UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky

Mikropropagace u vybraných zástupců čeledi *Fabaceae* a *Lamiaceae*

Diplomová práce

Bc. Sylvie Vašinová

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Učitelství chemie pro střední školy
Učitelství biologie pro střední školy
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci Mikropropagace u vybraných zástupců čeledi *Fabaceae* a *Lamiaceae* vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Boženy Navrátilové, Ph.D. a s použitím citovaných zdrojů.

V Olomouci dne

Diplomová práce byla realizována s podporou interního grantu PřF Univerzity Palackého v Olomouci IGA-PrF-2019-004, IGA-PrF-2020-003 a projektu MZe NAZV QK1910103.

Ráda bych poděkovala RNDr. Boženě Navrátilové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, veškeré spolupráce a konzultace a celé rodině za podporu při studiu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Sylvie Vašinová

Název práce: Mikropropagace u vybraných zástupců čeledi *Fabaceae* a *Lamiaceae*

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP

Vedoucí práce: RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Abstrakt:

Hlavním cílem diplomové práce byla optimalizace metody mikropropagace u vybraných zástupců čeledi *Fabaceae* a *Lamiaceae*. Literární přehled pojednává o charakteristikách čeledí *Fabaceae* a *Lamiaceae* a vybraných zástupců. Dále jsou zpracovány témata rostlinné biotechnologie a sekundární metabolity, využití explantátových kultur a mikropropagace. Experimentální část byla zaměřena na odvození *in vitro* kultur u vybraných rodů. Pro povrchovou sterilizaci bylo zvoleno použití 70% ethanolu a 2,5% chloraminu T. Mikropropagace proběhla nejlépe u *Ocimum sanctum* (BP, B66) na MS médiu s obsahem 0,1 mg/l BAP, u *Astragalus membranaceus, Lavandula angustifolia, Hyssopus officinalis* na MS médiu s obsahem 0,1 mg/l BAP a 0,2 mg/l NAA. *In vitro* zakořeňování prýtů proběhlo nejlépe u *Astragalus membranaceus* na ½ MS médiu s obsahem 0,1 mg/l IBA, u *Lavandula angustifolia* na ½ MS médiu bez růstových regulátorů a MS médiu s obsahem 0,5 mg/l IBA, u *Hyssopus officinalis* na MS médiu s obsahem 0,5 mg/l IBA. Pro převod do *in vivo* podmínek byly zvoleny rašelinové sadbovače (jiffy).

Klíčová slova: *Fabaceae, Lamiaceae*, mikropropagace, rostlinné biotechnologie, sekundární metabolity

Počet stran: 109

Počet příloh: 2

Jazyk: Čeština

Bibliografical identification

Author's first name and surname: Bc. Sylvie Vašinová

Title: Micropropagation by selected representatives of family *Fabaceae* and *Lamiaceae*

Type of thesis: Master

Department: Department of botany PřF UP

Supervisor: RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract:

The main aim of this master thesis was the optimalization of micropropagation method of family *Fabaceae* and *Lamiaceae*. Literary summary deals with the characteristics of family *Fabaceae* and *Lamiaceae* and selected representatives. Further more topics of plant biotechnology and secondary metabolites have been presented as well as the use of biotechnology methods and micropropagation. The experimental part was focused on the derivation *in vitro* culture by selected representatives. The use of 70% ethanol and 2,5% chloramine T was selected for surface sterilization. The best results of micropropagation by *Ocimum sanctum* (BP, B66) on MS medium supplemented with 0,1 mg/l BAP, by *Astragalus membranaceus*, *Lavandula angustifolia*, *Hyssopus officinalis* on MS medium supplemented with 0,1 mg/l BAP and 0,2 mg/l NAA. *In vitro* producing of roots was appropriate by *Astragalus membranaceus on* ½ MS medium supplemented with 0,1 mg/l IBA, by *Lavandula angustifolia* on ½ MS medium without growth regulators and MS medium supplemented with 0,5 mg/l IBA, by *Hyssopus officinalis* on MS medium supplemented 0,5 mg/l IBA. For transfer to *in vivo* condition jiffy pellets were selected.

Keywords: *Fabaceae, Lamiaceae*, micropropagation, plant biotechnology, secondary metabolites

Number of pages: 109

Number of appendices: 2

Language: Czech

Obsah

Seznam zkratek

Úvod a cíle práce

1. Literární přehled 11

1.1 Charakteristika čeledi *Fabaceae* 11

1.2 Charakteristika čeledi *Lamiaceae* 12

1.3 Charakteristika vybraných rodů z čeledi *Fabaceae* 13

1.3.1 Rod kozinec (*Astragalus sp.*) 13

1.4 Charakteristika vybraných rodů z čeledi *Lamiaceae* 18

1.4.1 Rod bazalka (*Ocimum sp.*) 18

1.4.2 Rod levadule (*Lavandula sp.*) 21

1.4.3 Rod rozmarýn (*Rosmarinus sp.*) 23

1.4.4 Rod yzop (*Hyssopus sp.*) 25

1.5 Rostlinné biotechnologie 28

1.5.1 Explantátové kultury u rodu bazalka (*Ocimum sp.*) 28

1.5.2 Explantátové kultury u rodu kozinec (*Astragalus sp.*) 31

1.5.3 Explantátové kultury u rodu levandule (*Lavandula sp.*) 33

1.5.4 Explantátové kultury u rodu rozmarýn (*Rosmarinus sp.*) 36

1.5.5 Explantátové kultury u rodu yzop (*Hyssopus sp.*) 37

1.6 Využití explantátových kultur 44

1.7 Mikropropagace 44

1.7.1 Výběr matečné rostliny a odvození explantátové kultury 44

1.7.2 Fáze proliferace a zakořeňování explantátů 45

1.7.3 Převod do nesterilních podmínek 45

1.8 Biotechnologické metody 45

2. Materiál a metody 47

2.1 Rostlinný materiál 47

2.2 Pracovní postupy....47
2.2.1 Povrchová sterilizace semen....47
2.2.2 Sterilizace prýtů rostlin *Rosmarinus officinalis*....48
2.2.3 Výsev semen....49
2.2.4 Kultivace rostlin ze semen....50
2.2.5 Kultivace rostlin prýtů *Rosmarinus officinalis*....51
2.2.6 Zakořeňování rostlin....52
2.2.7 Převod do nesterilních podmínek....52
3. Výsledky....54
3.1 Povrchová sterilizace a klíčivost semen....54
3.2 Mikropropagace....56
3.2.1 Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*)....56
3.2.2 Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*)....58
3.2.3 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)....59
3.2.4 Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*)....60
3.2.5 Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*)....61
3.3 Zakořeňování *in vitro*....63
3.4 Převod do nesterilních podmínek....65
4. Didaktická analýza odborného tématu....67
4.1 Zařazení biotechnologií do výuky pro žáky na základní škole....67
4.2 Zařazení biotechnologií do výuky pro studenty na střední škole....68
4.3 Vyhodnocení pracovních listů....68
5. Diskuze....70
5.1 Povrchová sterilizace....70
5.1.1 Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*)....70
5.1.2 Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*)....71
5.1.3 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)....71

5.1.4 Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*) 72
5.1.5 Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*) 73
5.2 Mikropropagace 73
5.2.1 Bazalka posvátná (*Ocimum basalicum*) 73
5.2.2 Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*) 74
5.2.3 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) 75
5.2.4 Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*) 75
5.3 Zakořeňování 76
5.3.1 Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*) 76
5.3.2. Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*) 76
5.3.2 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) 77
5.3.3 Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*) 77
5.4 Převod do *in vivo* podmínek 78
5.5 Zařazení biotechnologií do výuky 78
6. Závěr 79
7. Použitá literatura 80
8. Internetové zdroje 87
9. Přílohy
9.1 Fotografické přílohy
Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*)
Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*)
Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)
Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*)
Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*)
9.2 Didaktické přílohy
9.2.1 Zařazení biotechnologií do výuky pro žáky na základní škole
9.2.2 Zařazení biotechnologií pro studenty na střední škole

Seznam zkratek

B_5	Gamborg
BA	benzyladenin
BAP	6 – benzylaminopurin
2,4 – D	2,4 – dichlorfenoxyoctová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
GA_3	giberelová kyselina
IAA	indolyl – 3 – octová kyselina
IBA	indolyl – 3 – máselná kyselina
IPA	indolyl – 3 – propionová kyselina
2iP	2 – isopentyladenin
KIN	kinetin
LV	Litvay, 1985
MS	Murashige & Skoog, 1962
mT	6 – (3 – hydroxybenzylamino) purin
NAA	α – naftyloctová kyselina
TDZ	thidiazuron
WPM	Lloyd & McCown, 1980
ZEA	zeatin
ZR	zeatin ribosid
KA	kyselina askorbová

Úvod a cíle práce

Léčivé rostliny obsahující biologicky aktivní sloučeniny a esenciální oleje mají velký význam v lidovém léčitelství (Saha a kol., 2010). Řada rostlin vytváří antimikrobiální látky a látka prospěšné pro zvýšení obranyschopnosti těla. Tyto rostlinné antimikrobiální látky pomáhají při boji proti bakteriím, virům, plísním, kvasinkám nebo parazitům (Ritterová, 2018). Práce pojednává o metodě mikropropagace u vybraných léčivých rostlin z čeledi *Fabaceae* a *Lamiaceae*. Metoda mikropropagace má svůj celosvětový význam v rychlém množení a produkci rostlin (Jamal a kol., 2016).

Po metodické stránce bude práce zahrnovat:

1. Shromažďování a studium literárních údajů k zadané problematice.
2. Vypracování tematické kapitoly podle RVP z biologie rostlin.
3. Experimentální část – odvození in vitro kultury, optimalizace mikropropagace u vybraných rostlin.
4. Převod do nesterilních podmínek.
5. Didaktické zpracování tématu na tvorbu materiálů pro učitele a pracovní listy pro žáky/studenty k vybraným celkům (dotazník, anketa…).
6. Sepsání diplomové práce.

1. Literární přehled

1.1 Charakteristika čeledi *Fabaceae*

Název *Fabaceae* má synonymum *Viciaceae* ADANS, český název bobovité (motýlokvěté, luštinaté). Čeleď zahrnuje 730 rodů, 19 400 druhů, jedná se o třetí nejčetnější čeleď na světě. Největší zástupcem je kozinec (*Astragalus* L.), který má víc než 2000 druhů. Dále následuje akácie (*Acacia* MILL) s 900 druhy a indigovník (*Indigofera* L.) se 700 druhy. Zástupci čeledi *Fabaceae* jsou stromy, keře, polokeře. Čeleď *Fabaceae* je rozšířena v tropických až mírných, ojediněle i studených pásech (Hendrych, 1986).

Pro čeleď *Fabaceae* jsou charakteristické hlízky s nitrogenními bakteriemi rodu *Rhizobium*, které fixují vzdušný kyslík. Dalším typickým znakem čeledi je hroznovité květenství. Květní kalich vzniká srůstem pěti lístků, koruna je tvořena pěti korunními lístky – horní pavéza, dvě křídla a dva srůstající v člunek (Pelikán a kol. 2012). Květy jsou obvykle oboupohlavné, heterochlamydní, synsepální a choripetální. Květ má většinou 10 tyčinek, volných nebo srostlých (9 +1). Gyneceum je apokarpní se svrchním semeníkem. Plodem je lusk, struk nebo nažka (Hendrych, 1986). U čeledi *Fabaceae* jsou známy čtyři typy opylovacího mechanismu – klapkový, pružinový, pístový a kartáčový. K opylování dochází převážně včelou medonosnou nebo čmelákem.

Zástupci čeledi slouží jako významné potraviny s obsahem proteinů (fazol, čočka, hrách, sója) nebo krmivo pro hospodářská zvířata (šroty). Pro potravinářské účely se pěstuje lékořice, podzemnice olejná, sója. Vojtěška, jetel, lupina, čičorka nebo janovec slouží jako krmivo pro hospodářská zvířata. Pro okrasné účely jsou pěstovány hrachory, lupiny, čilimník a další. V léčitelství má uplatnění úročník, komonice lékařská, jetel luční, janovec metlatý a jehlice trnitá (Pelikán a kol., 2012).

1.2 Charakteristika čeledi *Lamiaceae*

Čeleď zahrnuje jednoleté i vytrvalé byliny, zčásti polokeře, dřeviny (Chinery, 2002; Jahodář, 2011). Zástupci jsou rozšířeni celosvětově, největší výskyt je ve Středozemí a Přední Asii. Čeleď zahrnuje 220 druhů a 4000 rodů (Jahodář, 2011; Hendrych, 1986).

Zástupci jsou charakterizováni čtyřhrannými lodyhami. Listy obvykle jednoduché, křižmostojné, přeslenité (Hendrych, 1986). Většina zástupců má na listech žlázy obsahující silice. Květy rostou obvykle v přeslenech tvořících klasovitá květenství. Květy mají zpravidla dva pysky, vyklenutý horní a širší spodní pysk (Chinery, 2002). Horní pysk kalichu a dolní pysk koruny jé dvoucípý, dolní pysk kalichu a horní pysk koruny jsou trojcípé (Jahodář, 2011). Květy jsou oboupohlavné, synsepalní a sympetální, často zygomorfní. Květy mají 4 tyčinky, dvoumocné. Gyneceum je synkarpní, semeník je svrchní 4–2 pouzdrý. Plodem je tvrdka (Hendrych, 1986). Zástupci této čeledi obsahují terpenové silice, deriváty kyseliny kávové třísloviny a polyfenoly (Jahodář, 2011).

Řada rostlin z čeledi *Lamiaceae* se pěstuje pro farmaceutické a potravinářské účely. V tradiční medicíně se používá hluchavka bílá (*Lamium alba*) obsahující třísloviny a flavonoidy. Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) s obsahem citralu a citronellalu se doporučuje pro zklidnění organismu. Lékopisné rostliny jsou máta peprná (*Mentha piperita*) obsahující silici s mentholem, šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*) s obsahem thujonu, borneolu a cymolu, levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) obsahující linalol a linalylacetát, dále tymián obecný (*Thymus vulgaris*), rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*) obsahující kyselinu rozmarýnovou, yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*).

Karbinec evropský (*Lycopus europaeus*) je vytrvalá bylina s květním barvivem lykopen. Významnou medonosnou rostlinou je šanta kočičí (*Nepeta cataria*). Majoránka zahradní (*Majorana hortensis*), bazalka pravá (*Ocimum basilicum*) jsou rostliny, které se hojně používají pro potravinářské účely (Jahodář, 2011).

1.3 Charakteristika vybraných rodů z čeledi *Fabaceae*

1.3.1 Rod kozinec (*Astragalus sp.*)

Zařazení rodu *Astragalus* do systému vyšších rostlin (Cronquist, 1988):

říše: *Plantae* (rostliny)
podříše: *Cormobionta* (cévnaté rostliny)
oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny)
třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)
podtřída: *Rosidae*
řád: *Fabales* (bobotvaré)
čeleď: *Fabaceae* (bobovité)
rod: *Astragalus* (kozinec)

Kozinec blanitý *(Astragalus membranaceus)*

Název je odvozen z řeckého *Astragalos* v překladu hrací kostka. Pravděpodobně kvůli podobnosti semen s tmavými skvrnami a hrací kostkou (Spohnová a Golte – Bechtleová, 2010).

Kozinec blanitý je rozšířen v severní a severozápadní Číně, Japonsku, jižním Mongolsku a Zabajkalí. Kozinec roste v údolích řek, písečných přesypech, dubových lesích, keřovitých porostech a na úbočí horských svahů. Rod kozinec má 1800 druhů, v České republice roste 15 druhů - např. kozinec sladkolistý, kozinec cizrnovitý, kozinec bezlodyšný, kozinec dánský (Valíček, 2014).

Tato víceletá rostlina z čeledi bobovité (*Fabaceae)* má 50–150 cm dlouhý a žlutohnědý kořen. Stonek je přibližně 1 m vysoký, hranatý. Rostlina má blanité zašpičatělé palisty, listy lichozpeřené s 8 až 12 jařmy a lístky celokrajné a hrotité. Květy jsou po 1 až 15 květech v hroznech (Valíček, 2014). Kozinec blanitý má bílé květy (Obr. 1), které kvetou v létě (Jablonský a Bajer, 2007). Kalich je při bázi ztlustlý, trubkovitý a nepravidelně zubatý. Plodem je pukavý kožovitý lusk, který je až 6 cm dlouhý s kožovitou přihrádkou. Lusk obsahuje 12 černých ledvinovitých semen (Valíček, 2014).

Kozinec blanitý obsahuje triterpenoidní saponiny, astragalosidy a jejich acetylové deriváty, agroastragalosidy, astramembraniny, isoflavony včetně formononetinu a kumatakeninu a astrogaloglukany (Heinrich a kol. 2012).

Kořen (Astragali radix) obsahuje polysacharidy astragalany I, II, saponiny astragalosidy I-VIII, isoastragalosid I-II, soyasaponin I. Dále obsahuje β-sitosterol, calycosin, focmononetin, glukany, nenasycené mastné kyseliny, falvonoidy, betain, aminokyseliny a slizy (Valíček, 2014). V 1994 Hirotani a kol. izolovali agroastraglosid I, acetylastragalosid I, astraglosid I, astragalosid IV z hairy roots kultur kozince blanitého.

Kozinec blanitý je používán v čínské medicíně jako Huang qi. Z pohledu tradiční čínské medicíny má rostlina mírně teplou, sladkou chuť a váže se k dráze sleziny a plic. Syrový kořen posiluje čchi, krev, plíce, slezinu, zastavuje pocení, odvádí vodu, odstraňuje toxiny, urychluje hojení ran. Řada klinických studií, podporovaných údaji od více než 1000 pacientů v Číně, potvrzuje použití kozince jako imunostimulantu pro použití při nachlazení a infekcích horních cest dýchacích. Takzvaný Žlutý císař zařadil kozinec blanitý mezi nejvýznamnější druhy, využíval se jako lék na bolesti, hnis a hemeroidy a dětské nemoci. V Číně se používá pro zvýšení imunity, a to převážně u mladých lidí a také jako podpůrná léčba rakoviny. Kořen Astragalu se využívá jako obecné tonikum, jeho datace se pohybuje v období legendárního čínského císaře Shen – Nonga (Heinrich a kol., 2012; Valíček, 2014).

Kozinec snižuje riziko nachlazení, urychluje léčení virových a bakteriálních onemocnění, jeho účinek se zvyšuje za přítomnosti zinku, vitamínu A a vitamínu C (Mindell a Mundisová, 2010). Kozinec blanitý má rovněž antioxidační, hepatoprotektivní a antivirovou aktivitu. Používá se také ke zlepšení kardiovaskulárních funkcí (Heinrich a kol., 2012). Kozinec blanitý má adaptogenní, antibakteriálním protirakovinné a močopudné účinky. Dále inhibuje sekreci žaludečních kyselin, redukuje žaludeční kyselost a pomáhá léčit žaludeční vředy. Droga snižuje hladinu cukru v krvi, krevní tlak. Zvyšuje životní energii, stimuluje vznik protilátek, podporuje tvorbu bílých krvinek a produkci interferonů a tím zvyšuje odolnost proti virům. Také je lékem, který snižuje horečku a působí při vyčerpanosti, kardiotonicky a pomáhá při srdečním selháním vzniklým z vyčerpání (Jablonský a Bajer, 2007).

Yu a kol. v roce 2018 uvádí, že alkoholový roztok polysacharidů (arabinosa, galaktosa, glukosa, manosa) získaný z kozince blanitého zvyšuje schopnost imunity se bránit proti nádorovým buňkám. Yang a kol. (2013) ve studii o protinádorové aktivity polysacharidů získaných z kozince blanitého na H22 – karcinom jater u myší uvádí, že podporují funkci imunity. Liu a kol. (2017) popisuje protinádorovou aktivitu polysacharidů z kozince blanitého. Dále popisuje schopnost zvýšit makrofágovou pinocytózu a počet T lymfocytů při užití polysacharidového vodného extraktu. Také posiluje látkovou výměnu,

dýchání, obranyschopnost organismu, zahřívá svaly a končetiny. Syrový kořen se používá při nočním pocení, u bloků z krevní stáze, otocích, při vředech. Pražený kořen se dále indikuje při únavě, průjmech z prázdnoty sleziny, vyhřeznutí konečníku, dělohy, krvácení z dělohy. Kozinec blanitý posiluje imunitu, zvyšuje fyzickou odolnost a působí protivirově. Rozšiřuje cévy, zlepšuje prokrvení kůže, zrychluje krevní oběh, posiluje srdeční svalovinu. Také je močopudný, ulevuje při zadržování tekutin, pomáhá při léčbě zánětů ledvin, odstraňuje bílkovinu z moči a má výrazné antibiotické účinky.

Výzkumy prokazují, že kozinec blanitý má mimořádně léčivé schopnosti, je výrazným antioxidantem a imunostimulátorem, zvyšuje odolnost a vitalitu organismu. Působí blahodárně pro jaterní buňky před toxickými vlivy. Kozinec blanitý je modifikátorem biologické odpovědi, tedy zvyšuje činnost kůry nadledvinek, makrofágů, T-lymfocytů, červených krvinek, interferonu a imunoglobinů. Dále se využívá po chemoterapii, radioterapii, u pacientů majících AIDS, protože aktivuje kostní dřeň a prodlužuje období reprodukce zdravých buněk. Nedoporučuje se při stagnaci potravy, poškození kůže a syndromech plnosti. Také není vhodné jej užívat společně s šácholanem čínským (*Magnolia officinali*) a slivoní mume (*Prunus mume*), (Valíček, 2014).

Jedná se o rostlinu mírného pásma, léčivku, která působí estetickým dojmem i v zahradě. Kozinec blanitý potřebuje dobře propustné, písčité, mírně alkalické půdy a slunné místo. Rostlina snese teploty až –15 ˚C. Před výsevem do studeného pařeniště, je vhodné semena stratifikovat namočením do horké vody 24 hodin před výsevem tak, aby se nepoškodilo embryo v semeni nebo semena před výsevem mechanicky obrousit mezi dvěma smirkovými papíry. Klíčení trvá 4–9 týdnů při 13 ˚C. Obvykle po 12 týdnech se semenáčky vysadí do květináčů a pěstují se ve skleníku. Do volné půdy se mladé rostliny vysazují pozdě na jaře nebo v časném létě. Kozinec špatně snáší poškození kořene (Jablonský a Bajer, 2007).

Obr. 1: Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*) [1]

Kozinec slizodárný (*Astragalus gummifer*)

Jedná se o rostlinu rostoucí v malé Asii. Kozinec slizodárný je trnitý, trsnatý keř se sudozpeřenými listy a drobnými fialovými květy.

Tento kozinec stejně jako *A. verus, A. microcephalus* je zdrojem lékopisné suroviny – slizu (Tragacantha), který je používán jako pomocná látka při výrobě léčivých přípravků nebo v terapii. Sliz vytékající z poraněných pletiv kůry spolu se škrobem na vzduchu tuhne (Jahodář, 2011).

Kozinec sladkolistý (*Astragalus glycyphyllos*)

Kozinec sladkolistý má poléhavý stonek, listy jsou střídavé a lichozpeřené. Rostlina dorůstá velikosti 50–150 cm. Žlutozelené motýlovité květy o velikosti přibližně 1,5 cm vyrůstají z paždí listů, kalich je lysý, 8–30 květů vytváří hroznovité květenství (Obr. 2). Plodem je lusk, 3–4 cm dlouhý a 0,5 cm tlustý.

Rostlina roste na okraji lesů, lesních cestách, svazích u cest po celé Evropě, preferuje slunné a polostinné stanoviště, půdy bohaté na živiny a báze (Spohnová a Golte – Bechtleová, 2010).

Kozinec sladkolistý jako droga se používá nať a kořen Rostlina obsahuje z chemických látek alkaloidy, aminokyseliny (asparagin), flavonoidy (campherol, quercetin), glykosidy, fytosteroly, kaučuk, kyseliny (glutamová, linoleová, linolenová, listová), minerální látky (Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn), mastné oleje, proteiny,

pryskyřice, sacharidy (Hemzal, 2015). Obsahuje také saponin glycyrrhizin, který dává kozinci sladkou chuť (Spohnová a Golte – Bechtleová, 2010).

Kozinec sladkolistý působí jako adaptogen, antihypertenzivum, antipyretikum. Dále má diuretické, hypoglykemické, karcinostatické a sedativní účinky. Tento kozinec se indikuje při urologických potížích, chorobách plic, psychických, neurovegetativních problémech, otocích, únavovém syndromu, gynekologických a sexuálních chorobách. Větší obsah účinný látek má kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*), (Hemzal, 2015).

Obr. 2: Kozinec sladkolistý (*Astragalus gummifer*) [2]

1.4 Charakteristika vybraných rodů z čeledi *Lamiaceae*

1.4.1 Rod bazalka (*Ocimum sp.*)

Zařazení rodu *Ocimum* do systému vyšších rostlin (Cronquist, 1988):

říše: *Plantae* (rostliny)
podříše: *Cormobionta* (cévnaté rostliny)
oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny)
třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)
podtřída: *Asteridae*
řád: *Lamiales* (hluchavkotvaré)
čeleď: *Lamiaceae* (hluchavkovité)
rod: *Ocimum* (bazalka)

Bazalka pravá (*Ocimum basilicum*)

Bazalka pravá je původní v Přední Indii, v Evropě se pěstuje v Německu, Itálii a Polsku (Traxl, 1992). Pro produkci se bazalka se pěstuje ve Francii, Španělsku a Bulharsku (Jirásek, 1989). Pojmenování pochází z řeckého *basileus* – král, Řekové pokládali bazalku za velmi významnou rostlinu. Od 16. století jsou dochovány zmínky o bazalce v Británii a odtud byla rozšířena osadníky do Ameriky a Austrálie (Hurstová, 2019).

