



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Využití biotechnologických metod u vybraných
léčivých rostlin z čeledi *Solanaceae***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jana Konečná
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora Jana Konečná

Název práce Využití biotechnologických metod u vybraných léčivých rostlin z čeledi *Solanaceae*

Typ práce Bakalářská

Pracoviště Katedra botaniky

Vedoucí práce RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

Rok obhajoby práce 2018

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce se zabývá biotechnologickými metodami, zejména klíčivostí semen, iniciací kalusu a mikropropagací u vybraných léčivých rostlin z čeledi *Solanaceae*. Teoretická část zahrnuje literární rešerši na téma čeleď *Solanaceae*, obsahové látky rostlin čeledi *Solanaceae* a biotechnologické metody. V experimentální části byl testován vliv sterilizačních roztoků 70% ethanolu, 2.5% chloraminu T, 36% Sava a 4% PPM. Semena rodů *Datura*, *Nicotiana*, *Withania* a *Mandragora* byla vysazena na médium MS nebo na filtrační papír. Kalus byl iniciován z kořenových (*Mandragora officinarum*, *W. somnifera*), listových a řápkových segmentů (*W. somnifera*) na médiu MS obsahujícím 1 mg/l BAP a 2.5 mg/l NAA (MSCI) nebo na médiu MS obsahujícím 2 mg/l BAP a 5 mg/l NAA (MSCII). Část kalusových kultur z listů byla v rámci optimalizace kultivována na médiu MS obsahujícím 1.5 mg/l IBA (MSCIII). Pro iniciaci kalusů z listových a řápkových segmentů *W. somnifera* bylo vhodnější médium MSCII. K mikropropagaci nodálních segmentů *W. somnifera* bylo použito médium MS obsahující 0.5 mg/l BAP a 1.5 mg/l NAA (W1), médium MS obsahující 0.5 mg/l BAP (W2) nebo médium MS obsahující 1 mg/l BAP (W3). Nejvhodnějším médiem pro mikropropagaci *W. somnifera* bylo médium W2.

Klíčová slova *Solanaceae*, mikropropagace, explantátové kultury, *in vitro*, léčivé rostliny, sekundární metabolity

Počet stran 72

Počet příloh 2

Jazyk Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jana Konečná
Title of thesis	The use of biotechnological methods in selected medicinal species of <i>Solanaceae</i> family
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Botany
Supervisor	RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

The present thesis deals with biotechnological methods, especially germination of seeds, initiation of callus and micropropagation in selected medicinal species of *Solanaceae* family. The theoretical part includes a literature review on the topic of *Solanaceae* family, plant substances of *Solanaceae* family and biotechnological methods. In the experimental part was tested the effect of sterilizing solutions 70% ethanol, 2.5% chloramine T and 36% Savo. The seeds of genera *Datura*, *Nicotiana*, *Withania* and *Mandragora* were planted on MS medium or on a filter paper. The callus was initiated from root (*Mandragora officinarum*, *W. somnifera*), leaf and petiole (*W. somnifera*) segments on MS medium supplemented with 1 mg/l BAP and 2.5 mg/l NAA (MSCI) or MS supplemented with 2 mg/l BAP and 5 mg/l NAA (MSCII). Part of callus leaf cultures were cultivated on MS medium supplemented with 1.5 IBA (MSCIII) as part of the optimization. The most suitable medium for callus initiation of leaf and petiole segments of *Withania somnifera* were medium MSCII. Nodal segments of *W. somnifera* were micropropagated on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP and 1.5 mg/l NAA (W1), MS with 0.5 mg/l BAP (W2) or MS with 1 mg/l BAP (W3). The most suitable medium for micropropagation of *W. somnifera* was medium W2.

