

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů**

Katedra zahradnictví



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

***In vitro* kultury kari (*Murraya koenigii* L. Spreng.)**

Bakalářská práce

Martina Hradcová

Zahradnictví

doc. Ing. Bc. Martin Koudela, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "*In vitro* kultury kari (*Murraya koenigii* L. Spreng.)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce doc. Ing. Bc. Martinu Koudelovi, Ph.D. za veškeré rady, podněty, připomínky a ochotu při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Oushadee Abeyawardana, Ph.D. za poskytnutí podkladů a podporu při zakládání pokusů praktické části této práce.

***In vitro* kultury kari (*Murraya koenigii* L. Spreng.)**

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá rostlinou *Murraya koenigii* (L.) Spreng. z čeledi *Rutaceae* Juss., její mikropropagací pomocí nodálních a listových explantátů a sestavením vhodného sterilizačního postupu pro tuto rostlinu bez využití chloridu rtuťnatého.

Murraya koenigii pochází z jižní a jihovýchodní Asie, kde se využívá jako léčivá a kořeninová rostlina. Z důvodu obsahu biologicky aktivních látek (zejména karbazolových alkaloidů) se tak stala zajímavou surovinou pro farmaceutický průmysl.

V praktické části této práce byly založeny *in vitro* kultury z litových čepelí a příčně a podélně řezaných nodů z mladých výhonů. Jako kultivační médium pro indukci výhonů bylo použito polotuhé MS médium obohacené o různé kombinace regulátorů růstu. Během kultivace došlo nejen k tvorbě výhonů z nodálních kultur, ale i k tvorbě kalusu a výhonu na listových kulturách. Po úspěšné indukci výhonů byly explantáty přesazeny do zakořeňovacího média, jehož základem bylo opět MS médium doplněné o regulátory růstu.

Pro indukci výhonů z nodálních explantátů bylo nejúčinnější MS médium obohacené o 2,50 mg/ BAP, 2,50 mg/l kinetinu a 0,25 mg/l IBA. Nody kultivované ve vertikální poloze v tomto médiu vyprodukovaly průměrně 2,77 výhonů na explantát. V kulturách listů byl vyprodukován kalus a v jednom případě i výhony. Nejúspěšnější mkultivační médium pro kultury listů se skládalo z MS média doplněného o 7,50 mg/l BAP, 2,50 mg/l kinetinu, 0,25 mg/l IBA, 0,01 mg/l GA₃ a 0,05 mg/l NAA. Pro indukci kořenů bylo použito MS médium doplněné o 0,5 mg/l IBA a 1,0 mg/l NAA. Indukce kořenů na tomto kultivačním médiu nebyla úspěšná, kultury tedy nemohly být převedeny do *ex vitro* podmínek.

Pro sterilizaci explantátů bez použití HgCl₂ byly použity různé kombinace a koncentrace roztoků etanolu a NaClO. Nejúspěšnější metodou bylo umístění explantátů na 25 minut do 20% roztoku NaClO a následně na 10 minut do 70% roztoku etanolu.

Klíčová slova: *in vitro* kultury, kari, *Murraya koenigii* L. Spreng., mikropropagace

***In vitro* cultures of curry leaves**

(*Murraya koenigii* L. Spreng.)

Summary

This bachelor thesis deals with *Murraya koenigii* (L.) Spreng. of the *Rutaceae* Juss. family, its micropropagation using nodal and leaf explants, and the establishment of a suitable sterilization procedure for this plant without the use of mercuric chloride.

Murraya koenigii is native to South and Southeast Asia where it is used as medicinal plant and seasoning. It has also become also an interesting plant for the pharmaceutical industry because of its content of bioactive compounds (especially carbazole alkaloids).

In the practical part of this work, *in vitro* cultures were established from leaf blades and transversely and longitudinally cut nodes from young shoots. Semi-solid MS medium supplemented with different combinations of growth regulators was used as growth medium for shoot induction. During cultivation, not only shoot formation from nodal cultures but also callus and shoot formation on leaf cultures occurred. After successful shoot induction, explants were transplanted into rooting medium, which consisted of MS medium supplemented with growth regulators.

For shoot induction from nodal explants, MS medium enriched with 2.50 mg/ BAP, 2.50 mg/l kinetin and 0.25 mg/l IBA was most effective. Nodules cultured vertically in this medium produced an average of 2.77 shoots per explant. The leaf cultures produced callus and in one case shoots. The most successful culture medium for leaf cultures consisted of MS medium supplemented with 7.50 mg/l BAP, 2.50 mg/l kinetin, 0.25 mg/l IBA, 0.01 mg/l GA₃ and 0.05 mg/l NAA. For root induction, MS medium supplemented with 0.5 mg/l IBA and 1.0 mg/l NAA was used. Root induction on this culture medium was not successful, thus the cultures could not be transferred to *ex vitro* conditions.

Different combinations and concentrations of ethanol and NaClO solutions were used to sterilize the explants without HgCl₂. The most successful method was to place the explants in a 20% NaClO solution for 25 minutes and then in a 70% ethanol solution for 10 minutes.

Keywords: *in vitro* cultures, curry, *Murraya koenigii* L. Spreng., micropropagation

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Hypotéza	9
4	Literární rešerše	10
4.1	Využití rostliny	10
4.1.1	Antidiabetické účinky	10
4.1.2	Účinky na cévní soustavu	11
4.1.3	Antikarcinogenní účinky	11
4.1.4	Antioxidační účinky	11
4.1.5	Účinky na trávicí soustavu	11
4.1.6	Pesticidní účinky	12
4.2	Současná technologie pěstování	12
4.3	<i>In vitro</i> kultury rostlin a mikropropagace	13
4.3.1	Kultivační média	14
4.3.1.1	Regulátory růstu	14
4.3.1.2	Gelující látky	15
4.3.1.3	Hodnoty pH média	15
4.3.1.4	Akumulace toxických látek	15
4.4	<i>In vitro</i> kultury <i>Murraya koenigii</i>	16
4.4.1	Shrnutí předchozí literatury	16
4.4.2	Rizika použití rtuť	19
4.4.3	Volba metodiky	19
5	Metodika	21
5.1	Aseptická opatření při zakládání <i>in vitro</i> kultur	21
5.2	Příprava kultivačních médií	22
5.2.1	Příprava zásobních roztoků	22
5.2.2	Příprava kultivačních médií	23
5.2.3	Použitá kultivační média	23
5.2.4	Rostlinný materiál	24
5.2.5	Sterilizační postupy	24
5.2.6	Založení kultur	26
5.2.7	Přesazování kultur	29
5.2.8	Zpracování výsledků	29
6	Výsledky	30
6.1	Účinnost sterilizačních postupů	30
6.1.1	První známky kontaminace	30

6.1.2	Kontaminace celé kultury	31
6.2	Nodální kultury.....	32
6.2.1	Zastoupení vitálních explantátů a explantátů tvořících výhony.....	32
6.2.2	Délka výhonů indukovaných z nodálních explantátů.....	33
6.2.3	Počet výhonů indukovaných na nodální explantát	36
6.2.4	Listové kultury	37
7	Diskuze	40
7.1	Indukce růstu výhonů a kalusu	40
7.1.1	Nodální kultury.....	40
7.1.2	Listové kultury	42
7.1.3	Vliv gelující látky a aktivního uhlí na vitalitu a produktivitu kultury.....	42
7.2	Sterilizační postupy	43
8	Závěr	44
9	Literatura.....	45
10	Seznam použitých zkratk a symbolů	55

1 Úvod

Ve své práci se věnuji rostlině *Murraya koenigii* a její mikropropagaci. *Murraya koenigii* je rostlina pocházející z jižní a jihovýchodní Asie, kde se používá jako tradiční kořeninová a léčivá rostlina. V důsledku globalizace vzrostl zájem o tuto aromatickou rostlinu i mimo její domovinu. V posledních 30 letech proběhly studie, které potvrdily léčebné účinky bioaktivních látek obsažených v této rostlině, a tím otevřely dveře pro její využití i v moderní medicíně a farmacii. Dostupné studie také potvrdily jejich pesticidní účinky a tedy i možné využití při ochraně rostlin a prevenci chorob přenášených bodavým hmyzem.

Mikropropagace je relativně nová moderní metoda množení rostlin v podmínkách *in vitro*. Tato metoda propagace zajišťuje aseptické a plně kontrolovatelné podmínky pro pěstování rostlin, a tím poskytuje kvalitní množitelský materiál a surovinu pro farmaceutický a potravinářský průmysl. Mikropropagace a kultivace rostlin *in vitro* také zvyšují množitelský koeficient a zkracují dobu množitelského cyklu. Jedna část této práce je zaměřena na optimalizaci složení kultivačních médií pro mikropropagaci *Murraya koenigii*.

V dostupných zdrojích zabývajících se mikropropagací *Murraya koenigii* byly explantáty sterilizovány pomocí roztoku chloridu rtuťnatého. Dostupné studie naznačují, že zacházení se rtutí má negativní vliv na lidské zdraví. Vzhledem k využití *Murraya koenigii* v potravinářství se jeví jako důležité eliminovat případné riziko možné kontaminace této rostliny rtutí. Zásadní jsou i negativní dopady na životní prostředí, zejména v podobě kontaminace vod a s tím souvisejícími následky pro vodní organismy. Z těchto důvodů se další část této práce věnuje stanovení efektivního sterilizačního postupu bez využití chloridu rtuťnatého.

Motivací pro napsání této práce byla snaha přinést nové poznatky, které by mohly přispět k modernizaci a vyšší bezpečnosti pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin.

2 Cíl práce

Cílem práce je založit *in vitro* kulturu *Murraya koenigii* (L.) Spreng. za použití nodálních a listových explantátů a určit optimální podmínky kultury pro mikropropagaci *Murraya koenigii* (L.) Spreng.

3 Hypotéza

Složení kultivačního média a postup sterilizace explantátů mají průkazný vliv na vitalitu a produktivitu *in vitro* kultur.

4 Literární rešerše

Murraya koenigii (L.) Spreng. je keř, případně nízký strom, z čeledi *Rutaceae* Juss. *Murraya koenigii* dorůstá výšky až 6 m. Borka je hnědo-šedá, hladká, bez trnů. Listy této rostliny jsou 15 až 30 cm dlouhé, lichozpeřené s 11 až 25 lístky, bez palistů, lístky jsou kopinaté přibližně 5 cm dlouhé a 2 cm široké, na řapících dlouhých až 0,3 cm. Květy jsou pětičetné, bílé, oboupohlavné, nálevkovité, umístěné ve vrcholících obsahujících až 90 květů. V domovině kvete od dubna do poloviny května. Plody jsou drobné, kulaté až vejcovité černé peckovice délky až 1,6 cm, které v domovině dozrávají v červenci a srpnu. (Raghunathan & Mitra 1982). *Murraya koenigii* pochází z jižní a jihovýchodní Asie, odkud byla introdukována do částí Severní Ameriky, Afriky a Austrálie a Oceánie.

Čeleď *Rutaceae* (routovité) je téměř kosmopolitní a zahrnuje více než 1600 druhů rozdělených do minimálně 150 rodů. Většinou se jedná o opadavé keře nebo stromy, zřídka byliny. V České republice je původní jediný zástupce *Dictamnus albus* a dále se zde vyskytují zavlečené zplanělé druhy *Ruta graveolens*, *Ptelea trifoliata* a *Phellodendron amurense* (Wild et al. 2021). Mnoho zástupců této čeledi si díky obsahu aromatických a biologicky aktivních látek našlo uplatnění v moderní i lidové medicíně, potravinářském a kosmetickém průmyslu. Pilocarpin, alkaloid využívaný k léčbě glaukomu, se získává z listů rostlin rodu *Pilocarpus* (Pinheiro 1997). *Zanthoxylum piperitum* (známé jako sečuánský pepř), *Murraya koenigii* a *Ruta graveolens* jsou využívány jako kořeninové rostliny. Mezi nejvýznamější ovocné druhy z této čeledi patří zástupci rodů *Citrus* a *Fortunella*. *Poncirus trifoliata* se využívá jako okrasná dřevina a mrazuvzdorná podnož pro citrusy.

4.1 Využití rostliny

Různé části *Murraya koenigii* obsahují velké množství biologicky aktivních látek. Mezi nejvýznamější patří karbazolové alkaloidy (např. koenimbin, murrayacin, girinimbin a další), fenolické látky, flavonoidy, saponiny. Listy navíc obsahují minerály, karoteny a vitamíny B₃, B₉ a C. Z tohoto důvodu je *Murraya koenigii* často používanou rostlinou v jihoasijské kuchyni i v tradiční indické medicíně (ajurvédě) a stala se i velmi zajímavou surovinou pro farmaceutický průmysl (Prajapati et al. 2003).

4.1.1 Antidiabetické účinky

Mahanimbin izolovaný z celé rostliny *Murraya koenigii* u potkanů účinně snížil vysokou hladinu krevního cukru indukovanou streptozotocinem. Účinek byl způsobený buď zvýšením sekrece inzulínu ve slinivce nebo zvýšením vstřebávání glukózy do okolních tkání. Mahambinin také napomáhá inhibovat α -amylázu, a tím zpomalovat trávení polysacharidů (Dineshkumar et al. 2010). Sepala et al. (2022) prokazuje inhibiční účinky nově popsaného karbazolového alkaloidu 3,3',5,5',8-pentametyl-3,3'-bis(4-methylpent-3-en-1-yl)-3,3',11,11'-tetrahydro-10,10'-bipyran[3,2-a]karbazolu na α -amylázu a α -glucosidázu v podmínkách *in vitro*.

4.1.2 Účinky na cévní soustavu

Při pokusech na žábách bylo prokázáno, že vodný extrakt z listů *Murraya koenigii* zpomaluje tepovou frekvenci a rozšiřuje cévy (Kadam et al. 2011). Pokusy na myších naznačují, že lihový extrakt z listů *Murraya koenigii* snižuje hladinu krevního cholesterolu do stejné míry jako běžně dostupné statiny (Tembhurne et al. 2010) a urychluje hojení ran (Anand et al. 2011).

4.1.3 Antikarcinogenní účinky

Sadwal et al. (2024) prokazuje, že orální aplikace hydroetanolového extraktu z plodů *Murraya koenigii* snižuje riziko vzniku nádoru mléčných žláz indukovaným 7,12-dimetylbenz(a)anthracenem u potkanů, zpomaluje růst nádoru a pomáhá zachovat strukturu okolních tkání. Pooja et al. (2023) uvádí, že zlaté a stříbrné nanočástice s extraktem z kůry *Murraya Koenigii* mají antikarcinogenní účinek. Ten je způsoben obsahem flavonoidů a karbazolových alkaloidů. Flavonoidy mají antiproliferační účinky a způsobují apoptózu nádorových buněk (Slika et al. 2022). Karbazolové alkaloidy inhibují působení telomerázy a topoisomerázy v nádorových buňkách (Song et al. 2021). V pokusech na myších byly prokázány chemoprotektivní účinky methanolového extraktu z listů *Murraya koenigii*. Běžně používané chemoterapeutikum cyklofosfamid způsobuje poškození chromozomů erytrocytů v kostní dřeni. Erytrocyty myši, kterým byl před použitím cyklofosfaminu podán extrakt z *Murraya koenigii*, vykazovaly nižší procento poškození genetické informace (Swati et al. 2012). Je tedy pravděpodobné, že extrakty z *Murraya koenigii* by mohly sloužit jako doplněk nebo náhrada současných chemoterapeutik. Ito et al. (2006) uvádí, že karbazolové alkaloidy mahanin, pyrayafolin-D a murrayafolin-I mají cytotoxické účinky proti leukemickým buňkám HL-60.

4.1.4 Antioxidační účinky

Tachibana et al. (2001) uvádí, že karbazolové alkaloidy obsažené v extraktu z *Murraya koenigii*, mahanin a euchrestin B, mají vyšší primární antioxidační účinky než α -tokoferol. Společně s bismurrayafolinem E mají také významnou schopnost odstraňovat volné radikály.

4.1.5 Účinky na trávicí soustavu

Vodný extrakt z listů *Murraya koenigii* měl u myši výrazný účinek na prevenci tvorby žaludečních vředů indukovaných několika různými způsoby. Výsledky byly srovnatelné s běžnými léčivy (Shirwaikar et al. 2006; Praveen et al. 2011).

Některé z karbazolových alkaloidů (zejména kurryam a koenimbin) izolovaných ze semen *Murraya koenigii* prokázaly u potkanů schopnost zpomalovat motilitu střev a léčit průjem (Mandal et al. 2010). V tradiční medicíně se různé části *Murraya koenigii* využívají také proti zácpě, plynatosti, úplavici, pro zastavení zvracení a zvýšení chuti k jídlu.

4.1.6 Pesticidní účinky

Látky osazené v různých částech rostliny mají baktericidní, fungicidní, herbicidní a insekticidní účinky. Girinimbin prokázal silné inhibiční účinky vůči grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*. Proti gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a *Proteus vulgaris* a houbám *Candida albicans* a *Aspergillus niger* byly účinné dimerické karbazoly. (Rahman et al. 2005).

Ramsewak et al. (1999) uvádí, že mahanimbin se projevil jako účinný insekticid proti komárům *Aedes aegypti*, přenašečům závažných chorob jako jsou horečka dengue nebo žlutá zimnice.

Vashishth et al. (2023) prokazuje v *in vitro* i *in vivo* pokusech, že vodný extrakt z listů *Murraya koenigii* inhibuje klíčení testovaných plevelů (*Anagallis arvensis*, *Poa annua*, *Lepidium didymum* a *Vicia sativa*), ale zároveň nezpomaluje růst testovaných kulturních plodin (*Triticum aestivum* a *Cicer arietinum*) a nemá negativní vliv na půdní vlastnosti.

Tyto poznatky nasvědčují o možnosti využití extraktů z *Murraya koenigii* nejen v medicíně, ale i v zemědělství jako prostředku ochrany rostlin, v potravinářství ke konzervačním účelům a při prevenci nemocí přenášených bodavým hmyzem.

4.2 Současná technologie pěstování

Množení nejčastěji probíhá pomocí semen. Zralé plody se z mateřských rostlin sklízí v červenci a srpnu. Po odstranění oplodí se semena umístí do sadbovačů s navlhčeným substrátem. Optimální teplota pro klíčení semen je 21 °C. Po vzejití lze semenáče vysadit na stanoviště při minimální výšce 15 až 20 cm. Této výšky semenáče dosahují po 3 až 12 měsících. Při menším objemu produkce lze také využít jako množící materiál kořenové výmladky. Minimálně roční výmladky se mohou ihned sázet na připravené stanoviště.