Bazalka pravá je 30–70 cm vysoká rostlina. Listy jsou vstřícné, vejčité až kosníkovité s krátkým řapíkem (Obr. 3). Okraj může být celokrajný až vroubkovaný. Květy po 6 květech v lichopřeslenech tvoří složený klas. Kalich je pyskatý.

Koruna 10–15 mm dlouhá, bílá, krátce trubkovitá s 4laločnatým horním pyskem. Květ je oboupohlavný, kalich může být zelený nebo fialový, koruna bílá, žlutá, růžová, červená až fialová. Plodem je černohnědá tvrdka (Podlech, 1997; Traxl, 1992; Valíček, 2005).

Bazalka obsahuje silici, taniny a bazalkový kafr (Ody, 2004). Silice bazalky může obsahovat podle původu různé složky – linalool, metylchavikol, kafr, d-pinen, cineol a eugenol (Jirásek, 1989).

Bazalka pravá je původem z Indie. Léčivých účinků této bazalky se využívá v homeopatii, při nadýmání a zažívacích problémech (Podlech, 1997). Doporučuje se užívání při chronickém žaludečním kataru a při spastické zácpě (Korbelář a Endris,

1990). Rostlina působí jako antidepresivum, tonikum. Bazalka pravá má antiseptické účinky.

Dále pomáhá snížit hořečku, vykašlávat a zabraňuje zvracení (Ody, 2004). Rostlina také léčí nachlazení a chřipku. Kloktadlo pomáhá na záněty hltanu a dásní, vředy v ústech. Bazalka pravá přináší úlevu při bolestech hlavy a migrénách (Hurstová, 2019). Zkvalitňuje spánek a pomáhá zabít některé parazity. Listy bazalky urychlují hojení drobných poranění, zmírňují svědění po hmyzím kousnutí. Koupel ve směsi bazalkové šťávy a medu se doporučuje při kožních onemocněních (Streisand a Mars, 2017). Bazalka pravá mírní průduškové astma, léčí kožní záněty. Éterický olej z bazalky vonné má protizánětlivé účinky. Ve vyšších dávkách může bazalka vyvolat nevolnost (Gato, 2013).

Bazalka pravá má velké využití v potravinářství. Používá se jako koření do polévek, omáček, salátů, pest a různých past. Doporučuje se bazalku používat čerstvou, tepelně zpracovávat co nejkratší dobu.

Obr. 3: Bazalka pravá (*Ocimum basilicum*) [3]

Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*)

Původem zřejmě z Indie, kde se nazývá *tulasi* nebo *tulsi*, z hindštiny nejlepší rostlina. Další názvy jsou například „nejlepší šťáva“ nebo „ničitel bolesti“. Bazalka posvátná se pěstuje v Arábii, Indii, od Indonésie až k Polynésii. V Indii je bazalka posvátná považována za léčivou a kultovní rostlinu s náboženským významem (Valíček, 2005).

Bazalka posvátná má 30–100 cm vzpřímenou a bohatě větvenou chlupatou lodyhu. Jedná se o jednoletou bylinu, v tropech může být i víceletá. Listy mají eliptický až vejčitý tvar s pilovitým okrajem (Obr. 4). Koruna je zbarvena do fialova, kalich je chlupatý. Plodem je vejčitá tvrdka. V Indii jsou rozšířeny dvě variety bazalky posvátné, zelená Ráma tulasi a fialová Kršna tulasi (Valíček, 2005).

Silice bazalky posvátné obsahuje eugenol, metyleugenol, karvakrolu a citralu. Dále v menším množství obsahuje metylchavikol, linalool a chavibetol (Valíček, 2005). Olej z bazalky posvátné obsahuje ethyl isovalerát, α – pinen, sabinen, β – pinen, myrcen, 1,8 – cineol, linalool a estragol (Saharkhiz a kol., 2015). Další obsahové složky jsou karvakrol, β – karyofyllen, nerol, kyselina ursolová a oleanolová, flavonoidy, alkaloidy a mastné kyseliny (Navrátilová a Patočka, 2015).

Bazalka posvátná je hojně využívána v ajurvédské medicíně pro léčení řady zdravotních problémů, harmonizaci procesů v těle a k prodloužení života. Bazalka posvátná pomáhá od bolesti, užívá se při rakovině, cukrovce, onemocněních srdce a jater, kožních problémech. Éterický olej z bazalky posvátné má protizánětlivé a antioxidační účinky (Simmonds a kol., 2018).

Obr. 4: Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*) [4]

1.4.2 Rod levadule (*Lavandula sp.*)

Zařazení rodu *Lavandula* do systému vyšších rostlin (Cronquist, 1988):

říše: *Plantae* (rostliny)
podříše: *Cormobionta* (cévnaté rostliny)
oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny)
třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)
podtřída: *Asteridae*
řád: *Lamiales* (hluchavkotvaré)
čeleď: *Lamiaceae* (hluchavkovité)
rod: *Lavandula* (levandule)

Levadule lékařská (*Lavandula angustifolia*)

Název levandule pochází z latiny, *lavare* znamená umýt a vyprat. Římané používali levanduli do svých koupelí a zavezli levanduli do Británie. Pro parfumérský průmysl se pěstuje levandule ve Francii, hlavně oblast Provence je známa levandulovými poli (Hurstová, 2019). Levandule roste ve Středomoří, Přímořských Alpách a jižní Evropě (Jirásek, 1989). Dále se levandule pěstuje v Německu a Bulharsku (Traxl, 1992).

Levandule roste ve výšce 800 až 1800 m. n. m. (Bühring, 2010). Tato rostlina má hustě větvený polokeř, který je 20 až 60 cm vysoký. Levandule lékařská má vstřícné a úzké listy, přibližně 8krát delší než širší (Podlech, 1997). Listy jsou přisedlé, čárkovité, 2,5–5 cm (Korbelář a Endris, 1990). Listy mají podvinuté okraje a tím snižují plochu, ze které se odpařuje voda (Bühring, 2010). Tento polokeř má čtyřhranné přímé a nevětvené větve (Traxl, 1992). Květenství je tvořeno úzkým lichoklasem z 3–8 lichopřeslenů, které jsou tvořeny 6–10 květů v paždí blanitým, kosníkovitých listenů. Květy jsou oboupohlavné a souměrné. Kalich je trubkovitý, pětizubý se žláznatými chlupy. Koruna je dvoupyská, zbarvena do fialova (Obr. 5). Tyčinky jsou dvoumocné, semeník je svrchní. Plodem jsou 4 tvrdky (Jirásek a kol., 1989).

Silice levandule obsahuje linalylacetát, terpineol, borneol, cineol a geraniol (Jirásek, 1989). Éterický olej levandule obsahuje také ocimem, pinen, kamfen, citral, skořicový aldehyd, bisabolen a karyofylen (Bühring, 2010).

Levandulový olej zahrnuje terpine-4-ol, anthanilát a minerály (Mn, Cu, Ca, Mg, Zn, Fe, Na), (Adaszynska a kol., 2011, Brown SA, 1962). Levandule dále obsahuje taniny, kumariny, flavonoidy, třísloviny a hořčiny (Gato, 2003).

Levandule lékařská se používá v lékařství pro své uklidňující účinky na centrální nervový systém, při migrénách, vyčerpanosti, dále při srdečních potížích nervového původu (Podlech, 1997). Květy levandule se užívají při neklidu, problémech se spaním (Bohne, 2011). Ve Francii se zavěšuje levandule pro uklidnění kojenců nad jejich postel. Levandule pomáhá zvládat stres a snižuje krevní tlak (Bühring, 2010). Dále se levandule doporučuje při nervovém vyčerpání, depresi a na zklidnění nervové soustavy. Levandule zmírňuje křeče trávicího ústrojí, pomáhá při střevních a zažívacích potížích (Gato, 2003). Levandule zmírňuje nechutenství, koliky, křeče, nadýmání. Dále zklidňuje dráždivý žaludek a střevo (Bühring, 2010). Protizánětlivých účinků se využívá při mytí ran, ekzémů a po bodnutí hmyzem (Gato, 2003). Díky svým antiseptickým účinkům se levandule doporučuje k léčbě oparů (Ody, 2004). Levandule bývá obsažena v mastech pro špatně hojící se rány, používaných při dně, revmatismu nebo zánětech nervu. Silice se přidává do mazání proti svědění. Při dávce vyšší než 1g může silice z levandule vyvolat omámení (Korbelář a Endris, 1990). Levandule se v Arabské medicíně doporučuje jako expektorans a antispasmodikum (Ody, 2004). Květy levandule zlepšují schopnost soustředit se (Bühring, 2010).

Obr. 5: Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) [5]

Levandule je typická příjemnou vůní (Korbelář a Endris, 1990). Silice levandule se využívají v kosmetickém průmyslu jako přísada do voňavek (Podlech, 1997). Dále se v kosmetickém průmyslu z levandule vyrábějí mýdla, pleťové vody nebo přísady do

koupele (Gato, 2003). Éterický olej z levandule je vhodný pro léčbu popálenin, aplikace oleje na ránu přináší úlevu od bolesti, nedochází k tvorbě puchýřů a zrychlí se tvorba nových buněk pokožky. Olej tiší svědění kůže a prokrvuje tkáně, proto se používá při dně a revmatu. Dále se inhaluje při zánětech průdušek anebo aplikuje na kůži proti chřipkové infekci (Bühring, 2010). Levandulový olej se také používá v aromaterapii, ale při vnitřním užití je jedovatý a neředěný může na kůži vyvolat podráždění. Levandule pomáhá proti vším a jiným zvířecím parazitům (Streisand a Mars, 2017), také se používá proti molům a jako náplň do vonných polštářků (Bohne, 2011).

1.4.3 Rod rozmarýn (*Rosmarinus sp.*)

Zařazení rodu *Rosmarinus* do systému vyšších rostlin (Cronquist, 1988):

říše: *Plantae* (rostliny)
podříše: *Cormobionta* (cévnaté rostliny)
oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny)
třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)
podtřída: *Asteridae*
řád: *Lamiales* (hluchavkotvaré)
čeleď: *Lamiaceae* (hluchavkovité)
rod: *Rosmarinus* (rozmarýn)

Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*)

Název je odvozen z latinského *marnus* – rosa z moře, pojmenování souvisí s přirozeným stanovištěm na mořském pobřeží. Rostlina je původem ze Středomoří a byla rozšířena do celé Evropy benediktýnskými mnichy (Hurstová, 2019). Od 8. století je na příkaz Karla Velikého pěstována v klášterech (Bühring, 2010). Rozmarýn lékařský roste planě v Portugalsku, ve Středomoří a na části severní Afriky. Od 9. století je rozmarýn pěstován na polích v Anglii (Jirásek a kol., 1989).

Jedná se o stálezelenou aromatickou rostlinu dorůstající výšky 50–150 cm. Stonky jsou přímé a bohatě větvené s šedou borkou. Křižmostojné listy mají krátký řapík, čárkovitou a kožovitou čepel s podvinutými okraji (Obr. 6). Květenství vytváří lichoklasy složené z lichopřeslenů z 5–10 květů. Souměrné květy mohou být oboupohlavné nebo pouze samičí. Dvoupyský kalich má tvar zvonku, koruna je také dvoupyská přibližně dvakrát delší s velmi vykrojeným horním pyskem. Koruna bývá zbarvena modrofialově,

ojediněle pak růžově nebo bíle. Květ obsahuje 2 tyčinky a svrchní semeník ze 2 plodolistů. Plodem jsou hladké tvrdky (Jirásek a kol., 1989).

Z byliny se užívají listy, které mají charakteristickou kafrovitou vůni, kořennou a nahořklou chuť. Listy se zpracovávají v potravinářství, pro parfumérský průmysl se využívá kvetoucí nať, část produkce je určena farmaceutickému průmyslu. V droze rozmarýny je obsaženo1,5 – 2,5 % silice s cineolem, poté borneolem, bornylacetátem, kafrem, kamfenem, limonenem, flavonové glykosidy, hořčiny a kyselinu rozmarýnou (0,2 – 0,3 %), (Jirásek a kol., 1989).

Rozmarýn lékařský omezuje účinky volných radikálů a chrání buňky před poškozením (Ortemberg, 2003). Rostlina má hřejivé a povzbuzující, dezinfekční účinky, užívá se při nachlazení a revmatických potížích a zánětu sedacího nervu. Rozmarýn lékařský dále posiluje krevní oběh, zvyšuje krevní tlak, působí pozitivně na zažívání, podporuje vylučování žluči a tlumí křeče. Rozmarýn by neměly užívat těhotné, kojící ženy a lidé s poruchami ledvin z důvodu vysokého obsahu hořčin a silicí. (Gato, 2013). Také se nedoporučuje u pacientů s vysokým tlakem, epilepsií nebo záchvaty (Hurstová, 2019). Olej z rozmarýnu není vhodné užívat vnitřně, ale jen pod lékařským dohledem (Streisand a Mars, 2017). Éterický olej z rozmarýnu se doporučuje pro zahřátí svalů před sportem (Alberts a kol., 2006). Z éterického oleje se vyrábí masážní směs pro léčbu artritidy a dále se tento olej používá pro posílení vlasů. Éterický olej působí jako analgetikum, antirevmatikum a stimulans. Nať rozmarýny uklidňuje nervovou soustavu, působí jako antidepresivum a karminativum, zvyšuje pocení. Vhodné použití nati je při vyčerpání a oslabení organismu, nachlazení i bolesti hlavy (Ody, 2004). V přírodním léčení se užívají sušené listy po infekčních chorobách (Podlech, 1997). Rozmarýn zvyšuje prokrvení koronárních cév a okrajových částí těla. Vhodné je užívání rozmarýnu při napětí a nadměrném stresu (Bühring, 2010).

Rostlina pomáhá při posílení paměti, zrychluje smysly a pozitivně ovlivňuje duševní bystrost (Hurstová, 2019). Přivonění k oleji z rozmarýnu může zlepšit mentální výkon – zlepšení dlouhodobé paměti, prospektivní paměti a duševní aritmetiky (Simmonds a kol., 2018). Pro prokrvení kůže a lepší hojení ran se doporučují koupele s rozmarýnem (Korbělář a Endris, 1990).

Rozmarýn lékařský má dezinfekční, posilující a aromatické vlastnosti. V kosmetickém průmyslu se z rozmarýnu prodávají voňavky, mýdla a vlasové vody (Gato, 2013). V potravinářství se rozmarýa užívá jako koření, které se přidává do středomořských pokrmů – maso, ryby, polévky. Z květů rozmarýnu se vyrábí rozmarýnový cukr

a rozmarýn se zpracovává i v likérnickém průmyslu (Bohne a kol., 2011). Rostlina používá i v aromaterapii a aromabalneoterapii (Valíček, 2005).

Obr. 6: Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis***)** [6]

1.4.4 Rod yzop (*Hyssopus sp.*)

Zařazení rodu *Hyssopus* do systému vyšších rostlin (Cronquist, 1988):

říše: *Plantae* (rostliny)
podříše: *Cormobionta* (cévnaté rostliny)
oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny)
třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)
podtřída: *Asteridae*
řád: *Lamiales* (hluchavkotvaré)
čeleď: *Lamiaceae* (hluchavkovité)
rod: *Hyssopus* (yzop)

Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*)

Název je odvozen z řeckého *azob* = svatá rostlina (Ody, 2004). Yzop lékařský roste zejména na slunných a chráněných místech. Nejvhodnější jsou lehké půdy s dostatkem vápna. Bylina je původem z jižní Evropy, v oblasti Středozemního moře roste planě. Yzop se dále pěstuje v Německu, Itálii, Maďarsku a v České republice (Traxl, 1992). Yzop lékařský preferuje slunné a suché kamenité a skalnatí vápencové stráně a skalní stepi. (Podlech, 1997).

Yzop lékařský je velmi aromatický plazivý polokeř, který má 1, 5 m dlouhý stonek. Listy jsou vstřícné, kopinaté a přisedají na stonek. Yzop lékařský má velmi krátce stopkaté květy, které jsou v lichopřeslenech vytvářející lichoklas. Kalich je trubkovitý. Koruna je dlouhá 8–12 mm v dolní části srůstá v rource. Horní pysk krátký, dolní pysk je 2krát delší. Čnělka a dvoumocné tyčinky vyčnívají z koruny (Podlech, 1997). Kalich je fialový a koruna fialovomodrá, ojediněle růžová nebo žlutavě bílá (Obr. 7). Semeník je svrchní tvořený ze dvou plodolistů, plodem jsou čtyři čtyřstěnné tvrdky. Listy jsou vstřícné, přisedlé s čárkovitou čepelí, která obsahuje siličných žlázek (Jirásek a Starý, 1989). Kvete od července do září a plodem je tříhranná nažka (Traxl, 1992).

Hlavní silicí obsaženou v yzopu lékařském je 1-pinokafén. Z flavonoidů se jedná zejména o hesperidin, glykosid diosmin. Dalšími obsahovými látkami jsou třísloviny (Traxl, 1992). Silice zahrnuje pinen a seskviterpeny, hořčin marubiin, triterpenické kyseliny a alkaloidy (Jirásek a Starý, 1989).

Drogou je nať, která se sbírá na začátku kvetení, za dobu vegetace lze získat dvě sklizně. Droga by neměla obsahovat dolní zdřevnatělé části lodyh a je třeba, aby si zachovala původní barvu listů i květů. Yzop lékařský voní po kafru a má hořkou chuť a pěstuje se hlavně pro koření. Z čerstvé natě se získává silice, která se používá do kořeněných esencí (Jirásek a Starý, 1989). Yzop lékařský se zpracovává v potravinářském průmyslu, v likérnictví, průmyslu vonných látek a součást kosmetických přípravků. Ve farmaceutickém průmyslu se silice využívá jako součást léčivých přípravků. (Jirásek a Starý, 1989).

Yzop lékařský byl Hippokratem předepisován na zánět pohrudnice. Dioscorides jej používal jako drogu pro léčbu astmatu a kataru (Ody, 2004). Yzop lékařský se objevil ve střední Evropě až v raném středověku, přibližně v 9. století zásluhou benediktýnů. Nejprve se pěstoval v klášterních zahradách, později se rozšířil do selských zahrádek a na venkov, dále se pěstoval jako důležitá medonosná rostlina (Jirásek a Starý, 1989).

Jedná se o bylinu s hořkou chutí a mírně zahřívajícími účinky. Yzop lékařský působí protizánětlivě, antivirově. Současně podporuje uvolnění periferních cév, pocení. Nať yzopu lékařské se podává jako expektorans při bronchitidě, hrudních nachlazeních, astmatu a chřipce. Květy se dříve tradičně používaly do sirupů proti kašli. Dále se nať používá pro zmírnění nadýmání a křečovité bolesti. Éterický olej z yzopu působí jako příznivé a mírně uklidňující nervové tonikum. Tento olej je vhodný při nervovém vyčerpání, úzkostech, depresích, mírnění pocitů žalu a viny (Ody, 2004). Yzop se doporučuje jako kloktadlo nebo jako dezinfekční prokrvující přísada do koupelí (Jirásek

a Starý, 1989). Ústní voda z yzopu pomáhá při zánětu hltanu, infekci dásní a zubů. Listy yzopu lékařského uklidňují zažívací problémy, mírní zánět sliznic a snižují horečku (Hurstová, 2019). V minulosti se yzop doporučoval k léčbě nevolnosti, ztuhlých kloubů, zánětů středního ucha, zabití vší a vypuzení parazitů z těla. Uvádí se, že vůně yzopu lékařského měla chránit před morem a kouřem se léčila i nemocná drůbež (Streisand a Mars, 2017). Yzop lékařský mírní bolesti při menstruaci, ulevuje při popáleninách a po hmyzím bodnutí. Yzop je vhodný pro děti, staré lidi, těhotné i kojící ženy (Gato, 2013), ale pro vysoký obsah jódu není doporučen k užívání pro lidi s problémy se štítnou žlázou nebo srdcem (Hurstová, 2019).

Yzop lékařský je vhodný jako koření do masových, rybích pokrmů i do polévek. Rostlina slouží jako hojný zdroj potravy pro včely (Bohne a kol., 2011).

Obr. 7: Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*) [7]

1.5 Rostlinné biotechnologie

V tabulkách 1–5 jsou uvedeny složení kultivačních médií, zmnožení u mikropropagace jednotlivých vybraných rodů z čeledi *Fabaceae* a *Lamiaceae* z vybraných citací.

1.5.1 Explantátové kultury u rodu bazalka (*Ocimum sp.*)

Mikropropagace slouží jako efektivní metoda k rychlému namnožení rostlinného materiálu. Rod bazalka (*Ocimum*) zejména bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*) je využívána k léčebným účelům v bylinné medicíně, a proto je žádoucí odvodit správný postup *in vitro* regenerace. Pro kultivaci explantátů u rodu bazalka (*Ocimum*) se nejčastěji používá Murashige a Skoog médium, 1962 například u Jamal a kol., 2016; Saha a kol., 2010; Dode a kol., 2010; Singh a Segal, 1999; Köszeghi a kol., 2014; Khan a Saeed, 2012; Manan a kol., 2016; Verma a kol, 2016; Banu a Bari, 2007; Siddique a Anis, 2007. Jako explantáty byly nejčastěji zvoleny semena (Dode a kol, 2003; Köszeghi a kol., 2014; Verma a kol., 2016), nodální segmenty (Jamal a kol., 2016; Saha a kol., 2010; Khan a Saeed, 2012), vzrostné vrcholy (Jamal a kol., 2016; Banu a Bari, 2007; Siddique a Anis, 2007) nebo dále listové čepele (Banu a Bari, 2007) a květenství (Singh a Segal, 1999), prýty (Manan a kol., 2016).

Pro povrchovou sterilizaci explantátů se používá roztok $HgCl_2$ (Jamal a kol., 2016; Saha a kol., 2010, Singh a Segal, 1999; Banu a Bari, 2007; Siddique a Anis, 2007), chlornan sodný (Dode a kol., 2003; Köszeghi a kol, 2014), 70% ethanol (Dode a kol., 2003; Mana a kol., 2016; Saha a kol., 2010), dále také dezinfekční přípravek Domestos (Verma a kol., 2016) nebo Clorox (Manan a kol., 2016).

Metodu mikropropagaci u bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) prováděli v roce 2016 Jamal a kol. Pro iniciaci prýtů použili růstové regulátory BAP o různých koncentracích (0,5, 1, 2, 3 4 mg/l) nebo BAP v kombinaci s NAA, IAA, 2,4 – D (0,1 a 0,5 mg/l). Nejvyššího počtu prýtů na explantát bylo dosaženo na médiu s 2,0 mg/l BAP v kombinaci s 0,5 mg/l NAA (Tabulka 1). Pro zakořenění bylo použito ½ MS s NAA a IAA o různých koncentracích. Nejdelší kořeny byly docíleny na MS médiu s obsahem 1,0 mg/l NAA.

V roce 1999 Singh a Segal zkoumali přímou a nepřímou regeneraci u bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*). Tvorba kalusů proběhla na médiích s obsahem 2,4 – D a TDZ, přímá regenerace na médiu s obsahem BAP. Se zvyšující koncentrací BAP se

snižovalo zmnožení prýtů. Po 6 týdnech kultivace bylo dosaženo nejvyššího zmnožení prýtů na MS médiu s obsahem 0,05 mg/l IAA a 1,0 mg/l BAP. Pro zakořenění bylo zvoleno MS médium bez růstových regulátorů, 92 % prýtů tvořilo kořeny.

In vitro regeneraci bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) prováděli v roce 2007 Banu a Bari. Vzrostné vrcholy segmentovali na 0,7 – 1,0 cm velké kousky a umístili je na MS médium pro tvorbu prýtů s obsahem BAP, KIN o různých koncentracích nebo v kombinaci s NAA. Listové explantáty o velikosti 1 cm byly umístěny na médium s různými koncentracemi 2,4 – D a NAA. Největšího zmnožení prýtů na explantát bylo docíleno na médiu s 0,2 mg/l BAP (5,88 prýtů na explantát). Tvorba kalusu byla nejvyšší na médiu s obsahem 1,0 mg/l NAA. Kořenění bylo nejvyšší na MS médiu s 0,1 mg/l NAA.

Vhodnou metodu mikropropagace u bazalky pravé (*Ocimum basalicum*) zkoumali také Saha a kol. v roce 2010. Explantáty byly umístěny na médium s růstovými regulátory BAP (0,25 – 2,0 mg/l) a KIN (0,25 – 2,0 mg/l). Nejvyššího počtu prýtů na explantát bylo dosaženo na médium s obsahem 0,5 mg/l BAP. Pro kořenění bylo zvoleno ½ MS nebo MS s obsahem NAA (0,25 – 2,0 mg/l) nebo IBA (0,25 – 2,0 mg/l). Pro zakořenění bylo nejvhodnější ½ MS s obsahem 1,0 mg/l NAA (4,6 kořene na explantát).

Dode a kol. (2003) hledali vhodný postup mikropropagace u bazalky pravé (*Ocimum basalicum*). Děložní lístky kultivovali na médiu s různým obsahem růstových regulátorů. V experimentech byla použita kombinace BAP (0,1, 2, 3, 4 a 5 mg/l) a NAA (0,2 mg/l). Prýty o velikosti 1,5 cm byly pasážovány na ½ MS s růstovými regulátory. Po 6–7 týdnech bylo nejvyšší zmnožení prýtů na explantát (3,46 prýtů na explantát) na médiu s obsahem 0,2 mg/l NAA a 5 mg/l BAP (Tabulka 1). Pro zakořenění bylo vhodné MS médium bez přídavku růstových regulátorů.