Keywords	<i>Solanaceae</i> , micropropagation, plant tissue cultures, <i>in vitro</i> , medicinal plants, secondary metabolites
Number of pages	72
Number of appendices	2
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením RNDr. Boženy Navrátilové, Ph.D., za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala RNDr. Boženě Navrátilové, Ph. D., za její trpělivost, odborné vedení, cenné rady a čas, který mi při řešení práce věnovala.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	6
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1 Čeleď <i>Solanaceae</i>	11
2.1.1 Charakteristika vybraných zástupců léčivých rostlin čeledi <i>Solanaceae</i>	12
2.1.1.1 Rod <i>Datura</i>	12
2.1.1.2 Rod <i>Mandragora</i>	15
2.1.1.3 Rod <i>Atropa</i>	17
2.1.1.4 Rod <i>Hyoscyamus</i>	18
2.1.1.5 Rod <i>Nicotiana</i>	19
2.1.1.6 Rod <i>Withania</i>	21
2.2 Obsahové látky rostlin čeledi <i>Solanaceae</i>	23
2.3 Biotechnologické metody	26
2.3.1 Explantátové kultury	26
2.3.2 Využití explantátových kultur	28
2.3.2.1 Využití <i>in vitro</i> technik pro produkci SM	30
2.3.2.2 Techniky pro zvýšení produkce SM v rostlinách pěstovaných <i>in vitro</i>	31
3 MATERIÁL A METODY	36
3.1 Rostlinný materiál	36
3.2 Příprava rostlinného materiálu	36
3.2.1 Povrchová sterilizace a příprava semen <i>Datura stramonium</i> , <i>D. inoxia</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>N. rustica</i> , <i>W. somnifera</i> a <i>Mandragora officinarum</i>	36
3.2.2 Povrchová sterilizace kořene <i>Mandragora officinarum</i> a <i>Withania somnifera</i>	38
3.2.3 Povrchová sterilizace a odvození kultur z prýtů <i>Withania somnifera</i>	39
3.2.4 Mikropropagace <i>W. somnifera</i> a kalogeneze u <i>M. officinarum</i> a <i>W. somnifera</i>	40
3.2.4.1 Iniciace kalusu u <i>M. officinarum</i> a <i>W. somnifera</i>	41

3.2.4.2	Mikropropagace <i>W. somnifera</i>	41
4	VÝSLEDKY	42
4.1	Povrchová sterilizace semen a testování klíčivosti.....	42
4.1.1	Povrchová sterilizace semen a klíčivost u <i>Datura stramonium</i> a <i>D. inoxia</i>	43
4.1.2	Povrchová sterilizace semen a klíčivost u <i>Nicotiana tabacum</i> a <i>N. rustica</i>	43
4.1.3	Povrchová sterilizace semen a klíčivost u <i>Withania somnifera</i>	44
4.1.4	Povrchová sterilizace semen a klíčivost u <i>Mandragora officinarum</i>	44
4.2	Iniciace kalusu u <i>Mandragora officinarum</i> a <i>Withania somnifera</i>	44
4.2.1	Iniciace kalusu u kořene <i>M. officinarum</i>	45
4.2.2	Iniciace kalusu u kořene <i>W. somnifera</i>	46
4.2.3	Iniciace kalusu u listů a řapíků <i>W. somnifera</i>	46
4.3	Mikropropagace <i>W. somnifera</i> z nodálních segmentů.....	48
5	DISKUZE	50
5.1	Povrchová sterilizace semen a testování klíčivosti.....	50
5.2	Iniciace kalusu	52
5.3	Mikropropagace u <i>Withania somnifera</i>	54
6	ZÁVĚR.....	55
7	POUŽITÁ LITERATURA	56
8	PŘÍLOHY	62

SEZNAM ZKRATEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
BAP	6-benzylaminopurin (6-benzyladenin)
GA ₃	kyselina gibberelová
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
MS	médium MS (Murashige a Skoog, 1962)
NAA	kyselina naftalenoctová
PPM	Plant Preservative Mixture
SE	standard error/střední chyba průměru
SM	sekundární metabolity
TCCA	kyselina trichlorisokyanurová