Optimální teploty pro pěstování *Murraya koenigii* se pohybují v rozmezí 20 – 26 °C. Teploty nižší než 13 °C výrazně zpomalují růst.

Murraya koenigii vyžaduje hlinitopísčité propustné půdy, dobře zásobené organickými látkami. Před založením plantáže se doporučuje aplikovat chlévský hnůj v dávce 20 t/ha. Rostliny se vysazují do připravených jam o velikosti 30 x 30 x 30 cm ve sponu 120 až 150 cm. Sazenice je vhodné zasypat směsí zeminy a chlévského hnoje.

Po výsadbě je vhodné rostliny seříznout přibližně 15 cm nad zemí. Po 6 měsících na stanovišti by rostliny měly být pravidelně dvakrát ročně seřezávány na výšku 1 m. Společně s řezem je vhodné vyštipovat vrcholové pupeny, aby se podpořilo větvení. Při dodržení vhodných agrotechnických opatření je možné listy sklízet až čtyřikrát ročně. Po každé sklizni se doporučuje přihnojení dusíkem (90 kg/ha), fosforem (10 kg/ha) a draslíkem (10 kg/ha). Po pátém roce pěstování může být hektarový výnos až 5 tun. Trvanlivost plantáží se pohybuje v rozmezí 15 až 20 let.

V tradičních pěstitelských oblastech jsou nejčastějšími škůdci housenky otakárka citrusového (*Papilio demoleus*). Při menší míře napadení se housenky odstraňují ručně, v závažnějších případech je možné použít insekticid. Při výskytu mer nebo červců se doporučuje odstranit napadené větve, případně aplikovat vhodný insekticid. Nejčastější chorobou je skvrnitost listů, které se dá předejít použitím fungicidů.

V současné době se *Murraya koenigii* komerčně pěstuje ve třech kultivarech. Krajová odrůda 'Senkaanpu' je pěstována převážně v indickém státě Tamilnádu. Tato odrůda má fialové řapíky a je výrazně aromatická. Na University of Agricultural sciences, Dharwad, Indie byly vyšlechtěny dva kultivary 'DWD-1' také nazývaný 'Suwasini', a 'DWD-2'. V porovnání s 'DWD-1' má 'DWD-2' méně aromatické listy, ale rychleji roste a lépe snáší nižší teploty. Ve volné přírodě se vyskytují tři variety *Murraya koenigii*. Vedle standardní variety existuje ještě zakrslá varieta, která je vhodná pro pěstování v nádobách, ale má méně aromatické listy. Další varietou je *gimthi* která je nejaromatictější ze všech. (Vasanthkumar et al. 2023)

4.3 *In vitro* kultury rostlin a mikropropagace

In vitro kultury jsou takové kultury, které jsou založené z částí rostlin vyjmutých ze svého běžného prostředí. Rostliny jsou tak kultivovány v optimalizovaných a regulovaných podmínkách – fyzikálních (vzdušná vlhkost, intenzita osvětlení), nutričních i hormonálních. Kultivační podmínky jsou také aseptické, tedy bez přítomnosti škůdců a původců chorob. Dále rovněž dochází k narušení normálního vývoje rostliny. Izolované pletivo může dát vzniknout kalusu nebo celému orgánu. (Pierik 2012)

Mikropropagace je přímou metodou množení rostlin využívající techniky *in vitro*. Hlavní výhodou mikropropagace je výrazné zvýšení rychlosti množení. U některých druhů (například u některých rostlin z čeledi *Orchideaceae* nebo u opadavých azalek *Rhododendron* sect. *Pentathera*) je mikropropagace nejčastějším způsobem množení z důvodu nízké efektivity nebo vysoké náročnosti ostatních metod. Další výhodou mikropropagace je možnost produkce velkého množství uniformních klonů na relativně malém prostoru. Jelikož mikropropagace není závislá na průběhu počasí a ročním období, umožňuje rozložit produkci rostlin do celého roku. Mikropropagací může být také zajištěna produkce bezvirózních rostlin a rostlin bez bakteriálních a houbových chorob. Mikropropagace je také často využívána ve šlechtitelském procesu (Bhojwani & Razdan 2012).

Dle rostlinného materiálu, který byl vybrán k založení, se *in vitro* kultury dělí do několika kategorií. První kategorií jsou kultury celých rostlin, kdy použitým rostlinným materiálem je semeno, které bylo vyjmuté z mateřské rostliny a jehož klíčení probíhá na kultivačním médiu. Složení média a další podmínky kultivace je možno přísně kontrolovat a regulovat. Tím je možné minimalizovat vlivy, které by mohly negativně ovlivňovat klíčivost. Další kategorií jsou kultury embryí. V tomto případě je kultivováno embryo, které bylo vyjmuté ze semena. Tato technika je velmi přínosná pro šlechtitele, jelikož umožňuje tvorbu haploidů a překonání dormance semen a překážek při křížení nekompatibilních jedinců. Při mezidruhovém křížení, nebo křížení diploidních a tetraploidních rostlin, mnoho embryí uhynie z důvodu nesprávného vývoje endospermu. Tento problém je odstraněn vyjmutím embrya a nahrazením endospermu živným médiem. Dormance semen může být mimo jiné způsobena látkami obsaženými v některých vrstvách semene. V tomto případě odstranění těchto vrstev a kultivace embrya na médiu překonává dormanci a urychluje tím klíčení. V tomto případě je možné embrya také jarovizovat. Orgánové kultury fungují na principu kultivace jednoho rostlinného orgánu. Jako explantáty mohou být použity meristémy, vzrostné vrcholy, kořeny, prašníky, nebo jiné orgány. Kultury meristémů se využívají k ozdravení rostlin od virů.

Jelikož v meristémech nejsou přítomna vodivá pletiva, je méně pravděpodobné, že meristémy budou infikovány virovou chorobou ze zbytku rostliny. Odebráním a následnou kultivací meristému lze dopěstovat nového bezvirózního jedince. V kulturách vzrostných vrcholů, kořenů, nodů a listů jsou indukovány postranní výhony, které jsou následně používány jako množitelství materiál bez bakteriálních a houbových chorob. Prašnickové kultury se využívají ve šlechtitelství ke tvorbě haploidů (v případě polyploidů i k tvorbě nižších stupňů polyploidie) a jako výchozí materiál pro indukci mutací. Kalusové kultury jsou zakládány z diferencovaného pletiva, které je kultivováno za takových podmínek, aby začalo vytvářet nediferencované pletivo – kalus. Z kalusu je poté možné diferencovat orgány nebo embrya. Kalus tak může být zdrojem sekundárních metabolitů nebo protoplastu pro další kultivaci. Kalusové kultury se také využívají ke kryokonzervaci genetické informace v genových bankách. V kulturách samostatných buněk jsou kultivovány pouze buňky, nikoliv pletiva. Využití těchto kultur je podobné jako u kalusových kultur. Kultury protoplastů, kdy je buněčná stěna enzymaticky rozložena a následně je kultivován pouze protoplast, nejsou využívány k mikropropagaci jako takové, ale především k tvorbě cytoplazmatických hybridů a transplantaci jader nebo jiných organel (Pierik 2012).

Po úspěšném vypěstování klonů v *in vitro* podmínkách je možné takto vyprodukované rostliny převést do polních nebo skleníkových pěstebních podmínek. V *in vitro* podmínkách jsou však rostliny pěstovány v optimalizovaném substrátu a při vyšší vlhkosti a nižší intenzitě světla než v *ex vitro* podmínkách. Z tohoto důvodu je nutné rostliny aklimatizovat na nové podmínky. Aklimatizace většinou probíhá v několika fázích ve skleníku postupným zvyšováním intenzity světla a snižováním vzdušné vlhkosti. Kultivační médium je během aklimatizace vyměněno za pěstební substrát vhodný pro mladé rostliny. (Sathyanarayana & Varghese 2007).

4.3.1 Kultivační média

Kultivační médium slouží jako substrát pro vývoj rostlin a zároveň suplementuje živiny, v některých případech může nahradit i symbiotické půdní organismy. Z důvodu různých nároků jednotlivých druhů, případně i jednotlivých částí rostliny, neexistuje pro mikropropagaci univerzální kultivační médium. Optimalizace média je tedy velmi důležitou součástí zakládání *in vitro* kultur. Kultivační média obsahují organické nebo anorganické soli makro i mikroživin, zdroj uhlíku (snadno využitelný cukr – nejčastěji sacharóza), vitamíny, regulátory růstu, případně další komponenty dle požadavků kultury. Při kultivaci na pevných médiích se do média přidává gelující látka. Pro většinu rostlin se jako vhodné kultivační médium osvědčilo MS médium (Murashige & Skoog 1962). Woody plant médium (Lloyd & McCown 1981) lze využít pro mikropropagaci dřevin. (Sathyanarayana & Varghese 2007)

4.3.1.1 Regulátory růstu

Auxiny přispívají k prodlužování internodií a zachování apikální dominance rostlin. V *in vitro* kulturách používají k indukci kořenů a v kombinaci s cytokininy na proliferaci výhonů. Mezi nejčastěji používané auxiny patří přírodní kyselina indol-3-octová (IAA), indol-3-máselná kyselina (IBA) a syntetická kyselina 1-naftyloctová (NAA) a další. Cytokininy jsou využívány k inhibici apikální dominance a stimulaci větvení výhonů a kořenů. 6-

benzylaminopurin (BAP), isopentenyl-adenin (2iP) a N⁶-furfuryladenin (kinetin) jsou nejčastěji používané cytokininy. Gibereliny se v *in vitro* kulturách využívají méně často. Gibereliny podporují mimo jiné dlouhivý růst, indukují klíčení semen a násadu květů. Kyselina giberelová (GA₃) je nejčastěji používaným giberelinem. (Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.)

4.3.1.2 Gelující látky

Gelující látky se využívají při zakládání statických kultur, aby se předešlo úplnému ponoření explantátů do kultivačního média, což by mohlo mít za následek odumření kultury z důvodu nedostatku kyslíku. U dynamických kultur se gelující látky nepoužívají. Pro *in vitro* kultivaci se využívají gelující látky, které jsou chemicky inertní a které vydrží sterilizaci, nejčastěji v autoklávu. Nevýhodou nejčastěji používaných zahušťovadel je jejich přírodní původ, výrobky různých značek a šarží se od sebe mohou lišit. Agar, nejčastěji používaná gelující látka, je směs polysacharidů získávaná z červených řas rodů *Gracilaria* a *Gelidia*. Agaróza je zahušťovadlo získávané odstraněním agraropektinů z agaru. Tento proces je velmi náročný, což výrazně zvyšuje cenu produktu. Agaróza se využívá pouze v případech, kdy je potřeba velmi pevné médium. Gelrite a Phytigel jsou obchodní názvy pro polysacharid vytvářené bakterií *Pseudomonas elodea*. Na rozdíl od agaru tyto látky nevyžadují zahřátí pro vytvoření gelu (Bhojwani & Razdan 2012).

4.3.1.3 Hodnoty pH média

Ve většině případů se pH upravuje při přípravě média na rozmezí 5,0 až 6,0, dle požadavků kultivované rostliny. Zvolené pH média má mimo vitality explantátů vliv i na pevnost média. Hodnota pH média se samovolně mění během různých fází kultivace (Bhojwani & Razdan 2012).

4.3.1.4 Akumulace toxických látek

Při *in vitro* kultivaci rostlin je častým problémem akumulace toxických produktů oxidace fenolických látek, které jsou vylučovány explantátem. Toto může mít negativní dopady na kultivované rostliny – od mírného snížení vitality až po úhyn kultivovaných rostlin. Tento jev je často detekovatelný podle hnědého zbarvení explantátů a kultivačního média. Jako prevenci lze do kultivačního média přidat antioxidanty nebo adsorbenty. Mezi nejčastěji používané antioxidanty patří kyselina askorbová a kyselina citronová. Aktivní uhlí nebo polyvinylpyrrolidon jsou často používané adsorbenty. Některá aditiva ale mohou mít sama o sobě negativní vliv na vitalitu kultury. Optimalizace kultivačního média je tedy klíčová pro úspěšnou *in vitro* kultivaci. Další možností předcházení akumulace toxických látek je časté přesazování explantátů do nového média (Permadi et al. 2024).

4.4 In vitro kultury *Murraya koenigii*

Jak bylo uvedeno v předchozích kapitolách, mikropropagace má mnoho výhod. V případě *Murraya koenigii* je možné mikropropagaci využít k výrobě velkého množství kvalitního množitelského materiálu pro polní pěstování. Kalusové kultury je možné využít pro produkci sekundárních metabolitů a biologicky aktivních látek. Pěstování farmaceutických surovin v podmínkách *in vitro* snižuje riziko kontaminace materiálu bakteriálními a houbovými patogeny oproti pěstování v polních podmínkách. Mikropropagace a další *in vitro* techniky také mohou výrazně urychlit šlechtitelské procesy.

4.4.1 Shrnutí předchozí literatury

Úspěšnou mikropropagaci *Murraya koenigii* se podařilo provést již v několika případech. Bhuyan et al. (1997) a Rani et al. (2012) použili jako explantáty semena. Mathew et al. (2007) a Perveen et al. (2015) kultury založili ze vzrostných vrcholů. Mathew et al. (1999), Babu et al. (2000), Rout (2005) a Khatik & Joshi (2018) zakládali *in vitro* kultury z nodálních explantátů. Žádný z dostupných zdrojů nepopisuje mikropropagaci *Murraya koenigii* z listových explantátů.

Povrchová sterilizace byla ve všech případech zahájena důkladným opláchnutím rostlinného materiálu ve vodě. S výjimkou pokusů od Mathew et al. (1999) a Mathew et al. (2007) byl použit i detergent. Bhuyan et al. (1997), Rani et al. (2012) a Perveen et al. (2015) využili dále fungicid na bázi methylbenzimidazol-2-ylkarbamát, Babu et al. (2000) použili fungicid na bázi oxychloridu mědi. Ve dvou případech byl k povrchové sterilizaci také použit roztok chlornanu sodného – Bhuyan et al. (1997) použili roztok o 7 % objemu, Rani et al. (2012) roztok o 2 % objemu. Explantáty byly poté ve všech experimentech sterilizovány 0,1% roztokem HgCl₂, jedinou výjimkou byl experiment Mathew et al. (1999), kdy byl použit 0,06% roztok. Explantáty byly v tomto roztoku ponechány v rozmezí 1 až 20 minut. Poté byly všechny explantáty alespoň třikrát opláchnuty autoklávovanou destilovanou vodou.

pH všech médií bylo upraveno před autoklávováním na 5,7 až 5,8. Založené kultury byly kultivovány při 25 °C a fotoperiodě 16 hodin. Pouze Babu et al. (2000) zvolili fotoperiodu 12 hodin.

Bhuyan et al. (1997) použili ke kultivaci semen MS médium s 3 % sacharózy a 0,8 % agaru. Kultivační médium suplementovali BAP o koncentracích od 0 do 5 mg/l. Nejsilnější koncentrace BAP byly poté ještě doplněny GA₃ o koncentraci 0,2 a 0,4 mg/l. Jako nejproduktivnější bylo označeno médium s 5 mg/l BAP a 0,4 mg/l GA₃. Indukcí výhonů v tomto případě reagovalo 98,4 % kultivovaných semen, průměrný počet výhonů na jedno semeno byl 15,9 a jejich průměrná délka byla 4,7 cm. K indukci růstu kořenů bylo použito MS médium o poloviční koncentraci s 2 % sacharózy a 0,2 % Phytagelu suplementováno různými kombinacemi IAA, IBA, IPA a NAA. Nejlepší výsledky poskytlo médium suplementované o 1 mg/l IBA: růst kořenu se projevil u 95 % explantátů a jejich průměrná délka byla 6,9 cm. Při kultivaci na neobohacených médiích, médiích obohacených o 0,5 mg/l IAA, 0,5 a 1 mg/l IPA a médiích s kombinací 0,5 mg/l IBA a 0,5 mg/l NAA nebyl pozorován růst kořenů.

Mathew et al. (1999) při kultivaci nodálních explantátů použili k indukci výhonů MS médium se 0,7 % agaru obohacené o 1 mg/l BAP, 0,5 mg/l kinetinu a 0,1 mg/l NAA. Průměrná délka výhonů byla 1,5 cm a každý výhon měl 2 až 3 listy. K zakořenění bylo použito kapalné MS médium o poloviční koncentraci obohaceno o 0,1 mg/l NAA a 0,1 mg/l IBA. Průměrná délka kořenů byla 2 až 3 cm.

Babu et al. (2000) kultivovali nodální explantáty z kořenových výmladků na Woody plant médiu s 3 % sacharózy a 0,7 % agaru. Médium bylo suplementováno různými kombinacemi BAP, kinetinu a IBA. Nejlepší výsledky poskytla dvě média: první s 2 mg/l BAP a 2 mg/l kinetinu, a druhé s 3 mg/l BAP a 1 mg/l kinetinu; ani jedno z těchto médií nebylo obohaceno o IBA. Tato média vyprodukovala výhony v 60 % případů s průměrným počtem 28 výhonů na explantát. Pro zakořenění výhonů bylo opět použito woody plant médium s 2 % sacharózy a 0,7 % agaru. Médium bylo suplementováno různými kombinacemi NAA a IBA. Nejvyšší procento zakořenění (75 %) bylo pozorováno u média s 1,85 mg/l NAA a bez IBA. Průměrný počet kořenů na explantát byl 4.

Rout (2005) provedl kultivaci nodálních explantátů na MS médiu s 0,8 % agaru. Kultivační médium bylo suplementováno o různé koncentrace BAP, adenin sulfát a IAA. Explantáty kultivované na médiu s 2,5 mg/l BAP, 50 mg/l ADS a 0,25 mg/l IAA vyprodukovaly výhony v 82,2 % případů, s průměrným počtem 6,85 výhonu na rostlinu. Médium neobohacené o regulátory růstu a médium s 1 mg/l BAP nevyprodukovala žádné výhony. K zakořeňování explantátů byla použita média obohacená o různé kombinace IAA a NAA. Při kultivaci na médiu s 0,25 mg/l IAA a 0,25 mg/l NAA vyprodukovalo kořeny 85,4 % explantátů.