Vliv cytokininů na mikropropagaci bazalky pravé (*Ocimum basalicum*) sledovali Köszeghi a kol. v roce 2014. Rostliny kultivovaly na médiu s obsahem BAP a mT o různých koncentracích. V druhé fázi experimentu byly rostliny pasážovány na médium s různým obsahem BAP a mT pro namnožení prýtů a kořenění. Použití mT ovlivnilo vyšší zmnožení, délku a kvalitu prýtů ve srovnání s použitím BAP. Z výsledků vyplývá, že optimální je použití 1mg/l BAP nebo 0,5 mg/l mT. Nejvyššího zmnožení bylo dosaženo na MS médiu s obsahem 0,5 g/l mT (6,2 prýtů na explantát).

Metodu mikropropagace u bazalky pravé (*Ocimum basalicum*) popsali v roce 2016 Manan a kol. U odvozených *in vitro* rostlin zkoumali morfologii listů, květů a obsah esenciálního oleje. Explantáty byly kultivovány na médiu s různým obsahem růstových regulátorů: BAP, GA_3, nebo kombinace BAP a NAA, GA_3 a NAA. Nejlepším médium

bylo MS médium s obsahem 1,0 mg/l BAP, kdy 100 % prýtů prorůstalo (5,00 ± 0,28 prýtů na explantát). Se zvyšující koncentrací BAP se snižovalo zmnožení prýtů. Stejný účinek měla kombinace BAP a NAA. Použití GA_3 vyvolalo prodloužení prýtů, ovšem zmnožení bylo pouze 2 prýty na explantát. *In vitro* získané rostliny se lišily v morfologii trichomů, květů, nižším obsahu esenciálního oleje oproti *in vivo* pěstovaným rostlinám. Po aklimatizaci rostlin v *in vivo* podmínkách byla morfologie a obsah esenciálního oleje podobný jako u *in vivo* pěstovaných rostlin.

Khan a Saeed (2012) srovnávali obsah mědi a olova v rostlinách bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) pěstovaných v *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Nodální segmenty kultivovaly na MS médium s růstovými regulátory (2,4 – D, BAP, NAA, TDZ, BAP + 2,4 – D, 2,4 – D + BAP + NAA). Nejvyšší tvorba kalusu (96,6 %) byla pozorována na MS médiu s obsahem 2,4 – D o koncentraci 2,5 mg/l. Následně v regenerovaných rostlinách zjišťovali obsah mědi a olova. Dospěli k závěru, že obsah mědi a olova byl nižší u rostlin pěstovaných v *in vitro* podmínkách. *In vitro* pěstované rostliny by tak mohly být použity pro fixování větší množství těchto prvků v půdách.

V roce 2016 Verma a kol. sledovali vliv síranu železnatého ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) na *in vitro* regeneraci bazalky pravé (*Ocimum basilicum*). Experimenty probíhaly buď na MS médiu bez obsahu $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ a s obsahem auxinu IAA, anebo na MS médiu s obsahem $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ o různých koncentracích (8,6; 12,9; 17,2 mg/l) v kombinaci s IAA. Explantáty rostoucí na MS médiu pouze s obsahem $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ byly nekrotické. Z výsledků experimentu vyplývá, že pro regeneraci rostlin je efektivní kombinace $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ a auxinu IAA. Po 8 týdnech bylo dosaženo nejvyšší zmnožení prýtů na explantát (15,0 ± 1,6) na MS médiu s obsahem 12,9 mg/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ a 1,0 mg/l IAA.

Saha a kol. v roce 2010 prováděli metodu mikropropagace u bazalky vytrvalé (*Ocimum kilimandscharicum,* Guerke). Média obsahovala růstové regulátory BAP (0,5 – 3,0 mg/l) nebo KIN (0,5 – 3,0 mg/l) nebo 2 – iP (0,5 – 3,0 mg/l). Nejlepších výsledků zmnožení prýtů bylo dosaženo na médiu s obsahem 1,0 mg/l BAP (6,09 ± 0,05 prýtů na explantát). Pro zakořenění rostlin bylo nejlepší ½ MS s 1,5 mg/l IBA.

Siddique a Anis v roce 2007 popsali vhodný postup metody mikropropagace u bazalky pravé (*Ocimum basalicum*). Sledovali koncentrace TDZ a dobu kultivace na *in vitro* regeneraci rostlin. Explantáty byly umístěny na médium doplněné o TDZ (5, 25, 50, 75 a 100 μM). Pro zmnožení prýtů byla optimální koncentrace 50 μM TDZ po dobu 8 dní (11,6 ± 1,16 prýtů na explantát). Tvorba kořenů proběhla nejlépe na MS médiu s obsahem 1,0 μM IBA.

1.5.2 Explantátové kultury u rodu kozinec (*Astragalus sp.*)

Zástupci rodu *Astragalus* mají svůj farmaceutický význam díky obsahu triterpenoidních saponinů. Rostlinné biotechnologie mohou být užitečné pro získání rostlinného materiálu s vyšším obsahem účinných sloučenin (Ionkova a kol., 2014).

V roce 2011 Wu a kol. zjišťovali obsah bioaktivních sloučenin u kultur kozince blanitého (*Astragalus membranaceus*) získaných kultivací v bioreaktoru. Kultivace adventivních kořenů byla testována na pevném médiu, tekutém médiu nebo pomocí bioreaktoru (B_5 médium s obsahem 2 mg/l IBA). Tvorba adventivních kořenů začala nejdříve (za 15 dní) na pevním médium, ovšem nejvyšší růst kořenů byl po 40 dnech docílen v bioreaktoru při použití kořene o délce 1,5 cm. Obsah polysacharidů u adventivních kořenů kultivovaných v bioreaktoru byl vyšší než u volně rostoucích rostlin, obsah saponinů a flavonoidů byl u obou zdrojů podobný. Rostlinné biotechnologie mohou být užitečné pro získání rostlinného materiálu s vyšším obsahem účinných sloučenin (Ionkova a kol., 2014).

Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*) je rostlina tradiční čínské medicíny, která je předmětem řady studií. Pro mikropropagaci rodu kozinec (*Astragalus*) je nejčastěji používáno MS médium (Turgut – Kara a Ari,2006; Hasançebi a kol., 2011; Dilaver a kol., 2017; Luo a Jia, 1998; Chen a Gao, 2007; Hill a kol., 2015), méně často pak médium B_5 a WPM (Han a kol., 2014). Jako zdroj explantátu mohou být použity semena, vzrostné vrcholy (Chen a Gao, 2006), prýty (Turgut – Kara a Ari, 2006), hypokotyly (Hasançebi a kol., 2011; Luo a Jia, 1998; Dilaver a kol., 2017), epikotyly (Dilaver a kol., 2017), embrya (Turgut – Kara a Ari, 2008), listy a řapíky (Hill a kol., 2015; Dilaver a kol., 2017), nodální segmenty (Dilaver a kol., 2017) nebo děložní listy (Dilaver a kol., 2017).

Metodu mikropropagace u *Astragalus maximus* prováděli v roce 2006 Turgut – Kara a Ari. sledovali vliv růstových regulátorů BAP, ZR na zmnožení prýtů. Explantáty byly kultivovány na médiu s růstovými regulátory BAP (0,2, 0,5, 1,0 mg/l), ZR (0,2, 0,5, 1,0 mg/l) a kombinaci BAP a NAA (0,4 mg/l) nebo ZR a NAA (0,4 mg/l). Nejvhodnějším médiem bylo zvoleno MS médium s 0,5 mg/l ZR (30,2 ± 1,24 prýtů na explantát za 20 dní). Kořenění rostlin bylo testováno na MS médiu bez růstových regulátorů, MS médium s obsahem NAA a ½ MS. Kořeny se tvořily pouze na ½ MS.

Hasançebi a kol. (2011) zkoumali vliv kombinace cytokininu (ZR, KIN, BAP) a auxinu (NAA, IBA) na zmnožení prýtů u *Astragalus chrysochlorus*. Segmenty hypokotylů byly kultivovány na médium s obsahem 2, 4–D pro tvorbu kalusů. Kořenění

prýtů bylo testováno na médiích s auxiny (NAA, IBA, IAA). Nejlepších výsledků bylo dosaženo na médiu s 0,5 mg/l ZR, kdy prorůstalo 100 % explantátů a zmnožení bylo 13 prýtů na explantát (Tabulka 2). Kombinace auxinu a cytokininu nebyly stejně účinné jako samotné použití ZR. Nejvíce kalusů se tvořilo na médiu s 0,5 mg/l 2,4 – D. Pro kořenění bylo nejvhodnější MS médium s 0,5 mg/l NAA.

Dilaver (2017) studovali *in vitro* regeneraci u *Astragalus vulnerariae*. Pro zkrácení doby dormance semen byla použita kyselina sírová, optimální byla 40% koncentrace. Pro kultivaci explantátů byly zvoleny média s kombinací růstových regulátorů KIN a NAA nebo BAP a NAA. Pro regeneraci prýtů byla vhodná kombinace KIN a NAA. Kombinace růstových regulátorů BAP a NAA vykazovala horší výsledky. Pro regeneraci prýtů bylo nejlepší použití hypokotylu a média s obsahem 0,5 mg/l NAA. V případě kultivace na médiu s kombinací BAP a NAA byla regenerace nejúspěšnější z epikotylu. Kořenění proběhlo na médiu s 0,5 mg/l IBA.

Nepřímou regeneraci rostlin přes indukci kalusu u *Astragalus adsurgens* prováděli Luo a Jia v roce 1998. Indukce kalusu proběhla na MS médiu s 2,4 – D a BAP. Kalusy byly dále segmentovány na MS médiu s kombinací NAA a BAP pro tvorbu prýtů. Prorůstající prýty byly kultivovány na ½ MS s NAA o různých koncentracích. Na zmnožení prýtů měl vliv typ kalusu, z kterého byly prýty získány, složení kultivačního média. Nejvyššího počtu prýtů bylo dosaženo kultivací kalusu na médiu s obsahem 2,3 mg/l 2,4 – D a 0,5 mg/l BAP a následná kultivace prýtů na médiu s obsahem 0,09 g/l NAA a 2 mg/l BAP.

Chen a Gao (2007) popsali postup odvození tetraploidních rostlin u kozince blanitého (*Astragalus membranaceus*). Explantáty byly umístěny na médium s obsahem kolchicinu (0,1, 0,2, 0,3 %) a 2 % DMSO. Nejvíce tetraploidních rostlin bylo získáno při použití 0,2 % kolchicinu (35,3 % tetraploidních rostlin). Tetraploidní rostliny kořenily na ¾ MS doplněném 2,0 mg/l NAA a 2,0 mg/l IBA. Rostliny ošetřené kolchicinem vykazovaly menší prýty a menší počet nodálních uzlin než takto neošetřené rostliny. Z listových explantátů mixoploidních rostlin odvozovali kalus. Nejvhodnější složení média bylo 2,0 mg/l BAP, 1,0 mg/l KIN a 0,5 mg/l NAA (98,4 ± 3,8 % rostlin tvořilo kalus).

Metodu mikropropagace u *Astragalus holmgreniorum* popsali v roce 2015 Hill a kol. V experimentech zkoumali kombinaci růstových regulátorů 2,4 – D a BAP. Tvorba embryí a následné odvození prýtů proběhlo nejlépe pro oba druhy explantátů – řapík i list na MS médiu s obsahem 1 mg/l BAP a 0 mg/l 2,4 – D a na médiu s 1 mg/l BAP a 7 mg/l 2,4 – D.

Ze závěru studie vyplývá, že pro růst rostlinných pletiv má větší vliv rovnováha hormonů více než koncentrace jednotlivých hormonů.

1.5.3 Explantátové kultury u rodu levandule (*Lavandula sp.*)

Rod levandule (*Lavandula sp.*) má velké využití v potravinářském, parfumérském a farmaceutickém průmyslu. Odvození metody mikropropagace u těchto zástupců je důležitý z hlediska zefektivnění rostlinné produkce a jejich sekundárních metabolitů (Gonçalves a Romano, 2013). Pro mikropropagace levandule (*Lavandula sp*.) bývá nejčastěji zvoleno Murashige a Skoog médium, 1962 jako u Zuzarte a kol., 2010; Andrys a kol, 2017; Miclea a Chifor, 2008; Calvo a Segura, 1988; Calvo a Segura, 1989; Borovec a kol., 1990; Mokhtarzadeh, 2019; Machado, 2014 nebo také WPM (Minh a kol., 2017).

Explantáty mohou být semena (Minh a kol., 2017; Miclea a Chifor, 2008; Calvo a Segura, 1988; Mokhtarzadeh, 2019), prýty (Minh a kol., 2017; Andrys a kol., 2017), vzrostné vrcholy (Zuzarte a kol., 2010; Machado, 2014; Borovec a kol., 1990). Pro povrchovou sterilizaci rostlinného materiálu se používá 70% ethanol u Minh a kol., 2017; Zuzarte a kol., 2010; Andrys a kol., 2017; Borovec a kol., 1990; Machado, 2014, chlornan sodný u Minh a kol., 2017; Zuzarte a kol., 2010; Andrys a kol., 2017; Mokhtarzadeh, 2019; Machado, 2014 nebo chloramin T (Calvo a Segura, 1988).

Mikropropagaci u levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) zkoumali Minh a kol. (2017). Testovali správný postup sterilizace, sledovali vliv kultivačního média na růst prýtů (1/2 MS, MS, WPM, LV), dále zkoumali efekt rozdílných koncentrací BA na tvorbu prýtů. Dále sledovali efekt auxinů na tvorbu kořenů a vliv dřevěného uhlí na růst prýtů. Nejvhodnější sterilizace byla s použitím 75 % chlornanu sodného s přídavkem pár kapek Tween-80 po dobu10 minut. Nejlepším médiem pro růst prýtů bylo stanoveno WPM médium se zmnožením 2,46 prýtů na explantát a nejdelší délkou prýtů 5,28 cm. Pro mikropropagaci levandule lékařské je nejvhodnější koncentrace 0,1 mg/l BA, kdy počet indukovaných prýtů byl 3,06 prýtů na explantát a délka 6,35 cm. Auxiny IBA a NAA nebyly pro tvorbu kořenů přijatelné. Kořenění bylo nejlepší na médiu s 0,1 mg/l IAA (2,26 kořenů na explantát, 1,06 cm délka.

Metodu mikropropagace u levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) prováděli také Miclea a Chifor v roce 2008. Sterilizovaná semena umístili na ½ MS médium nebo na směs destilované vody a phytagelu. Prýty o velikosti 10–15 mm byly kultivovány na médiu bez růstových regulátorů, na médiu se zeatinem (0,5 mg/l, 1 mg/l,2 mg/l) nebo na médiu

s BA a IBA o různých koncentracích: 1 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA, 2 mg/l BA + 1 mg/l IBA nebo 3 mg/l BA a 1,5 mg/l IBA. Pro tvorbu prýtů bylo nejvhodnější médium s 2 mg/l zeatinem (11,12 prýtů na explantát), (Tabulka 3). Indukce kalusu byla nejlepší na MS médiu s 3 mg/l BA a 1,5 mg/l IBA.

Mikropropagaci a obsah sekundárních metabolitů u rostlin *Lavandula pedunculata* prováděli v roce 2010 Zuzarte a kol., zkoumali u získaných rostlin hlavně morfologii trichomů a prováděli analýzu esenciálního oleje pomocí GC (plynová chromatografie), GC-MS (plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie). Získané výsledky byly srovnány s volně rostoucími rostlinami. Explantáty byly kultivovány na MS médiu s 2 % cukru, 10 mg/l kyseliny askorbové a s přídavkem BA o různých koncentracích. Prýty prorůstaly rychleji z nodálních segmentů, ovšem také byla větší tvorba kalusů oproti vzrostným vrcholům. Nejvyššího počtu zmnožení bylo docíleno na médiu s přídavkem 0,25 mg/l BA. Pro nodální segment uvádí zmnožení 4,07 prýtů na explantát, u vzrostného vrcholu 3,88 prýtů na explantát. Studie uvádí vzrostný vrchol jako vhodný zdroj explantátu pro mikropropagaci. Rostliny odvozené ze vzrostných vrcholů obsahovaly stejné sekundární metabolity jako volně rostoucí rostliny.

Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) obsahuje řadu fenolických látek. Andrys a kol. v roce 2017 zkoumali antioxidační a antimikrobiální aktivitu, polyfenolický obsah u olejů získaných z *in vitro* kultury levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) kultivarů „Munstead“, „Ellagance Purple“ a „Blue river“. Explantáty byly kultivovány na médiu s 2 mg/l KIN a 0,2 mg/l IAA. Poté byly explantáty pasážovány na médium o různém obsahu BAP, KIN a 2iP. Pomocí destilace vodní parou byl získán olej z *in vitro* kultivovaných rostlin a z volně rostoucích rostlin. Antimikrobiální aktivita byla testována na bakteriích *Escherichia coli, Pseudomonas aeuriginosa, Staphylococus aureus, Staphylococcus epidermis* a plísni *Candida albicans*. Největší počet prýtů na explantát byl dosažen na médiu s 2 mg/l BAP u kultivarů „Ellagance Purple“ (6,9 prýtů na explantát) a „Munstead“ (9,9 prýtů na explantát). Pro kultivar „Blue river“ bylo největší zmnožení na MS médiu s 1,0 mg/l 2iP (7,5 prýtů na explantát). Pro kořenění bylo nejvhodnější médium s 0,2 mg/l IBA. Všechny testované oleje vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným bakteriím i proti *Candida albicans*. Oleje získané z *in vitro* rostoucích rostlin vykazovali větší antimikrobiální aktivitu než olej získaný z volně rostoucích rostlin.

Calvo a Segura v roce 1988 studovali *in vitro* kultury u levandule širolisté (*Lavandula latifolia*) a levandule smilovité (*Lavandula stoechas*). Explantáty kultivovali na médiu obsahujícím různé kombinace a koncentrace růstových regulátorů (IAA, NAA,

2,4-D, BAP. Kalusy, které byly vytvořeny na médiu s auxiny, měly žluté zbarvení, naopak kalusy indukované pomocí cytokininů byly zelené. Pro tvorbu kalusů byla vhodná kombinace cytokininů a auxinů. Nejlepší tvorba kalusů u levandule smilovité (*Lavandula stoechas*) proběhla na médiu s NAA (0,01 nebo 0,1 mg/l) a BAP (0,1 mg/l). U levandule širolisté (*Lavandula latifolia*) kombinace 2,4-D a BAP. Pro kořenění bylo nejvhodnější médium s 1 mg/l IAA a 2 mg/l NAA.

In vitro kultury u levandule širolisté (*Lavandula latifolia*) byly popsány Calvo a Segura v roce 1989. Explantáty kultivovali na médiu o různých koncentracích auxinů IAA nebo NAA (0,01, 0,1, 1, 2 mg/l) nebo cytokininů BA (2, 4, 6, 8 mg/l) nebo různých kombinacích auxinů i cytokininů. Explantáty byly kultivovány po dobu 4 až 8 týdnů v rozdílných světelných podmínkách. Pro iniciaci tvorby prýtů bylo vhodné médium s obsahem BA. Tvorba kalusu byla nejlepší na médiu s obsahem BA a IAA nebo NAA. Se zvýšením koncentrace auxinů a kultivaci ve tmě došlo k snížení prorůstání prýtů.

Calvo a Segura (1989) v témže roce sledovali vliv růstových regulátorů a kokosového mléka na mikropropagaci u levandule širolisté (*Lavandula latifolia*). *In vitro* kultury rostlin zakládaly ze semenného materiálu. Po 30 dnech byly 1 cm dlouhé hypokotyly pasážovány na MS médium s 0,1mg/l IAA a 2 mg/l BAP. Po 30 dnech explantáty s prorůstajícími úžlabními pupeny byly pasážovány na MS nebo ½ MS médium. Pro zakořenění zvolili MS médium nebo ½ MS médium. Nejlepší výsledky byly dosaženy na ½ MS médiu obsahujícím 20% kokosové mléko, 2 mg/l BAP a 0,01 mg/l IAA (16,2 prýtů na explantát). Přidání kokosového mléka pozitivně ovlivnilo počet získaných prýtů.

Mokhtarzadeh a kol. v roce 2019 izolovali a identifikovali chemické sloučeniny obsažené v rostlinách levandule smilovité (*Lavandula stoechas*) získané z *in vitro* kultur. Pro založení *in vitro* kultur použili semenný materiál. Po 10 dnech odebrali děložní lístky a nodální segmenty kultivovali na médiu obsahujícím 0,25 mg/l BAP. Rostliny získané mikropropagací byly pasážovány na médium s 1 mg/l IBA pro zakořenění. Z těchto *in vitro* získaných rostlin byly izolovány chemické sloučeniny a identifikovány pomocí GC-FID (plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem) a GC-MS (plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie). Hlavní sloučeniny obsažené v levanduli smilovité (*Lavandula stoechas*) byly kafr (38,5 %), isoborneol (10,6 %), α - fenchon (8,9 %), eukaptol (4,3 %), α-pinen (4,0 %) a dále například linalool a myrtenol.

Machado a kol. v roce 2014 hodnotili vliv koncentrace Ca^{2+} na délku prýtů, zmnožení rostlin, procento zakořenění, vitrifikaci a apikální nekrózu u *in vitro* pěstovaných rostlin levandule lékařské (*Lavandula latifolia*). Pro srovnání rostliny kultivovali na

médiích s rozdílným obsahem $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, na standartním MS médium s obsahem 440 mg/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a na médiu se zvýšeným obsahem 1320 mg/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. V kultivovaných rostlinách dále zjišťovali obsah a akumulaci Ca^{2+} iontů. Vápník byl nejvíce akumulován v bazálních a středních částech prýtů, do apikálních částí rostlin se Ca^{2+} ionty pohybovaly velmi pomalu. Ve studii dospěli k závěru, že zvýšení koncentrace $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ v kultivačním médiu nemá vliv na délku prýtů, počet listů, zmnožení nebo procento zakořenění, ale má vliv na snížení vitrifikace rostlin a zvýšení obsahu Ca^{2+} iontů v rostlinách.

1.5.4 Explantátové kultury u rodu rozmarýn (*Rosmarinus sp.*)

Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*) je důležitá léčivá rostlina obsahující řadu fenolických látek s antioxidačními účinky (Kuhlmann a Röhl, 2006). Pro mikropropagaci této léčivky se nejčastěji používá MS médium (Kuhlmann a Röhl, 2006; Pistelli a kol., 2013; Darwesh a Alayafi, 2018), méně často WPM (Misra a Chaturvedi, 1984).

Pro odvození *in vitro* kultur mohou být zvoleny jako explantáty semena (Kuhlmann a Röhl, 2006; Darwesh a Alayafi, 2018; Darwesh a Alayafi, 2018), nodální segmenty (Misra a Chaturvedi, 1984), vzrostné vrcholy (Pistelli L. a kol, 2013; Misra a Chaturvedi,1984), listy (Kuhlmann a Röhl, 2006). Pro povrchovou sterilizaci explantátů se používá ethanol (Kuhlmann a Röhl, 2006; Misra a Chaturvedi, 1984; Darwesh a Alayafi, 2018), chlornan sodný (Kuhlmann a Röhl, 2006; Pistelli a kol., 2013) nebo roztok $HgCl_2$ (Misra a Chatuverdi, 1984) nebo Clorox (Darwesh a Alayafi, 2018).

Mikropropagaci a obsah fenolických látek u rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) zkoumali Kuhlmann a Röhl (2006). Rostliny kultivovali na médiu s obsahem 1 mg/l BAP. Pro nepřímou regeneraci bylo zvoleno médium s 4,7 mg/l BAP a 3,9 mg/l NAA. Obsah karnosové kyseliny, karnosolu a rozmarýnové kyseliny byl hodnocen u prýtů, kalusů a buněčné suspenze. Nejvíce karnosové kyseliny bylo zjištěno u prýtů. Karnosová kyselina jako fenolická látka zajišťuje protizánětlivé účinky rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*).

Pistelli a kol. v roce 2013 identifikovali pomocí GC – MS (plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie) obsahové látky v *in vitro* rostlinách rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*). Vzrostné vrcholy ponechali po dobu 15 dní v roztoku 0,01 % chlornanu sodného a 2 % sacharidu. Rostliny kultivovaly na médiu s obsahem 0,017 mg/l.

Pro kořenění bylo zvoleno médium s 0,2 mg/l NAA. V rostlinách byly stanoveny monoterpeny, seskviterpeny, α–pinen, 1,8–cineol a kafr.

Mikropropagaci rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) prováděli v roce 1984 Misra a Chaturvedi. V experimentech testovali WPM médium a dvě modifikace MS média s odlišným obsahem makroprvků. Dále potom vliv růstových regulátorů na růst prýtů, indukci kalusů a tvorbu kořenů. Pro tvorbu prýtů bylo nejvhodnější médium s obsahem 0,1 mg/l. Největší zmnožení prýtů bylo na médiu s obsahem 0,2 mg/l BAP (13,6 ± 0,92 prýtů na explantát), ale probíhala tvorba kalusu (Tabulka 4). Kořenění rostlin bylo hodnoceno na médiích s obsahem IAA, IPA, IBA a NAA, 80 % rostlin kořenilo na médiu s obsahem 0,25 mg/l IPA.

V roce 2018 Darwesh a Alayafi zkoumali vliv elicitorů na *in vitro* propagaci a obsah fenolických látek u rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*). V experimentech byl sledován vliv růstových regulátorů KIN a BAP a kokosového mléka. Největší zmnožení prýtů bylo dosaženo na médiu s obsahem 5,0 mg/l KIN. Největší počet listů a délka prýtů byla na médiu s obsahem 3 mg/l BAP a 5 ml/l kokosového mléka. Při kultivaci explantátů na médiu s obsahem 3,0 mg/l BAP byl nejvyšší obsah fenolických látek. Nejvyšší obsah chlorofylu byl při kultivaci na médiu s obsahem 5,0 mg/l BAP a 5,0 ml/l kokosového mléka.