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Význam zástupců čeledi *Solanaceae* (lilkovité) nespočívá pouze v produkci zemědělských plodin, jako jsou například brambory, rajčata, močyně nebo paprika. Řada zástupců patří mezi významné léčivé rostliny, ačkoli se souběžně většinou jedná o rostliny prudce jedovaté. Mezi významné zástupce léčivých rodů patří *Datura* (durman), *Mandragora* (mandragora), *Hyoscyamus* (blín), *Atropa* (rulík) a *Withania* (vitánie). Tyto rostliny produkují vysoké množství sekundárních metabolitů (SM), zejména alkaloidů. Zástupci rodu *Withania* obsahují i další metabolické složky a jako jedny z mála léčivých druhů čeledi *Solanaceae*, nejsou prudce jedovaté. Pro kuřáky je z této čeledi nejcennější rod *Nicotiana* (tabák), který je základní surovinou pro výrobu tabákových výrobků, a který je, dle některých klasifikací, také řazen k léčivým rostlinám.

Pro celoroční využití rostlinných produktů (nejen v době jejich sklizně), se už v časném starověku rostlinám dodávalo trvanlivosti sušením, nakládáním do rostlinných olejů nebo do alkoholu. Nakládáním rostlin do alkoholu vznikají tinktury, ve kterých se účinné látky z rostliny do alkoholu extrahují. Extrahují se pouze ty látky, které jsou v alkoholu rozpustné, například alkaloidy (Lüllmann et al., 2012).

Za první izolovaný alkaloid je dle většiny publikací označován morfin, který je nejdůležitějším a dominantním alkaloidem opia. V opiu jsou alkaloidy především ve formě solí kyseliny mekonové, mléčné a sírové (www.biotox.cz). Izolace morfia je připisována Friedrichovi W. A. Sertürnerovi (1783 – 1841), mladému německému lékárníkovi. Nejprve publikoval výsledky týkající se izolace kyseliny mekonové, později pak detailní popis 57 experimentů popisujících izolaci tzv. *principum somniferum* neboli aktivní složky a podstaty narkotických vlastností opia (později nazvané morfium). Datace této události nejsou jednotné a spadají do rozmezí let 1803 – 1806. Tato alkalická sloučenina byla prvním zástupcem organických bází, které se nazývaly „rostlinné zásady“, a které později (1818) Karl F. W. Meissner (1792 – 1853) poprvé označil za alkaloidy. Bílé krystalky morfia (*principum somniferum*) Friedrich Sertürner zkoušel nejprve na myších a psech, později na sobě a svých přátelích. Svými pokusy dokázal, že je morfin zodpovědný za farmakologické účinky opia. Přes počáteční neakceptaci výsledků ve své práci Friedrich Sertürner vytrval a v roce 1817 své závěry opět uveřejnil. Ve zveřejněné práci, bylo poprvé použito označení morfium, jež je odvozeno od Morfea, řeckého boha snů. Izolace morfinu významně posunula studium SM rostlin, které je neustále v rozvoji a vědeckém zájmu. Od doby, kdy Sertürner izoloval *principum somniferum*, se začaly ve farmaceutických

laboratořích izolovat z přírodních produktů účinné látky v chemicky čisté formě. Cílem izolace látek je kromě jejich identifikace a analýzy i zjišťování vztahů mezi účinkem a chemickou strukturou vedoucí např. k syntéze pozměněných derivátů původní látky s příznivějšími farmakologickými vlastnostmi (Lüllmann et al., 2012; Štenclová, 2010).

Izolace rostlinných SM používaných k léčebným účelům, je obvykle náročná. Organická syntéza rostlinných SM není vždy možná, protože jde často o složité mnohastupňové biosyntetické reakce, což by bylo pro účely využití v medicíně a farmacii finančně náročné. Jednou z možností, jak usnadnit získávání významných SM léčivých rostlin, je využití explantátových kultur. Kultivace *in vitro* je jednodušší a rychlejší než pěstování celých léčivých rostlin v přirozených podmínkách a navíc je možné snadno sledovat a ovlivňovat samotnou syntézu SM (Isah et al., 2017; Sedláčková, 2014).