Mathew et al. (2007) kultivovali vzrostné vrcholy na MS médiu. Médium bylo obohaceno o BAP nebo kinetin v kombinaci s IAA. Nejvhodnější médium obsahovalo 1,5 mg/l BAP a 0,5 mg/l IAA. Na jeden explantát vyprodukovalo toto médium průměrně 21,5 výhonů o průměrné délce 2,23 cm s průměrně 12,3 listy na výhon. Kinetin v porovnání s BAP poskytoval o poznání horší výsledky. Zakořeňovací médium bylo suplementováno různými koncentracemi NAA. Nejlepších výsledků dosáhlo médium s 5 mg/l NAA: průměrně 8,3 kořenů na explantát; průměrná délka kořenů byla 3,58 cm. Neobohacené médium a médium s 1 mg/l NAA nevyprodukovala žádné kořeny.

Rani et al. (2012) kultivovali nezralá semena na MS médiu s 3 % sacharózy a 0,7 % agaru. Pro indukci výhonů byla použita média suplementována BAP, nebo kinetinem. Médium s 2,5 mg/l BAP bylo vyhodnoceno jako nejlepší, jelikož vyprodukovalo výhony v 90 % případů. Toto médium následně bylo suplementováno o různé koncentrace GA₃. Nejdelší výhony byly pozorovány u média s 0,4 mg/l GA₃. K zakořenění bylo použito MS médium o poloviční koncentraci obohacené o IAA, nebo IBA. Nejúčinnější bylo médium s 0,5 mg/l IAA, ve kterém zakořenilo 78 % rostlin. Při koncentracích nad 1,5 mg/l IAA a 1 mg/l IBA nebyly pozorovány žádné kořeny.

Perveen et al. (2015) kultivovali vzrostné vrcholy na MS médiu s 3 % sacharózy a 0,8 % agaru. Média byla obohacena o různé kombinace thidiauronu (TDZ), BAP, nebo kinetinu. Nejlepší výsledky poskytl TDZ o koncentraci 0,1 mg/l, kde výhony vyprodukovalo 78 % explantátů. Průměrný počet výhonů na jeden explantát byl 16,6 a jejich průměrná délka 2,93 cm. Při použití 1,13 mg/l BAP byla indukce výhonů pozorována u 74 % explantátů. Jejich průměrný počet na explantát byl 13,6 a průměrná délka 2,56 cm. Kinetin poskytoval horší

výsledky. Zjištěné nejvhodnější koncentrace těchto regulátorů růstu byly následně suplementovány ještě o různé koncentrace IAA. U všech testovaných koncentrací IAA bylo zřejmé zvýšení počtu a délky výhonů. V kombinaci s 0,1 mg/l TDZ se jako nejvhodnější projevila IAA o koncentraci 0,05 mg/l. Tato kombinace poskytovala výhony v 80 % případů, jejich průměrný počet byl 30,6 a průměrná délka 4,16 cm. Pro 0,13 mg/l BAP bylo nejlepších výsledků dosaženo v kombinaci s 0,09 mg/l IAA. Při této kombinaci reagovalo indukci výhonů 75 % explantátů. Průměrný počet výhonů na explantát byl 26,6 a jejich průměrná délka 3,73 cm. Pro zakořenění bylo testováno MS médium o poloviční i plné koncentraci suplementované různými koncentracemi IBA. Nejvhodnější bylo MS médium o poloviční koncentraci s 0,3 mg/l IBA. Na tomto médiu zakořenilo 60 % explantátů. Průměrný počet kořenů na explantát byl 3,33 a jejich průměrná délka 2,5 cm. Při koncentraci nad 0,6 mg/l k zakořenění nedošlo u žádného z explantátů.

Khatik a Joshi (2018) jako explantáty použili nodální segmenty, které byly kultivovány na MS médiu s 3 % sacharózy a 0,8 % agaru. Kultivační médium bylo dále suplementováno různými kombinacemi koncentrací BAP, kinetinu a adenin sulfátu. Nejvyšší úspěšnost (97 %) mělo médium s 2,5 mg/l BAP, 2,5 mg/l kinetinu a 30 mg/l ADS. U tohoto média byl průměrný počet výhonů na explantát 8,8 a jejich průměrná délka 4,3 cm. K zakořenění byly kombinovány různé koncentrace IBA a IAA. Nejvhodnější kombinací bylo 2,5 mg/l IBA a 0,9 mg/l IAA, kde kořeny průměrné délky 2,4 cm vyprodukovalo 95,6 % explantátů.

Na skleníkové nebo polní podmínky byly rostliny aklimatizovány po opláchnutí zbytků kultivačního média z kořenů. Aklimatizace ve všech případech probíhala v zastíněném skleníku při vysoké relativní vzdušné vlhkosti (minimálně 70 %). Jako nejvhodnější substrát (s 96,7% úspěšností) označil Mathew et al. (2007) směs rašeliny, perlitu a jemného písku v poměru 1:1:2.

Pro založení listových *in vitro* kultur *Murraya koenigii* zřejmě dosud neexistuje vhodná literatura, z tohoto důvodu byly využity poznatky z literatury zabývající se jinými druhy rostlin. Meng et al. (2004) při mikropropagaci *Rubus* sp. uvádějí nej lepší výsledky u listových explantátů rozříznutých podél středního žebra položených abaxiální stranou na kultivační médium. Toto zjištění rozporuje Siwach a Gill (2014), u kterých byla nejúspěšnější mikropropagace *Ficus religiosa*, pokud byly listy rozříznuty kolmo přes střední žebro a jejich prostřední části (tedy bez řapíku i špičky listu) umístěny na kultivační médium adaxiální stranou. Mikropropagace *Moringa oleifera* byla nejúspěšnější, pokud distální část vertikálně umístěného listu byla v kontaktu s médiem (Zhang et al. 2017). Thokchom a Maitra (2017) uvádějí, že nejvyšší pravděpodobnost tvorby kalusu mají listové explantáty *Anthurium andreanum*, které obsahují střední žebro. Papafotiou a Martini (2009) při mikropropagaci *Zamioculcas zamiifolia* zjistily, že nejvýnosnější jsou vertikálně umístěné explantáty z proximální části listu s řapíkem nebo středním žebrem.

4.4.2 Rizika použití rtuti

Chlorid rtuťnatý je látka, která se často využívá k povrchové sterilizaci rostlinných explantátů při kultivaci *in vitro*. Jak je rozvedeno níže, rtuťnaté kationty jsou toxické nejen pro mikroorganismy, ale i pro živočichy. Rtuťnaté kationty mají schopnost bioakumulace ať už v organických nebo anorganických sloučeninách a mohou mít nepříznivý dopad na plodnost, imunitní systém a funkci nervové a vylučovací soustavy u živočichů. U eukaryotických organismů byla prokázána genotoxicita. Bonacker et al. (2004) ve své studii prokazuje klastogenní a aneugenní účinky rtuťnatých kationtů způsobené poruchami cytoskeletu a tím i dělicího vřeténka. Tyto poruchy jsou způsobeny interakcí rtuťnatých kationtů s kinesinem a tubulinem. Dieguez-Acuña et al. (2004) uvádí, že již při nízkých koncentracích rtuťnaté ionty zabraňují aktivaci transkripčních faktorů v epitelových buňkách ledvin a tím způsobují jejich předčasnou apoptózu. Dlouhodobé vystavení nízkým koncentracím rtuti je spojeno s poruchami reprodukční soustavy u člověka. U žen může vést k poruchám menstruačního cyklu a k problémům s početím a donošením dítěte (De Rosis et al. 1985). U mužů snižuje počet pohyblivých spermií (Ernst & Lauritsen 1991). Intoxikace rtuťnatým kationty je spojena s výskytem neurodegenerativních onemocnění (zejména Parkinsonovy a Alzheimerovy nemoci). Rtuťnaté kationty způsobují oxidační stres (Olivieri et al. 2002) a tvorbu Lewyho tělísek v neuronech (Uversky et al. 2001) a vazbou na thiolové skupiny negativně ovlivňují funkci některých enzymů a permeabilitu buněčné membrány (Mathieson 1995; Markovich & James 1999; Bapu et al. 1994). Tyto uvedené procesy jsou spojeny s výskytem mnoha neurodegenerativních onemocnění (zejména pak Parkinsonovy a Alzheimerovy nemoci).

4.4.3 Volba metodiky

Ačkoliv Perveen et al. (2015) uvádějí TDZ jako nejúčinnější cytokinin, z důvodu jeho vysoké ceny a nedostupnosti v laboratoři byly použity BAP a kinetin. Tento autor také uvádí, že doplnění cytokininů auxiny zvyšuje počet indukovaných výhonů. Mnou testovaná média pro indukcii růstu výhonů tedy obsahovala IBA a v některých případech byla doplněna i o NAA. Z pokusů provedených Babu et al. (2000) vyplývá, že BAP a kinetin v kombinaci poskytují lepší výsledky než samostatně. Z tohoto důvodu mnou testovaná média obsahovala vždy tuto kombinaci. V neúspěšnějších médiích se koncentrace BAP pohybovaly v rozmezí 1 až 5 mg/l. S výjimkou jednoho mnou testovaného média bylo toto rozmezí dodrženo. Rani et al. (2012) prokázali, že použití GA_3 má pozitivní účinky na délku indukovaných výhonů. GA_3 byla tedy použita do mnou testovaných médií. Auxiny IAA nebo IBA v koncentracích od 0,25 do 0,9 mg/l se v předchozích stádiích ukázali jako vhodný doplněk cytokininů. V některých mnou testovaných médiích byly tedy použity v koncentracích od 0,05 do 1 mg/l. NAA bylo využito pro indukcii výhonů pouze v jednom případě (Mathew et al. 1999), pro zjištění vlivu použití tohoto regulátoru růstu jsem je zakomponovala do části mnou testovaných médií.

Pro nejvhodnější média na indukcii kořenů byly v předchozích případech použity auxiny v různých koncentracích a kombinacích: IBA v koncentracích od 0,1 do 2,5 mg/l, NAA v koncentracích od 0,1 do 5 mg/l a IAA v koncentracích od 0,25 do 0,9 mg/l. Z důvodu nedostupnosti IAA v laboratoři byla nakonec zvolena pro mé pokusy kombinace 0,5 mg/l IBA

a 1 mg/l NAA. Pro prevenci akumulace toxických látek bylo do média přidáno aktivní uhlí o koncentraci 100 mg/l.

Kultury založené z listů byly kultivovány na stejných médiích jako nodální kultury. Z předchozí uvedené literatury vyplývá, že listové explantáty obsahující střední žebro jsou výnosnější. Jako explantáty byly tedy zvoleny jednotlivé listky rozříznuté napůl podle středního žebra. Vzhledem ke skutečnosti, že listy *Murraya koenigii* nejsou dostatečně pevné na vertikální umístění do kultivačního média, byly na něj uloženy horizontálně s abaxiální stranou v kontaktu s médiem.

Jelikož *Murraya koenigii* je rostlinou využívanou ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, je třeba eliminovat riziko kontaminace této potraviny a suroviny pro výrobu léčiv. Zacházení se sloučeninami obsahujícími rtuť může mít také nepříznivé dopady na zdraví personálu. Při nesprávném zacházení může také dojít ke kontaminaci vodních zdrojů. Z těchto důvodů je tato práce zaměřena i na nalezení účinného sterilizačního postupu bez použití rtuti. Pro odstranění prachu a jiných nečistot z povrchu rostlinného materiálu byla stejně jako ve většině předchozích studií použita voda se saponátem. Nabilah et al. (2013) dosáhli uspokojivých výsledků povrchové sterilizace *Labisia Pumila* (Blume) Fern.-Vill. pouze s využitím roztoků NaClO a etanolu. Pro povrchovou sterilizaci byla tedy v mých experimentech zvolena rovněž tato kombinace. Doba sterilizace v NaClO se pohybovala v rozmezí 15 až 30 minut. Použitý NaClO (SAVO, Unilever) obsahuje 4,7 % hmotnosti NaClO. V testovaných sterilizačních postupech byly využity roztoky SAVO o objemových koncentracích 20 a 25 %. Výsledné koncentrace NaClO byly tedy 9,5 a 12 g/l. Etanol je běžně používaný dezinfekční prostředek s antimikrobiálními účinky. V této práci byl použit denaturovaný líh (Lih technický, Severochema) obsahující minimálně 93 % hmotnosti etanolu, dále pak ethyl(methyl)keton, propan-2-ol a denatonium benzoát. Dostupná literatura nenaznačuje, že by kterékoliv z těchto denaturačních činidel mělo mít negativní vliv na sterilizaci nebo vitalitu explantátů.

5 Metodika

Nodální a listové explantáty byly zvoleny pro založení kultur z důvodu vyššího množitelského koeficientu oproti vzrostným vrcholům. Semena v době zakládání pokusu nebyla dostupná.

Jako základ kultivačního média bylo zvoleno MS médium doplněné o standardní vitamíny, jelikož ve většině předchozích pokusů poskytovalo dobré výsledky. Jako zdroj uhlíku byla zvolena stejně jako v předchozích studiích sacharóza. Rout (2005) a Khatik a Joshi (2018) uvádějí, že přídavek adenin sulfátu pozitivně ovlivňuje indukci výhonů. Z důvodu nedostupnosti v laboratoři byl adenin sulfát nahrazen adenin hemisulfátem o koncentraci 50 mg/l. Pro otestování vlivu na akumulaci toxických exudátů a růst kultur byl pro některé kultury zvolen jako gelující látka agar a pro některé Phytigel. Po shledání, že při kultivaci dochází k akumulaci toxických látek, bylo do média přidáno aktivní uhlí o koncentraci 20 mg/l. Hodnota pH byla stejně jako ve většině předchozích případů upravena na 5,8. Teplota během kultivace byla konstantně udržována na 25 °C, stejně jako v předchozích experimentech.

Veškeré laboratorní práce probíhaly v laboratořích Katedry zahradnictví Fakulty agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity. Veškeré použité vybavení je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled použitého laboratorního vybavení, včetně výrobců a modelů

Název vybavení	Výrobce, model
Kultivační komora	Binder, APT.Line KBW
Autokláv	Sanyo, MSL-3781L
Laminární box	Flowfast H 18
Měřič pH	Jenway, 3505
Laboratorní váha	Mettler, AE 200

5.1 Aseptická opatření při zakládání *in vitro* kultur

Příprava zásobních roztoků a kultivačních médií proběhla v laboratoři na pracovních plochách ošetřených etanolem. Připravená kultivační média byla následně sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Veškeré laboratorní nástroje použité při sterilizačních protokolech a založení kultur byly sterilizovány stejnou metodou.

Založení kultur a povrchová sterilizace rostlinného materiálu probíhaly uvnitř laminárního boxu, jehož vnitřní plochy byly před uvedením do provozu ošetřeny UV zářením po dobu 15 minut a vydezinfikovány pomocí etanolu. Při práci v laminárním boxu byly vždy použity nitrilové rukavice a ústní rouška z nanovláknů. Rukavice byly průběžně dezinfikovány etanolem.

Vnitřní povrchy kultivační komory byly před umístěním kultur vydezinfikovány pomocí etanolu.

Po založení byly kultury pravidelně kontrolovány. Kontaminované kultury byly z kultivační komory vyjmuty a zlikvidovány.

5.2 Příprava kultivačních médií

Kultivační média byla připravena z chemikálií dostupných v laboratořích Katedry zahradnictví Fakulty agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity. V tabulce 2 jsou uvedeny všechny použité chemikálie, jejich výrobci a případně i obchodní názvy.

Tabulka 2 Přehled použitých chemikálií a jejich výrobců

Chemikálie	Výrobce, (komerční název)
MS médium	Duchefa Biochemie
Sacharóza	PENTA
Kyselina nikotinová	Carl Roth
Thiamin HCl	Sigma-Aldrich
Pyridoxin HCl	Sigma-Aldrich
Myo-inositol	Sigma-Aldrich
Adenin hemisulfát	Sigma-Aldrich
Kyselina 1-naftyloctová	Sigma-Aldrich
6-Benzylaminopurin	Sigma-Aldrich
Kyselina gibberelová	Sigma-Aldrich
Kyselina indol-3-máselná	Sigma-Aldrich
Kinetin	Duchefa Biochemie
Agar	Carl Roth
Phytigel	Sigma-Aldrich
Aktivní uhlí	Carl Roth
Etanol	Severochema, (Láh technický)
Chlornan sodný	Unilever, (SAVO)
Polysorbát 20	Corda International (TWEEN 20)
Myclobutanil	Dow AgroSciences, (TALENT)
Saponát	Procter & Gamble, (Jar)

5.2.1 Příprava zásobních roztoků

Pro přípravu kultivačních médií byly nejdříve připraveny zásobní roztoky s aktivními látkami. Zásobní roztoky byly připraveny za laboratorních podmínek na pracovním povrchu vydezinfikovaném pomocí etanolu. Chemikálie byly naváženy a následně rozpuštěny v příslušném objemu destilované vody. Látky nerozpustné ve vodě byly nejprve rozpuštěny v malém množství etanolu nebo NaOH a následně smíchány s příslušným objemem destilované vody (viz tabulka 3). Zásobní roztoky byly skladovány v uzavíratelných skleněných lahvích při teplotě přibližně 5 °C.

Tabulka 3 Přehled koncentrací zásobních roztoků a použitých rozpouštědel pro přípravu kultivačních médií

Aktivní látka	Koncentrace	Použité rozpouštědlo
Kyselina 1-naftyloctová	50 mg/100 ml	NaOH
6-Benzylaminopurin	75 mg/50 ml	NaOH
Kyselina gibberelová	0,25 mg/50 ml	Etanol
Kyselina indol-3-máselná	50 mg/100 ml	NaOH
Kinetin	50 mg/100 ml	-
Pyridoxin hydrochlorid	100 mg/ 100 ml	-
Thiamin hydrochlorid	100 mg/100 ml	-
Kyselina nikotinová	100 mg/100 ml	-

5.2.2 Příprava kultivačních médií

Kultivační média byla připravována při laboratorních podmínkách na pracovní ploše ošetřené etanolem. Sypké látky byly přímo naváženy a rozpuštěny v příslušném objemu destilované vody. Příslušné objemy zásobních roztoků byly odměřeny automatickou pipetou. Následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 5,8 za pomoci roztoků HCl a NaOH. Po úpravě pH byl do roztoku přidána gelující látka a případně aktivní uhlí. Následně bylo médium zahřáto v mikrovlnné troubě, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění zpevňujícího agens. Poté bylo kultivační médium přelito do sklenic, přičemž v každé bylo přibližně 20 ml média (vrstva přibližně 1,5 cm). Hrdla sklenic byla překryta hliníkovou fólií, která byla připevněna gumičkou. Takto připravená média byla následně sterilizována (viz 5.1).