1.5.5 Explantátové kultury u rodu yzop (*Hyssopus sp.*)

Pro založení *in vitro* kultur u rodu yzop je vhodné použití MS média. (Hosseini a kol., 2016; Zayova a kol, 2018; Toma a kol., 2004)

Hosseini a kol. (2016) zkoumali *in vitro* regeneraci u yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*). V experimentech sledovali vliv růstových regulátorů kombinace TDZ + IAA a BAP + IAA na mikropropagaci rostlin. Pro kořenění bylo zvoleno médium s obsahem IBA. Pro mikropropagaci yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) bylo vhodnější použití růstového regulátoru BAP. Největší zmnožení prýtů na explantát u médií s růstovým regulátorem BAP bylo na médiu s obsahem 0,5 mg/l nebo 1 mg/l BAP v kombinaci s 0,2 mg/l IAA (9 prýtů na explantát).

Zayova a kol. (2018) zkoumali antioxidační vlastnosti *in vitro* rostlin yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*). V experimentech byl sledován vliv růstových regulátorů (BAP, TDZ, ZEA v kombinaci s IBA) na aktivitu antioxidačních enzymů. Nejvyšší zmnožení (4,8± 0,34 prýtů na explantát) bylo na médiu s obsahem 1,0 mg/l BAP a 0,1 mg/l

IBA (Tabulka 5). Kořenění bylo testováno na ½ MS s obsahem IBA a NAA nebo IAA. Pro kořenění bylo nejvhodnější ½ MS s obsahem 0,1 mg/l IBA (85 % rostlin tvořilo kořeny). Rostliny kultivované na médiu s (BAP, TDZ, ZEA v kombinaci s IBA) měly zvýšenou aktivitu enzymů (superoxiddismutáza, kataláza, guajakol peroxidáza). Nejvyšší aktivita těchto enzymů byla naměřena při kultivaci rostlin na médiu s 0,1 mg/l IBA a 1 mg/l BAP.

Toma a kol. (2004) sledovali vliv růstových regulátorů (IAA, NAA, IBA, BAP) na anatomii listů a stonku *in vitro* kultivovaných rostlin yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*). U všech kombinací růstových regulátorů měly stonky tenkou pokožku, slabě vyvinuté vodivé pletivo, redukovaný palisádový parenchym, rozvinutý houbový parenchym. Nejmenší změny v anatomii, vitrifikace a tvorba kalusu na bázi byly pozorovány při použití růstového regulátoru IBA.

Tabulka 1: Mikropropagace u rodu *Ocimum* z vybraných citací

species	explantát	médium	doba [týden]	fytohormony [mg/l]		počet prýtů na explantát	citace
				auxin	cytokinin		
O. basalicum	nodální segment	MS	4	-	BAP 0,5	6,2±0,1	Saha a kol. (2010)
O. basilicum	děložní lístek	MS	6-7	NAA 0,2	BAP 5,0	3,46	Dode a kol. (2003)
O. basilicum	semena	MS	6		mT 0,5	6,2	Köszeghi a kol. (2014)
O. basilicum	semena	MS	8		BAP 1,0	5,00 ± 0,28	Manan a kol. (2016)
O. basilicum	semena	MS	8	IAA 1,0		15,0 ± 1,6	Verma a kol. (2016)
O. kilimandscharicum	nodální segment	MS	-		BAP 1,0	6,09 ± 0,05	Saha a kol. (2010)
O. sanctum	nodální segment	MS	3	NAA 0,5	BAP 2,0	-	Jamal a kol. (2016)
O. sanctum	květenství	MS	6	IAA 0,05	BAP 1,0	11,2±0,28	Singh a Segal (1999)

Tabulka 2: Mikropropagace u rodu *Astragalus* z vybraných citací

species	explantát	médium	doba [týden]	fytohormony [mg/l]		počet prýtů na explantát	citace
				auxin	cytokinin		
A. holmgreniorum	list, embryo	MS	4	-	BAP 0,1	4,8±1,6	Hill a kol. (2015)
A. adsurgens	hypokotyl	MS	5	NAA 0,1	BAP 2,0	-	Luo a Jia (1998)
A. vulnerariae	hypokotyl	MS	8	NAA 0,5	KIN 0,5	4,47	Dilaver a kol. (2017)
A. membranaceus	vzrostný vrchol	MS	4	IAA 0,5	BAP 2,0	7,8±1,2	Chen a Gao (2006)
A. chrysochlorus	hypokotyl	MS	-	-	ZR 0,5	13	Hasaçebia kol.(2010)

Tabulka 3: Mikropropagace u rodu *Lavandula* z vybraných citací

species	explantát	médium	doba [týden]	fytohormony [mg/l]		počet prýtů na explantát	citace
				auxin	cytokinin		
L. angustifolia	semena	WPM	4	-	BA 0,1	3,06	Minh a kol. (2017)
L. angustifolia	prýty	½ MS	8	-	zeatin 2	11,12±2,33	Miclea a Chifor (2018)
L. latifolia	hypokotyl	MS*	4	0,01 IAA	BAP 2	16,2	Calvo a Segura, (1989)
L. pendulata	nodální segment	MS	2	-	BAP 0,25	4,07±0,35	Zuzarte a kol. (2010)
L. viridis	nodální segment	½ MS	-	-	BAP 0,15	11,69	Dias a kol. (2002)

*20% kokosové mléko

Tabulka 4: Mikropropagace u rodu *Rosmarinus* z vybraných citací

species	explantát	médium	doba [týden]	fytohormony [mg/l]		počet prýtů na explantát	citace
				auxin	cytokinin		
R. officinalis	vzrostný vrchol, nodální segment	*MS	4	-	BAP 0,2	13,6±0,92	Misra a Chaturvedi, (1984)
R. officinalis	vzrostný vrchol	MS	4	IAA 0,017	-	1,50±0,5	Pistelli a kol. (2013)
R. officinalis	semena	MS	4	-	KIN 3,0	7	Darwesh a Alayafi, (2018)

*upravené MS

Tabulka 5: Mikropropagace u rodu *Hyssopus* z vybraných citací

species	explantát	médium	doba [týden]	fytohormony [mg/l]		počet prýtů na explantát	citace
				auxin	cytokinin		
H. officinalis	-	MS	3	IAA 1	TDZ 4,4	19,83	Hosseini a kol. (2016)
H. officinalis	vzrostný vrchol	MS	4	IBA 0,1	BAP 1,0	4,8±0,34	Zayova a kol. (2018)

1.6 Využití explantátových kultur

Explantátové kultury byly zavedeny především jako metoda sloužící k rychlému namnožení rostlinného materiálu. Tyto techniky poskytují také různé genetické varianty rostlin, haploidní rostliny, rostliny odolné vůči chorobám, tvorbu nových odrůd rostlin. Explantátové kultury mají využití v genových bankách a ve šlechtitelství.

1.7 Mikropropagace

Metoda mikropropagace slouží k snadnému namnožení vybraného genotypu za použití *in vitro* technik. V závislosti na druhu a kulturních podmínkách může mikropropagace probíhat několika způsoby. Jedná se o stimulaci axilárního větvení, nodální kultury, tvorbu adventivních prýtů přes prýtovou organogenezi, somatickou embryogenezi. V praxi se pro komerční produkci nejvíce využívá metoda stimulace axilárního větvení. Mezi výhodu této metody patří genetická stabilita a snadnost provedení u mnoha druhů (Trigiano a Gray, 2005).

Díky totipotenci rostlinných buněk je možné řídit vývoj rostlinných buněk, pletiv a orgánů v *in vitro* kulturách. *In vitro* kultury mají význam při studiu fyziologie a genetiky rostlin, také v biotechnologických metodách (Luštinec a Žárský, 2003).

1.7.1 Výběr matečné rostliny a odvození explantátové kultury

Správná volba matečné rostliny ovlivňuje odvození explantátové kultury. Matečná rostlina by měla být zdravou rostlinou, s dobrými růstovými schopnostmi a fyziologií. Pro založení *in vitro* kultur je důležité zvolit vhodný zdroj explantátu.

Před umístěním explantátu na médium je nutné jej povrchově sterilizovat. Druh sterilizačního roztoku a doba působení se odvíjí od citlivosti pletiva, obtížnosti jej dezinfikovat a typu mikrobiální kontaminace. Běžně se k povrchové sterilizaci používá 0,5 – 1 % chlornan sodný, 70% etanol nebo 10% peroxid vodíku. Mezi další dezinfekční činidla patří 7% chlornan vápenatý, 1% bromová voda nebo 0,2% chlorid rtuťnatý. Pro vymytí dezinfekčního agens je nutné sterilizované explantáty opakovaně promýt sterilní destilovanou vodou. Výskyt vnitřích kontaminací je eliminován použitím antibiotik (Trigiano a Gray, 2005; Hradilík, 2005).

1.7.2 Fáze proliferace a zakořeňování explantátů

Povrchově vysterilizované explantáty jsou umístěny na kultivační médium pro multiplikaci pupenů nebo jiných orgánů odvozených z explantátu. Při stimulaci axilárního větvení je namnožení prýtů iniciováno použitím cytokininů v médiu. Cytokininy potlačují apikální dominanci a podporují růst prýtů z úžlabních pupenů. Typ a koncentrace cytokininu ovlivňuje zmnožení a délku prýtu, genetické odchylky. Dalším stupněm mikropropagace je vytvoření kořenů u rostlin pro úspěšný převod do *in vivo* podmínek. Tvorbu a délku kořenů ovlivňuje přidání auxinů do kultivačního média. *In vitro* kořenění rostlin probíhá běžně i na médiu s absencí auxinů (Trigiano a Gray, 2005; Hradilík, 2005).

1.7.3 Převod do nesterilních podmínek

Úspěšnost převodu rostlin do nesterilních podmínek závisí na schopnosti adaptovat se na nižší vlhkost, vyšší světelné podmínky a heterotrofní výživu. *In vitro* rostliny nemají vytvořeny kutikulu nebo jen tenkou, slabě vyvinutý mezofyl, slabé cévní spojení mezi prýty a kořeny. Při převodu do nesterilních podmínek se používají porézní materiály, především, perlit, rašelina, směs písku a rašeliny. Rostliny je třeba po výsadbě překrýt fólií. (Hradilík, 2005).

1.8 Biotechnologické metody

Explantátové kultury mohou sloužit k přípravě transgenních rostlin. Jedná se o stabilní transformaci rostlin cizorodou DNA. Běžně se k transformaci používá *Agrobacterium* obsahující Ti plasmid s transgenem (Luštinec a Žárský, 2003).

Ionkova a kol. (1997) studovali kořenové kultury (hairy root kultury) u *Astragalus mongholicus*. V experimentech použili čtyři kmeny *Agrobacterium rhizogenes* (LBA 9402, ATCC 15834, R 1601, TR 105), u kterých hodnotili vliv na růst kořenových kultur a produkci saponinů. Kořenové kultury (hairy root kultury) se vyznačují rychlým růstem a zvýšenou produkcí sekundárních metabolitů. Pro růst kořenových kultur byly vhodnější kmeny LBA 9402 a ATCC 15834. Jednotlivé kmeny bakterií se lišily v produkci saponinů. Bakterie kmene LBA 9402 byly vykazovaly nejvyšší produkci saponinů, celkový obsah saponinů byl o 36 % vyšší ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Nikšić a kol. (2017) zkoumali chemické složení, antimikrobiální a antioxidační aktivitu esenciálního oleje z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*). Esenciální olej

vykazoval větší antibakteriální aktivitu proti gramnegativním bakteriím a antiproliferační aktivitu proti třem liniím rakovinových buněk MOLT – 4, NCI – H460 (H460) a MCF7. Nejvíce byl esenciální olej účinný na buňky akutní lymfoblastické leukémie.

Radulescu a kol. (2017) studovali chemické složení extrakce levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*). Fenolické látky v levandulovém extraktu (voda – alkohol, glycerin, propylenglykol) identifikovali pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie, infračervené spektroskopie a Ramanově spektroskopie. Jako primární fenolické látky byly stanoveny kyselina chlorogenová, kyselina gallová, 3-hydroxykumarin, vitexin. Fenolické látky vykazují antioxidační aktivitu a pomáhají v boji proti volným radikálům.

Hassanshahian a kol. (2019) testovali antimikrobiální aktivitu etanolového a metanolového extraktu z yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*). V experimentech byly sledovány grampozitivní bakterie *Bacillus cereus, Stapyhlococcus aureus* a gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumonia*. Metanolický extrakt měl vyšší antimikrobiální aktivitu, ze všech kmenů bakterií byl nejcitlivější *Actinetobacter baumannii*. Ze studie vyplývá, že tento extrakt by mohl být účinným lékem na některé bakteriální infekce.

Bernotienė a Butkienė (2010) zkoumali pomocí GC (plynové chromatografie) a GC – MS (plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie) obsahové složky esenciálního oleje yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*). Obsahové látky byly hodnoceny u esenciálních olejů získaných z různých stanovišť. U všech vzorků byly hlavní složkou monoterpeny (36,0 – 50,7 %), další podstatnou část esenciálních olejů tvořily sloučeniny obsahující ve vzorci pinan (43,6 – 56,9 %). Esenciální oleje obsahovaly pinokarvon (21,1 – 28,1 %), isopinokamfon (11,5 – 15,9 %), β – pinen (7,0 – 11,4 %) a hedykaryol (4,1 – 4,8 %).

Borhanuddin M. v roce 2016 sledoval vliv vodného extraktu bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) na snížení krevního tlaku. Experimenty byly provedeny na 2 – 3 měsíčních krysách. Běžný krevní tlak krys byl 83/71 mm/Hg. Po použití vodného extraktu bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) se tlak snížil na 66/50 mm/Hg. Vodný extrakt snížil krevní tlak krys o 19–30 %.

2. Materiál a metody

2.1 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byly použity semena bazalky posvátné (*Occinum sanctum*), levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*), yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*) a kozinec blanitý (*Astragaluus propinquus*), (Tabulka 6) a prýty rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) získané z jedné donorové rostliny z VÚRV Olomouc.

Tabulka 6: Použitý semenný materiál

rostlinný druh identifikační číslo	označení	původ
Ocinum sanctum	2018/(B66)	VÚRV Praha
Ocinum sanctum 09A68 00066/3295	2010/(BP)	VÚRV Olomouc
Lavandula angustifolia „Mustead“ 09A55 00051/3218	2007/(L51)	VÚRV Olomouc
Lavandula angustifolia 09A5500047/3176	2007/(L47)	VÚRV Olomouc
Hyssopus officinalis „Blankyt“ 09A5100001/2040	2005/(H1)	VÚRV Olomouc
Astragalus propinquus	361/(AM)	LF MU Brno
Astragalus propinquus	2018/(AP)	VÚRV Praha

2.2 Pracovní postupy

2.2.1 Povrchová sterilizace semen

Ke sterilizaci semen byl použit 70% etanol a 2,5% roztok chloraminu T. Semena byla zabalena do uhelonu a poté vložena do injekční stříkačky (Obr. 8)

Postup sterilizace:

1. Semena byla zabalena do uhelonu, který byl zavázán nití, a vložena do injekční stříkačky (objem 20 ml).
2. Poté byla semena opláchnuta v 70% etanolu po dobu 2 minut.
3. Po odstranění etanolu byla sterilizace ve 2,5% chloraminu T po dobu 15 minut.
4. Odstranění chloraminu T již v aseptickém prostředí flowboxu.
5. Sterilizace konců injekční stříkačky pomocí 96% etanolu.
6. 3× propláchnutí sterilní destilovanou vodou.

Obr. 8: Sterilizace semen v uhelonu

2.2.2 Sterilizace prýtů rostlin *Rosmarinus officinalis*

Pro experiment byly odebrány segmenty prýtů rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*), které byly po dobu 2–4 hodiny promývány pod tekoucí vodou. Následně byly explantáty nařezány do velikosti 2 cm a vloženy velké injekční stříkačky a byly sterilizovány nejprve 70 % etanolem, a pak 2,5% chloraminem T (Obr. 9).

Postup sterilizace I:

1. Segmenty o velikosti 2 cm byly vloženy do injekční stříkačky.
2. Nejprve byly explantáty sterilizovány 70% etanolem po dobu 1 minuty.
3. Odstranění etanolu.
4. Následně byly sterilizovány v 2,5% chloraminu T po dobu 30 minut.
5. Odstranění chloraminu T již v aseptickém prostředí flowboxu.
6. Sterilizace konců injekční stříkačky pomocí 96% etanolu.
7. 3× propláchnutí sterilní destilovanou vodou.

Postup sterilizace II:

1. Explantáty o velikosti 2 cm byly vloženy do injekční stříkačky.
2. Nejprve byly explantáty sterilizovány 70% etanolem po dobu 1 minuty.
3. Odstranění etanolu.
4. Následně byly sterilizovány v 2,5% chloraminu T po dobu 15 minut.
5. Odstranění chloraminu T.
6. Sterilizace konců injekční stříkačky pomocí 96% etanolu.
7. 3× propláchnutí sterilní destilovanou vodou.

Obr. 9: Sterilizace větviček rozmarýnu

2.2.3 Výsev semen

Po ukončení sterilizace byla semena vysázena Petriho misek o průměru 60 mm obsahujících MS médium s přídavkem 20 mg KA (kyselina askorbová) a 0,1% PPM (Obr. 10). Petriho misky byly uzavřeny parafilmem a následně umístěny do termostatu (25 ˚C, tma). Semena kozince blanitého (*Astragalus membranaceus*) byla umístěna po dobu 10 dnů do lednice, a poté přemístěna do termostatu (25 ˚C, tma).

Obr. 10: Semena yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) na MS médiu

2.2.4 Kultivace rostlin ze semen

Rostliny vyklíčené ze semen byly přemístěny do zkumavek obsahujících 7,5 ml MSA média (Obr. 11).

Příprava kultivačních médií:

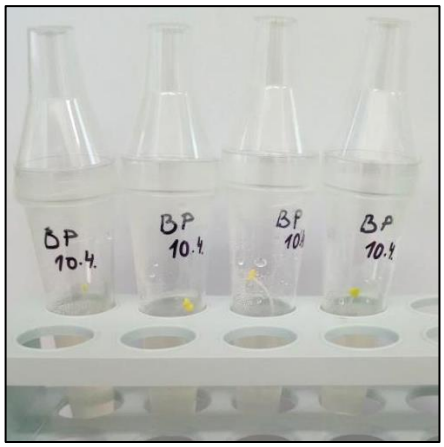
a) na analytických vahách bylo naváženo 4,405 g MS média (Duchefa Biochemie), 30 g sacharózy (Penta), 7,5 g agaru (Duchefa Biochemie).

b) navážený obsah MS média a sacharózy byl rozpuštěn v cca 450 ml destilované vody v kádince o objemu jednoho litru umístěné na míchačce (Heidolph MR Hei – Standart). Dále byly přidány příslušné růstové regulátory (Tabulka 7) a 20 mg KA (kyseliny askorbové).

c) v druhé kádince o objemu jednoho litru byl vsypán agar do 550 ml destilované vody a rozvařen v mikrovlnné troubě, přibližně 5 minut.

d) následně se byly oba objemy kádinek smíchány a doplněny destilovanou vodou do celkového obsahu jednoho litru. Celkové pH média bylo upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu 5,8.

e) připravené médium bylo rozlito do láhví o objemu 500ml – 3 láhve a autoklávováno při teplotě 121 ˚C, přetlak 100 kPa.



Obr. 11: Semenáčky bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) na MSA médiu

Tabulka 7: Složení kultivačních médií

označení média	médium MS [g/l]	sacharóza [g/l]	auxiny [mg/l]	cytokininy [mg/l]	kyselina askorbová [mg/l]
MSA	4,405	30	-	BAP 0,1	20
MSB	4,405	30	-	BAP 0,5	20
MSC	4,405	30	NAA 0,2	BAP 1,0	20

2.2.5 Kultivace rostlin prýtů *Rosmarinus officinalis*

Povrchově vysterilizované explantáty byly umístěny na filtrační papír a usušeny. Následně byly seříznuty bazální části segmentů a zkráceny listy. Velikost explantátu byla 1–2 cm (Obr. 12). Explantáty byly umístěny na MS médium a MS médium s obsahem PPM do Petriho miskem (60 mm, 2–4 ks). Petriho misky byly uzavřeny parafilmem a umístěny do kultivační místnosti. Vzrostné vrcholy byly umístěny do zkumavek s obsahem 7 – 7,5 ml média MSA.

Obr. 12: Explantáty rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*)

2.2.6 Zakořeňování rostlin

Pro zakořenění rostlin yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*), kozince blanitého (*Astragalus membranaceus*) a levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) byla testována čtyři kultivační média: MS, ½ MS, MS + 0,5 IBA, ½ MS + 0,1 IBA. Před umístěním na média byly seříznuty bazální části prýtů a odstraněny staré listy. Rostliny bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) kořenily již během kultivace na médiích pro zmnožení prýtů.

2.2.7 Převod do nesterilních podmínek

Pro převod do nesterilních podmínek byly vybrány rostliny s dostatečně vytvořenými kořeny. Nejprve byly ze zkumavek odstraněny víčka a zkumavky byly překryty potravinářskou folií. Pro převod do nesterilních podmínek byly zvoleny rašelinové sadbovače (jiffy, 41/7 mm), které byly předem namočeny ve vodě. Rostliny byly vyjmuty ze zkumavek a pod tekoucí vodou bylo z kořenů důkladně odstraněno médium. Rostlinám se zkrátily kořeny a odstranily se poškozené a staré listy. Rostliny umístěné do rašelinových sadbovačů byly vloženy do plastového minipařeniště (Obr. 13, 14). Z časových důvodů byl převod do nesterilních podmínek proveden pouze u rostlin bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) a yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*).

Obr. 13: Rostliny bazalky posvátné vysazené do rašelinových sadbovačů (jiffy)

Obr. 14: Rostliny yzopu lékařského vysazené do rašelinových sadbovačů (jiffy)

3. Výsledky

Jedním z cílů diplomové práce bylo úspěšné odvození *in vitro* kultur u vybraných zástupců z čeledi *Fabaceae* a *Lamiaceae* a stanovení vhodné metody mikropropagace. Uvedené experimenty byly provedeny v laboratoři tkáňových kultur a rostlinných biotechnologií Katedry botaniky PřF UP v Olomouci od března 2019 do března 2020.

3.1 Povrchová sterilizace a klíčivost semen

K experimentům byl použit semenný materiál uvedený v Tabulce 2. Pro povrchovou sterilizaci semen byl použit 70% etanol po dobu 2 minut, následně 2,5% chloramin T po dobu 15 minut.

Klíčivost a kontaminace semen byla hodnocena po dobu 8 týdnů (Tabulka 8). Přidání do PPM mělo pozitivní efekt u semen kozince blanitého (*Astragalus membranaceus*) a levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) – L47, na MS médiu bez přídavku PPM byla 100% kontaminace. Semena bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*), (Obr. 15) a yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) klíčila za 1 týden. Naopak semena levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) klíčila po 2 až 4 týdnech. Nejvyšší procento klíčení bylo dosaženo u semen yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) a levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) – L51 s použitím PPM.

Obr. 15: Prorůstající semeno bazalky posvátné

Tabulka 8: Klíčivost a kontaminace semen

genotypy	PPM	počet	1 týden		2 týdny		4 týdny		6 týdnů		8 týdnů	
			klíčení [%]	kont. [%]	klíčení [%]	kont. [%]	klíčení [%]	kont. [%]	klíčení [%]	kont. [%]	klíčení [%]	kont. [%]
B66	+	10	10	0	30	0	40	0	40	0	50	0
	-	10	0	0	0	0	20	0	30	0	40	0
BP	+	10	20	0	20	0	50	0	50	0	50	0
	-	10	20	0	20	0	30	0	30	0	30	0
L51	+	10	0	0	0	0	20	0	30	0	40	0
	-	10	0	0	10	0	50	0	60	0	60	0
L47	+	10	0	0	10	0	20	0	20	0	20	0
	-	10	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	+	10	20	20	60	20	60	2	60	20	60	20
	-	10	20	0	60	0	60	0	60	0	60	0
AP	+	10	-	-	-	-	20	0	20	0	20	0
	-	10	-	-	-	-	20	100	-	-	-	-
AM	+	10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	-	10	-	-	-	-	0	100	-	-	-	-

3.2 Mikropropagace

Pro veškerý rostlinný materiál bylo zvoleno výchozí médium MSA. Vyklíčené semenáčky byly kultivovány ve zkumavkách s obsahem MSA média. U získaných namnožených rostlin byly následně testovány média MSA, MSB a MSC. Pro každou variantu mikropropagace bylo použito 10 až 15 prýtů.