Explantátové kultury většinou nedosahují tak intenzivní biosyntézy a jejich produkce je až na některé výjimky nižší než u intaktní rostliny (tj. původní, mateřské, pěstované v přirozených podmínkách), proto jsou hledány různé techniky, jako jsou např. biotransformace, imobilizace, elicitace, aplikace prekurzorů a jejich vzájemné kombinace nebo metody genového inženýrství, kterými by se produkce a akumulace SM v těchto kulturách zvýšila (Isah et al., 2017).

V předložené bakalářské práci byly vytyčeny následující cíle:

1. Vyhledávání, shromažďování a studium odborné literatury k zadané problematice.
2. Zvládnutí technik explantátových kultur (příprava médií, sterilizace rostlinného materiálu, testování klíčivosti a mikropropagace, iniciace kalusů a u vybraných zástupců čeledi *Solanaceae*).
3. Optimalizace použitých biotechnologických metod (optimalizace kultivačních médií, sterilizace semen).
4. Průběžné zpracování získaných výsledků z experimentu a jejich fotodokumentace.
5. Sepsání bakalářské práce.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Mezi biotechnologické metody patří využívání rostlinných buněk a pletiv pěstovaných *in vitro* pro produkci farmakologických látek. Tyto postupy jsou výhodné zejména pro látky, které jsou jinými způsoby obtížně získatelné, nebo je jejich průmyslová výroba finančně velmi náročná. Pro produkci SM *in vitro* lze využít i zástupce čeledi *Solanaceae*, mezi žádané látky patří zejména alkaloidy, které jsou odpovědné za toxický účinek pro člověka, avšak při vhodném dávkování mají terapeutické účinky.

2.1 Čeleď *Solanaceae*

Zařazení čeledi *Solanaceae* do systému vyšších rostlin (Cronquist, 1988):

Říše:	<i>Plantae</i> (rostliny)
Podříše:	<i>Tracheobionta</i> (cévnaté rostliny)
Oddělení:	<i>Magnoliophyta</i> (krytosemenné rostliny)
Třída:	<i>Rosopsida</i> (vyšší dvouděložné rostliny)
Podtřída:	<i>Asteridae</i>
Řád:	<i>Solanales</i> (lilkotvaré)
Čeleď:	<i>Solanaceae</i> (lilkovité)

Čeleď *Solanaceae* je čeledí vyšších dvouděložných rostlin patřící do řádu *Solanales*. Tento řád bývá některými autory řazen ke krtičníkovitým, avšak od nich se odlišuje nepřítomností iridoidů (Jahodář, 2011). Dalšími čeleděmi tohoto řádu jsou *Convolvulaceae*, *Hydroleaceae*, *Montiniaceae* a *Sphenocleaceae*. Nejobsáhlejší skupinou je čeleď *Solanaceae*. Patří zde jednoleté, dvouleté i vytrvalé byliny (v tropech i dřeviny) se střídavými bezpalistnatými listy a dvojbočnými (bikolaterálními) cévními svazky. Květy jsou oboupohlavné, pravidelné, koruna je z pěti lístků, vyrůstající jednotlivě nebo ve vrcholičnatých květenstvích. Semeník je svrchní, pestík srostlý ze dvou plodolistů. Kalich vytrvalý, někdy se zvětšuje a u některých rodů celý plod obaluje. Plodem je obvykle mnohosemenná bobule nebo tobolka. Zvláště plody obsahují četné alkaloidy, které jsou často prudce jedovaté (Novák a Skalický, 2012; Kincl, 1993).

Čeleď obsahuje přibližně 2 500 druhů, z nichž jich u nás roste pouze kolem třiceti (www.kvetenacr.cz). Více než polovinu čeledi zastupuje rod *Solanum*. Přírozené stanoviště *Solanaceae* se nachází v tropickém a subtropickém pásu (Novák a Skalický, 2012).