5.2.3 Použitá kultivační média

Základem všech použitých kultivačních médií bylo MS médium doplněné sacharózu, gelující látku a další bioaktivní látky. Jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 4. Dále bylo médium suplementováno různými kombinacemi regulátorů růstu, jejichž koncentrace jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 4 Složení základního kultivačního média

Chemická látka	Hmotnostní koncentrace na 1 l kultivačního média
MS médium	4,3 g
Sacharóza	30 g
Kyselina nikotinová	1 mg
Thiamin hydrochlorid	10 mg
Pyridoxin hydrochlorid	1 mg
<i>Myo</i> -inositol	100 mg
Adenin hemisulfát	50 mg
Aktivní uhlí pro indukci výhonů	20 mg
Aktivní uhlí pro zakořenění	100 mg
Agar/Phytigel	8 g

Tabulka 5 Použité kombinace koncentrací regulátorů růstu v jednotlivých kultivačních médiích

Označení	Zpevňující agens	BAP [mg/l]	Kinetin [mg/l]	IBA [mg/l]	GA ₃ [mg/l]	NAA [mg/l]
1	Phytigel	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	Phytigel	5,00	2,50	0,25	0,01	0,05
3	Agar	2,50	2,50	0,25	0,00	0,00
4	Agar	2,50	2,50	0,25	0,02	0,00
5	Phytigel	5,00	5,00	0,50	0,02	0,50
6	Agar	5,00	5,00	0,50	0,20	1,00
7	Agar	7,50	2,50	0,25	0,01	0,05
8	Phytigel	1,00	2,50	0,25	0,01	0,05
Zakořeňovací médium	Agar	0,00	0,00	0,50	0,00	1,00

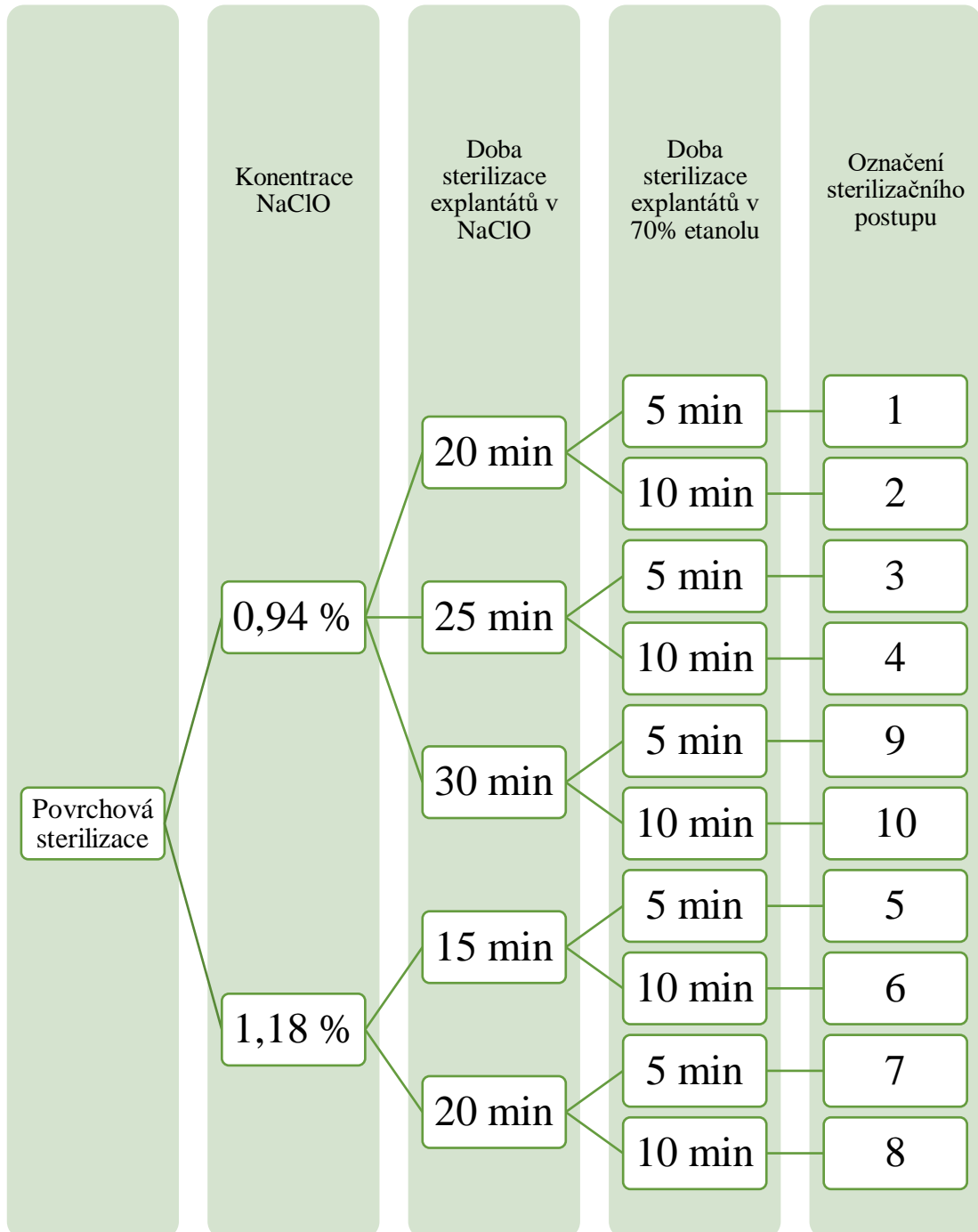
5.2.4 Rostlinný materiál

Rostlina, ze které pochází všechny explantáty, se nachází ve skleníku Botanické zahrady Fakulty tropického zemědělství České zemědělské univerzity. Rostlina je na stanovišti přibližně 25 let a je pěstována při průměrné teplotě 22 °C. Rostlina nebyla v posledních šesti měsících před sběrem materiálu ošetřena žádnými přípravky na ochranu rostlin. Rostlina byla krátce před sběrem materiálu hluboce seříznuta. V průběhu pokusu byla rostlina napadena červci. K založení kultur byly vybrány mladé zelené výhony dlouhé maximálně 20 cm, které byly odštíhnuty a následně umístěny do nádoby s vodou, aby se předešlo uvadání při přenosu do laboratoře. V laboratoři byly z výhonů odstraněny listy a výhony byly následně rozřezány na menší části.

5.2.5 Sterilizační postupy

Veškerý rostlinný materiál byl před založením kultur povrchově sterilizován. Sterilizace listů a výhonů probíhala odděleně. Pokud byli na rostlinném materiálu přítomni červci, byli mechanicky odstraněni pomocí papírového ubrousku namočeného v saponátu. Následně byl rostlinný materiál umístěn do kádinky a proplachován po dobu 30 minut vodou z vodovodu. Poté byl do kádinky přidán saponát a proplachování pokračovalo dalších 20 minut. Následně byl rostlinný materiál přemístěn do roztoku fungicidu na bázi myclobutanilu o koncentraci 0,2 ml/l. Po 20 minutách v roztoku fungicidu byl rostlinný materiál opláchnut destilovanou vodou. Následující kroky sterilizace probíhaly v laminárním boxu. Rostlinný materiál byl vložen do sterilizovaných Erlenmeyerových baněk s roztokem NaClO. Během sterilizace v tomto roztoku bylo s baňkami několikrát zatřesen. Posléze byl roztok NaClO slit a nahrazen 70% roztokem denaturovaného lihu. Po celou dobu sterilizace v etanolu bylo s baňkami kontinuálně třeseno. K přípravě sterilizačních roztoků byla použita autoklávovaná destilovaná voda, do roztoků NaClO bylo přidáno několik kapek surfaktantu polysorbátu 20. Po dokončení sterilizace byl rostlinný materiál v Erlenmeyerových baňkách třikrát opláchnut autoklávovanou destilovanou vodou.

Pro zjištění nejúčinnějšího sterilizačního postupu bylo otestováno 10 postupů. Jednotlivé sterilizační postupy se od sebe lišily použitou koncentrací roztoku NaClO a dobou, po kterou byl rostlinný materiál umístěn roztoku NaClO a ethanolu. Délka sterilizace v roztocích a použitá koncentrace NaClO jsou uvedeny na obrázku 1. Pro každý sterilizační postup byly založeny 3 kultury po 5 nodech. V každém sterilizačním postupu (SP) byly vždy dvě kultury založeny s příčně řezanými nody a jedna kultura s podélně řezanými nody.



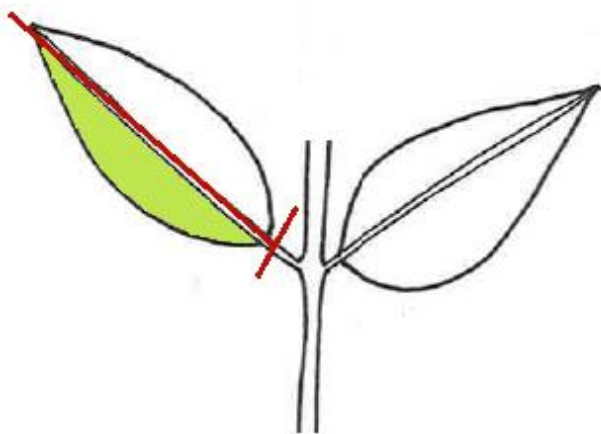
Obrázek 1 Schéma postupů povrchové sterilizace explantátů

5.2.6 Založení kultur

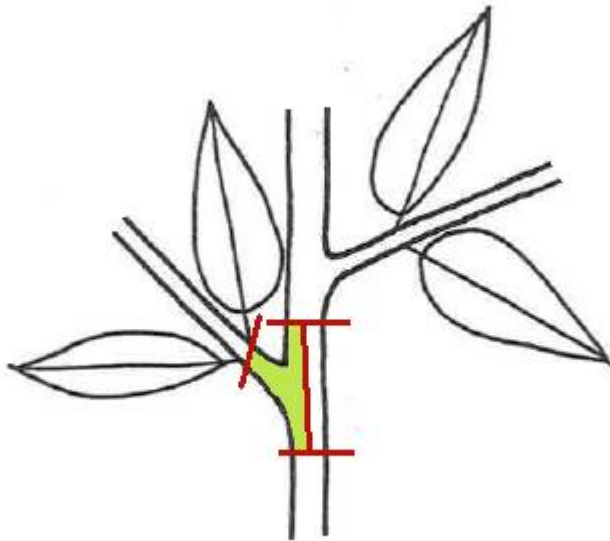
Založení kultur probíhalo v laminárním boxu a bylo použito pouze sterilizované vybavení (viz 5.1). Povrchově sterilizovaný rostlinný materiál byl vyjmut z baněk pomocí pinzety a přemístěn na Petriho misku. K řezání rostlinného materiálu byl použit skalpel s vyměnitelnou čepelí. Mezi manipulací s jednotlivými částmi rostlin byly nástroje vždy namočeny v etanolu a opáleny nad kahanem.

Části výhonů byly rozříznuty na jednotlivé nody buď podélně, nebo příčně, a přesunuty pinzetou do kultivačního média. Při umístování příčně řezaných nodů bylo dbáno na zachování polarity. Podélně rozříznuté nody byly umístěny do média tak, aby pouze část řezné plochy byla zanořena do média. Z listů byly odděleny jednotlivé lístky, které byly rozříznuty podél středního žebra na dvě části. Ty byly lehce vtlačeny abaxiální stranou do kultivačního média tak, aby celá řezná plocha byla zanořena v médiu. Na obrázcích 2; 3 a 4 jsou zobrazeny způsoby řezu nodálních a listových explantátů. Červené čáry znázorňují místa, kterými byl veden řez, a zeleně jsou vyznačeny části, které byly následně umístěné do kultivačního média.

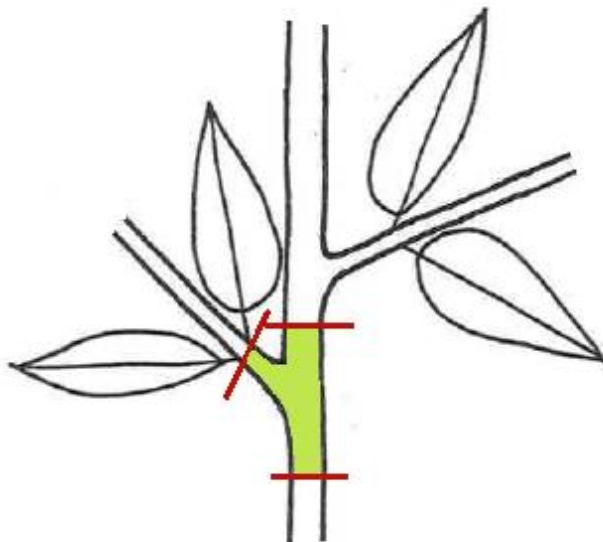
Takto založené kultury byly následně umístěny do kultivační komory. Teplota v kultivační komoře byla konstatně 25 °C, intenzita osvětlení 7500 lx a fotoperioda 16/8 hodin. Na obrázcích 5 a 6 jsou vyobrazeny právě založené kultury připravené ke kultivaci.



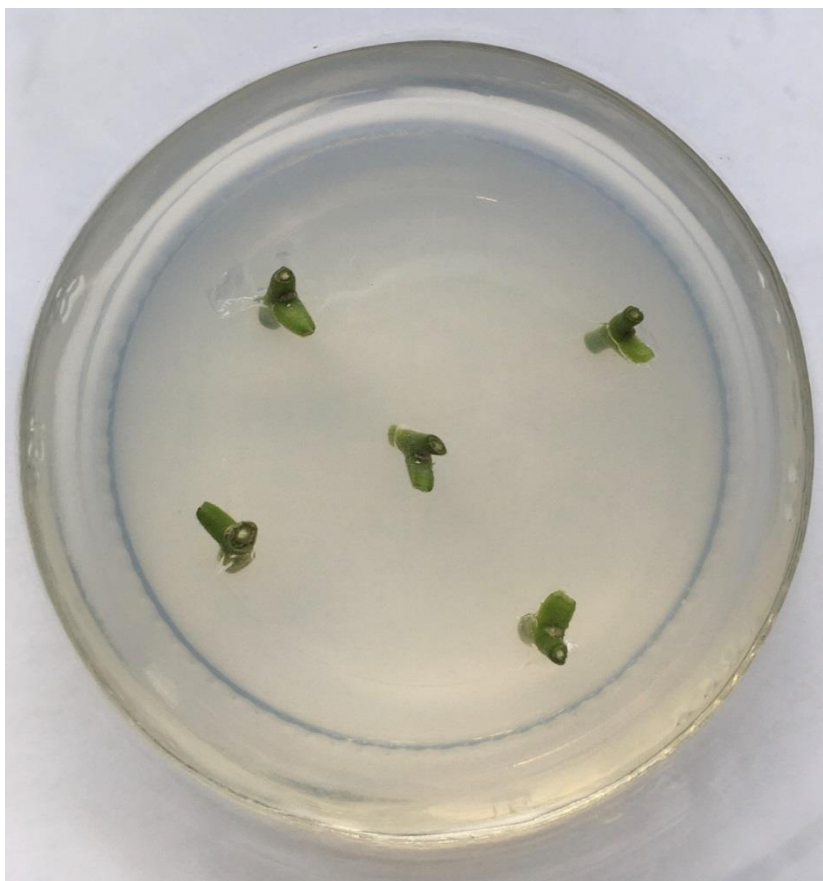
Obrázek 2 Schéma řezu listových explantátů



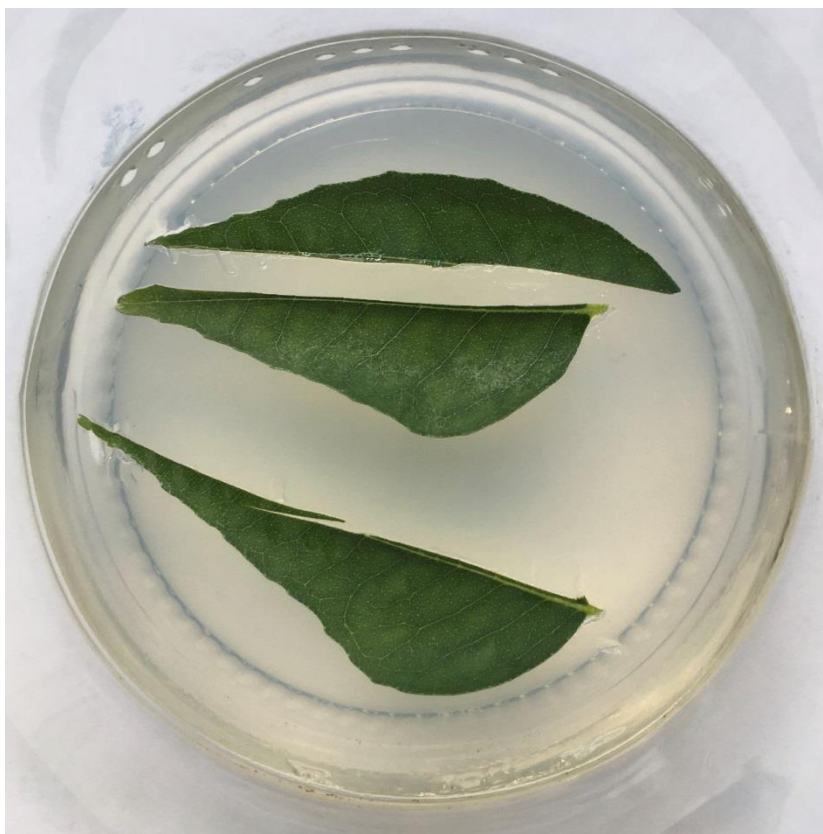
Obrázek 3 Schéma řezu podélně krájených nodálních explantátů



Obrázek 4 Schéma řezu příčně krájených nodálních explantátů



Obrázek 5 Nodální explantáty ihned po umístění do kultivačního média



Obrázek 6 Listové explantáty ihned po umístění do kultivačního média

5.2.7 Přesazování kultur

V případě zpozorování bakteriální kontaminace pouze u některých explantátů v kultuře byly ostatní, tedy nekontaminované, explantáty vyjmuty a přesazeny do nového média. Pokud došlo v kulturách ke zhnědnutí média případně i explantátu, což může značit nahromadění fenolických látek, byly explantáty přesazeny do média s obsahem aktivního uhlí. Poté co explantáty vyprodukovaly výhonky, byly přesazeny do zakořeňovacího média. Přesazování probíhalo podobným způsobem jako založení kultur: v laminárním boxu za použití pinzety.

