85, 2, stránky 243-256.
12. **Jahodář, Luděk.** *Farmakobotanika semenné rostliny.* Praha : Univerzita Karlova v Praze, 2006. stránky 15-26. 80-246-1225-9.
13. **Ramawat, K.G.** *Desert plants: biology and biotechnology.* Heidelberg Dordrecht London New York : Springer, 2010. stránky 159-160. 978-3-642-02549-5.

14. **Bussmann, R.W. a Sharon, Douglas.** Shadows of the colonial past – diverging plant use in Northern Peru and Southern Ecuador. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*. 2009, Sv. 5, 1.
15. **Stafford, Peter.** *Encyklopedie psychedelických látek*. Praha : Volvox Globator, 1997. stránky 186-238. 80-7207-057-6.
16. **Barceloux, Donald G.** *Medical toxicology of drug abuse: Synthesized chemicals and psychoactive plants*. Hoboken : Wiley, 2012. str. 945. 9781118106075.
17. **Dobkin, Marlene.** Trichocereus pachanoi - A mescaline cactus used in folk healing in Peru. *Economic Botany*. 1968, Sv. 22, 2, stránky 191-194.
18. **Bruhn, J.G.** Ecstasy analogues found in cacti. *Journal of psychoactive drugs*. 2008, Sv. 40, 2, stránky 219-222.
19. **Štarha, Roman.** *Sekundární metabolity čeledi Cactaceae*. Ostrava : Ostravská univerzita, 2001. stránky 8, 19, 50, 53-55. 80-7042-806-6.
20. **Kinoshita, K., Takizawa, T. a kol.** New triterpenes from Trichocereus pachanoi. *Journal of natural products*. 1995, Sv. 58, 11, stránky 1739-1744.
21. **Spinella, Marcello.** *The psychopharmacology of herbal medicine: Plant drugs that alter mind, brain, and behavior*. Cambridge : The MIT Press, 2001. stránky 345-349. 9780262287746.
22. **Spilková, Jiřina a kolektiv.** *Farmakognozie*. Praha : Univerzita Karlova v Praze, 2016. stránky 193-201. 978-80-246-3264-3.
23. **Carstairs, Shaun D. a Cantrell, F. Lee.** Peyote and mescaline exposures: a 12-year review of a statewide poison center database. *Clinical Toxicology*. 2010, Sv. 48, 4, stránky 350-353.
24. **Halpern, J.H.** Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Pharmacology & therapeutics*. 2004, Sv. 102, 2, stránky 131-138.
25. **Ogunbodede, O., a další.** New mescaline concentrations from 14 taxa/cultivars of Echinopsis spp. (Cactaceae) ("San Pedro") and their relevance to shamanic practice. *Journal Of Ethnopharmacology*. 2010, Sv. 131, 2, stránky 356-362.

26. **Sutter, M.E., Chenoweth, J. a Albertson, T.E.** Alternative drugs of abuse. *Clinical Reviews In Allergy & Immunology*. 2014, Sv. 46, 1, stránky 3-18.
27. **Civjan, Natanya.** *Natural products in chemical biology*. Hoboken, New Jersey : Wiley, 2012. stránky 24-25. 9781118391822.
28. **Macholán, Lumír.** *Sekundární metabolity*. Brno : Masarykova univerzita v Brně, 2003. stránky 7-11, 58. 80-210-3068-2.
29. **Kar, Ashutosh.** *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. New Delhi : New Age International (P) Limited, 2007. stránky 481-482, 801. 9788122429152.
30. **Aniszewski, Tadeusz.** *North-Holland Personal Library: Alkaloids - Secrets of life: Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*. Burlington : Elsevier, 2007. stránky 76-77. 9780080475332.
31. **Lundström, J. a Agurell, S.** A complete biosynthetic sequence from tyrosine to mescaline in two cactus species. *Tetrahedron Letters*. 1969, 39, stránky 3371-3374.
32. **Hussain, Altaf, a další.** Plant tissue culture - Current status and opportunities. [autor knihy] Annarita Leva a Laura M.R. Rinaldi. *Recent advances in plant in vitro culture*. místo neznámé : InTech, 2012, stránky 1-28.
33. **Jahodář, Luděk.** *Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty*. Praha : Univerzita Karlova v Praze, 2000. stránky 35-41, 45. 80-246-0131-1.
34. **Procházka, Stanislav, a další.** *Fyziologie rostlin*. Praha : Academia, 1998. stránky 328-330. 80-200-0586-2.
35. **Dušek, J. a Dušková, Jiřina.** Explantátové kultury vyšších rostlin a jejich využití v biotechnologii. *Naše léčivé rostliny*. 1997, Sv. 34, 5, stránky 164-168.
36. **Dagla, H.** Plant tissue culture. *Resonance: Journal of Science Education*. 2012, Sv. 17, 8, stránky 759-767.
37. **Novák, František J.** *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Praha : Academia, 1990. str. 41. 80-200-0344-4.