Nejvíce endemických rodů (přibližně 40), nalézáme v zemích Střední a Jižní Ameriky (např. lilek brambor, lilek rajče tabák virginský a tabák selský). V mírném pásu USA a v Kanadě se nachází pouze 50 druhů z čeledi. Ve vodním prostředí zástupci zcela chybějí (Novák a Skalický, 2012; www.britannica.com).

Čeď zahrnuje řadu hospodářsky a ekonomicky významných plodin využívaných v mnoha odvětvích od potravinářství, krmivářství a průmyslu až po získání specifických látek používaných jako lékopisné drogy. Vzhledem k obsahu účinných alkaloidů lze v čeledi *Solanaceae* nalézt celou řadu druhů s psychotropními účinky. V tomto směru se nejvíce využívá tabák, a to zejména tabák virginský a selský (*Nicotiana tabacum* a *N. rustica*), (Valíček, 2002). V pěstitelské produkci zaujímá ve světě lilek brambor (*Solanum tuberosum*) čtvrté místo za pšenicí, kukuřicí a rýží. Co se týče počtu druhů, patří rod lilek k nejpočetnějším rodům vůbec. Z dalších zástupců ze *Solanaceae* jsou nejvýznamnějšími pěstovanými druhy rajče jedlé (*Lycopersicon esculentum*), paprika roční (*Capsicum annuum*) či lilek vejcoplodý (*Solanum melongena*). Řada druhů se stala pro své nápadité květy významnými okrasnými rostlinami (např. *Petunia*, *Physalis*). Některé rody *Solanaceae*, jsou již řadu let hojně využívány v genetickém a biotechnologickém výzkumu jako důležitý pokusný materiál a modelový organismus. Jako příklad lze uvést využití tabáku v rámci výzkumu zabývajícího se vývojem očkovací látky proti nádoru imunitního systému (folikulárnímu lymfomu) pomocí viru tabákové mozaiky (Roossinck, 2011; www.britannica.com).

2.1.1 Charakteristika vybraných zástupců léčivých rostlin čeledi *Solanaceae*

2.1.1.1 Rod *Datura*

Rod *Datura* (durman) je zastoupen 20 jednoletými až víceletými bylinami čeledi *Solanaceae*. Lodyhy jsou větvené, listy střídavé, jednoduché a krátce řapíkaté. Květy jsou oboupohlavné, pětičetné až 10 cm velké a vyrůstají jednotlivě. Plodem je tobolka, která puká čtyřmi chlopněmi nebo pravidelně. Většina druhů pochází z Ameriky (Valíček, 2002). Durmany jsou známé především svým nápadným vzhledem a nepříjemným zápachem (Korbelář a Endris, 1968). Včetně okrasných, pokojových a balkonových druhů, jsou jedovaté. Liší se především zbarvením květů a rozdílnou ostnatostí tobolek (Kresánek a Kresánek, 2008). Některé z nich jsou pěstovány jako okrasné rostliny, avšak terapeutický význam mají pouze druhy *Datura stramonium*, *D. inoxia* a *D. metel*. Kromě těchto druhů se pro farmaceutický průmysl využívají *D. ferox*, *D. tatula* a *D. leichhardtii*. Při zneužití

durmanu jakožto halucinogenní drogy, je nejčastější perorální příjem. Patří však i mezi rostliny léčivé s využitím při nachlazení, nervových potížích, průjmu, pohlavní nedostatečnosti či bronchiálním astmatu (Moussous et al., 2018; Valíček, 2002). Durman má vysoký obsah tropanových alkaloidů hyoscyaminu a scopolaminu, a proto je řazený mezi separanda (tj. silně účinné léčivo, které musí být uchováváno odděleně), (Jahodář, 2011).