5.2.8 Zpracování výsledků

Pro hodnocení efektivity sterilizačních postupů byly pro každý postup založeny 3 kultury po 5 nodech. Během kultivace byly tyto kultury kontrolovány a hodnoceny na výskyt bakteriální nebo houbové kontaminace. Následně byly tyto výsledky porovnány z hlediska prvního výskytu kontaminace od založení kultury a doby potřebné ke kontaminaci celé kultury od založení.

Kultivační média pro nodální i listové byla hodnocena z hlediska počtu vytvořených výhonů a jejich délky. U listových kultur byla hodnocena i tvorba kalusu.

6 Výsledky

6.1 Účinnost sterilizačních postupů

Pro účely tohoto experimentu byla kontaminace kultur hodnocena ze dvou hledisek. Prvním hlediskem bylo hodnocení doby, po které se objeví první viditelné známky kontaminace. Druhým hlediskem byla doba, po které kontaminace zasáhla celou kulturu (tj. všechny nody byly obklopeny myceliem nebo bakteriální kolonií).

Explantáty nevykazovaly známky chemického poškození nebo nekrózy při žádné z testovaných koncentrací etanolu nebo NaClO. Stejně tak nebyly pozorovány rozdíly v počtu nebo délce výhonů mezi jednotlivými sterilizačními postupy.

Na matečnici byli přítomni červci při sběru materiálu pro sterilizační postupy č. 4 až 10, ale z výsledků nevyplývá, že by tato skutečnost zvyšovala riziko kontaminace.

6.1.1 První známky kontaminace

U všech kultur založených s použitím sterilizačních postupů 1; 2; 3 a 7 se projeví první známky kontaminace po čtyřech dnech. Sterilizační postupy 5; 6 a 8 projeví vždy u dvou kultur první známky kontaminace po čtyřech dnech, u třetí kultury po sedmi dnech. U sterilizačních postupů 9 a 10 projeví první známky kontaminace po dvou kulturách po třech dnech a po jedné kultuře po šesti dnech. U sterilizačního postupu 4 jedna kultura nebyla kontaminována vůbec, další dvě kultury projeví známky kontaminace po sedmi a deseti dnech. V tabulce 6 jsou uvedena procenta kultur, u kterých se projeví první známky kontaminace v závislosti na dnech uplynulých od založení kultur.

Tabulka 6 Procento kultur s prvními známkami kontaminace v závislosti na dnech uplynulých od založení kultury

Sterilizační protokol	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP8	SP9	SP10
Den od založení kultury										
1. den	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. den	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. den	0	0	0	0	0	0	0	0	67	67
4. den	100	100	100	0	67	67	100	67	67	67
5. den	100	100	100	0	67	67	100	67	67	67
6. den	100	100	100	0	67	67	100	67	100	100
7. den	100	100	100	33	100	100	100	100	100	100
8. den	100	100	100	33	100	100	100	100	100	100
9. den	100	100	100	33	100	100	100	100	100	100
10. den	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100

6.1.2 Kontaminace celé kultury

Pro vyhodnocení efektivity jednotlivých sterilizačních postupů byly kultury po založení sledovány po dobu jednoho měsíce. U kultur založených s použitím sterilizačního postupu 4 došlo k celkové kontaminaci pouze v 1/3 případů. Při využití sterilizačního postupu 8 došlo k celkové kontaminaci dvě ze tří kultur po 14 dnech, poslední kultura byla celkově kontaminována až 31. den. Ostatní sterilizační postupy byly méně účinné. Sterilizační postup 4 byl tedy nejúčinnější jak z hlediska prvních známek kontaminace, tak z hlediska kontaminace celé kultury. V tabulce 7 jsou uvedena procenta kontaminovaných kultur v závislosti na dnech uběhlých od založení kultury.

Tabulka 7 Procento plně kontaminovaných kultur v závislosti na dnech uplynulých od založení kultury

Sterilizační protokol	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP8	SP9	SP10
Den od založení kultury										
4. den	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0
5. den	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0
6. den	0	0	33	0	0	0	0	0	33	67
7. den	0	33	33	0	33	33	33	0	33	67
8. den	0	33	33	0	33	33	33	0	33	67
9. den	0	33	33	0	33	33	33	0	33	67
10. den	0	33	33	0	100	33	67	0	100	67
11. den	100	33	67	0	100	33	67	0	100	67
12. den	100	33	67	0	100	33	67	0	100	67
13. den	100	33	67	33	100	33	67	0	100	67
14. den	100	67	100	33	100	67	100	67	100	67
15. den	100	67	100	33	100	67	100	67	100	67
16. den	100	67	100	33	100	67	100	67	100	67
17. den	100	100	100	33	100	67	100	67	100	67
18. den	100	100	100	33	100	67	100	67	100	100
19. den	100	100	100	33	100	67	100	67	100	100
20. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
21. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
22. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
23. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
24. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
25. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
26. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
27. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
28. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
29. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
30. den	100	100	100	33	100	100	100	67	100	100
31. den	100	100	100	33	100	100	100	100	100	100

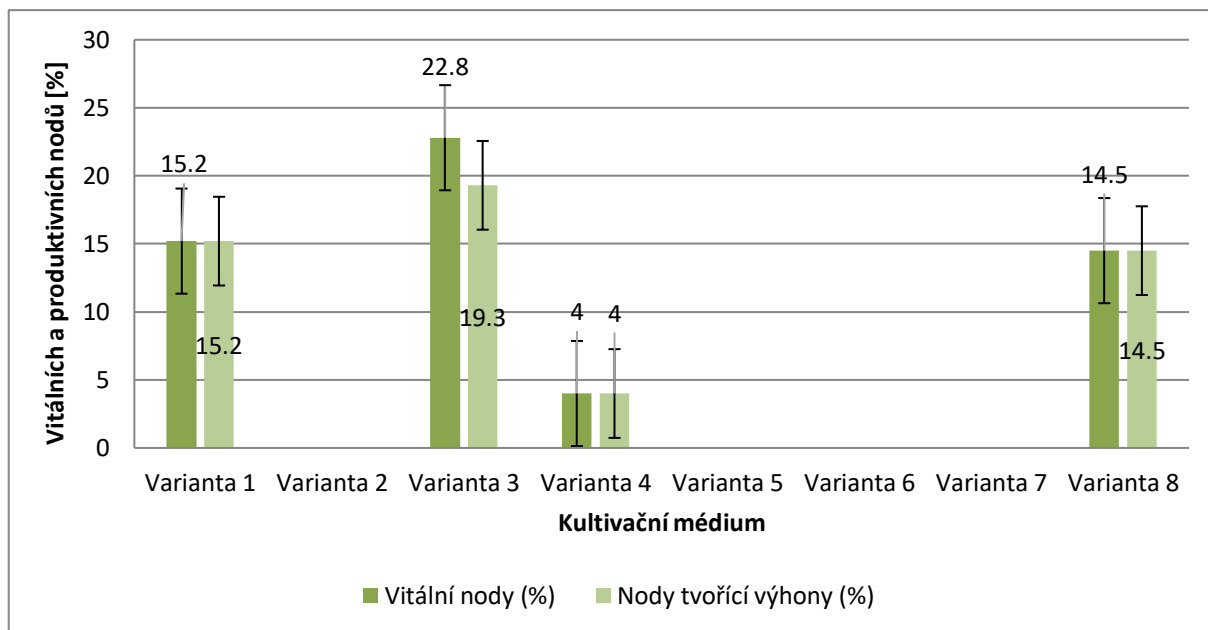
6.2 Nodální kultury

6.2.1 Zastoupení vitálních explantátů a explantátů tvořících výhony

Celkem bylo kultivováno 316 nodálních explantátů. V průběhu pokusu byly i přes dodržení aseptických opatření některé založené kultury kontaminovány houbovými organismy nebo bakteriemi. Mezi nejčastější kontaminanty patřily houbové organismy rodů *Apergillus*, *Fusarium*, *Candida* a neznámé bakterie. Pouze některé explantáty kultivované v médiích č. 1, 3, 4 a 8 vyprodukovaly vitální výhony (jako například na obrázku 7). U ostatních kultur nedošlo k indukci výhonů vůbec a ve většině případů byly kontaminovány. Kultury s podélně krájenými nodálními explantáty byly založeny jako součást testování sterilizačních postupů. Byly tedy kultivovány na MS médiu bez přidaných regulátorů růstu. Z celkem 50 kultivovaných explantátů vyprodukoval výhony pouze jeden. Výhon vyrostl z úžlabí listu a byl přibližně 2 cm dlouhý. Obrázek 8 zobrazuje procentuální zastoupení příčně krájených vitálních a produktivních nodálních explantátů dle kultivačního média. Za vitální nody byly považovány takové, které nebyly zasaženy kontaminací a u kterých nedošlo ke zhnědnutí pletiv v důsledku akumulace produktů oxidace fenolických látek. Za produktivní nody byly považovány ty, které splnily podmínky pro vitální nody a navíc vyprodukovaly alespoň 1 výhon.



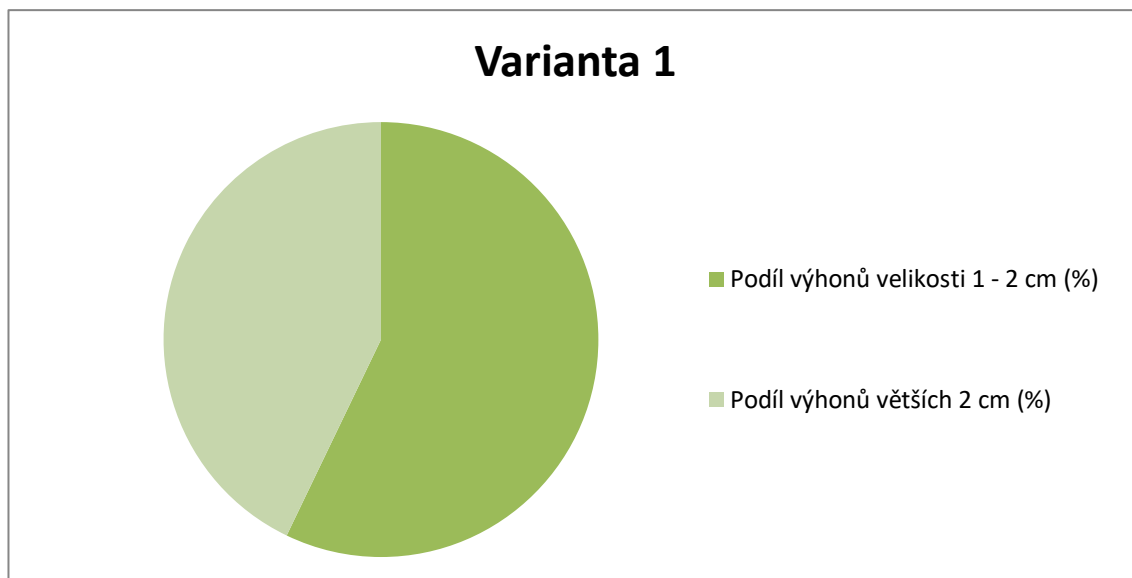
Obrázek 7 Nodální explantát s proliferovanými výhony



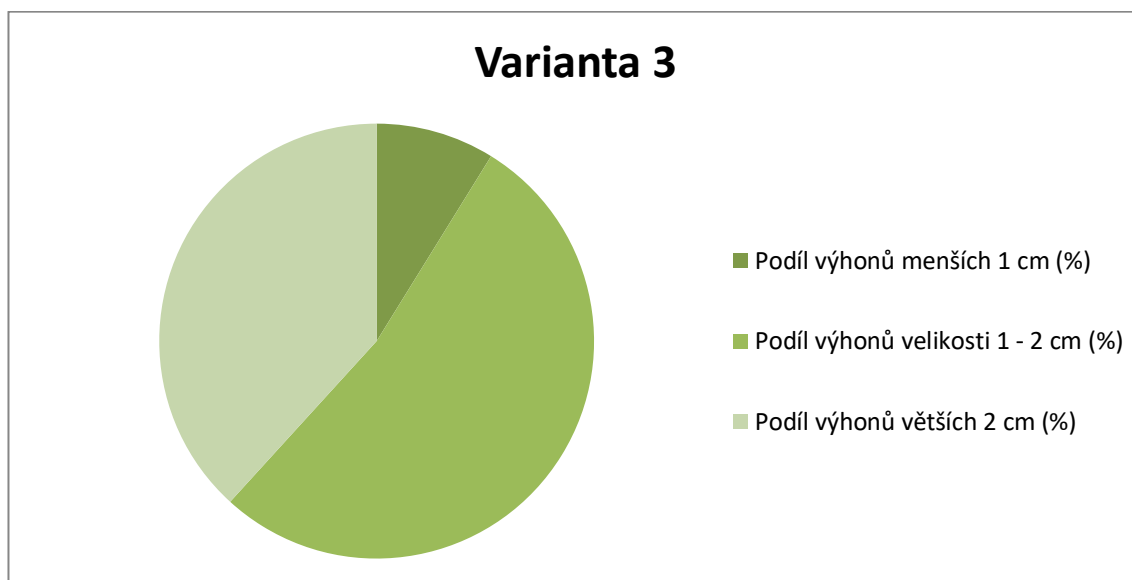
Obrázek 8 Procentuální zastoupení vitálních a produktivních nodů v závislosti na kultivačním médiu

6.2.2 Délka výhonů indukovaných z nodálních explantátů

Pro potřeby tohoto experimentu byly výhony rozděleny dle délky do tří kategorií: krátké výhony délky do 1 cm, střední výhony délky od 1 do 2 cm a dlouhé výhony délky nad 2 cm. Kultivační médium č. 1 (médium bez regulátorů růstu) mělo nejvyšší zastoupení středních (57,14 %) a dlouhých (42,86 %), krátké výhony v tomto kultivačním médiu nebyly zpozorovány. V kultivačním médiu č. 3 byly nejčastěji zastoupeny střední výhony (52,94 %), dlouhé výhony pak u 38,24 % explantátů a krátké výhony u 8,82 % explantátů. Explantáty kultivované v médiu č. 4 nevyprodukovaly žádné dlouhé výhony. Střední výhony byly zastoupeny ve 33,33 % případů, 66,67 % výhonů bylo krátkých. Kultivační médium č. 8 neposkytlo žádné dlouhé výhony, 31,25 % krátkých a 68,75 % středních výhonů. Tyto informace jsou graficky znázorněny na obrázcích 9; 10; 11 a 12. Pro následné přesazování se jako nejvhodnější projevily střední a krátké výhony. Dlouhé výhony byly příliš křehké a při manipulaci s nimi se snadno poškodily. Z hlediska délky vytvořených výhonů byla tedy nejúčinnější média č. 4 a 8.

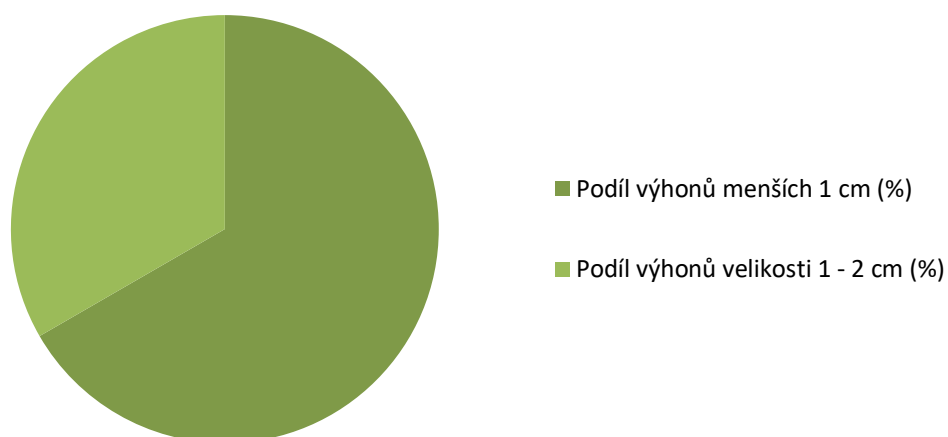


Obrázek 9 Zastoupení středních a dlouhých výhonů na nodálních explantátech kultivovaných v médiu č. 1



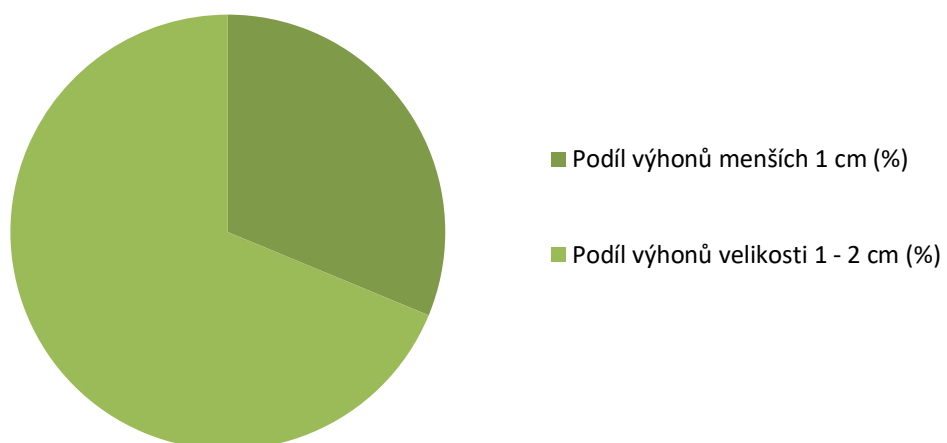
Obrázek 10 Zastoupení krátkých, středních a dlouhých výhonů na nodálních explantátech kultivovaných v médiu č. 3

Varianta 4



Obrázek 11 Zastoupení krátkých a středních výhonů na nodálních explantátech kultivovaných na médiu č. 4