38. **Ramawat, K.G. a Merillon, J.M.** *Biotechnology secondary metabolites: plants and microbes*. Enfield (NH), Jersey, Plymouth : Science Publishers, 2007. str. 546. 9781578085972.
39. **Moreno-Vázquez, S., a další.** Bacterial contamination of in vitro plant cultures: confounding effects on somaclonal variation and detection of contamination in plant tissues. *Plant cell, tissue, and organ culture*. 2014, Sv. 119, 3, stránky 533-541.
40. **Ponmurugan, P. a Kumar, Suresh K.** *Applications of plant tissue culture*. New Delhi : New Age International, 2012. stránky 1-67. 9788122434996.
41. **Saad, Abobkar I.M. a Elshahed, Ahmed M.** Plant tissue culture media. [autor knihy] Annarita Leva a Laura M.R. Rinaldi. *Recent advances in plant in vitro culture*. místo neznámé : InTech, 2012, stránky 29-40.
42. **Procházka, Stanislav, Šebánek, Jiří a kol.** *Regulátory rostlinného růstu*. Praha : Academia, 1997. stránky 147-163. 80-200-0597-8.
43. **Nordström, Anders, Tarkowski, Petr a a kol.** 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 of the United States of America*. 2004, Sv. 101, 21, stránky 8039-8044.
44. **Guo, L. a Xue, F.** Plant Tissue Culture: A Recent Progress and Potential Applications. *Agricultural Science & Technology*. 2014, Sv. 15, 12, stránky 2088-2099.
45. **Zhao, J. a Davis, LC.** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2005, Sv. 23, 4, stránky 283-333.
46. **Ramirez-Estrada, K.** Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*. 2016, Sv. 21, 2, stránky 101-124.
47. **Ramachandra, Rao S. a Ravishankar, G.A.** Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2002, Sv. 20, 2, stránky 101-153.



48. **Seidlová, Markéta.** Kultury léčivých rostlin in vitro – IXX. Hradec Králové : Univerzita Karlova v Praze, 2016. str. 28.
49. **Čabelková, Petra.** Explantátové kultury *Trichocereus pachanoi*. Hradec Králové : autor neznámý, 2015. stránky 1-61.
50. **Karlíček, Rudolf a kol.** *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha : Univerzita Karlova v Praze, 2013. stránky 267, 276-281. 978-8-246-2202-6.
51. **Klouda, Pavel.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. stránky 265-281. 80-86369-07-2.
52. **Murashige, Toshiro a Skoog, Folke.** A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962, Sv. 15, 3, str. 485.
53. **Martin, Jan.** Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v in vitro kulturách *Scutellaria baicalensis* Georgii. Hradec Králové : Univerzita Karlova v Praze, 2006. stránky 51, 73-75, 84.
54. **Klemerová, Věra a Klemra, Petr.** *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie*. Praha : Univerzita Karlova, 1999. stránky 23-42. 80-7184-888-3.

## 12. ABSTRAKT

Produkce sekundárních metabolitů v explantátových kulturách *Trichocereus pachanoi* (Cactaceae).

Lucie Urbanová

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Farmacie

Klíčová slova: *Trichocereus pachanoi*, explantátové kultury, meskalin, sekundární metabolity, prekurzory, elicitace, kyselina skořicová, skořican sodný, tryptofan, ozon, methylenová modř

Cílem této diplomové práce bylo sledování vlivu vybraných prekurzorů a elicitorů na produkci sekundárního metabolitu meskalinu v explantátových kulturách *Trichocereus pachanoi*. Ke kultivaci suspenzních kultur bylo použito medium dle Murashigeho a Skooga s přidanými růstovými regulátory kyselinou 2,4-dichlorfenoxycetovou a 6-benzylaminopurinem.

Ke zkoumání ovlivnění produkce byly vybrány prekurzory kyselina skořicová, skořican sodný a tryptofan a elicitory ozon a methylenová modř. Prekurzory byly připraveny a použity v koncentracích 50, 100 a 500 mg·l<sup>-1</sup>. Ozon byl přidán ve dvou časových úsecích 5 a 10 sekund. Methylenová modř byla použita v koncentraci 1, 10 a 100 mg·l<sup>-1</sup>. Kultivace s přidanými látkami probíhala po dobu 24 a 168 hodin. Ke stanovení obsahu meskalinu byla použita metoda HPLC.

Statisticky významný vliv na produkci meskalinu v kultuře *in vitro* byl prokázán pouze u skořicanu sodného. U koncentrace 500 mg·l<sup>-1</sup> došlo po 168 hodinách v porovnání s kontrolním vzorkem k osminásobnému zvýšení obsahu meskalinu. U koncentrace 100 mg·l<sup>-1</sup> došlo po stejném časovém úseku dokonce k jedenáctinásobnému zvýšení. Ostatní zkoumané látky nevykázaly žádné významné změny ve vztahu k produkci meskalinu.

### 13. ABSTRACT

Production of secondary metabolites in the explant cultures of *Trichocereus pachanoi* (Cactaceae)

Lucie Urbanová

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Pharmacy

Key words: *Trichocereus pachanoi*, the explant cultures, mescaline, secondary metabolites, prodrugs, elicitation, cinnamic acid, sodium cinnamate, tryptophan, ozone, methylene blue

The aim of this thesis was the research of effect of selected precursors and elicitors for secondary metabolite production of mescaline in explant cultures *Trichocereus pachanoi*. Suspension cultures were cultivated on the Murashige and Skoog medium with addition of the growth regulators 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzylaminopurine.

To observe changes in production these precursors: cinnamic acid, sodium cinnamate and tryptophan, and these elicitors: ozone and methylene blue, were selected. Precursors were prepared and used in concentrations of 50, 100 and 500 mg·l<sup>-1</sup>. Ozone was added in two time slots, 5 and 10 seconds. Methylene blue has been used in concentrations of 1, 10 and 100 mg·l<sup>-1</sup>. Cultivation with added compounds lasted for 24 and 168 hours. The content of mescaline was determined by HPLC analysis.

A statistically significant effect on the production of mescaline *in vitro* culture was proved only with sodium cinnamate. The content of mescaline was increased eight times compared with a control sample after 168 hours of cultivation at the sodium cinnamate concentration of 500 mg·l<sup>-1</sup>. The content of mescaline at the concentration of 100 mg·l<sup>-1</sup> was increased after the same period even eleven times. Other test compounds showed no significant changes in relation to production of mescaline.