3.2.1 Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*)

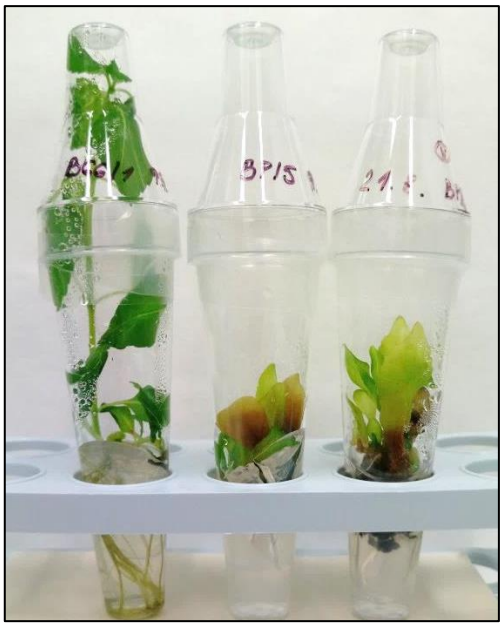
Mikropropagace bazalky posvátné byla provedena u dvou genotypů na médiích MSA, MSB a MSC (Tabulka 9, 10), jako nejvhodnější médium bylo MSA. Rostliny na MSA médiu měly pěkný vzhled, silné prýty a velké listy (Obr. 16–18). Média MSB a MSC byly pro mikropropagaci bazalky posvátné nevhodné, rostliny byly nižší a vytvářely na bázi zduřelý prýt (Obr. 16–18). Největší průměrné zmnožení prýtů na explantát u genotypu BP bylo také získáno na MSA médiu (Tabulka 9). Rostliny genotypu B66 byly vyšší, statnější, měly velké listy. Rostliny genotypu BP měly nižší vzrůst a menší listy (Obr. 17). Pro mikropropagaci bazalky posvátné bylo optimální použití explantátů genotyp B66 a kultivace na MSA médiu. Pro oba genotypy bazalky posvátné bylo nejvhodnější použití MSA média. Média MSB a MSC byla pro mikropropagaci bazalky posvátné nevhodná z důvodu zduření prýtů a vitrifikace rostlin.

Tabulka 9: Zmnožení prýtů na explantát a kořenění (%) bazalky posvátné genotyp BP v průběhu kultivace

médium	1. pasáž		2. pasáž		3. pasáž		průměr
	zmnožení	kořenění	zmnožení	kořenění	zmnožení	kořenění	[týdny]
MSA	2,88	38	3,41	100	3,91	-	3,406
MSB	2,56 *83	0	3,56	67	**	-	3,066
MSC	2,05 *67	74	2,00	67	**	-	2,036

* v procentech vyjádřený kalus na bázi,

** zduřelé prýty nebylo možné použít pro mikropropagaci



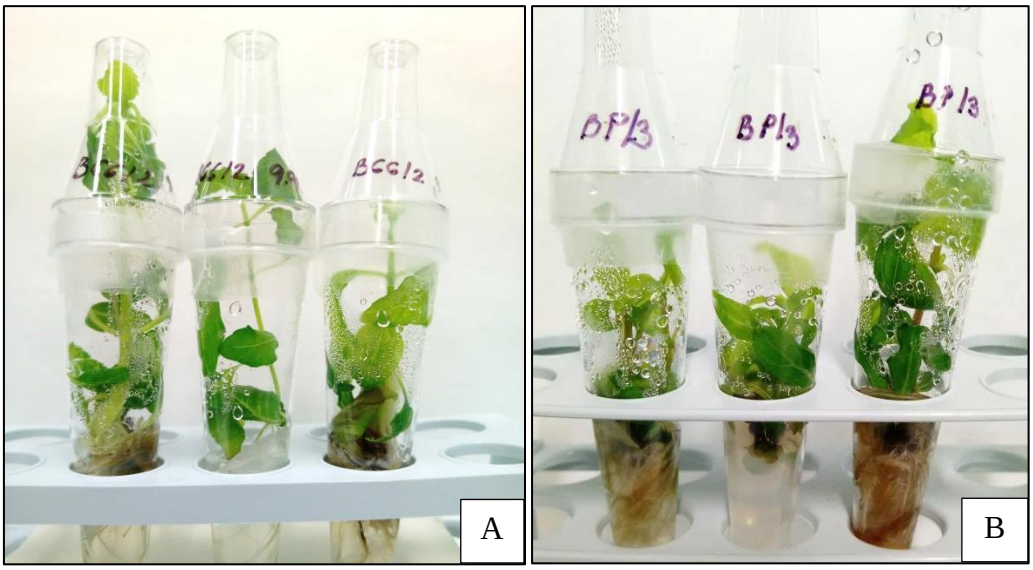
Obr. 16: Rostliny bazalky posvátné na médiích zleva MSA, MSB, MSC

Tabulka 10: Zmnožení prýtů na explantát a kořenění (%) bazalky posvátné genotyp B66 v průběhu kultivace

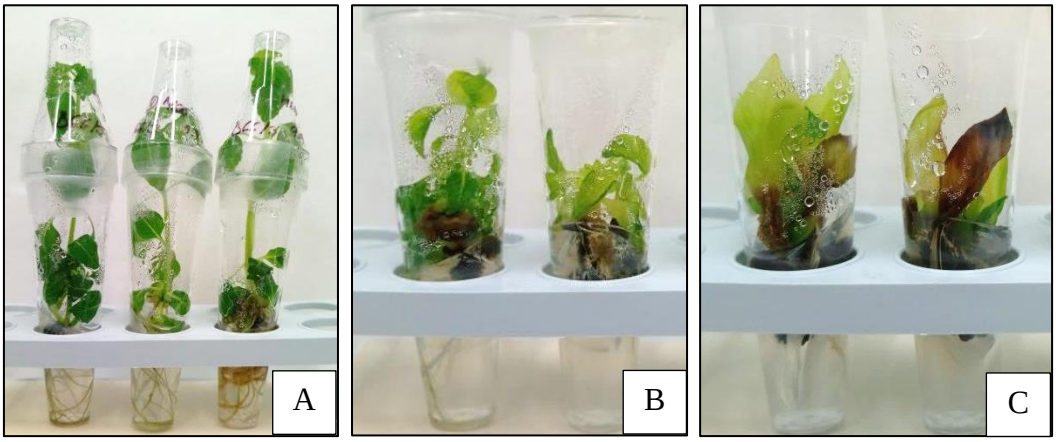
médium	1. pasáž		2. pasáž		3. pasáž		průměr
	zmnožení	kořenění	zmnožení	kořenění	zmnožení	kořenění	[týdny]
MSA	2,67	67	5,48	89	4,47, *39	58	4,219
MSB	5,50	75	3,00	86	**	-	4,259
MSC	5,57	100	**	-	**	-	5,5710

* v procentech vyjádřený kalus na bázi,

** zduřelé prýty, nebylo možné použít pro mikropropagaci



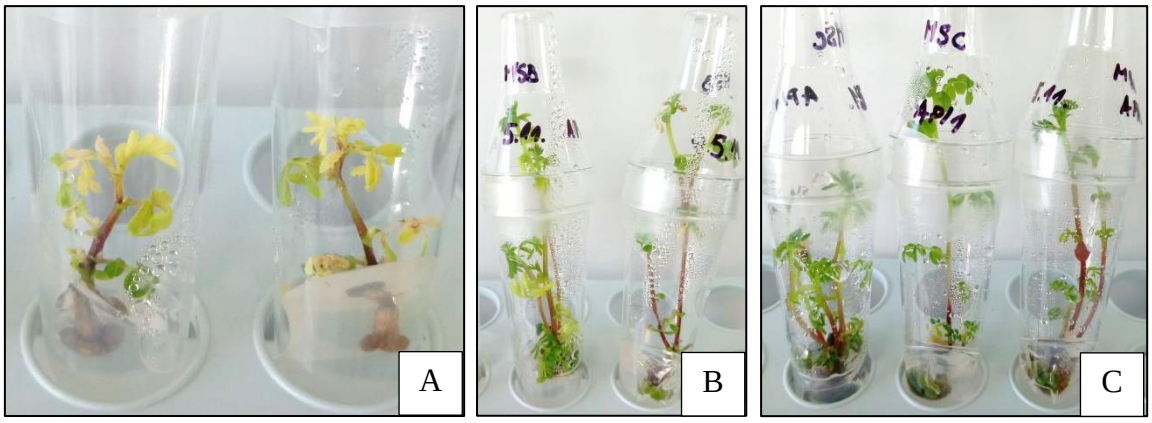
Obr. 17: Bazalka posvátná na médiu MSA: A – B66, B – BP



Obr. 18: Srovnání mikropropagace u bazalky posvátné na kultivačních médiích: A – MSA, B – MSB, C – MSC

3.2.2 Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*)

Kultivace rostlin kozince blanitého proběhla na médiích MSA, MSB a MSC. Maximální průměrné zmnožení prýtů na explantát (11,23) bylo získáno na MSC médiu (Tabulka 11). Rostliny kultivované na MSA médiu měly nižší vzrůst a menší listy. Rostliny rostoucí na MSB a MSC médiu byly statnější se zmnoženými prýty (Obr. 19). Nejvyšší rostliny byly na MSC médiu (Obr. 10).



Obr. 19: Kozinec blanitý 5 týdnů na kultivačních médiích: A – MSA B – MSB, C – MSC

Tabulka 11: Zmnožení prýtů na explantát a kořenění (%) kozince blanitého v průběhu kultivace

médium	1. pasáž		2. pasáž		3. pasáž		průměr
	zmnožení	kořenění	zmnožení	kořenění	zmnožení	kořenění	[týdny]
MSA	5,50	0	4,83	0	6,68	13,22	5,67 12
MSB	10,75 *70	0	7,75 *88	0	**	-	9,25 12
MSC	10,45 *100	0	12,00 *100	0	**	-	11,23 12

* v procentech vyjádřený kalus na bázi, ** z časových důvodů nebylo provedeno

3.2.3 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)

Mikropropagace levandule lékařské byla zkoumána na médiích MSA, MSB a MSC. Rostliny na médiu MSA a MSB měly nízké prýty s malými listy. Rostliny kultivované na MSC médiu byly statnější, tvořily zmnožené prýty s velkými listy (Obr. 20). Pro mikropropagaci levandule lékařské bylo nejvhodnější použití MSC média, nejvyšší zmnožení prýtů na explantát (8,0) bylo rovněž na MSC médiu (Tabulka 12). Rostliny levandule lékařské se vyznačovaly pomalým růstem, z tohoto důvodu byly provedeny pouze dvě pasáže.

Tabulka 12: Zmnožení prýtů na explantát a kořenění (%) levandule lékařské během jednotlivých pasáží

médium	1. pasáž		2. pasáž		průměr
	zmnožení	kořenění	zmnožení	kořenění	[týdny]
MSA	1,00	100	1,00	100	1,00 15
MSB	3,90 *85	31	**	-	3,90 13
MSC	8,00 *100	50	**	-	8,00 13

* v procentech vyjádřený kalus na bázi, ** z časových důvodů nebylo provedeno

Obr. 20: Levandule lékařská po 3 týdnech na médiích: A – iniciační médium MSA, B – MSB, C – MSC

3.2.4 Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*)

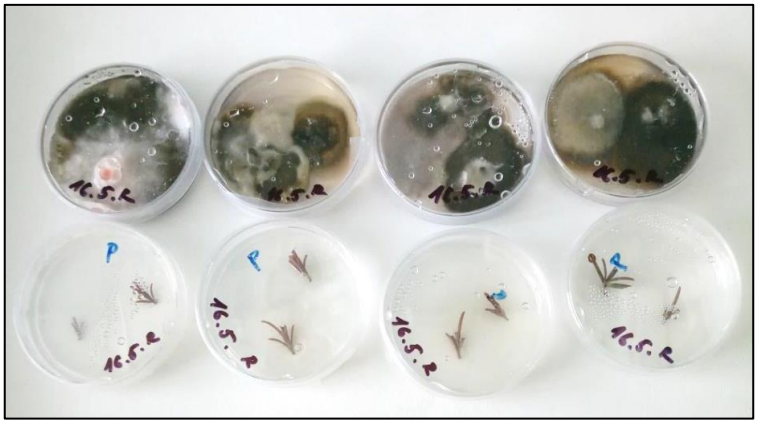
Pro odvození mikropropagace u rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) byly použity vrcholové a boční pupeny větviček (Obr. 21). V experimentech s rozmarýnem lékařským (*Rosmarinus officinalis*) pozitivně ovlivnilo přidání PPM do média procento kontaminací (Tabulka 13, 14). Z hlediska procenta kontaminací byl vhodnější postup sterilizace I oproti sterilizaci II (Tabulka 13, 14). Regenerace rostlin nebyla pozorována při všech postupech odvození *in vitro* kultur. Celkem 152 explantátů nekrotizovalo, a proto nebylo v experimentech pokračováno.

Tabulka 13: Regenerace rostlin rozmarýnu lékařského, postup sterilizace I

médium	celkem	1 týden kontamin. [%]	1 týden nekrotické [%]	2 týden kontamin. [%]	2 týden nekrotické [%]	růst [%]
MS	40	25	0	33	30	0
MS+PPM	50	0	0	4	36	0

Tabulka 14: Regenerace rostlin rozmarýnu lékařského, postup sterilizace II

médium	celkem	kontaminace [%]	růst [%]
MS	36	39	0
MS+PPM	26	19	0



Obr. 21: Petriho misky s explantáty rozmarýnu lékařského, horní řada na MSA médiu bez PPM, dolní řada na MSA médiu s PPM

3.2.5 Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*)

Mikropropagace yzopu lékařského byla sledována na médiích MSA, MSB a MSC. Rostliny kultivované na MSA médiu tvořily malé zmnožené vysoké prýty s velkými listy. Rostliny kultivované na MSB a MSC médiu bohatě zmnožené prýty s velkými listy (Obr. 20). Největší průměrné zmnožení prýtů na explantát (9,5) bylo dosaženo na MSC

médiu (Tabulka 15). Pro mikropropagaci yzopu lékařského bylo nejvhodnější použití MSC média.

Tabulka 15: Zmnožení prýtů na explantát a kořenění (%) yzopu lékařského v průběhu kultivace

médium	1. pasáž		2. pasáž		3. pasáž		průměr
	zmnožení	kořenění	zmnožení	kořenění	zmnožení	kořenění	[týdny]
MSA	2,71	67	11,15	83	13,22	40	9,03 11
MSB	6,59 *19	74	11,37 *58	25	7,67	-	8,54 11
MSC	9,75 *100	50	9,25	-	**	-	9,5 11

*v procentech vyjádřený kalus na bázi, ** z časových důvodů nebylo provedeno

Obr. 20: Rostliny yzopu lékařského na médiích zleva MSA, MSB a MSC

3.3 Zakořeňování *in vitro*

Zakořeňování rostlin kozince blanitého (*Astragalus membranaceus*), levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) a yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) bylo testováno na čtyřech médiích: MS, ½ MS, MS + 0,5 mg/l IBA, 1/2MS + 0,1mg/l IBA. Rostliny bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) kořenily na médiích pro zmnožení prýtů (Obr. 24), a proto nebyly testovány kořenící média. Rostliny kozince blanitého kořenily pouze na ½ MS s obsahem 0,1 mg/l IBA (Tabulka 16). Největší procento (66,7) kořenění u rostlin levandule lékařské bylo na médiích ½ MS a MS + 0,5 mg/l IBA (Tabulka 17). Rostliny yzopu lékařské kořenily na všech námi zvolených kořenících médií (Tabulka 18). Pro zakořeňování yzopu lékařského bylo nejvhodnější MS médium s obsahem 0,5 IBA (Obr. 23). Rostliny na tomhle médium vytvářely mohutné, bohatě husté a silné kořeny.

Tabulka 16: Zakořeňování prýtů kozince blanitého

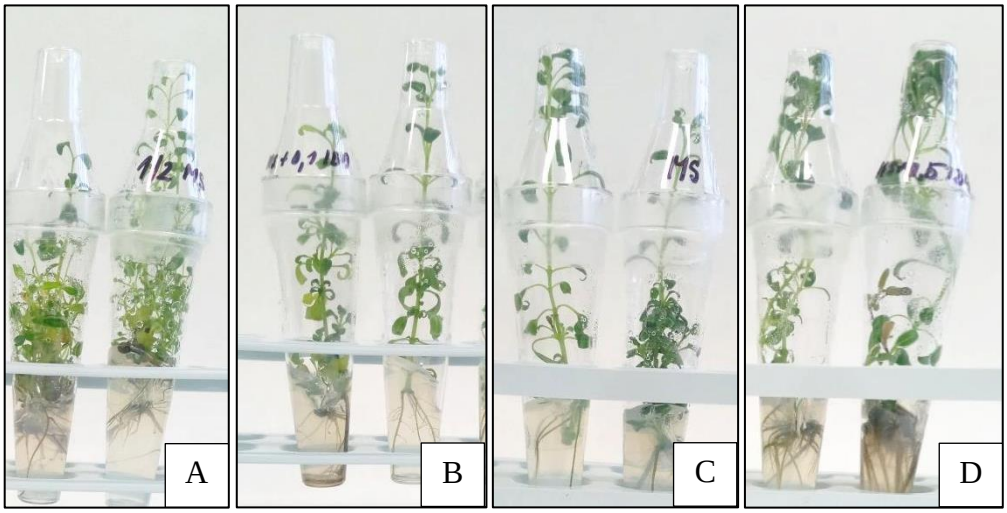
médium	kořenění [%] 2 týdny	kořenění [%] 4 týdny	kořenění [%] 6 týdnů
½ MS	0	0	0
½ MS + 0,1 IBA	16,7	16,7	33,4
MS	0	0	0
MS + 0,5 IBA	0	0	0

Tabulka 17: Zakořeňování prýtů levandule lékařské

médium	kořenění [%] 2 týdny	kořenění [%] 4 týdny	kořenění [%] 6 týdnů
½ MS	33,6	66,7	66,7
½ MS + 0,1 IBA	25,0	50,0	50,0
MS	33,4	33,4	33,4
MS + 0,5 IBA	16,7	66,7	66,7

Tabulka 18: Zakořeňování prýtů yzopu lékařského

médium	kořenění [%]	průměrná délka [cm]	kořeny
½ MS	100	2,0	krátké, tenké
½ MS + 0,1 IBA	100	1,2	krátké, nerozvětvené
MS	67	6,8	silné, delší
MS + 0,5 IBA	100	6,6	mohutné, husté, silné



Obr. 23: Kořenění yzopu lékařského: A - ½ MS, B - ½ MS + 0,1 IBA, C - MS, D - MS + 0,5 IBA)

Obr. 24: Kořenění rostlin bazalky posvátné na médiích pro zmnožení prýtů

3.4 Převod do nesterilních podmínek

Pro převod do nesterilních podmínek byly zvoleny rašelinové sadbovače (jiffy). Rostliny byly přesazeny do rašelinových sadbovačů a vloženy do minipařeniště. Rostliny byly pravidelně jednou týdně zalévány. Hodnocení a dokumentace bylo prováděno jednou za dva týdny.

Převod do nesterilních podmínek u rostlin bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) byl 100%. Rostliny genotypu B66 byly po převodu do nesterilních podmínek statnější, vyššího vzrůstu oproti rostlinám genotypu BP (Obr. 25). U rostlin yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) byl převod 100 %. Rašelinové sadbovače byly vhodné pro převod rostlin do nesterilních podmínek (Obr. 26). Převod do nesterilních podmínek nebyl z časových důvodů proveden u rostlin kozince blanitého a levandule lékařské.

Obr. 25: Rostliny bazalky posvátné v rašelinových sadbovačích (jiffy): A – genotyp B66, B – genotyp BP

Obr. 26: Rostliny yzopu lékařského v rašelinových sadbovačích (jiffy)

4. Didaktická analýza odborného tématu

Metodu mikropropagace je možné zařadit do tematického celku Biologie rostlin podle rámcového vzdělávacího programu pro základní školy i gymnázia.

4.1 Zařazení biotechnologií do výuky pro žáky na základní škole

Odborné téma biotechnologie rostlin se zaměřením na metodu mikropropagace jsem zařadila do výuky žáků na základní škole v rámci učiva fyziologie rostlin. Výuka proběhla na Základní škole Olomouc pro 23 žáků 7. třídy. V didaktické příloze (kapitola 9.3) jsou uvedeny prezentace a pracovní listy, které byly použity v rámci dvou vyučovacích hodin. Během výuky byli žáci seznámeni se základními fyziologickými procesy rostlin, prací s explantátovými kulturami, metodou mikropropagace. Další část byla věnována léčivým bylinám, kde si žáci ve skupinách vyzkoušeli poznat základní zástupce čeledi *Lamiaceae*. Použitá forma výuky byla hromadná, při determinaci rostlin byla použita skupinová práce žáků.

Výukové cíle byly stanoveny, že žák:

- charakterizuje fyziologické procesy (fotosyntéza, rozmnožování, růst)
- popíše způsoby rozmnožování rostlin (pohlavní, nepohlavní)
- vysvětlí princip fotosyntézy
- popíše regeneraci rostlin
- sdělí princip metody mikropropagace
- vyjmenuje fáze mikropropagace
- rozliší základní zástupce léčivých bylin z čeledi *Lamiaceae*

Praktický výstup:

- vyplnění pracovních listů (příloha), determinace vzorků

4.2 Zařazení biotechnologií do výuky pro studenty na střední škole

Rostlinné biotechnologie byly zařazeny do výuky na gymnáziu v rámci učiva fyziologie rostlin. Zařazení odborného tématu do výuky proběhlo na Gymnáziu a Jazykové škole s právem státní jazykové zkoušky Zlín. Pro studenty byly vytvořeny prezentace a pracovní listy, které jsou součástí didaktické přílohy (kapitola 9.3). Výuka zaměřená na rostlinné biotechnologie byla odučena v rámci dvou vyučovacích hodin pro 21 studentů 3. ročníku. Prezentace byla zaměřena na téma rostlinné hormony, využití explantátových kultur, metodu mikropropagace a léčivé byliny z čeledi *Lamiaceae*. Studenti nejprve získali základní informace o dané problematice z výkladu, poté následovalo vyplnění pracovních listů. Na závěr studenti poznávali vybrané zástupce z čeledi *Lamiaceae*. Použitá forma výuky byla hromadná, v druhé části výuky pak skupinová forma.

Výukové cíle byly stanoveny, že student:

- sdělí výhody pěstování rostlin v *in vitro* podmínkách
- sepíše funkce jednotlivých růstových regulátorů
- uspořádá fáze mikropropagace
- vyjmenuje složky kultivačního média
- definuje sekundární metabolity
- pozná základní zástupce léčivých bylin z čeledi *Lamiaceae*
- přiřadí účinné obsahové látky k jednotlivým zástupcům

4.3 Vyhodnocení pracovních listů

Pro žáky základních škol byly připraveny dva pracovní listy s otázkami na základní fyziologické procesy, metodu mikropropagace a rostliny čeledi *Fabaceae* a *Lamiaceae*. Celkem 52 % žáků dokázalo správně odpovědět na 80 % otázek v pracovním listě 1 (Tabulka 19). Pracovní list 2 byl sestaven z otázek s možností výběru správné odpovědi. Úspěšnost řešení žáků v pracovním listu bylo 100 % (Tabulka 19).

Pro studenty gymnázií byly přichystány dva pracovní listy. Pracovní list 1 obsahoval otázky na rostlinné hormony, metodu mikropropagace, sekundární metabolity. Celkem 94 % studentů odpovědělo na alespoň 90 % otázek správně (Tabulka 20). Pracovní list 2 vyplnilo správně 100 % studentů (Tabulka 20).

Tabulka 19: Vyhodnocení pracovních listů pro žáky ZŠ

správnost odpovědí [%]	počet studentů [%]	
	pracovní list 1	pracovní list 2
100 - 90	26	100
89 - 80	26	0
79 - 60	22	0
59 - 35	13	0
35 - 0	13	0

Tabulka 20: Vyhodnocení pracovních listů pro studenty SŠ

správnost odpovědí [%]	počet studentů [%]	
	pracovní list 1	pracovní list 2
100 - 90	94	100
89 - 80	0	0
79 - 60	6	0
59 - 35	0	0
35 - 0	0	0

5. Diskuze

5.1 Povrchová sterilizace

Pro úspěšné založení *in vitro* kultur je důležitý správný postup sterilizace a zdroj explantátu. V experimentech byly použity semena bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*), kozince blanitého (*Astragalus membranaceus*), levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*), yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*), prýty s vzrostnými vrcholy a úžlabními pupeny rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*).

5.1.1 Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*)

Jamal a kol. (2016) použili pro sterilizaci vzrostných vrcholů a nodálních segmentů bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) 0,1% $HgCl_2$ po dobu 7 minut a následně promývali sterilní destilovanou vodou. Saha a kol. (2010) stanovil optimální povrchovou sterilizaci nodálních segmentů *Ocimum kilimandscharicum* pomocí 70% etanolu po dobu 1 minuty, následně 0,1% $HgCl_2$ po dobu 3–5 minut a promytí sterilní destilovanou vodou. Banu a Bari v roce 2007 použili pro sterilizaci vzrostných a listových explantátů bazalky posvátné (*Ocimum sanctum*) 1% Savlon s obsahem Tween – 80, poté 0,1% $HgCl_2$ po dobu 6 minut. Siddique a Anis (2007) promývali odebrané explantáty bazalky pravé (*Ocimum basilicum*) pomocí tekoucí vody po dobu 30 minut. Následně sterilizovali 5% Teepol po dobu 15 minut a 0,1% $HgCl_2$. Pro odstranění sterilizačního agens byla použita sterilní destilovaná voda. Použití roztoku $HgCl_2$, který je vysoce toxickou látkou, jsme pro sterilizaci semen v experimentech vyloučili.

Dode a kol. (2003) použili pro sterilizaci semen 70% etanol po dobu 2 minut a chlornan sodný po dobu 15 minut. Chlornan sodný pro povrchovou sterilizaci semen použil také Köszeghi (2014). Manan a kol. (2016) povrchově sterilizovali semena a prýty bazalky pravé (*Ocimum basilicum*) pomocí nejprve pomocí 70% Cloroxu (5,25% chlornan sodný) s 0,1% Tween – 20 po dobu 6 minut, dále 40% Clorox po dobu 6 minut a 20% Clorox po dobu 6 minut, 70% etanol po dobu 1 minuty. Následně byly explantáty promyty sterilní destilovanou vodou.