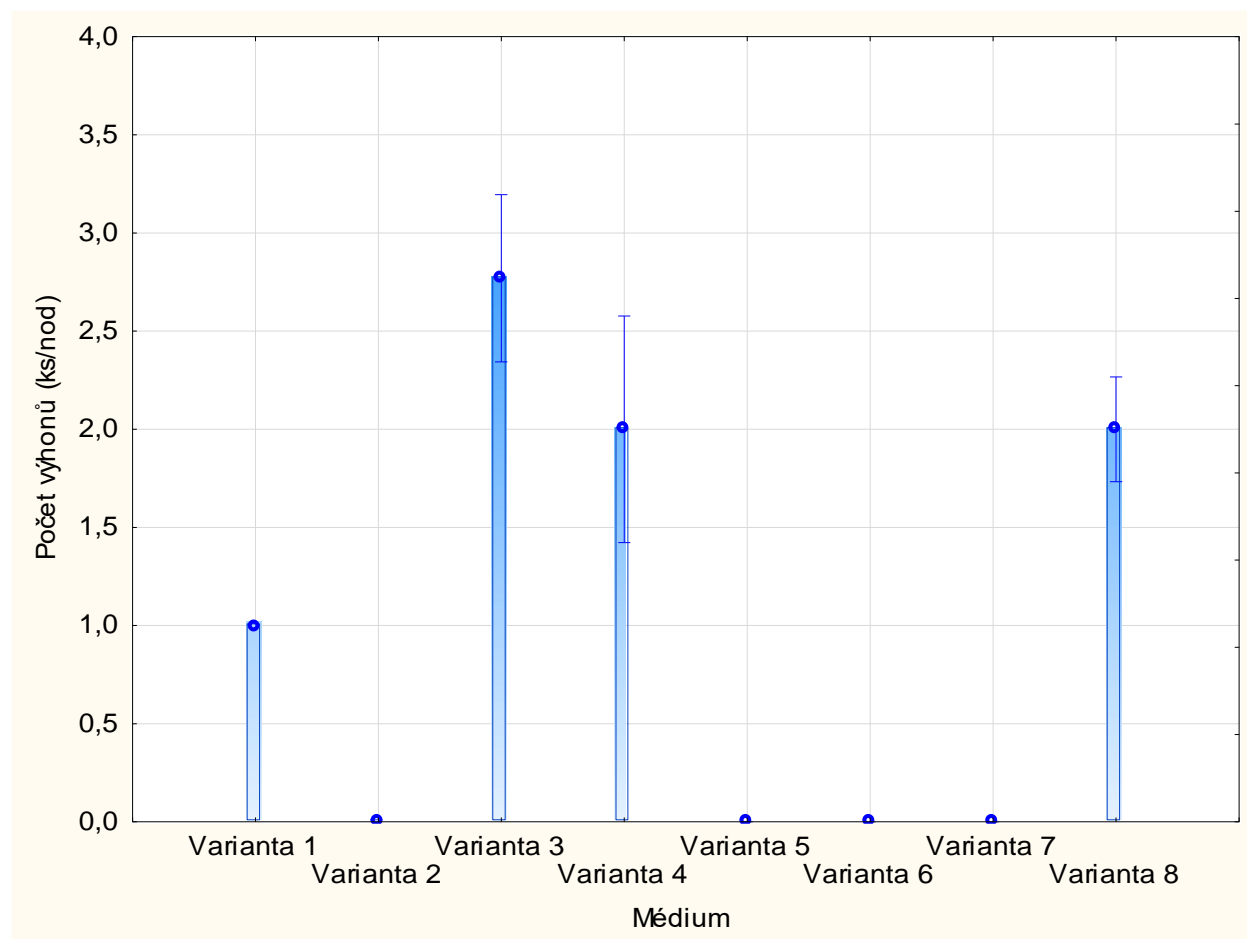
Varianta 8



Obrázek 12 Zastoupení krátkých a středních výhonů na nodálních explantátech kultivovaných na médiu č. 8

6.2.3 Počet výhonů indukovaných na nodální explantát

Počet výhonů na explantát byl zjišťován po minimálně 30 dnech kultivace na vitálních explantátech (tj. bez známek kontaminace nebo výrazného ztmavnutí pletiv). Explantáty kultivované v médiu č. 1 ve všech případech vyprodukovaly pouze 1 vitální výhon – měly tedy nejnižší průměrný počet výhonů na explantát. Kultivace na médiích č. 4 a č. 8 vedla k proliferaci průměrně 2 výhonů na explantát. U obou těchto médií vyprodukovaly všechny vitální explantáty alespoň 1 výhon, nikdy ne však více než 3 výhony na explantát. Nejvyšší zjištěný počet byl 5 vitálních výhonů na explantát; tento počet se vyskytl u explantátu kultivovaného v médiu č. 3. Explantáty kultivované v tomto médiu vyprodukovaly v průměru 2,77 vitálních výhonů na explantát. V případě dvou explantátů v médiu č. 3 neproběhla indukce vedlejších výhonů, přestože explantáty nejevily známky kontaminace nebo akumulace toxických látek. Obrázek 13 tyto informace znázorňuje graficky.



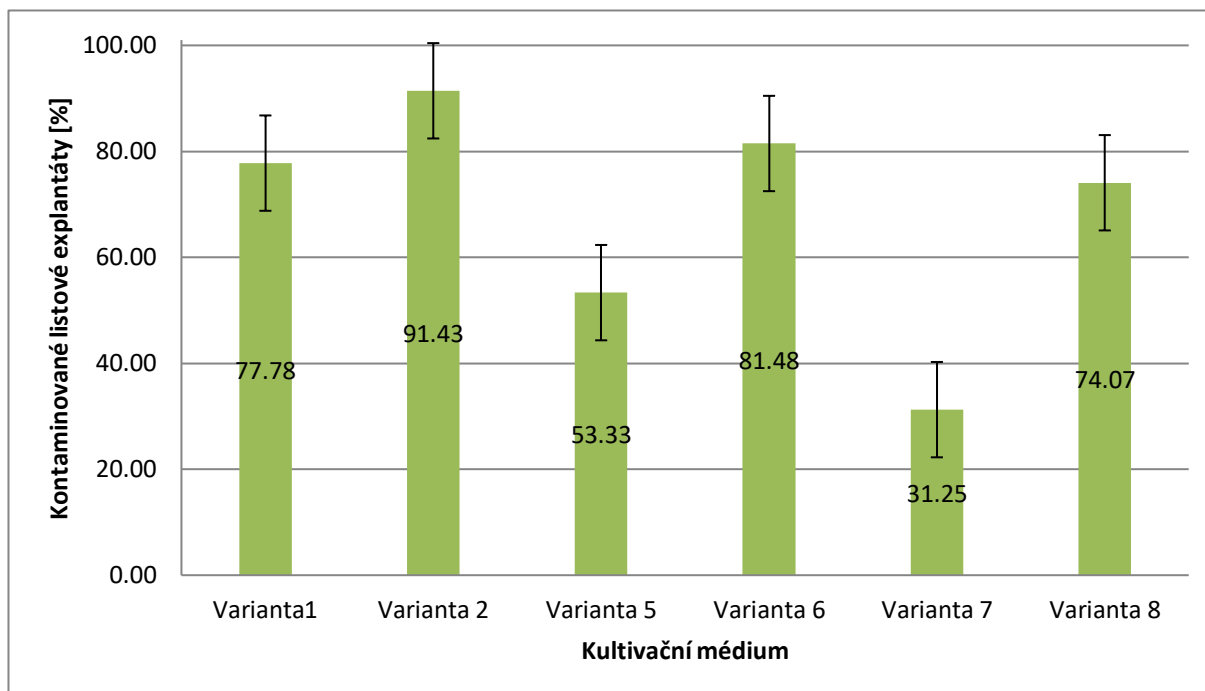
Obrázek 13 Průměrný počet výhonů indukovaných na nodálních explantátech v závislosti na kultivačním médiu

6.2.4 Listové kultury

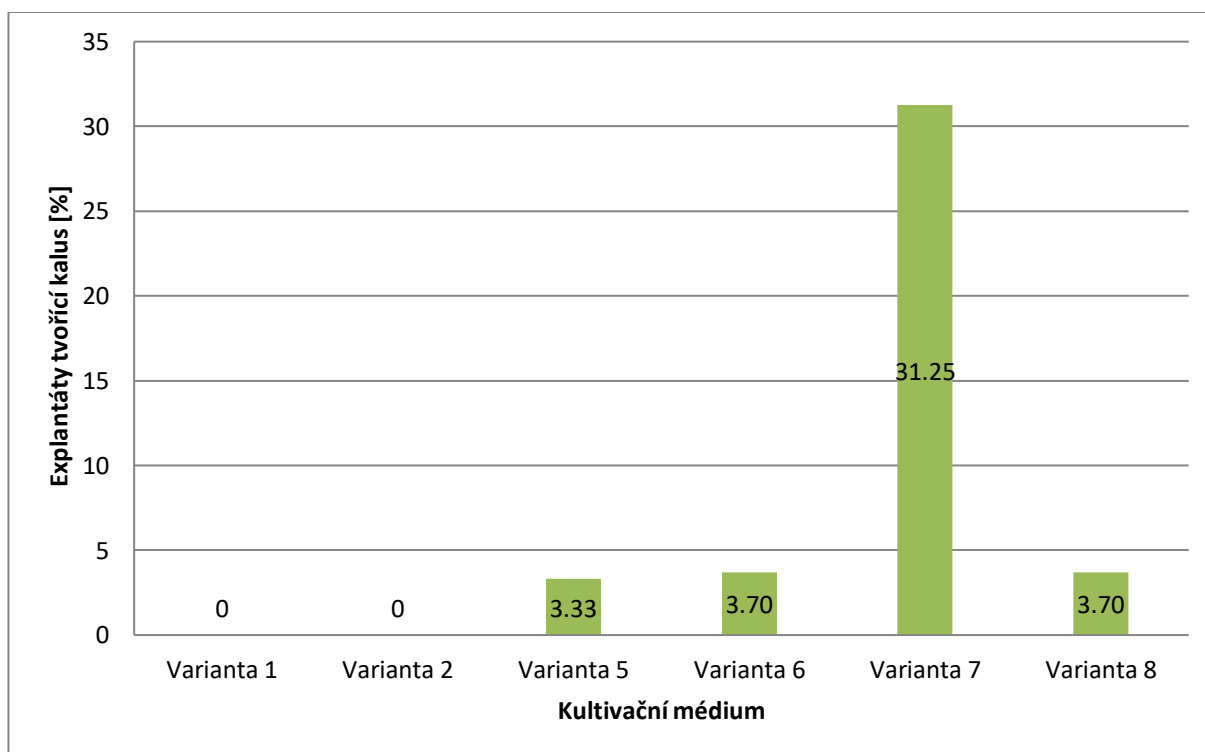
Z celkem 153 kultivovaných listových explantátů bylo 109 kontaminováno. Ze zbývajících 44 explantátů vytvořil pouze 1 explantát po 60 dnech kultivace 2 vitální výhony, které lze vidět na obrázku 14. Výhony byly přibližně 2 cm dlouhé. Tento explantát byl kultivován na médiu č. 7. Celkem 8 explantátů vytvořilo kalus. Pět z těchto explantátů bylo kultivováno na médiu č. 7. V médiích č. 5, 6 a 8 bylo vždy po jednom listu produkujícím kalus. Všechny tyto informace jsou také graficky znázorněny na obrázcích 15; 16 a 17. První viditelné známky tvorby kalusu byly zpozorovány po 60 dnech od založení kultury. Listové kultury vykazovaly znaky nežádoucího nahromadění a následné oxidace fenolických látek.



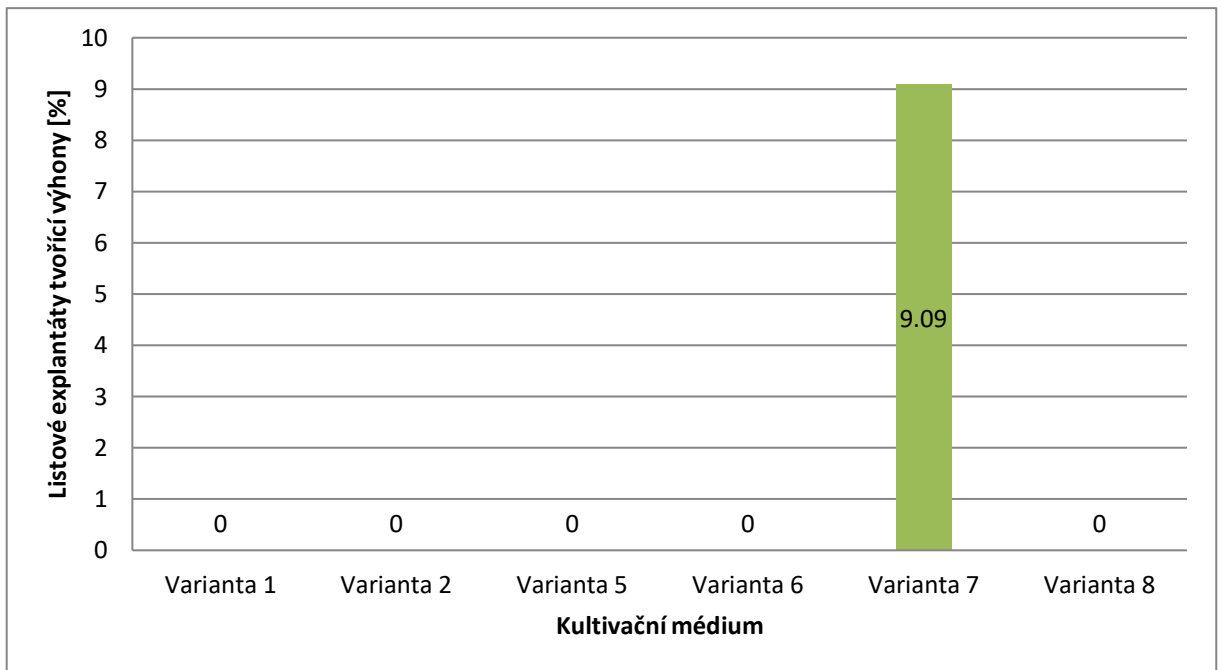
Obrázek 14 Listové explantáty. A: explantát s proliferovanými výhony. B: nekrotický explantát



15 Procento kontaminovaných listových explantátů



Obrázek 16 Procento listových explantátů, na kterých byl vytvořen kalus po 60 dnech kultivace



Obrázek 17 Procento listových explantátů, u kterých došlo k indukci výhonů

7 Diskuze

7.1 Indukce růstu výhonů a kalusu

Mnou provedené pokusy potvrdily, že je možné založit vitální nodální i listové kultury *Murraya koenigii* pro indukci výhonů.

7.1.1 Nodální kultury

Efektivitu mikropropagace může ovlivňovat mnoho faktorů, jako je složení kultivačního média, podmínky prostředí během kultivace i kultivar množené rostliny. Zejména koncentrace použitých regulátorů růstu se zdají být druhově specifické.

Oproti výsledkům, které uvádí Bhuyan et al. (1997), Babu et al. (2000), Rout (2005), Mathew et al. (2007), Perveen et al. (2015) a Khatik a Yoshi (2018), vykazovaly mé kultury nižší počet výhonů na explantát. V tomto ohledu bylo nejúspěšnější médium č. 3 (2,5 mg/l BAP a 2,5 mg/l kinetinu), u kterého bylo indukováno průměrně 2,77 výhonu na explantát. Podobných výsledků dosahovali Bhuyan et al. (1997) již při 0,5 mg/l BAP bez použití kinetinu, Babu et al. (2000) při 1 mg/l BAP bez použití kinetinu, Rout (2005) při 2,5 mg/l BAP bez použití kinetinu a Mathew et al. (2007) při 1,25 mg/l bez použití kinetinu. Perveen et al. (2015) dosáhli při 2,25 mg/l BAP bez suplementace kinetinem průměrné hodnoty 8,33 výhonů na explantát a Khatik a Yoshi (2018) při 2,5 mg/l BAP a 2,5 mg/l kinetinu v průměru na hodnotu 8,8 výhonů na explantát. Babu et al. (2000) a Mathew et al. (2007) vyšší produktivity explantátů dosáhli pravděpodobně také postupným odebíráním a pasážováním vyprodukovaných výhonů. Tuto myšlenku potvrzuje i Webster et al. (2015) při kultivaci podnože M9 pro *Malus Mill.* a Mustafa et al. (2012) při kultivaci *Ficus carica L.* Při kultivaci částí výhonů by dle Yae et al. (1987) mohlo být možné zvýšit počet výhonů na explantát odstraněním apikálního meristému.

Výhony o největší průměrné délce (nad 2 cm) byly indukovány na médiu bez přidaných regulátorů růstu (médium č. 1). Bhuyan et al. (1997) uvádí, že jejich nejdelší výhony dosahovaly průměrné délky 4,7 cm, Rani et al. (2012) uvádí až délku 5,6 cm, Perveen et al. (2012) až 4,16 cm a Khatik a Yoshi (2018) až 4,26 cm. Suplementace kultivačního média auxiny by měla vést k prodloužení výhonů, jak uvádějí Bhuyan et al. (1997), Mathew et al. (2007) a Rani et al. (2012). Porovnáním délky výhonů indukovaných na mnou testovaných médiích č. 3 a 4, které se od sebe liší pouze obsahem GA₃, je však možné dojít k opačnému závěru. Má práce však byla limitována malým počtem opakování z důvodu dostupnosti pouze malého množství rostlinného materiálu. Mé výsledky mohou být tedy zkrácené a rozdíly mohou být vysvětleny jako statistická chyba.

Orientace nodálních explantátů při kultivaci může hrát významnou roli v počtu proliferovaných výhonů na explantát. V mých pokusech produkovaly nejvíce výhonů na explantát příčně krájené nodální explantáty umístěné do kultivačního média bazální stranou (tj. se zachováním polaritu). Ke stejným výsledkům došli i García-Luis et al. (2006) při kultivaci křížence *Citrus sinensis (L.) Osbeck* × *Poncirus trifoliata (L.) Raf.* Yae et al. (1987) a Vieitez et al. (1993) však uvádí, že při kultivaci některých kultivarů *Malus* a *Quercus rubra L.* poskytují lepší výsledky horizontálně umístěné nody. Také umístění odebíraných

nodů na výhonech mateřské rostliny může ovlivnit počet vyprodukovaných výhonů na explantát. Hsia et al. (1996) při kultivaci různých druhů rodu *Rosa* L., Shekafandeh a Khosh-Khui. (2008) při kultivaci *Psidium guajava* L., a Mishra et al. (2001) při kultivaci *Phyllanthus emblica* L. zaznamenali, že nody blíže k apexu výhonu mateřské rostliny poskytují více výhonů než ty vzdálenější. Mishra et al. (2001) ale dále uvádí, že pokud jsou nody umístěny příliš blízko apexu, mohou jejich pletiva být příliš jemná a hrozí tedy riziko poškození a ztráty vitality během procesu sterilizace. I když tato skutečnost nebyla v mnou prováděných experimentech pozorována, nemusí být apikální nody nejvhodnějším materiálem pro mikropropagaci.

Rozdíly mezi výsledky mých a předchozích experimentů mohou být způsobeny interakcí explantátů s aktivním uhlím v médiu, kultivarem mateřské rostliny i malým počtem opakování experimentů. Další výzkum by mohl pomoci objasnit tyto nesrovnalosti.

Dle Rahmana et al. (1992) jsou podmínky pro indukci kořenů druhově specifické. Jelikož žádný z mých pokusů o zakořenění výhonů nebyl úspěšný, považuji za nutné porovnat můj experiment hlavně se zdroji zabývajícími se kultivací *Murraya koenigii*. Hodnota pH médií, koncentrace agaru, teplota a světelné podmínky byly v mých experimentech zvoleny shodně s předchozí literaturou. Je tedy nepravděpodobné, že by tyto faktory byly příčinou nezakořenění výhonů v mých kulturách. Na rozdíl od mých experimentů, Bhuyan et al. (1997), Mathew et al. (1999) a Rani et al. (2012) zvolili pro zakořenění výhonů MS médium o poloviční koncentraci. Je tedy možné, že snížení koncentrace MS média na polovinu by mohlo mít pozitivní vliv na růst kořenů, ačkoliv Rout (2004), Perveen et al. (2015) a Khatik a Yoshi (2018) úspěšně indukovali kořeny i na MS médiu o plné koncentraci. Bhuyan et al. (1997) a Rout (2005) snížili pro zakořenění koncentraci sacharózy na 20 g/l oproti 30 g/l pro indukci výhonů. V mém případě byla koncentrace sacharózy ponechána na 30 g/l, což mohlo být příčinou nezakořenění výhonů, Khatik a Yoshi (2018) ovšem dosáhli indukce kořenů i při této koncentraci sacharózy. Jak je podrobněji diskutováno v kapitole 7.1.3, je možné, že aktivní uhlí má negativní vliv na kultury *Murraya koenigii* a tedy i na indukci kořenů v těchto kulturách. Zakořenění výhonů *in vitro* probíhá nejčastěji na médiích obohacených o auxiny. V této práci byla zvolena kombinace 0,5 mg/l IBA a 1,0 mg/l NAA. Bhuyan et al. (1997) uvádí, že kombinace NAA a IBA také nevedla k indukci kořenů. Avšak u Mathewa et al. (1999) a Babu et al. (2000) kombinace těchto auxinů o různých koncentracích poskytla jedny z nejlepších výsledků. Toto potvrzuje i Al-Bahrany (2002) při kultivaci *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. Bhuyan et al. (1997) a Perveen et al. (2015) dosáhli nejlepších výsledků za použití pouze IBA, Mathew et al. (2007) za použití pouze NAA a Rani et al. (2012) za použití pouze IAA. Rout (2005) testoval pouze kombinaci IAA a NAA, Khatik a Yoshi (2018) pouze kombinaci IBA a NAA. Další studie věnující se této problematice by mohla být přínosná pro optimalizaci kultivačních podmínek pro produkci sadbového materiálu *Murraya koenigii*.

7.1.2 Listové kultury

Vzhledem k nedostupnosti literatury zabývající se mikropropagací *Murraya koenigii* z listových explantátů, není možné porovnat mnou dosažené výsledky s experimenty od jiných autorů.

V porovnání s nodálními kulturami se listové kultury nejeví jako vhodný způsob mikropropagace *Murraya koenigii*, pokud je cílem regenerace výhonů. V případech, kdy je požadovaným produktem kalus, by mohly být listové kultury použitelné.

Jelikož nejvyšší počet explantátů tvořící kalus byl kultivován na médiu č. 7, je možné se domnívat, že zvýšení koncentrace cytokininů (zejména BAP) utlumuje proliferaci výhonů a stimuluje tvorbu kalusu. Dostupné literatura toto potvrzuje u kultivace jiných kulturních plodin, jako je *Saccharum officinarum* L. (Gopitha et al. 2010) a *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Amin & Jaiswal 1993).

Kromě koncentrace a kombinace použitých regulátorů růstu mohou mít na tvorbu kalusu vliv také světelné podmínky při kultivaci. Suhartanto et al. (2006) a Yeoman a Davidson (1971) uvádějí, že kultury tvoří více kalusu bez přístupu světla. Wahyuni et al. (2020) došli k závěru, že vedle světelných podmínek má vliv na tvorbu kalusu i koncentrace sacharózy v kultivačním médiu. Dle Adila et al. (2019) má vliv na tvorbu kalusu i spektrální složení světla při kultivaci. Tvorba kalusu v kulturách *Withania somnifera* L. byla nejúspěšnější při použití bílého a červeného světla. Johkan et al. (2012) uvádí, že zelené světlo má vliv na délku výhonů indukovaných ze semen *Lactuca sativa* L.

Dalším faktorem hrajícím roli při produkci kalusu nebo výhonů v kulturách listů může být úprava (např. přítomnost řapíku, středního žebra nebo směr řezu) a orientace explantátu na kultivačním médiu. Dle Papafotiou a Martini (2009) probíhá tvorba kalusu lépe na explantátech z bazální části listu obsahující část řapíku nebo středního žebra. Podobných výsledků dosáhli i Gow et al. (2009) – explantáty z bazálních částí listů *Phalaenopsis amabilis* Blume vykazují vyšší produkci somatických embryí. Bhatia et al. (2005) uvádí, že umístění listového explantátu *Solanum lycopersicum* L. abaxiální stranou na médium produkuje více výhonů. Toto rozporují Cardoso a Habermann (2014), kteří dosáhli vyššího počtu výhonů při umístění explantátu *Anthurium andreanum* Linden ex André adaxiální stranou na kultivační médium.

K optimalizaci metodiky pro *in vitro* tvorbu kalusu nebo indukci výhonů z listových explantátů *Murraya koenigii* je tedy nutné provést další studie – zejména v oblasti vhodného složení kultivačního média, světelných podmínek kultury a orientace explantátů v médiu.

7.1.3 Vliv gelující látky a aktivního uhlí na vitalitu a produktivitu kultury

Během kultivace nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v produktivitě mezi kultivačními médii zpevněnými agarem a médii zpevněnými Phytagelem. Ke stejnému závěru došli také Puchooa et al. (1999) při kultivaci *Nicotiana tabacum* L. a Klimaszewska et al. (2000) při kultivaci *Pinus strobus* L. Raina (2017) ovšem došla k závěru, že Phytigel poskytuje horší výsledky při kultivaci *Albizzia lebeck* (L.) Benth. Toto rozporují Veramendi et al. (1997), kteří uvádějí, že *Solanum tuberosum* L. reaguje lépe na média zpevněná Phytagelem.

Přidáním aktivního uhlí do kultivačního média se podařilo snížit zahnědnutí média i explantátů, které způsobila akumulace produktů oxidace fenolických látek. Aktivní uhlí mělo pozitivní účinky v experimentech Wanga a Huanga (1976), Weatherheada et al. (1978), Fridborga et al. (1978), Manjuly et al. (1997), Madhusudhanana a Rahimana (2000) a Nguyena et al. (2007). Při kultivaci některých rostlin však může mít aktivní uhlí i negativní nebo nulový vliv, jak uvádí Boggetti et al. (1999), Tivarekar a Eapen (2001), Wei et al. (2006) nebo Nandakumar et al. (2005). V žádných z předchozích zdrojů zabývajících se kultivací *Murraya koenigii* nebylo aktivní uhlí použito. Jak je ale uvedeno v kapitole 7.1.1, mé kultury dosahovaly nižších výsledků v délce výhonů a počtu výhonů a kořenů na explantát. Je tedy možné, že přítomnost aktivního uhlí v kultivačním médiu má negativní vliv na produktivitu in vitro kultur *Murraya koenigii*.

Interakce rostlinných tkání a použité gelující látky a aktivního uhlí nebo jiných aditiv v kultivačním médiu mohou být druhově specifické. Bylo by tedy vhodné provést výzkum zaměřený na tuto problematiku.

7.2 Sterilizační postupy

Mnou provedené experimenty potvrdily, že úspěšná povrchová sterilizace nodálních a listových explantátů *Murraya koenigii* bez využití HgCl_2 je možná, i když málo účinná. Nejúčinnější sterilizační postup (SP4) zahrnoval 25 minut sterilizace v 0,94% roztoku NaClO a následně 10 minut v 70% roztoku technického lihu. S použitím sterilizačního postupu 4 se podařilo založit 67 % aseptických kultur. Jan et al. (2013) však při kultivaci *Fragaria* × *ananassa* Duch. uvádí, že sterilizace po dobu 20 minut v 1,5% roztoku NaClO následovaná 30 sekundami v 70% etanolu je nejúčinnější metodou i ve srovnání s použitím roztoku HgCl_2 , avšak s vysokým podílem odumírání tkání explantátů z důvodů poškození během sterilizace. Ayele a Tefera (2018) dosáhli při sterilizaci nodálních explantátů *Vanilla planifolia* Andr. po dobu 25 minut v 5% roztoku NaClO podobných výsledků jako při využití 0,5% roztoku HgCl_2 . Nabilah et al. (2013) jako nejúčinnější postup pro sterilizaci listů *Labisia pumila* (Blume) Fern.-Vill. uvádí 20 minut v 2,2% roztoku NaClO následovanou 2 minutami v 70% roztoku etanolu a dalšími 5 minutami v 1,5% roztoku NaClO . Tato 20 % explantátů. Žádný z mnou testovaných sterilizačních postupů nezpůsobil očividnou nekrózu tkání kultivovaných explantátů. Na základě tohoto poznatku a dostupné literatury se lze domnívat, že další navýšení koncentrace NaClO nebo etanolu, případně doby, po kterou v nich jsou explantáty sterilizovány, by mohlo vést k vyšší efektivitě sterilizace.

I přes použití fungicidu byla kontaminace houbovými organismy vysoká. Volba jiné aktivní látky nebo změna metodiky aplikace fungicidu by mohly poskytnout lepší výsledky.

Při prevenci kontaminace kultur může hrát roli pozice nodálního explantátu na výhonu mateřské rostliny. Hand a Reed (2011) a Hand et al. (2016) uvádějí, že čím vyšší je u *Corylus avellana* vzdálenost nodu od apexu výhonu, tím je vyšší riziko mikrobiální kontaminace založené kultury. Při sběru rostlinného materiálu pro mé experimenty byly dostupné pouze mladé výhony s malým počtem nodů; nelze tedy zhodnotit vliv tohoto faktoru, ale studie zabývající se tímto tématem by mohly přinést cenné informace.

8 Závěr

Cílem práce bylo založit in vitro kulturu *Murraya koenigii* (L.) Spreng. za použití nodálních a listových explantátů a určit optimální podmínky kultury pro mikropropagaci *Murraya koenigii* (L.) Spreng.

Nodální kultury pro mikropropagaci byly úspěšně založeny, ačkoliv dosahovaly nižších výsledků v oblasti proliferace výhonů v porovnání s dostupnou literaturou. Přesto ale tyto experimenty potvrdily, že mikropropagace může být vyhovující metodou množení druhu *Murraya koenigii* a že složení kultivačního média hraje velmi důležitou roli při proliferaci výhonů. V mých experimentech dosahovala nejlepších výsledků média s vyrovnaným poměrem BAP a kinetinu s přídatkem IBA.

Mikropropagace *Murraya koenigii* za použití listových explantátů se neosvědčila jako vhodná metoda pro indukci výhonů, ale projevila potenciál pro tvorbu kalusu. Tohoto poznatku by se dalo využít, jelikož kalusové kultury jsou často využívány pro produkci sekundárních rostlinných metabolitů, které jsou následně využívány ve farmaceutickém průmyslu. Jako nejvhodnější se pro tvorbu kalusu jeví média s vysokým obsahem cytokininů, zejména BAP.

Dále bylo potvrzeno, že povrchová sterilizace rostlinných explantátů *Murraya koenigii* bez využití HgCl_2 je možná, ačkoliv její efektivita je relativně nízká (maximálně 67 % založených kultury bylo aseptických). Přesto je ale možné tento způsob povrchové sterilizace považovat za méně rizikový, zejména z hlediska bezpečnosti personálu, bezpečnosti potravin a ochrany životního prostředí. Další výhodou této metody sterilizace je možná finanční úspora z důvodu nižších nákladů na pořízení a likvidaci NaClO a etanolu oproti HgCl_2 .

Pro další výzkum by bylo vhodné založit experimenty většího rozsahu zaměřující se zejména na složení kultivačních médií, vliv přítomnosti aktivního uhlí na kultury *Murraya koenigii* a vliv orientace explantátů v kultivačním médiu na proliferaci výhonů. Pro výzkum tvorby kalusu z listových explantátů by mohl být dále rozšířen o hodnocení vlivu světelných podmínek kultury. Z hlediska povrchové sterilizace by mohly být provedeny rozsáhlejší studie vlivu vyšších koncentrací NaClO a etanolu na vitalitu kultur, případně by mohly být zařazeny i jiné sterilizační prostředky.

9 Literatura

- Adil M, Abbasi BH, Haq IU. 2019. Red light controlled callus morphogenetic patterns and secondary metabolites production in *Withania somnifera* L. *Biotechnology Reports* **24**. Available from <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00380>.
- Al-Bahrany AM. 2002. Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Scientia Horticulturae* **95**:285-295. Available from [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00349-1).
- Amin MN, Jaiswal VS. 1993. In vitro response of apical bud explants from mature trees of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33**:59–65 Available from <https://doi.org/10.1007/BF01997599>.
- Anand T, Kalaiselvan A, Gokulakrishnan K. 2011. Wound healing activity of *Murraya koenigii* in Male Albino Rats. *International Journal of current research* **3**:425-427. Available from <https://journalcra.com/sites/default/files/issue-pdf/SamiLS.pdf>.
- Ayele YZ, Tefera W. 2018. Low Cost Sterilization Technique and In Vitro Initiation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.), *Journal of Agricultural Science and Food Research* **9**. Available from https://www.researchgate.net/profile/Yilkal-Ayele-2/publication/348880344_Low_Cost_Sterilization_Technique_and_In_Vitro_Initiation_of_Vanilla_Vanilla_planifolia_Andr/links/60141226299bf1b33e315ec4/Low-Cost-Sterilization-Technique-and-In-Vitro-Initiation-of-Vanilla-Vanilla-planifolia-Andr.pdf.
- Babu KN, Anu A, Remashree AB, Praveen K. 2000. Micropropagation of curry leaf tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **61**:199-203.
- Bapu C, Purohit RC, Sood PP. 1994. Fluctuation of Trace Elements During Methylmercury Toxication and Chelation Therapy. *Human & Experimental Toxicology* **13**:815-823. Available from <https://doi.org/10.1177/096032719401301201>.
- Bhatia P, Ashwath N, Midmore DJ. 2005. Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **41**:457–464. Available from <https://doi.org/10.1079/IVP2005649>.
- Bhuyan AK, Pattanaik S, Chand PK. 1997. Micropropagation of Curry Leaf Tree [*Murraya koenigii* (L.) Spreng.] by axillary proliferation using intact seedlings. *Plant Cell Reports* **16**:779-782.
- Bhojwani SS, Razdal MK. 2012 *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Boggetti B, Jasik J, Mantell S. 1999. In vitro multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glasshouse-raised plants. *Plant Cell Reports* **18**:456-461. Available from <https://doi.org/10.1007/s002990050603>.

- Bonacker D, Stoiber T, Wang M. 2004. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. *Archives of Toxicology* **78**:575–583. Available from <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0578-8>.
- Cardoso JC, Habermann G. 2014. Adventitious shoot induction from leaf segments in *Anthurium andreanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **55**:56–62. Available from <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0022-9>.
- De Rosi F, Anastasio SP, Selvaggi L, Beltrame A, Moriani G. 1985. Female reproductive health in two lamp factories: effects of exposure to inorganic mercury vapour and stress factors. *Occupational and Environmental Medicine* **42**:488-494. Available from <https://www.jstor.org/stable/27723994>.
- Dieguez-Acuña FJ, Polk WW, Ellis ME, Simmonds PL, Kushleika JV, Woods JS. 2004. Nuclear Factor κ B Activity Determines the Sensitivity of Kidney Epithelial Cells to Apoptosis: Implications for Mercury-Induced Renal Failure. *Toxicological Sciences* **82**:114–123. Available from <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh236>.
- Dineshkumar B, Mitra A, Mahadevappa M. 2010. Antidiabetic and hypolipidemic effects of mahanimbine carbazole alkaloid from *Murraya koenigii* Rutaceae leaves. *International Journal of Phytomedicine* **2**:22-30. Available from <https://core.ac.uk/download/pdf/297038777.pdf>.
- Ernst E, Lauritsen JG. 1991. Effect of Organic and Inorganic Mercury on Human Sperm Motility. *Pharmacology & Toxicology* **68**:440-444. Available from <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1991.tb01267.x>.
- Fridborg G, Pedersén M, Landström LE, Eriksson T. 1978. The Effect of Activated Charcoal on Tissue Cultures: Adsorption of Metabolites Inhibiting Morphogenesis. *Physiologia Plantarum* **43**:104-106. Available from <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb01575.x>
- García-Luis A, Molina R, Varona V. 2006. The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration in vitro in epicotyl cuttings of Troyer citrange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **85**:137–144. Available from <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9060-4>.
- Gopitha K, Bhavani AL, Senthilmanickam J. 2010. Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **1**. Available from https://www.researchgate.net/publication/264879990_Effect_of_the_different_auxins_and_cytokinins_in_callus_induction_shoot_root_regeneration_in_sugarcane.