V našich experimentech bylo použito pro sterilizaci semen bazalky posvátné 70% etanolu po dobu 2 minut stejně jako u Saha a kol. (2010), Dode a kol. (2003) a 2,5% chloraminu T po dobu 15 minut. Následovalo třikrát promytí pomocí sterilní destilované vody. Po 8 týdnech byla nejvyšší klíčivost semen bazalky posvátné 50 % na MS médiu

s přídavkem PPM. Po dobu 8 týdnů se u semenného materiálu neprojevila kontaminace, zvolený způsob sterilizace pomocí 70% etanolu a 2,5% chloraminu T lze považovat za optimální.

5.1.2 Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*)

Turgut – Kara a Ari (2006) prováděli povrchovou sterilizaci semen *Astragalus maximus* pomocí 70% etanolu po dobu 1 minuty. Poté sterilizovali komerčním dezinfekčním prostředkem Domestos po dobu 15 minut. Semena následně důkladně třikrát byla promyta pomocí sterilní destilované vody po dobu 15 minut. Hasaçebi a kol. (2011) použili stejný postup sterilizace jako Turgut – Kara a Ari (2006) při sterilizaci semen *Astragalus chrysochlorus*. Hill a kol. (2015) sterilizovali listy a řapíky *Astragalus holmgreniorum* pomocí 70% etanolu po dobu 5 minut a 0,52% chlornanu sodného se smáčedlem Tween 20. Dilaver a kol. (2017) zvolili pro sterilizaci semen *Astragalus vulnerariae* 5% chlornan sodný. Explantáty byly pětkrát promyty sterilní destilovanou vodou po dobu 3 minut. Chen a Gao (2006) sterilizovali vzrostné vrcholy *Astragalus membranaceus* pomocí 0,1% $HgCl_2$ po dobu 5 minut. Luo a Jia (1998) použili ke sterilizaci 0,1% $HgCl_2$ po dobu 8 minut.

V našich experimentech byla semena kozince blanitého povrchově sterilizována pomocí 70% etanolu stejně jako u Turgut-Kara (2006), Hasaçebi a kol. (2011) a Hill a kol. (2015) po dobu 2 minut a 2,5% chloraminu T po dobu 15 minut a sterilní destilované vody. U semen kozince blanitého genotypu AP byla po 8 týdnech klíčivost 20 % na MS médiu s přídavkem PPM. U semen bez přídavku PPM byla kontaminace 100 %. Pro povrchovou sterilizaci semen kozince blanitého bylo použití 70% etanolu po dobu 2 minut a 2,5% chloraminu T po dobu 15 minut dostačující v případě přidání PPM do MS média.

5.1.3 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)

Minh a kol (2017) použili při sterilizaci semen a prýtů levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) 70% etanol a 5% chlornan sodný. Zuzarte a kol. (2010) k povrchové sterilizaci vzrostných vrcholů a nodálních segmentů *Lavandula pendulata* použili 70% etanol po dobu 30 sekund a 7% chlornan sodný s obsahem Tween 20. Andrys a kol. (2017) zahájili sterilizaci prýtů levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) promývání pod tekoucí vodou. Poté zvolili 70% etanol po dobu 30 sekund a 7% chlornan sodný po dobu 20 minut. Sterilizační agens bylo odstraněno a explantáty promyty pomocí

sterilní destilované vody. Miclea a Chifor (2008) sterilizovali semena levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) pomocí komerčního dezinfekčního prostředku po dobu 10 minut a explantáty třikrát promývali sterilní destilovanou vodou. Borovec a kol. (1990) promývali větvičky levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) pod tekoucí vodou po dobu 30 minut. Následně segmenty větviček proplachovali 70% etanolem a 5% chlorovým vápnem. Machado (2014) sterilizovali vzrostné vrcholy levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) sterilizovali pomocí 70% etanol po dobu 20 sekund a dále pomocí 1% chlornanu sodného s obsahem Tweenu 20.

Calvo a Segura (1988) uvádí vhodný postup povrchové sterilizace semen *Lavandula latifolia* a *Lavandula stoechas.* Semena byla ponechána v 0,5% roztoku H_2O_2 po dobu 24 hodin. Poté následovala sterilizace 2% chloraminem T s přídavkem 0,1% Tween 20 po dobu 1 hodinu. Mokhtarzadeh (2019) sterilizovali semena *Lavandula stoechas* pomocí 5% chlornanu sodného po dobu 8 minut, k promytí byla použita sterilní destilovaná voda.

Pro povrchovou sterilizaci semen levandule lékařské jsme zvolili 70% etanol stejně jako Minh a kol. (2017), Zuzarte a kol. (2010), Andrys a kol. (2017), Borovec a kol. (1990) a Machado a kol. (2014) a 2,5% chloramin. Zvolený postup sterilizace byl pro semena levandule lékařské optimální. U semen levandule L47 mělo na omezení kontaminace vliv i přidání PPM do MS média.

5.1.4 Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*)

Kuhlmann a Röhl (2006) sterilizovali semena rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) pomocí 70% etanolu po dobu 1 minuty a 1:10 zředěným 12 % chlornanem sodným po dobu 4 minut s obsahem 0,02% Tween 80. Misra a Chaturvedi (1984) sterilizovali vzrostné vrcholy a nodální segmenty rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) pomocí 5% Teepolu po dobu 5 minut, 95% etanolem po dobu 2 sekund a 0,1% $HgCl_2$ po dobu 3 – 5 minut. Explantáty promyli po dobu 30 minut sterilní destilovanou vodou. Pistelli a kol. (2013) uvádí optimální sterilizaci vzrostných vrcholů rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) pomocí 70% etanolu po dobu 1 minuty a 25% chlornanu sodného po dobu 10 minut a promytí sterilní destilovanou vodu po dobu 5 minut. Darwesh a Alayafi (2018) použili při povrchové sterilizaci semen rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) 70% etanol po dobu 1 minut a 15% Clorox po dobu 10 minut.

Pro povrchovou sterilizaci prýtů rozmarýnu lékařského jsme testovali dva postupy sterilizace. Při sterilizaci I bylo použito 70% etanol po dobu 1 minuty stejně jako u Kulhman a Röhl (2006), Pistelli a kol. (2013) a Darwesh a kol. (2013) a Darwesh a Alayafi (2018) a 2,5% chloraminu T po dobu 30 minut. Z důvodu velkého počtu nekrotických explantátů byla při sterilizaci II zkrácena doba působení 2,5% chloraminu T na 15 minut. V obou experimentech se nepodařilo docílit prorůstání explantátů. Jedním důvodem může být kyselina rozmarýnová, která je obsažena v rozmarýnu lékařském.

5.1.5 Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*)

Hosseini a kol. (2016) sterilizovali semena yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) pomocí 70% ethanolu po dobu 1 minuty a 2,5% chlornan sodný. Nanova a kol. (2007) použili k povrchové sterilizaci vzrostných vrcholů yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) 0,04% $HgCl_2$ s obsahem 0,1% Tweenu po dobu 90 minut. Explantáty třikrát promyli sterilní destilovanou vodou. Toma a kol. (2004) zvolili pro sterilizaci úžlabních pupenů yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) 0,1% $HgCl_2$ po dobu 12 minut. Zayova a kol. (2018) zvolili pro sterilizaci vzrostných vrcholů yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) stejně jako Toma a kol. (2004) $HgCl_2$ (0,04%, 20 minut).

V našich experimentech byla semena yzopu lékařského sterilizována pomocí 70% etanolu stejně jako Hossieni a kol. (2016) a následně 2,5% chloraminu T. Použití $HgCl_2$ jsme z důvodu vysoké toxicity v našich experimentech vyloučili. Po 8 týdnech byla u semenného materiálu 60 % klíčivost. Pro sterilizaci semen byl uvedený postup vhodný stejně jako přidání PPM do MS média, neprojevily se žádné kontaminace.

5.2 Mikropropagace

V našich experimentech byla mikropropagace testována u bazalky posvátné, kozince blanitého, levandule lékařské a yzopu lékařského na médiích MSA (MS; 0,1 mg/l BAP, 20 mg/l KA), MSB (MS ;0,5 mg/l BAP, 20 mg/l KA) a MSC (MS; 0,2 mg/l NAA, 1,0 mg/l BAP, 20 mg/l KA).

5.2.1 Bazalka posvátná (*Ocimum basalicum*)

Jamal a kol. (2016) pro mikropropagaci bazalky posvátné testovali vliv růstových regulátorů BAP, BAP + NAA, BAP + IAA nebo BAP + 2,4 –D. Nejlepších výsledků se dosáhlo na MS médiu s 2,0 mg/l BAP a 0,5 mg/l NAA. V našich experimentech byla

kombinace růstových regulátorů BAP a NAA testována v médiu MSC (1,0 mg/l BAP a 0,2 mg/l NAA), které nebylo vhodné pro mikropropagaci bazalky posvátné z důvodu vitrifikace rostlin a tvorby zduřelých prýtů. U bazalky posvátné genotyp B66 bylo nejvyšší zmnožení prýtů na explantát (5,57) právě na MSC médiu. Saha a kol. (2010) prováděli *in vitro* kultivaci rostlin *Ocimum kilimandscharicum* na médiích s růstovými regulátory BAP, KIN, 2iP o koncentraci 0,5 – 3 mg/l. Nejlepší médium bylo zvoleno médium s obsahem 1,0 mg/l BAP.

Výsledky mikropropagace u bazalky posvátné souhlasí se závěrem Singh a Segal (1999), že se zvyšující koncentrací BAP se snižuje zmnožení prýtů explantátů. Se zvyšující koncentrací BAP v médiu také dochází ke zduření prýtů, proto bylo nejvhodnějším médiem pro mikropropagaci MSA médium obsahující 0,1 mg/l BAP s průměrným zmnožením 3,4 prýtů na explantát. K podobným závěrům dospěli i Banu a Bari (2007). Ve studii uvádí pro mikropropagaci bazalky posvátné jako optimální médium s obsahem 0,2 mg/l BAP (5,8 prýtů na explantát). Saha a kol. (2010) u bazalky pravé získali nejvyšší zmnožení prýtů na explantát na MS médiu s obsahem 0,5 mg/l BAP. Stejné složení odpovídá médiu MSB, které nebylo pro mikropropagaci bazalky posvátné v našich experimentech z důvodu vitrifikace prýtů vhodné. Köszeghi a kol. (2014) zkoumali vliv růstových regulátorů BAP a mT na mikropropagaci bazalky pravé. V závěru uvádí, že přidání mT v médiu zvyšuje počet prýtů na explantát a délku prýtů ve srovnání s použitím BAP.

5.2.2 Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*)

Turgut-Kara a Ari (2006) zkoumali vliv růstových regulátorů BAP, ZR, NAA a jejich kombinací na mikropropagaci *Astragalus maximus*. Nejvhodnější bylo použití 0,5 mg/l ZR se zmnožením 30,2 prýtů na explantát za 20 dní. Hasançebi a kol. (2011) uvádí rovněž médium s 0,5 mg/l ZR jako nejlepší médium pro mikropropagaci *Astragalus chrysochlorus*.

Dilaver a kol. (2017) sledovali vliv kombinace růstových regulátorů KIN + NAA, BAP + NAA v různých koncentracích na mikropropagaci *Astragalus vulnerariae*. Největší procento regenerace prýtů (86,67 %) se zmnožením 4,47 prýtů na explantát bylo získáno na MS médiu s 0,5 mg/l KIN a 0,5 g/l NAA. Dilaver a kol. (2017) uvádí, že kombinace růstových regulátorů BAP + NAA vykazuje horší výsledky než kombinace KIN + NAA. Úspěšná regenerace prýtů proběhla i při použití epikotylu a média s obsahem 1mg/l BAP

a 0,5 mg/l NAA. Hill a kol. (2015) testovali vliv kombinace 2,4 – D a BAP. Nejlepší výsledky byly dosaženy na médiu s obsahem 1,0 mg/l BAP bez obsahu 2,4 – D. V našich experimentech byla koncentrace 1 mg/l BAP použita v kombinaci s 0,2 mg/l NAA v MSC médiu, které bylo nejúspěšnější a nejvhodnější pro mikropropagaci *Astragalus membranaceus*.

5.2.3 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)

Miclea a Chifor (2008) zkoumali mikropropagaci *Lavandula angustifolia*. V experimentech sledovali vliv růstových regulátorů ZEA, BAP, IBA. Pro tvorbu prýtů s maximálním zmnožením 11,12 prýtů na explantát bylo nejlepší médium s 2 mg/l ZEA. Calvo a Segura (1989) studovali vliv auxinů IAA a NAA, cytokininů BA nebo jejich kombinací na mikropropagaci *Lavandula latifolia*. Pro iniciaci prýtů bylo vhodné médium s obsahem růstového regulátoru BA. Zuzarte a kol. (2010) uvádí, že při mikropropagaci *Lavandula pedunculata* bylo maximální zmnožení na médiu s obsahem 0,25 mg/l BAP.

Andrys a kol. (2017) sledovali u kultivarů *Lavandula angustifolia* růstových regulátorů o různém obsahu BAP, KIN, 2iP. Pro kultivary „Ellagance Purple“ a „Munstead“ bylo nejlepší MS médium s 2 mg/l BAP. Calvo a Segura (1989) ve studii o mikropropagaci *Lavandula latifolia* uvádí optimální médium s obsahem kokosového mléka, 2 mg/l BAP a 0,01 mg/l IAA (16,2 prýtů na explantát). Mokhtazadeh a kol. (2019) také zvolili médium s obsahem růstového regulátoru BAP pro kultivaci rostlin *Lavandula stoechas*. V našich experimentech bylo pro mikropropagaci *Lavandula angustifolia* nejlepší použití média MSC s 1,0 mg/l BAP a 0,2 mg/l NAA. Vyšší koncentrace růstového regulátoru BAP v kombinaci s NAA vykazovala vyšší zmnožení prýtů na explantát ve srovnání s nižší koncentrací BAP na kultivačních mediích MSA a MSB.

5.2.4 Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*)

Hosseini a kol. (2016) prováděli mikropropagaci u *Hyssopus officinalis*. V experimentech testovali vliv kombinace růstových regulátorů TDZ + IAA, BAP + IAA. Média s obsahem růstového regulátoru BAP bylo pro mikropropagaci *Hyssopus officinalis* efektivnější. Zayova a kol. (2018) stanovili nejvhodnější médium pro mikropropagaci *Hyssopus officinalis* s obsahem 1,0 mg/l BAP a 0,1 mg/l IBA. Na základě našich experimentů jsme vyhodnotili MSC médium s obsahem 1,0 mg/l BAP a 0,2 mg/l NAA jako nejlepší médium pro mikropropagaci *Hyssopus officinalis*. Koncetrace 1,0 mg/l BAP

se ukázala jako optimální stejně jako Zayova a kol. (2018). Také Hosseini (2016) hodnotí pozitivně přidání růstového regulátoru BAP na mikropropagaci *Hyssopus officinalis*.

5.3 Zakořeňování

V našich experimentech bylo *in vitro* zakořeňování testováno u kozince blanitého, levandule lékařské a yzopu lékařského na médiích ½ MS médiu bez růstových regulátorů, ½ MS médium + 01 mg/l IBA, MS médium, MS médium + 0,5 mg/l IBA.

5.3.1 Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*)

Jamal a kol. (2016) testovali kultivační média - MS a ½ MS s obsahem růstových regulátorů NAA nebo IAA (0,1, 0,5, 1 a 2 mg/l) pro zakořeňování *Ocimum sanctum*. Použití MS média vykazovalo lepší výsledky než ½ MS. Nejvyšší délka kořenů byla na MS médiu s obsahem 1,0 mg/l NAA. Dode a kol. (2003) zvolili pro zakořeňování *Ocimum basilicum* ½ MS bez růstových regulátorů, přičemž 90 % prýtů rychle vyvinulo kořeny. Saha a kol. (2010) zkoumali vliv MS a ½ MS obsahující NAA (0,25 – 2,0 mg/l) nebo IBA (0,25 – 2,0 mg/l) na kořenění *Ocimum basilicum*. MS médium obsahující auxiny vykazovalo horší výsledky v kořenění. Optimální médium s obsahem 1 mg/l NAA s průměrnou délkou 2,4 cm a počtem 4,6 kořenů na explantát. Singh a Segal (1999) zvolili pro kořenění *Ocimum sanctum* MS médium bez růstových regulátorů, 92 % prýtů vytvářelo kořeny. Siddique a Anis (2007) uvádí vhodné MS médium s obsahem 1,0 μM IBA pro zakořeňování *Ocimum basalicum*. Banu a Bari (2007) stanovili MS médium s obsahem 0,1 mg/l NAA jako nejlepší médium pro zakořeňování *Ocimum sanctum* (délka kořenů 3,55 cm, 5,66 kořenů na prýt). V našich experimentech kořenily rostliny *Ocimum sanctum* na všech mikropropagačních médiích (MSA, MSB, MSC), a proto nebyla výše uvedená kořenící média u *Ocimum sanctum* testována.

5.3.2. Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*)

Turgut-Kara a Ari (2006) zjistili, že MS médium bez růstových regulátorů a MS médium s obsahem NAA (0,2, 0,4, 0,8, 1, 2, 1,5 mg/l) neiniciovalo tvorbu kořenů u *Astragalus maximus*. Hasançebi a kol. (2010) zkoumali vliv MS média s 0,5 nebo 1,0 mg/l NAA, IBA nebo IAA na zakořeňování prýtů *Astragalus chrysochlorus*. Po 6 týdnech média s auxiny nepodnítila tvorbu kořenů. Celkem 93 % explantátů vytvářelo kořeny na MS médiu bez obsahu růstových regulátorů. Úspěšná tvorba kořenů v intervalu 30–60 dnů

proběhla na tekutém MS médiu s 0,5 mg/l NAA. Dilaver a kol. (2017) zvolili pro zakořeňování *Astragalus vulnerariae* MS médium s obsahem 0,5 mg/l IBA. V našich experimentech rostliny kozince blanitého kořenily pouze na ½ MS médiu s obsahem 0,1 IBA.

5.3.2 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)

Zuzarte a kol. (2010) zvolili pro zakořeňování *Lavandula pedunculata* MS médium. Za 30 dní celkem 73,16 % explantátů vytvářelo kořeny. MS médium bez růstových regulátorů pro zakořeňování *Lavandula latifolia* zvolili i Calvo a Segura (1989). Minh a kol. (2017) uvádí optimální médium pro tvorbu kořenů u *Lavandula angustifolia* MS médium s obsahem 0,1 mg/l IAA. Média s obsahem IBA a NAA nebyly vhodné pro zakořeňování *Lavandula angustifolia*. Andrys a kol. (2017) použili pro zakořeňování média s obsahem růstového regulátoru IBA. Koncentrace 0,1 – 0,2 mg/l a 0,75 mg/l IBA iniciovala tvorbu kořenů. Nejdelší kořeny 1,1 – 2,5 cm byly vytvořeny na médiu s 0,2 mg/l IBA. Mokhtazadeh a kol. (2019) použili pro zakořeňování *Lavandula stoechas* MS médium s 1 mg/l IBA. V našich experimentech proběhlo kořenění levandule nejlépe na MS médiu s obsahem 0,5 IBA a ½ MS. Vhodnost použití růstového regulátoru IBA pro kořenění prýtů souhlasí s Andrys a kol. (2017).

5.3.3 Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*)

Hosseini a kol. (2016) testovali MS médium s obsahem IBA o různých koncentracích (0,02, 0,5, 1,0 a 2 mol/l). Největší procento kořenění (89,5 %) bylo získáno na MS médiu s obsahem 2 mol/l IBA. Rostliny kultivované na MS médiu bez růstových regulátorů kořenily z 20 %. Ze závěru studie vyplývá, že zvyšující koncentrace podpořila tvorbu kořenů. Zayova a kol. (2018) sledovali vliv ½ MS s obsahem růstových regulátorů IBA, NAA, IAA: Nejvhodnější médium zakořeňování *Hyssopus officinalis* bylo ½ MS s obsahem 0,1 mg/l IBA. Celkem 85 % rostlin vytvářelo kořeny s průměrnou délkou 1,1 cm. V experimentech jsme testovali stejné médium jako Zayova a kol. (2018) – ½ MS s obsahem 0,1 IBA, na kterém rostliny vytvářely krátké a málo větvené kořeny s průměrnou délkou 1,2 cm, což se shoduje s výsledky Zayova a kol. (2018). Optimální medium bylo v našich experimentech MS médium s obsahem 0,5 IBA, stejně jako u Hosseini a kol. (2016), kdy zvyšující se obsah růstového regulátoru IBA podpořil tvorbu kořenů.

5.4 Převod do *in vivo* podmínek

Pro převod *Ocimum sanctum* do nesterilních podmínek použili Singh a Segal (1999) směs vermikulitu a sterilní zeminy v poměru 1:1. Stejný substrát zvolili pro převod rostlin *Ocimum basalicum* i Saha a kol. (2010). Dode a kol. (2003) úspěšně převedli do nesterilních podmínek rostliny *Ocimum sanctum* použitím zeminy stejně jako Banu a Bari (2007). Jamal a kol. (2016) testovali po převod rostlin *Ocimum sanctum* směs půdy, písku a hnojiva v poměru 1:1:1. Pro převod rostlin *Ocimum sanctum* byly v našich experimentech zvoleny rašelinové sadbovače (jiffy) a převod rostlin byl 100%.

Dilaver a kol. (2017) umístili zakořeněné rostliny *Astragalus vulnerariae* do rašelinových sadbovačů. Rostliny se aklimatizovaly se 78% úspěšností. Hill a kol. (2015) použili pro převod rostlin *Astragalus holmgreniorum*. Hasançebi a kol. (2011) zvolili u rostlin *Astragalus chrysochlorus* směs zeminy s 15 % perlitu, celkem 77 % rostlin se v *in vivo* podmínkách aklimatizovalo.

Calvo a Segura (1989) použili pro převod rostlin *Lavandula latifolia* zeminu. Miclea a Chifor (2008) testovali pro převod rostlin *Lavandula latifolia* směs vermikulitu, perlitu a písku v poměru 2:2:1 a směs rašeliny a písku 1:2. Obě varianty byly pro převod rostlin vhodné, více aklimatizovaných rostlin bylo na směsi vermikulitu, perlitu a písku. Mokhtazadeh a kol. (2019) zvolili pro převod *Latifolia stoechas* rašelinové sadbovače.

Zayova a kol. (2018) zkoumali různé směsi substrátů pro efektivní převod rostlin *Hyssopus officinal*is – zemina, písek, perlit (2:1:1), zemina, rašelina, perlit (2:1:1), zemina, kokosové vlákno, perlit (2:1:1). Nejvyšší procento aklimatizovaných rostlin (85 %) bylo na směsi zemina, písek, perlit (2:1:1).

5.5 Zařazení biotechnologií do výuky

Zařazení odborného tématu Mikropropagace u vybraných zástupců čeledi *Fabaceae* a *Lamiaceae* proběhlo v rámci pedagogických praxí. Žáci a studenti byli během výuky pozorní a aktivní. Nejvíce se žákům a studentům líbila praktická ukázka léčivých bylin, kde se naučili poznávat zástupce čeledi *Lamiaceae*. Výuka byla kladně hodnocena i pedagogy, kteří se seminářů zúčastnili. Zařazení biolotechnologií do výuky na základní škole i gymnáziu pomohlo zvýšit zájem studentů o studium biologie. Odborné téma mikropropagace rostlin zatraktivnilo a zmodernizovalo výuku. Žáci a studenti se dozvěděli informace o významu a praktickém využití biotechnologií v praxi.

6. Závěr

Předkládaná diplomová práce pojednává o mikropropagaci u vybraných druhů *Fabaceae* a *Lamiaceae*.

- Pro povrchovou sterilizaci rostlinného materiálu byl zvolen následující postup:
  semena – 70% ethanol 2 minuty a 2,5 % chloramin T 15 minut
  prýty – optimalizace postupu sterilizace byla úspěšná, explantáty neprorůstaly
- Pro mikropropagaci bylo nejvhodnější použití médií:
  bazalka posvátná – MS médium; 0,1 BAP; 20 mg KA
  kozinec blanitý – MS médium; 1,0 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 20 mg/l KA
  levandule lékařská – MS médium; 1,0 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 20 mg/l KA
  yzop lékařský – MS médium; 1,0 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 20 mg/l KA
- Doba pasáže byla odlišná u jednotlivých rodů:
  bazalka posvátná, yzop lékařský – 6 týdnů
  kozinec blanitý – 11 týdnů
  levandule lékařská – 13 týdnů
- Nejvhodnější médium pro tvorba kořenů v *in vitro* bylo:
  kozinec blanitý – ½ MS médium; 0,1 mg/l IBA
  levandule lékařská – ½ MS médium; MS médium; 0,5 mg/l IBA
  yzop lékařský – MS médium; 0,5 mg/l IBA.
- Rašelinové sadbovače (jiffy) byly vhodné pro převod rostlin do *in vivo* podmínek.
- Téma mikropropagace u léčivých rostlin bylo zařazeno dle Rámcového vzdělávacího programu do tematického celku Biologie rostlin v rámci výuky přírodopisu na základní škole i v rámci výuky biologie na střední škole během pedagogické praxe. Výuka byla kladně hodnocena pedagogy, žáky i studenty.