- Gow WP, Chen JT, Chang WC. (2009). Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**:363-369. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-008-0243-6>.
- Hand CP, Reed BM. 2011. The Effect of Explant Node Position on the Amount and Type of Bacterial Contamination in Hazelnut Shoot Cultures. *Society for In Vitro Biology Proceedings* **47**:67. Available from <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=264373>.
- Hand CR, Wada N, Stockwell V. 2016. Node position influences viability and contamination in hazelnut shoot explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **52**:580–589. Available from <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9791-4>.
- Hsia CN, Korban SS. 1996. Factors affecting in vitro establishment and shoot proliferation of *Rosa hybrida* L. and *Rosa Chinensis minima*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **32**:217–222. Available from <https://doi.org/10.1007/BF02822690>
- Ito C, Itoigawa M, Nakao K, Murata T, Tsuboi M, Kaneda N, Furukawa H. 2006. Induction of apoptosis by carbazole alkaloids isolated from *Murraya koenigii*. *Phytomedicine* **13**:359-365. Available from <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.03.010>.
- Jan A, Bhat KM, Bhat SJA, Mir MA, Bhat MA, Imtiyaz A, Rather JA. 2013. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for in vitro culture. *African Journal of Biotechnology* **12**. Available from <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/135789>.
- Johkan M, Shoji K, Goto F, Hahida S, Yoshihara T. 2012. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. *Environmental and Experimental Botany* **75**:128-133. Available from <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.010>.
- Kadam SH, Dombe S, Naikwadi P, Patil M. 2011. Cardiovascular Effects of Aqueous Extract of *Murraya koenigii* on Isolated Perfused Frog Heart Preparation. *Journal of Pharmacy Research* **4**:462-463. Available from <https://www.semanticscholar.org/paper/Cardiovascular-Effects-of-Aqueous-Extract-of-on-Kadam-Shailaja/5b447a5de5a5f9feac1e86e5a3c7d3ae2bbbe2c4>.
- Khatik N, Joshi R. 2018. In vitro propagation of *Murraya koenigii* by axillary bud proliferation using mature explants. *Indian Journal of Biotechnology* **17**:379-382.
- Klimaszewska K, Bernier-Cardou M, Cyr DR. 2000. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **36**:279-286. Available from <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0051-1>.

- Lloyd GB, McCown BH. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagators Society* **30**:421-437. Available from <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19830315515>.
- Madhusudhanan K, Rahiman B. 2000. The Effect of Activated Charcoal Supplemented Media to Browning of In Vitro Cultures of Piper species. *Biologia Plantarum* **43**:297–299. Available from <https://doi.org/10.1023/A:1002729032527>
- Mandal S, Nayak A, Kar M, Banerjee SK, Das A, Upadhyay SN. 2010. Antidiarrhoeal activity of carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* Spreng Rutaceae seeds. *Fitoterapia* **81**:72-74. Available from <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20103068127>.
- Manjula S, Thomas A, Daniel B, Nair GM. (1997). In vitro plant regeneration of *Aristolochia indica* through axillary shoot multiplication and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **51**:145-148. Available from <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1005978125424>.
- Markovich D, James KM. 1999. Heavy Metals Mercury, Cadmium, and Chromium Inhibit the Activity of the Mammalian Liver and Kidney Sulfate Transporter sat-1. *Toxicology and Applied Pharmacology* **154**:181-187. Available from <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8559>.
- Mathew D, Prasad MC. 2007. Multiple Shoot and Plant Regeneration from Immature Leaflets of In Vitro Origin in Curryleaf (*Murraya koenigii* Spreng). *Indian Journal of Plant Physiology* **12**:18-22.
- Mathew KM, Rao YS, Kumar KP, Sallykutty J, Lakshmanan R, Madhusoodanan KJ. 1999. Micropropagation of curry leaf (*Murraya koenigii* L.). *Journal of Spices and Aromatic Crops* **8**:77-79.
- Mathieson PW. 1995. Mercury: god of Th2 cells? *Clinical and Experimental Immunology* **102**:229-230.
- Meng R, Chen HHT, Finn CE, Li Y. 2004. Improving In Vitro Plant Regeneration from Leaf and Petiole Explants of ‘Marion’ Blackberry. *Hortscience* **39**:316–320. Available from <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.2.316>.
- Mishra M, Pathak RK. 2001. Effect of nodal position and season on in vitro shoot proliferation in aonla (*Emblica officinalis* Gaertn.). *Journal of Applied Horticulture* **3**:103-104. Available from https://www.horticultureresearch.net/jah/2001_3_2_103_104.PDF.

- Mustafa NS, Rania AT. (2012). Influence of Plant Growth Regulators and Subculturing on In Vitro Multiplication of Some Fig (*Ficus Carica*) Cultivars. *Journal of Applied Sciences Research* **8**: 4038-4044. Available from https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/36117596/Influence_of_Plant_Growth_Regulators_and_Subculturing_on_In_Vitro_Multiplication_of_Some_Fig_Ficus_Carica_Cultivars.-libre.pdf?1420152963=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DInfluence_of_Plant_Growth_Regulators_and.pdf&Expires=1714165758&Signature=bcwRWmZZ8jIz1wzv-RbonKsfVDzEXdzUuxtQVQSCq1iohW7bg6EmwNJWeLzkhAdu0rjU2fNNMogm5qfrKpMfr2S43AiUI71513YQO9aCZgFR2oxw-AWEmagiuIYBtyPtQkeUpnyNavmp5FoSohs04aFPFD3Xpng3CTHC~svB81f~7u5xIK30ix217wifPxjzUIQhPo4I8YaoIHC~iKS2WLyWzKC-6CoGRg0NiYVoJEqjNNXrq4Ui3vPjM64oO9dJW8hdHSBnlXdFPFUJTX0jyoIfDjlw1eS60Eo3MZdjG7SjPNU~SB8WWLD8gNKE5keIgicnQrcACqqm5nv9wDiQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**:473-497. Available from <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Nabilah SSB, Sharifah M, Hasnida HN, Fazwa MAF, Suhaila ARS, Nazirah A, Fuad YM, Haliza I, Mohamad O. 2013. development of a surface sterilisation method for culture initiation of field-grown *Labisia pumila* (kacip fatimah) explants. *Proceedings of the conference on forestry and forest products research*. 399-401. Available from https://www.researchgate.net/profile/Nor-Fadilah-Wook/publication/275884534_Production_of_high_quality_planting_materials_of_Eurycoma_longifolia_and_Labisia_pumila_in_FRIM_A_Mohd_Zaki_MA_Farah_Fazwa_N_Lokmal_S_Norhayati_SB_Syafiqah_Nabilah_W_Norfadilah/links/55487f3c0cf26a7bf4dac9a1/Production-of-high-quality-planting-materials-of-Eurycoma-longifolia-and-Labisia-pumila-in-FRIM-A-Mohd-Zaki-MA-Farah-Fazwa-N-Lokmal-S-Norhayati-SB-Syafiqah-Nabilah-W-Norfadilah.pdf#page=409.
- Nandakumar R, Chen L, Rogers SM. (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of the wetland monocot *Typha latifolia* L. (Broadleaf cattail). *Plant cell reports* **23**:744-750. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-004-0890-z>
- NguyenTV, Thanh TT, Claeys M. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **91**:155–164. Available from <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9228-1>.
- Olivieri G, Novakovic M, Savaskan E, Meier F, Baysang G, Brockhaus M, Müller-Spahn F. 2002. The effects of β -estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cells during heavy metal induced oxidative stress, neurotoxicity and β -amyloid secretion. *Neuroscience* **113**:849-855. Available from [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00211-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00211-7).

- Papafotiou M, Martini AN. 2009. Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl. (ZZ). *Scientia Horticulturae* **120**:115-120. Available from <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.09.023>.
- Permadi N, Akbari SI, Prismantoro D, Indriyani NN, Nurzaman M, Alhasnawi AN, Doni F, Julaeha E. 2024. Traditional and next-generation methods for browning control in plant tissue culture: Current insights and future directions. *Current Plant Biology* **38**. Available from <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2024.100339>.
- Perveen S, Khanam MN, Anis M, El Atta HA. 2015. In vitro mass propagation of *Murraya koenigii* L. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2**:60-68.
- Pierik RLM. 2012. In Vitro Culture of Higher Plants. Springer Science & Business Media, Dordrecht.
- Pinheiro CUB. 1997. Jaborandi (*Pilocarpus* Sp., Rutaceae): A Wild Species. *Economic Botany* **51**: 49-58. Available from https://www.academia.edu/53518935/Jaborandi_Pilocarpus_sp_rutaceae_A_wild_spec ies.
- Puchooa D, Purseramen PN, Rujbally BR. 1999. Effects of medium support and gelling agent in the tissue culture of tobacco *Nicotiana tabacum*. *Science and technology - Research Journal* **3**:129–144. Available from <https://www.ajol.info/index.php/umrj/article/view/130882>.
- Pooja M, Tabrez F, Suma A, Iqra N, Imran K, Saikh MW, Mohsin K, Moniba R, Zeeshan R, Salman K. 2023. Antiproliferative activity of gold and silver nanoparticles fabricated using bark extract of *Murraya koenigii*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **89**. Available from <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105014>.
- Prajapati ND, Purohit SS, Sharma AK, Kumar T. 2003. A Handbook of Medicinal plants. Agrobios, Jodhpur.
- Rahman MM, Gray AI. 2005. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* **66**:1601-1606. Available from <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.05.001>.
- Rahman SM, Hossain M, Islam AKMR, Joarder OI. 1992. Effects of media composition and culture conditions on in vitro rooting of rose. *Scientia Horticulturae* **52**:163-169. Available from [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(92\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0304-4238(92)90018-8).
- Raina RJ. 2017. Gelling agents for plant tissue culture media: A comparative study. *International journal of innovative research in science and engineering* **3**:324-331. Available from <http://ijirse.com/wp-content/upload/2017/03/K1009ijirse.pdf>.

- Ramsewak RS, Nair MG, Strasburg GM, DeWitt DL, Nitiss JL. 1999. Biologically active carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**:444 – 447. Available from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0033007243&doi=10.1021%2Fj9805808&partnerID=40&md5=d949ed39056fbc4e3010ba481869cc18>.
- Rani U, Sharma MM, Ismail N, Batra A. 2012. In vitro plant regeneration from immature seeds of *Murraya koenigii* (L.) Spreng. *Indian Journal of Biotechnology* **11**:108-110.
- Raghunathan K, Mitra R. 1982. *Pharmacognosy of Indigenous Drugs*, vol. 1. Central Council for Research in Ayurveda and Siddha, Nové Dillí.
- Rout GR. 2005. Direct plant regeneration of curry leaf tree (*Murraya koenigii* koenig.), an aromatic plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **41**:133-136.
- Sadwal S, Bharati S, Dar ZA, Kaur S. 2024. Chemopreventive potential of hydroethanolic *Murraya koenigii* leaves extract against DMBA induced breast carcinogenesis: In-silico and in-vivo study. *Journal of Ethnopharmacology* **319**. Available from <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117124>.
- Sampath SNTI, Jayasinghe S, Attanayake AP, Karunaratne V, Yaddehige ML, Watkins DL. 2022. A new dimeric carbazole alkaloid from *Murraya koenigii* (L.) leaves with α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities. *Phytochemistry Letters* **52**:87-91. Available from <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2022.09.013>.
- Sathyanarayana BN, Varghese DB. (2007). *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*. I. K. International Publishing House, Nové Dillí.
- Sharma P, Gali V, Bhandari A, Singh S, Ghule S, Agrawal S. 2011. Antiulcer Activity of Leaves Extract of *Murraya Koenigii* In Experimentally Induced Ulcer In Rats. *Pharmacologyonline* **2**:818-824. Available from <https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2011/vol2/081.sharma.pdf>.
- Shekafandeh A, Khosh-Khui M. 2008. Effects of Bud Position and Culture Medium on Shoot Proliferation from Nodal Culture of Two Mature Guava Cultivars. *Asian Journal of Plant Sciences* **7**:177-182. Available from https://scialert.net/fulltext/?doi=ajps.2008.177.182#google_vignette.
- Shirwaikar A, Ram HNA, Mohapatra P. 2006. Antioxidant and Antiulcer activity of aqueous extract of polyherbal formulation. *Indian Journal of Experimental Biology* **44**:474-480. Available from <https://www.semanticscholar.org/paper/Antioxidant-and-antiulcer-activity-of-aqueous-of-a-Shirwaikar-Ram/ead4f70e15c77652bfd8a5ed7e00eff27272f70e>.

- Siwach P, Gill AR. 2014. Micropropagation of *Ficus religiosa* L. via leaf explants and comparative evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity in the micropropagated and conventionally grown plants. *3 Biotech* 4:477-491. Available from doi: 10.1007/s13205-013-0175-8.
- Slika H, Mansour H, Wehbe N, Nasser SA, Iratni R, Nasrallah G, Shaito A, Ghaddar T, Kobeissy F, Eid AH. 2022. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **146**. Available from <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112442>.
- Song F, Liu D, Huo X, Qiu D. 2022. The anticancer activity of carbazole alkaloids. *Archiv der Pharmazie* **355**. Available from <https://doi.org/10.1002/ardp.202100277>.
- Suhartanto B, Astutik M, Umami N, Suseno N, Haq MS. 2006. The effect of explants and light conditions on callus induction of srikandi putih maize (*Zea mays* L.) IOP Conference Series: Earth and Environmental Science **1001**:2-5. Available from <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/1001/1/012006/meta>.
- Swati D, Pathak AK, Burande MD. 2012. Antigenotoxic effect of *Murraya koenigii* towards cyclophosphamide induced cytogenetic damage in mouse bone marrow cells. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **4**:59-63. Available from <https://impactfactor.org/PDF/IJPPR/4/IJPPR,Vol4,Issue2,Article5.pdf>.
- Tivarekar S, Eapen S. (2001). High frequency plant regeneration from immature cotyledons of mungbean. *Plant cell, tissue and organ culture* **66**:227-230. Available from <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1010644812268>.
- Tachibana Y, Kikuzaki H, Lajis N, Nakatani N. 2001. Antioxidative Activity of Carbazoles from *Murraya koenigii* Leaves. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**:5589-5594. Available from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf010621r>.
- Tembhurne SV, Sakarkar DM. 2010. Beneficial Effects of Ethanolic Extract of *Murraya Koenigii* Linn. Leaves in Cognitive Deficit Aged Mice Involving Possible Anticholinesterase and Cholesterol Lowering Mechanism. *International Journal of PharmTech Research* **2**:181-188. Available from [https://sphinxesai.com/sphinxsaivol_2no.1/pharmtech_vol_2no.1/PharmTech_Vol_2No_1.PDF/PT=29%20\(181-188\).pdf](https://sphinxesai.com/sphinxsaivol_2no.1/pharmtech_vol_2no.1/PharmTech_Vol_2No_1.PDF/PT=29%20(181-188).pdf).
- Thokchom R, Maitra S. 2017. Micropopagation of *Anthurium andreanum* cv. Jewel from leaf explants. *Journal of Crop and Weed* **13**: 23-27. Available from https://cwss.in/Journal/Complete_jurnal/Vol.13-No.1__4.pdf.

- Uversky VN, Li J, Fink AL. 2001. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein: a possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *Journal of Biological Chemistry* **276**:44284-44296. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819828685>.
- Vasanthkumar SS, Gowshika R, Kumaresan M, Rubika R, Pooja UK, Priya L. 2023. Production Technology Of Curry Leaf. *Trends in Vegetable Science* 51-58.
- Vashishth DS, Bachheti A, Bachheti RK, Alhag SK, Al-Shuraym LA, Kumar P, Husen A. 2023. Reducing Herbicide Dependency: Impact of *Murraya koenigii* Leaf Extract on Weed Control and Growth of Wheat (*Triticum aestivum*) and Chickpea (*Cicer arietinum*). *Agriculture* **13**:1678. Available from <https://doi.org/10.3390/agriculture13091678>.
- Veramendi J, Villafranca MJ, Sota V. 1997. Gelrite as an alternative to agar for micropropagation and microtuberization of *Solanum tuberosum* L. cv. Baraka. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **33**:195–199. Available from <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0021-y>.
- Vieitez AM, Pintos F, San-José MC, Ballester A. 1993. In vitro shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. *Tree Physiology* **12**:107–117. Available from <https://doi.org/10.1093/treephys/12.2.107>
- Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. Využití moderních in vitro biotechnologií v ovocnářství. *Metodické listy OPVK. Holovousy*.
- Wahyuni DK, Huda A, Faizah S, Purnobasuki H, Wardoyo BPE. 2020. Effects of light, sucrose concentration and repetitive subculture on callus growth and medically important production in *Justicia gendarussa* Burm.f. *Biotechnology Reports* **27**. Available from <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00473>.
- Wang, P. J., and L. C. Huang. "Beneficial Effects of Activated Charcoal on Plant Tissue and Organ Cultures." *In Vitro*, vol. 12, no. 3, 1976, pp. 260–62. JSTOR, <http://www.jstor.org/stable/20170290>. Accessed 24 Apr. 2024.
- Weatherhead MA, Burdon J, Henshaw GG. 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **89**:141-147. Available from [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(78\)80054-3](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(78)80054-3).
- Webster CA, Jones OP. 1989. Micropropagation of the Apple Rootstock M.9: Effect of Sustained Subculture on Apparent Rejuvenation in Vitro. *Journal of Horticultural Science* **64**:421–28. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14620316.1989.11515973>.

- Wei X, Gou X, Yuan T. 2006. A highly efficient in vitro plant regeneration system and Agrobacterium-mediated transformation in *Plumbago zeylanica*. *Plant Cell Report* **25**:513–521. Available from <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0114-9>.
- Wild J et al. (2019) Plant distribution data for the Czech Republic integrated in the Pladias database. *Preslia* 91: 1–24. Available from <https://doi.org/10.23855/preslia.2019.001>.
- Yae BW, Zimmerman RH, Fordham I, Ko KC. (1987). Influence of Photoperiod, Apical Meristem, and Explant Orientation on Axillary Shoot Proliferation of Apple Cultivars in Vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **112**:588-592. Available from: <https://doi.org/10.21273/JASHS.112.3.588>.
- Yeoman MM, Davidson AW. 1971. Effect of Light on Cell Division in Developing Callus Cultures. *Annals of Botany* **35**:1085–1100. Available from <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084544>.
- Zhang JJ, Yang YS, Lin MF, Li SQ, Tang Y, Chen HB, Chen XY. 2017. An efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick (*Moringa oleifera* Lam.). *Industrial Crops and Products* **103**:59-63. Available from <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.028>.

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

BAP: 6-Benzylaminopurin

GA₃: Kyselina gibberelová

IAA: Kyselina indol-3-octová

IBA: Kyselina indol-3-máselná

MS médium: Murashige a Skoog médium (1962)

NAA: Kyselina 1-naftyloctová

SP: sterilizační protokol

TDZ: thidiazuron