7. Použitá literatura

1. Adaszynska M, Swarcewicz M, Dobrowolska A (2011) Chemical and mineral composition in varieties of lavender (Lavandula augustifolia). Prog. Plant Prot. 51(1):15-20
2. Alberts A., Mullen P., Spohn M. (2006) Léčivé stromy a keře: jednotlivé druhy a jejich léčebné účinky. 1. vyd. Beta – Dobrovský, Praha
3. Andrys D., Kulpa D., Grzeszczuk M., Bihun M., Dobrowolska A. (2017) Antioxidant and antimicrobial activities of *Lavandula angustifolia* Mill. Fiel-grown and propagated *in vitro*. Folia Horticulturae 29(2):161 – 180
4. Banu L. A., Bari M. A. (2007) Protocol Establishment for Multiplication and Regeneration of *Ocimum sanctum* Linn.An Important Medicinal Plant with High Religious Value in Bangladesh. Journal of Plant Science 2(5): 530 – 537
5. Bernotienė G., Butkienė R. (2010) Essential oils of Hyssopus officinalis L. cultivated in East Lithuania. Chemija 21 (2 – 4):135 – 138
6. Bohne B., Volk. R., Volk F., Dittus – Bär R. (2011) Léčivé bylinky ve vaší zahradě a kuchyni: vše o sázení, pěstování a vaření. 1. vyd. Computer press, Brno
7. Borhanuddin M. (2016) Study of Antihypertensive effects of *Ocimum sanctum*. Bangladesh Journal of Medicinal Science 15(3):357 – 361
8. Borovec V., Dušek K., Vondráková D. (1990) Meristémová kultura levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*). Výzkumný a šlechtitelský ústav zelinářský, Olomouc
9. Bühring U. (2010) Léčivé rostliny: obsahové látky, zpracování, základní recepty. 1. vyd. Knižní klub, Praha
10. Brown SA(1962) Biosynthesis of coumarin and herniarin in lavender. Science 137(3534):977 – 8
11. Calvo M. C., Segura J. (1988) In Vitro Morphogenesis from Explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* Seedlings. Scientia Horticulturae36:131 – 137
12. Calvo M. C., Segura J. (1989) In Vitro Propagation of Lavander. HortScience 24(2):375 – 376
13. Calvo M. C., Segura J. (1989) Plant regeneration from cultured leaves of *Lavandula latifolia* Medicus: Influence of growth regulators and illumination conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19: 33 – 42

14. Cronquist A. (1988) The Evolution and classification of flowering plants. Ed. 2, New York Botanical Garden, USA
15. Darwesh H. Y., Alayafi A. A. (2018) *In vitro* Propagation Response of *Rosmarinus officinalis* L. to Biotic and Abiotic Elicitors on Phenolic Content and Photosynthetic Pigments. Journal of Agricultural Science 10(2): 301 – 306
16. Dilaver Z., Mirzapour M., Kendir H. (2017) Breaking seed dormancy and micropropagation of perennial *Vulnerarria Milkvetch* (*Astragalus vulnerariae* DC.) Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 16(4) 79 – 88
17. Dode L. B., Bobrowski V. L., Braga E. J. B., Seixas F. K., Schch M. W. (2003) *In vitro* propagation of *Ocimum basalicum* L. (*Lamiaceae*). Acta Scientiarum. Biological Sciences 25(2): 435 – 437
18. Gato M. (2013) Léčivé rostliny: v praktickém bylinkářství, kosmetice a kuchyni. 1. vyd. Rubico, Olomouc
19. Gonçalves s., Romano A. (2013) *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. Biotechnology Advances 31: 166 – 174
20. Han M. S., Noh S. A., Kwak M. C., Moon H. K. (2014) Micropropagation of a rare plant species, *Astragalus membranaceus* Bunge var. *alpinus* N. Journal of Plant Biotechnology 41: 100 – 106
21. Hasançebi S., Turgut Kara N., Çakir Ő., Şule A. (2011) Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (*Leguminosae*). Turkish Journal of Botany 35: 203 – 210
22. Hassanshahian M., Saadatfar A., Masoumi F. (2017) Antimicrobial Properties of *Hyssopus Officinalis* Extract Against Antibiotic – Resistant Bacteria in Planktonic and Biofilm Form 28(7):97 – 101
23. Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson M. E. (2012) Fundamentals of phamacognosy and phytotherapy, 2. vyd. Edinburgh: Churchill livingstone – Elsevier
24. Hemzal B. (2015) Rostlinné léky. Nakladatelství NEPTUN, Brno
25. Hendrych R. (1986) Systém a evoluce vyšších rostlin: Učeb. Přehled. 2., upr. vyd., Praha
26. Hill P., Gutierrez B., Carmack L., Kopp O. R. (2015) Micropropagation of *Astragalus holmgreniorum* (*Holmgren milkvetch*), an endemic and endangered species. Plant cell tissue and organ culture 121: 381 – 387

27. Hirotani M., Zhou Y., Lui H., Furuya T. (1994) Astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. Phytochemistry 36(3): 665 – 670
28. Hosseini B., Alizadeh M., Hassani A., Jafari M., Rahimi A. (2016) High – Frequency in Vitro Direct Shoot Regeneraion from Nodal Explants of Hyssop Plant (*Hyssopus officinalis* L.). Journal of Medicinal Plants and By – products 2: 187 – 193
29. Hradilík J. (2005) Rostlinné explantáty. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno
30. Hurstová K. (2019) Pozoruhodný svět bylin: 150 druhů z celého světa a jejich využití. Euromedia, Praha
31. Chen L., Gao S. (2007) *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Scientia Horticulturae 112: 339 – 344
32. Chinery M. (2002) Flóra a fauna Evropy. 2. vyd. Nakladatelství Slovart, Praha
33. Ionkova I., Shkondrov A., Krasteva I., Ionkov T. (2014) Recent progress in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of *Astragalus* saponins. Phytochemistry reviews 13: 343 – 374
34. Jablonský I., Bajer J. (2007) Rostliny pro posílení organismu a zdraví. vyd.1. Grada, Praha
35. Jahodář L. (2011) Farmakobotanika semenné rostliny. Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelství Karolinum
36. Jamal N. A. H. M., Sharif I. H., Shakil M. M., Rahman A. N. M. R., Banu N. A., Islam M. R., Nazmuzzaman M. (2016) *In vitro* regeneration of a common medicinal plant, *Ocimum sanctum* L. for mass propagation. African Journal of Biotechnology 15(24): 1269 – 1275
37. Jirásek V., Starý F. (1989) Atlas léčivých rostlin. 2.vyd. Státní nakladatelství, Praha
38. Korbelář J., Endris Z. (1990) Naše rostliny v lékařství. 7. vyd. Avicenum, Praha
39. Köszeghi S., Bereczki C., Balog A., Benedek K. (2014) Comparing the Effects of Benzyladenine and meta – Topolin on Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) Micropropagation. Natulae Scientia Biologicae 6(4): 422 – 427
40. Khan F., Saeed A. (2012) Evaluation of comparative scavenging of in vitro grown Ocimum tenuiflorum (Tulsi) for copper and lead using atomic absorption spectroscopy. Pakistan Journal of Science 64(2): 117 – 131

41. Kuhlmann A., Röhl C. (2006) Phenolic Antioxidant Compounds Produced by in Vitro Cultures of Rosmary (*Rosmarinus officinalis*) and Their Anti – inflammatory Effect on Lipopolysaccharide – Activated Microglia. Pharmaceutical Biology 44(6): 401 – 410
42. Liu A., Yu J., Ji H., Zhang H., Zhang Y., Liu H. (2017) Extraction of a Novel Cold – Water – Soluble Polysaccharide from *Astragalus membranaceus* and Its Antitumor and Immunological Activities. Molecules 23(62): 1 – 13
43. Luo J. – P., Jia J. –F. (1998) Callus induction and plant regeneration from hypokotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. Plant Cell Reports 17: 567 – 570
44. Luštinec J., Žárský V. (2003) Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Nakladatelství Karolinum, Praha
45. Machado M. P., Lopes da Silva A. L., Biasi L. A., Deschamps C., Filho J. C. B., Zanette F. (2014) Influence of Calcium Content of Tissue on Hyperhydricity and Shoot.Tip Necrosis of *in vitro* Regenerated Shoots of *Lavandula angustifolia* Mill. Brazilian archives of biology and biotechnology 57(5): 636 – 643
46. Manan A. A., Taha R. M., Mubarak E. E., Elias H. (2016) *In vitro* flowering, glandular trichomes ultrastructure, and essential accumulation in micropropagated Ocimum basilicum L. In Vitro Cellular & Developmental biology – plant 52: 303 – 314
47. Miclea I., Chifor R. (2018) Germination, *in vitro* Propagation and Acclimatization in *Lavandula Angustifolia*. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies 75(2):105 – 109
48. Mindell E., Mundisová H. (2010) Nová vitamínová bible: vitamíny, minerální látky, antioxidanty, léčivé rostliny, doplňky stravy, léčebné účinky potravin i léky používané v homeopatii. 3. vydání. Ikar. Praha
49. Minh Van T., Vinh D. T., Hos M. T., Khai P. C. (2017) Micropropagation of lavender (*Lavandula angustifolia*). Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences 4(2):07 – 11
50. Misra P., Chaturvedi H. C. (1984) Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L. Plant Cell Organ Culture 3: 163 – 168
51. Mokhtarzadeh S., Demirci B., Agalar H. G., Khawar K. M., Kurmer N. (2019) *In vitro* Propagation and Volatile Compound Characterization of Lavandula stoechas

L. subsp. Stoechas – An Economically Important records of natural products 13(2): 121-128

52. Navrátilová Z., Patočka J. (2015) Bazalka posvátná a její účinky na nervový systém. Psychyatrie 19(2): 85 – 89
53. Nikšić H., Kovač – Bešović E., Makarević E., durić K., Kusturica J., Muratovic S. (2017) Antiproliferative antimicrobial, and antioxidant aktivity of *Lavandula angustifolia* Mill. Essential oil. Journal of Health Science 7(1):35 – 43
54. Ody P. (2004) Velký atlas léčivých rostlin (obrazový průvodce s léčivými bylinami s uvedením prostředků na běžná onemocnění. 2. vyd. Euromedia Group – Knižní klub, Praha
55. Ortemberg A. (2003) Mládneme s antioxidanty. 1. vyd. Ivo Železný, Praha
56. Pelikán J., Hýbl M. a kolektiv (2012) Rostliny čeledi *Fabaceae* LINDL. (bobovité) České republiky (se zvláštním zaměřením na druhy významné pro zemědělství). Zemědělský výzkum Troubsko
57. Pistelli L., Noccioli C., D´Angiolillo F., Pistelli L. (2013) Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from Tuscany Islands. Acta Biochimica Polonica 60(1): 43 – 50
58. Podlech D. (1997) Léčivé rostliny: kapesní atlas: praktická příručka k určování léčivých rostlin s návody na přírodní léčení. Slovart, Praha
59. Radulescu C., Stihi C., Ilie M., Lazurca D., Gruia R., Olaru O. T., Bute O. C., Dulama I. D., Stirbescu R. M., Teodorscu S., Florescu M. (2017) Characterization of Phenolics in *Lavandula angustifolia*. Analytical Letters 50(17): 2839 – 2850
60. Ritterová C. (2018) Rostlinná antibiotika si vyrobíme sami. Mladá fronta, Praha
61. Saha S., Dey T., Ghosh P. (2010) Micropropagation of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (Labiatae). Acta biologica Cracoviensia Seties Botanica 52(2): 50 – 58
62. Saha S., Ghosh P. D., Sengupta (2010) An efficient method for micropropagation of *Ocimum basilicum* L. Indian Journal of Plant Physiology 15(2): 168 – 172
63. Saharkhiz J. M., Kamyab A. A., Kazerani K. N., Zomorodian K., Pakshir K., Rahimi J. M. (2015) Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Ocimum sanctum L. Essential Oils and Different Harvest Stages. Undishapur Journal of Microbiology 8(1):e13720
64. Siddique I., Anis M. (2007) Rapid micropropagation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre – cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. Biologia Plantarum 51(4): 787 – 790

65. Simmonds M., Howes M. - J., Irving J. (2018) Léčivé rostliny na zahradu: ilustrovaný herbář a tradiční recepty. Euromedia, Praha
66. Singh N. K., Sehgal C. B. (1999) Micropropagation of „Holy Basil“ (Ocimum sanctum) inflorescence explants. Plant growth Regulation 29: 161 – 166
67. Spohnová M., Golte – Bechtleová M. (2010) Co tu kvete? Květena střední Evropy. Více než 1000 planých rostlin. Knižní klub, Praha
68. Streisand O., Mars B. (2017) Posvátné bylinky. Dobrovský, Praha
69. Turgut – Kara N., Ari S. (2006) Micropropagation of Astragalus Maximus Willd. Biotechnology & Biotechnological Equipment 20(1): 20 – 22
70. Toma I., Toma C., Ghiorghita G. (2004) Histo – anatomy and *in vitro* morphogenesis in *Hyssopus officinalis* L. (*Lamiaceae*). Acta Botanica Croatica.63(1): 59 – 68
71. Traxl V. (1992) Léčivé rostliny ze zahrady. Květ, Praha
72. Trigiano R., Gray D. J. (2005) Plant development and biotechnology. Boca Raton: CRC Press
73. Valíček P. (2005) Koření a jeho léčivé účinky. Start, Benešov
74. Verma S. K., Sahin G., Das A. K. (2016) *In vitro* plant regeneration of *Ocimum basilicum* L. is accelerated by zinc sulfate. *In Vitro* Cellular & Developmental biology – plant 52: 20 – 27
75. Wu S.Q., Lian M. L., Gao R., Park S. Y., Piao X. C. (2011) Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus*. *In Vitro* Cellular & Developmental biology – plant 47: 719 – 724
76. Yang B., Xiao B., Sun T. (2013) Antitumor and immunomodulatory aktivity of Astragalus membranaceus polysaccharides in H22 tumor – bearing mice. International Journal of Biological Macromolecules 62: 287 – 290
77. Yu J., Ji H., Liu A. (2018) Alcohol – soluble polysaccharide from Astragalus membranaceus: Preparation, characteristics and antitumor aktivity. International Journal of Bioological Macromolecules 118: 2057 – 2064
78. Zayova E., Geneva M., Stancheva I., Dimitrova L., Petrova M., Hristorkova M., Salamon I. (2018) Evaluation of the antioxidant potential in vitro propagated hyssop (Hyssopus officinalis L.) with different plant growth regulators. Medicinal Plants 10(4): 295 – 304

79. Zuzarte M. R., Dinis A. M., Cavaleiro C., Salgueiro L. R., Canhoto J. M. (2010) Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (*Lamiaceae*). Industrial Crops and Products 32: 580 – 587

8. Internetové zdroje

1 Astragalus-membranaceus. In: *BodyNutrition.org* [online]. USA, c2013 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: https://bodynutrition.org/astragalus-membranaceus/

2 RACEK, Jaroslav. Kozinec sladkolistý. In: *Elektronický herbář* [online]. Milíkov u Stříbra, 2010 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: http://www.e-herbar.net/main.php?g2_itemId=11941

3 Bazalka pravá. In: *Bylinná lékarna v Plzni* [online]. Plzeň, 2020 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: https://www.bylinnalekarna.cz/bazalka-prava-ocimum-basilicum

4 ŠINDELÁŘ, Petr. Bazalka posvátná. In: *Bylinkovo.cz* [online]. Praha: Fiko Media, c2020 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: https://www.bylinkovo.cz/bazalka-posvatna/

5 Levandule lékařská. In: *Strakovo* [online]. Bystřice nad Pernštejnem: IWE studio, c2020 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: https://www.zcstrakovo.cz/produkt/lavandula-angustifolia-dwarf-blue-p11/

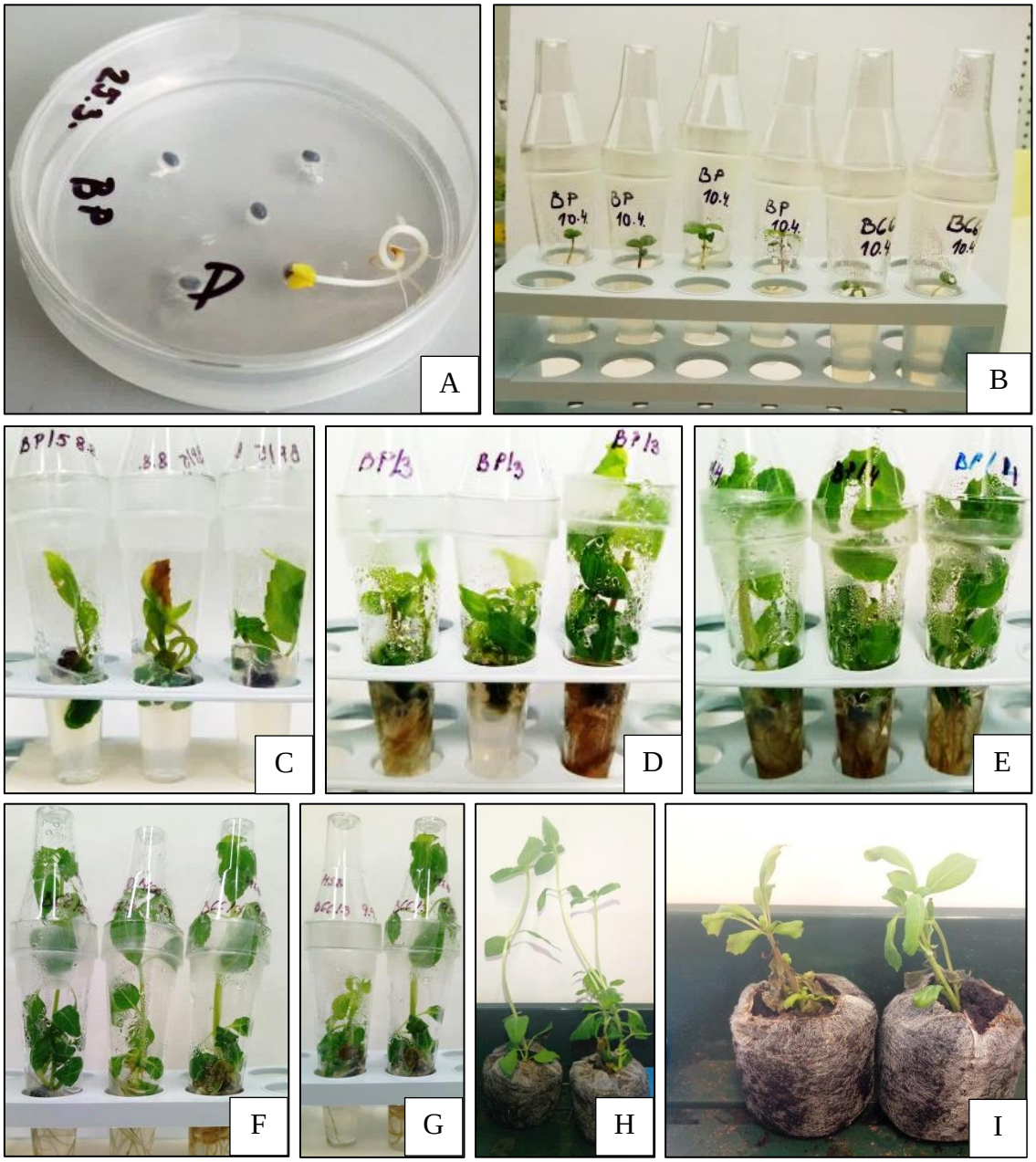
6 ZÁVORCOVÁ, Petra. Rozmarýn lékařský. In: *Bylinkove-zahradnictvi.cz* [online]. Praha, 2018 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: https://www.bylinkove-zahradnictvi.cz/p/304/rozmaryn-lekarsky-rosmarinus-officinalis

7 Yzop lékařský. In: *Logo Lukon bulbs* [online]. Lovčice [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: https://lukon-bulbs.eu/yzop-lekarsky

9. Přílohy

9.1 Fotografické přílohy

Bazalka posvátná (*Ocimum sanctum*)

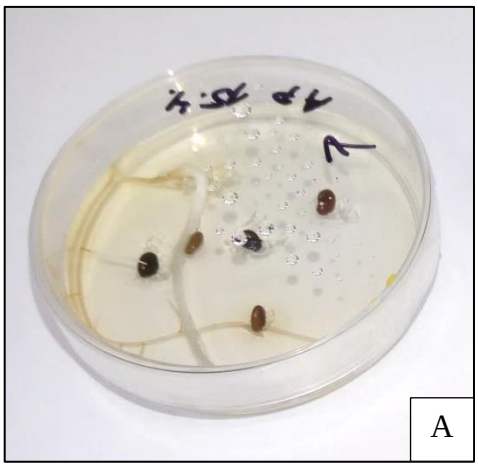


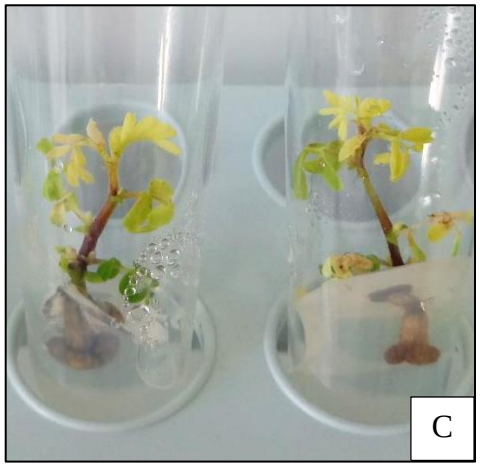
A – prorůstající semeno po 2 týdnech, B – rostliny na iniciačním médiu MSA,

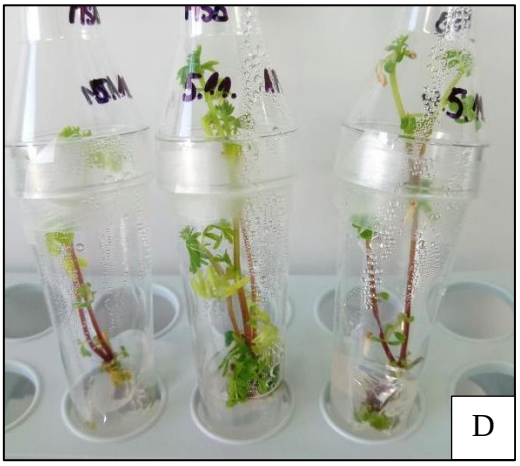
C – rostliny BP na médiu MSB, D, E – rostliny BP na médiu MSC

F – rostliny B66 na médiu MSA, G – rostliny B66 na médiu MSB, H, I rostliny v jiffech

Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*)





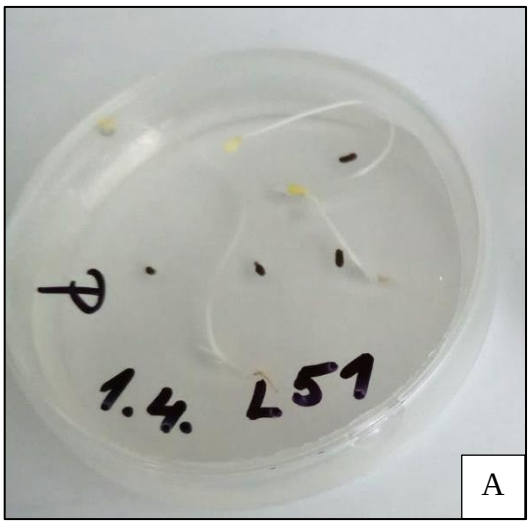


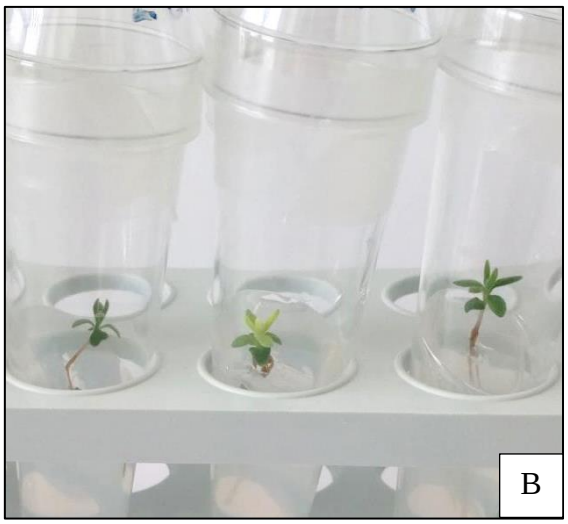
A – klíčící semeno, B – rostliny na iniciačním médiu MSA

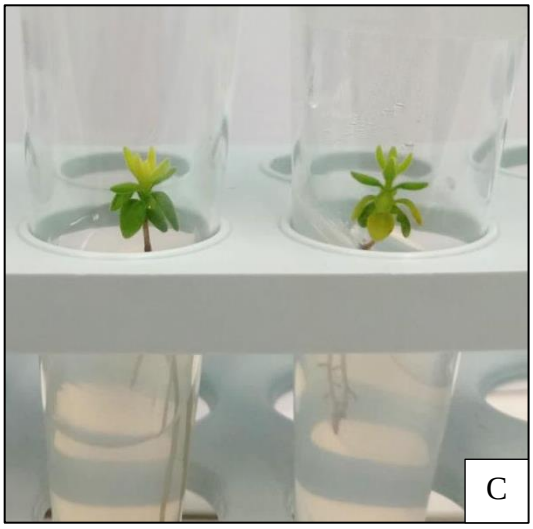
C – rostliny médiu MSA, D – rostliny na médiu MSB, E – rostliny médiu MSC,

F – rostliny na MS médiu pro zakořeňování

Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*)



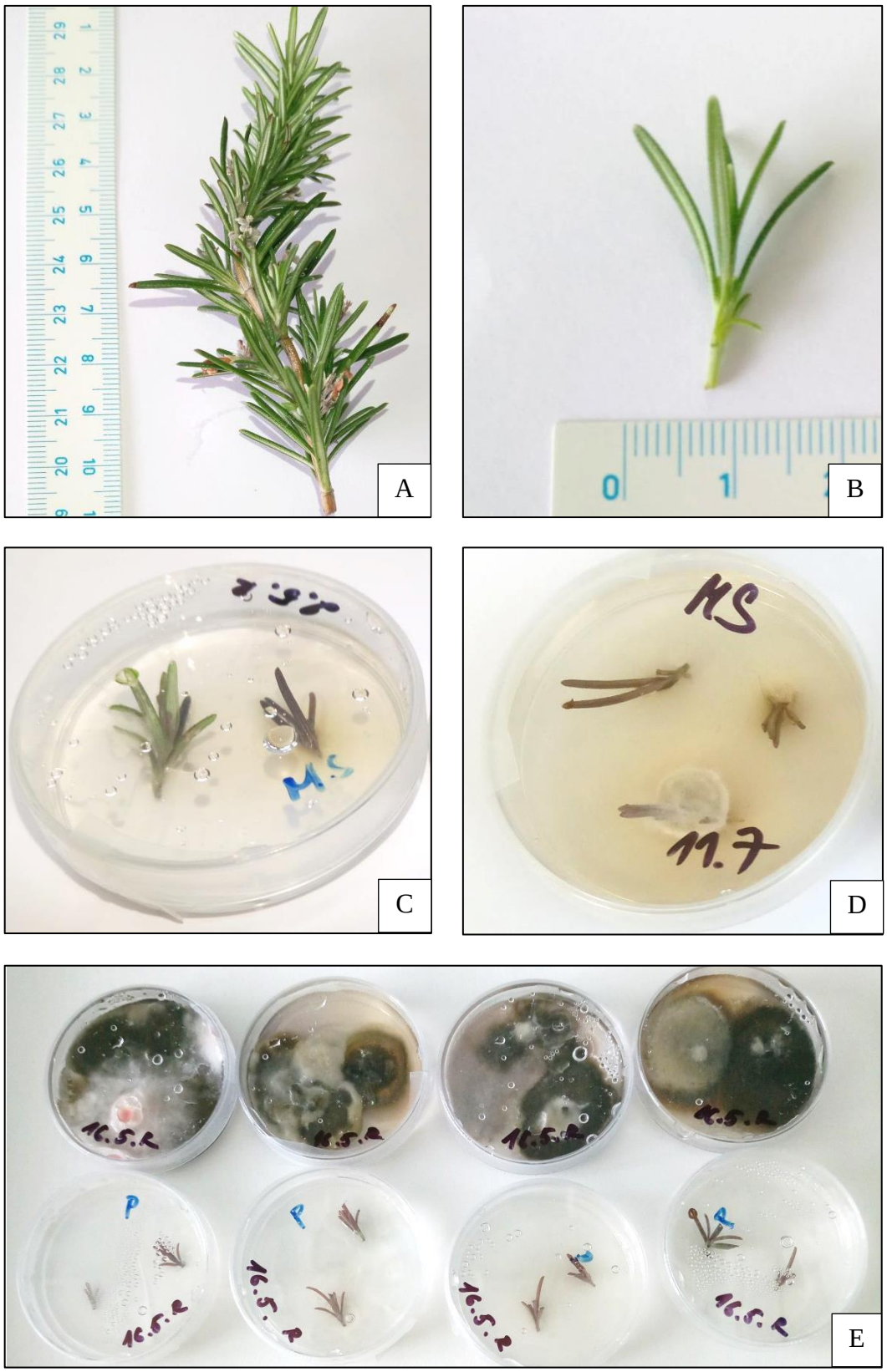




A – prorůstající semeno, B –7 týdnů na médiu MSA, C – 13 týdnů na MSA,

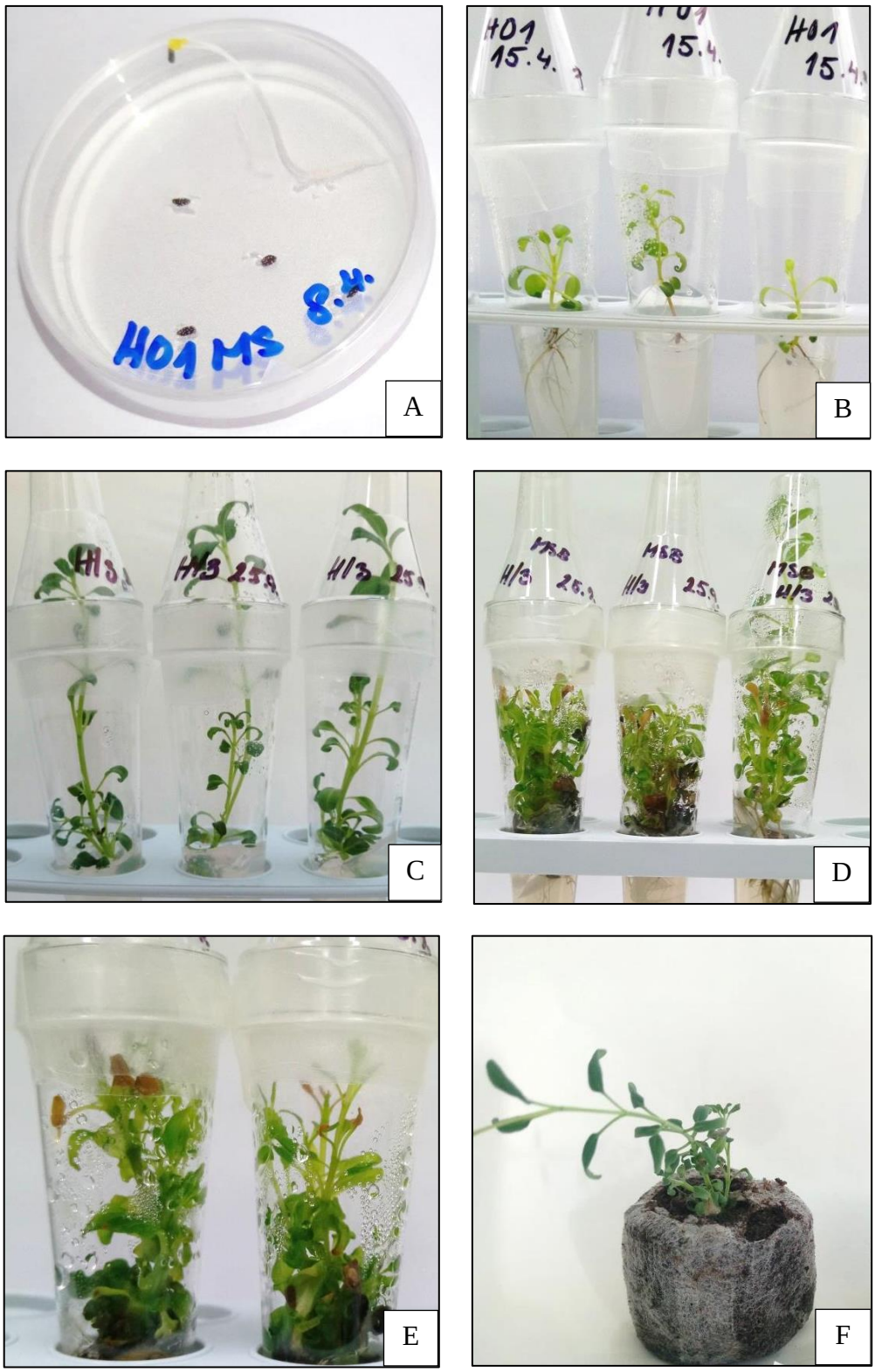
D – rostliny 12 týdnů na MSB, E – rostliny 12 týdnů na MSC, F – rostliny na médiu ½ MS + 0, 1 IBA pro zakořeňování

Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*)



A –větvička rozmarýnu lékařského, B – velikost explantátu, C, D – médium MS, E – horní řada MS, dolní řada MS + PPM

Yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*)



A – klíčící semeno, B – 1. pasáž na médium MSA, C – rostliny na médiu MSA,

D – rostliny na médiu MSB, E – rostliny na médiu MSC, F – převod do *in vivo* podmínek

9.2 Didaktické přílohy

9.2.1 Zařazení biotechnologií do výuky pro žáky na základní škole

FOTOSYNTÉZA

- děj, při kterém rostlina energii slunečního záření k syntéze organických látek (sacharidů) z jednoduchých anorganických látek (CO_2, H_2O)
- vedlejší produkt je kyslík
- děj probíhá v chloroplastech buněk za účasti fotosyntetických barviv (chlorofyl)

ROZMNOŽOVÁNÍ ROSTLIN

- **POHLAVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ**

- vzniká nový jedinec po splynutá 2 pohlavních buněk (gamet)

- pomocí semen

- **NEPOHLAVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ**

- jednobuněčné řasy – dělením, pučením

- mnohobuněčné rostliny – z jedné buňky (výtrusy, spory), skupiny buněk (vegetativní r.)

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ FOTOSYNTÉZU

- světlo – kvalita a intenzita
- teplota – optimum 25 °C
- obsah CO_2
- dostatek vody a anorganických látek
- množství chloroplastů
- množství průduchů
- stáří rostliny

VEGETATIVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ

- jedinec vzniká z vegetativní části mateřského organismu
- založeno na velké schopnosti regenerace
- rostliny vytváří různé útvary rozmnožující vegetativní rozmnožování:

- šlahouny, hlízy, oddenky

- ovocné stromy se rozmnožují roubováním, očkováním

RŮST ROSTLINY

- charakterizován zvětšením objemu a hmotnosti rostliny
- rostliny rostou po celý svůj život
- **FÁZE RŮSTU BUNĚK**:
- **ZÁRODEČNÁ FÁZE** - v dělivých pletivech, vznik nových buněk
- **ELONGAČNÍ FÁZE -** v této fázi se buňky nedělí, zvětšují svůj objem
- **ROZLIŠOVACÍ –** dochází ke specializaci buněk

Mikropropagace u léčivých rostlin

Sylvie Vašinová

REGENERACE ROSTLIN

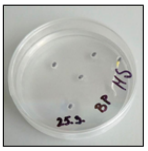
- proces opravy poškozených částí rostlin, nahrazení ztracených částí rostlin, orgánů
- zprostředkovávají ji dělivé pletiva (meristémy)

Práce s EK

- EK
- Laboratoř – přístroje – autokláv, termostat, lednice
- Chemikálie, laboratorní pomůcky – sklo, plast
- Chirurgické nářadí
- Kultivační místnost – světlo 16/8 (den/noc)

Kultivační médium

- EK vyžadují :
  - makro- a mikroprvky
  - cukry
  - vitamíny
  - antibiotika
  - růstové regulátory
  - zpevňující složka (vata, agar)

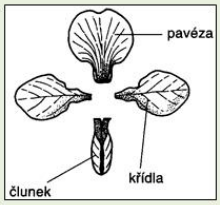


bobovité

- 236 rodů, 6900 – 7200 druhů
- okrasné druhy, potraviny, krmivo
- Sója, bob, hrách

Využití EK

- Genová banka
- Šlechtění rostlin
- GMO
- Využití obsahových látek

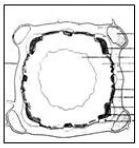


mikropropagace

- Soubor technik in vitro
- Rychlé namnožení rostlin
- Rostliny bez patogenů
- Fáze:
  - založení aseptické kultury
  - zmnožení explantátu
  - zakořeňování in vitro
  - převod do nesterilních podmínek

hluchavkovité

- Dvoupyská koruna
- Čtyřhranný stonek
- Hluchavka, šalvěj, máta, levandule



levandule

- Parfémy
- Nespavost
- Poranění
- Repelent proti hmyzu
- Uklidňující účinky

mateřídouška

- tymol
- Používá se při otravě jídlem
- Tlumí křeče v zažívacím ústrojí
- Dezinfekční působení
- Užívá se při kašli

bazalka

- Obsahuje karoten, askorbovou kyselinu
- Olej – příjemná vůně
- Působí proti bakteriím, bolesti
- Uklidňuje nervovou soustavu
- Pomáhá při zánětu průdušek

máta

- Mentol
- Žaludeční potíže
- Pomáhá při nevolnosti při cestování
- Bolest hlavy
- Odpuzuje hmyz

tymián

- Provensálské koření
- Kloktání, koupele, inhalace – chřipka, kašel, rýma
- Pomáhá při zažívacích obtížích

meduňka

- Citrónová vůně
- Snižuje krevní tlak
- Léčí opary
- Repelent, hmyzí bodnutí
- Ovlivňuje nervovou činnost
- Kosmetika, saláty

rozmarýn

- kyselina rozmarýnová
- karnosol, karnosolová kyselina
- Protizánětlivé účinky
- Pomáhá při bakteriálních i virových onemocnění
- Olej - koupele

yzop

- 30 – 60 cm vysoká rostlina
- Pomáhá při kašli, bolesti krku, nachlazení
- Léčí zánět průdušek, astma
- Olej - likéry

kozinec

- 2000 – 3000 druhů,
- V tradiční čínské medicíně – cukrovka, vysoký krevní tlak, leukémie
- Přísady do čaje a kávy

Zdroje

[illegible]

Biologie rostlin – pracovní list č. 1

1. Vysvětli základní fyziologické procesy (fotosyntéza, rozmnožování, růst)

……

……

……

2. Popiš způsoby rozmnožování rostlin (pohlavní, nepohlavní). Uveď příklady.

……

……

……

3. Charakterizuj princip fotosyntézy, její význam a faktory ovlivňující intenzitu fotosyntézy

……

……

4. Vysvětli regeneraci (obnovu) rostliny.

……

……

……

……

……

5. Jakým způsobem se pěstují rostliny v *in vitro* podmínkách?

……

……

6. Objasni princip metody mikropropagace.

……

……

……

7. Uspořádej fáze mikropropagace.

……

……

……

8. Napiš, jak se jmenují látky ovlivňující růst rostliny?

……

Mikropropagace u léčivých rostlin – pracovní list č. 2

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.

1. Většina rostlin pěstovaných *in vitro* není plně schopna
   a) fotosyntézy E
   b) kořenění T
   c) růstu D

2. Při práci s explantáty se používá
   a) sterilní chirurgické nářadí X
   b) nesterilní chirurgické nářadí O
   c) žiletka I

3. Nejčastější zpevňující složkou média je
   a) vata S
   b) agar P
   c) želatina A

4. Pro založení aseptické kultury je nutné rostlinný materiál
   a) povrchově sterilizovat L
   b) rozdrtit U
   c) spálit T

5. Z jakého počtu okvětních lístků se skládá květ bobovitých
   a) 5 A
   b) 4 I
   c) 3 E

6. Při otravě jídlem se používá
   a) mateřídouška N
   b) yzop K
   c) kozinec E

7. Mentol je obsažen v
   a) tymiánu A
   b) mátě T
   c) bazalce L

8. Jako přísada do kávy a čaje používá
   a) levandule I
   b) bazalka K
   c) kozinec Á

9. Do parfémů se hojně používá
   a) levandule T
   b) yzop V
   c) tymián O

Tajenka: EXPLANTÁT

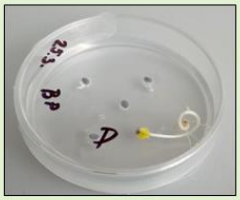
Fotodokumentace výuky pro žáky na základní škole

A – poznávání zástupců čeledi *Lamiaceae*

B – seminář k mikropropagaci rostlin

9.2.2 Zařazení biotechnologií pro studenty na střední škole

Mikropropagace u léčivých rostlin



Sylvie Vašinová

Růstové regulátory

- **KLASICKÉ:**

- AUXINY
- CYTOKININY
- GIBERELINY
- KYSELINA ABSCISOVÁ
- ETYLÉN

Práce s EK

- EK
- Laboratoř – přístroje – autokláv, termostat, lednice
- Chemikálie, laboratorní pomůcky – sklo, plast
- Chirurgické nářadí
- Kultivační místnost – světlo 16/8 (den/noc)

Auxiny

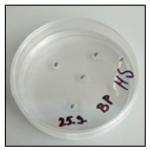
- **Syntéza**: ve vzrostných vrcholech mladých listech
- Růst a tvorba kořenů
- Dělení kambiálních buněk
- Tvorba semen
- IAA, IBA, NAA

Giberelíny

- Syntéza: v mladých listech, klíčících semenech, kořenech
- Růst stonku
- Klíčení semen
- Stimulace růstu
- GA_3

Kultivační médium

- EK vyžadují :



makro- a mikroprvky
cukry
vitamíny
antibiotika
růstové regulátory
zpevňující složka (vata, agar)

Cytokininy

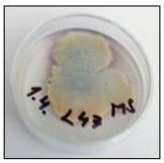
- **Syntéza:** v kořenových špičkách, kořenech, mladých listech
- Tvorba pupenů
- Zrychlení buněčného cyklu
- Stimulace fotosyntézy
- KIN, BAP, TDZ

Kyselina abscisová

- **Syntéza**: ve stárnoucích listech
- Antagonista cytokininů
- Zpomaluje růst
- Podporuje opad listů, plodů
- Brzdí klíčení

Založení aseptické kultury

- Sterilizační roztoky (NaClO, EtOH, $HgCl_2$)



Využití EK

- Genová banka
- Šlechtění rostlin
- GMO
- Využití obsahových látek
- Rostliny bez virových onemocnění

Zmnožení explantátu

- Namnožení počtu prýtů vlivem růstových regulátorů

Mikropropagace

- Soubor technik *in vitro* s cílem namnožení rostlinného materiálu
- Nejčastější jsou metody:
  - kultury vzrostných vrcholů
  - kultury stonkových řízků
  - organogeneze
  - adventivní embryonie

Zakořeňování in vitro

- Vytvoření kořenového systému

Fáze mikropropagace

- založení aseptické kultury
- zmnožení explantátu
- zakořeňování in vitro
- převod do nesterilních podmínek

Převod do nesterilních podmínek

- Aklimatizace
- Snížení vzdušné vlhkosti
- Nejčastěji rašelina, perlit

Výhody mikropropagace

- Geneticky stabilní
- Rychlé namnožení rostlin
- Minimální nároky na prostor
- Světový průmysl: 350 miliónů rostlin/rok

meduňka lékařská

- Původ ve Středozemí
- **Sběr:** listy, nať
- **Účinné látky:**
- 4% třísloviny
- organické kyseliny
- hořčin, vitamín C

Sekundární metabolity

- Látky neúčastnící se procesu růstu, vývoje či rozmnožování daného organismu
- Alkaloidy, glykosidy, silice, třísloviny, hořčiny
- Funkce:
  - adaptace rostlin k vnějšímu prostředí
  - překonávání stresových podmínek
  - ochranná
- Význam:
  - v lékařství, potravinářství, kosmetologii

meduňka lékařská

- **Léčivé účinky:**
- uklidnění nervové soustavy
- poruchy trávení
- úprava činnosti srdce

Elicitace

- Zdokonalení, zvýšení produkce sekundárních metabolitů u rostlin
- Na počátku obranné reakce je specifický metabolit (elicitor)
- Elicitor
  - je uvolněn při počáteční interakci buňky s patogenem
  - polysacharidy, specifické enzymy, peptidy

máta peprná

- **Sběr:** vrcholky natě
- **Účinné látky:**
- 1-2 % silice(menthol, menthon), flavonoidy
- třísloviny, hořčiny

hluchavka bílá

- Celá Evropa, Asie, S Amerika
- **Sběr:** vrcholky natě, korunní lístky
- **Účinné látky:** saponiny
- **Léčivé účinky:**
- uvolňování hlenů
- dýchací obtíže
- protizánětlivé
- močopudné účinky

máta peprná

- **Léčivé účinky:**
- mírnění bolesti (menthol)
- protizánětlivé účinky (čaje, kloktadla, inhalační směsi)
- podpora vylučování žluče

šalvěj lékařská

- Původ ze Středomoří
- **Sběr:**

- listy, vrcholky rostlin

- **Účinné látky:**
- tujony, salviol, cineol
- třísloviny, flavonoidy
- oxyterpenové kyseliny

mateřídouška úzkolistá

- Nížiny až subalpínské pásmo
- **Sběr:** nezdřevnatělé části natě
- **Účinné látky:**
- tymol, karvakrol -> dezinfekční účinky
- hořčiny, třísloviny
- flavonoidy, fytoncidy

šalvěj lékařská

- **Léčivé účinky:**
- působí protizánětlivě, baktericidně
- močopudné, dezinfekční účinky
- ovlivňuje trávící soustavu
- ve větších dávkách jedovatá

mateřídouška úzkolistá

- **Léčivé účinky:**
- protivirové, protibakteriální, protiplísňové
- kloktadlo – zánět krku, ústní dutiny
- trávicí poruchy, nervové vyčerpání, přecitlivělost

levandule lékařská

- Původem ze Středomoří až Indie
- Silice v trichomech kalichu
- **Účinné látky:**
- linalylacetát, třísloviny
- hořčiny
- linalol

rozmarýn lékařský

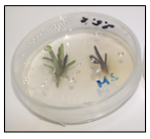
- Středozemí
- **Účinné látky:**
- borneol, cineol
- třísloviny, hořčiny, saponiny
- rozmarýnová kyselina
- karnosol

levandule lékařská

- **Léčivé účinky:**
- nespavost, srdeční potíže
- nervozita, závratě
- trávicí potíže
- odpuzování hmyzu

rozmarýn lékařský

- **Léčivé účinky:**
- ovl. vylučování žaludečních šťáv, žluči i moči
- tiší bolest
- zvyšuje prokrvení
- povzbuzuje nervovou činnost



yzop lékařský

- Původ Střední Asie, Středomoří
- **Sběr:**
- nať
- **Účinné látky:**
- pinocamphen

yzop lékařský

- **Léčivé účinky:**
- protizánětlivé účinky
- pomáhá při kašli, bolesti krku, nachlazení
- léčí astma, zánět průdušek

bazalka pravá

- Původem z jižní Asie
- **Sběr:**
- Nať
- **Účinné látky:**
- metylchalvikol, lilanol
- třísloviny, saponiny
- flavonoidy

bazalka pravá

- **Léčivé účinky:**
- chronický zánět průdušek
- Potíže trávicího ústrojí
- špatně se hojící rány

zběhovec plazivý

- Subatlanský druh
- **Účinné látky:**
- třísloviny, hořčiny, min. látky
- organické kyseliny
- **Léčivé účinky:**
- záněty dýchacích cest
- kašel a nachlazení

ZDROJE

- Kultury léčivých rostlin *in vitro*, Lucie Kunzová
- Produkce sekundárních metabolitů v rostlinných explantátových kulturách, Týmalová Kateřina
- Kultury léčivých rostlin *in vitro* – IXX, Seidlová Markéta
- https://www.google.com/search?q=thymus+vulgaris&source=lnms&tbm=isch[illegible]
- https://www.google.com/search?biw=1517&bih=640&tbm=isch[illegible]
- https://www.google.com/search?hl=[illegible]
- https://www.google.com/search?hl=[illegible]
- https://www.google.com/search?hl=[illegible]
- https://www.google.com/search?q=[illegible]
- https://www.google.com/search?biw=1517&bih=640&tbm=isch[illegible]
- https://www.google.com/search?biw=1517&bih=640&tbm=isch[illegible]
- https://www.google.com/search?biw=1517&bih=640&tbm=isch[illegible]
- https://www.google.com/search?biw=1517&bih=640&tbm=isch[illegible]

Biologie rostlin – pracovní list č. 1

1. Uveď výhody pěstování rostlin *in vitro.*

   …….

   ……

   …….

2. Vytvoř dvojice (růstový regulátor a jeho funkce).

1. AUXIN	A) TVORBA PUPENŮ
2. CYTOKININ	B) RŮST A TVORBA KOŘENŮ
3. KYSELINA ABSCISOVÁ	C) RŮST STONKU
4. GIBERELINY	D) OPAD LISTŮ

   1. ……
   2. ……
   3. ……
   4. ……

3. Uspořádej fáze mikropropagace.

   PŘEVOD DO NESTERILNÍCH PODMÍNEK
   ZALOŽENÍ ASEPTICKÉ KULTURY
   ZMNOŽENÍ EXPLANTÁTU
   ZAKOŘEŇOVÁNÍ *IN VITRO*

   1. ……
   2. ……
   3. ……
   4. ……

4. Jaké sloučeniny obsahuje kultivační médium?

   ……

   ……

   ……

5. Co jsou to sekundární metabolity? Jaké mají tyto látky využití?

   ……

   ……

6. Každá rostlinná buňka obsahuje genetickou informaci pro vytvoření celé rostliny. Jak se tato vlastnost nazývá?

   ……

   ……

   ……...

ŘEŠENÍ:

2.

1.B, 2.A, 3.D, 4.C

Mikropropagace u léčivých rostlin – pracovní list č. 2

1.	2.	3.	4.	5.	6.

10. Salviol je obsažen
    d) mátě T
    e) šalvěj M
    f) hluchavka I

11. Hmyzí parazity odpuzuje
    d) mateřídouška A
    e) bazalka R
    f) levandule É

12. Tymol je účinná látka obsažená v
    d) mateřídoušce D
    e) rozmarýnu N
    f) yzopu O

13. Pro prokrvení končetin se používá
    d) bazalka S
    e) rozmarýn I
    f) zběhovec T

14. Sterilizace kultivačních médií probíhá v
    d) autoklávu U
    e) termostatu V
    f) laminárním boxu K

15. Při převodu do nesterilních podmínek je třeba *in vitro* rostliny
    d) aklimatizovat M
    e) sterilizovat A
    f) segmentovat E

Tajenka: MÉDIUM

Fotodokumentace výuky pro studenty na střední škole

A – poznávání rostlin čeledi *Lamiaceae*

B – seminář k explantátovým kulturám