***Datura stramonium* L.** (durman obecný), (Obr. 1)

U nás nejznámější druh, durman obecný, někdy zvaný „panenská okurka“, je jednoletá významně jedovatá bylina rozložitého vzrůstu, rozšířená v teplejších oblastech. Obvykle roste na okrajích polí a cest, na rumišťích a kyprých dusíkatých půdách (Kresánek a Kresánek, 2008). V České republice roste hojně např. v Polabí a na jižní Moravě. Listy jsou řapíkaté, podlouhle vejčité, chobotnatě zubaté, nepříjemně zapáchající, dorůstající do velikosti až 20 cm. Plodem je ostnatá, asi jako ořech velká, tobolka (Korbelář a Endris, 1968). Květy mají trubkovitý kalich s pětícípou, až 8 cm dlouhou, bílou nebo fialovou korunou. Otvírají se mezi 19. – 20. hodinou



Obr. 1: *Datura stramonium* (durman obecný)

<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/t/thorna12-1.jpg>

a v dešti se zavírají, jejichmi opylovači jsou noční motýli, včelám poskytují nektar a pyl (Kresánek a Kresánek, 2008). Semena durmanu obecného jsou ledvinitá, černá až nahnědle šedá, 5 mm velká (Jahodář, 2011).

Léčebné účinky durmanu obecného byly známy už americkým indiánům, kteří ho používali i při náboženských obřadech. První dochovaná písemná zmínka o jeho jedovatosti pochází ze zápisu z roku 1676, kdy se s ním ve Virginii otrávil celá rodina. Drogou je obvykle list, někdy i květy a plody. Při odběru je třeba dbát na to, aby ve sbírané směsi nebyly zčernalé nebo zhnědnuté listy. Chuť listů je ostrá, slaná a nahořklá. Droga je

sbírána ráno, na začátku kvetení rostliny. Sušení je rychlé a vzhledem k vysoké toxicitě rostliny, by mělo probíhat odděleně od jiného sušeného materiálu. Na otravu dítěte stačí 10 – 15 semen nebo 4 – 5 g listů. Obecně intoxikací přibývá, a to částečně i kvůli zneužívání semen obsahujících atropin, který vyvolává mydriázu (rozšíření zorniček) a má silné halucinogenní účinky spojené se zmateností, dezorientací nebo ztrátou paměti. Další intoxikace jsou způsobeny např. vysáváním nektaru z květů, záměnou listů durmanu za jiné nebo konzumací potravin obsahujících durmanem znečištěnou mouku. Ke znečištění mouky může dojít např. při sečení kombajnem, když durman roste v obilovinách nebo kukuřici.

Dle publikace autorů Kresánek a Kresánek (2008), je při intoxikaci durmanem, nebo při užívání přípravku s obsahem durmanu nutné uvědomit lékaře a dbát na jeho interakce s jinými léčivými. Nesnáší se například s antihistaminiky, fenotiaziny, mnohými diuretiky a antidepresivy. Přípravky s durmanem nejsou vhodné pro kojící a těhotné ženy, pacienty se srdečními potížemi, apod. Uplatnění však nalézá při léčbě astmatu, černého kašle, svalového spasmu a Parkinsonovy choroby. Dále způsobuje uvolnění svaloviny zažívacího traktu a močového ústrojí. V polovině devatenáctého století se v Evropě staly populární tzv. orientální pilulky radosti, které obsahovaly opium, konopí, durman, arekový ořech a cukr a byly považovány za mimořádně účinná afrodiziaka (Kresánek a Kresánek, 2008; Štenclová, 2010).

Durman se zařadil mezi perspektivní léčivé rostliny. Léčiva obsahující durman se většinou užívají perorálně nebo ve formě čípků. Na počátku 19. století byl durman nově používán k léčbě astmatu jako součást směsi tzv. astmatických cigaret. Účinky této nové metody léčby astmatu však nebyly příliš přesvědčivé. Užívání durmanu bez lékařského předpisu není legální (Kresánek a Kresánek, 2008; Graeser a Rowe, 1935).

2.1.1.2 Rod *Mandragora*

Mandragora officinarum L. (mandragora lékařská, pokřín lékařský), (Obr. 2)

Mandragora lékařská, známá také jako pokřín, je vytrvalá bylina s řepovitým, dužnatým kořenem, z něhož vyrůstá hustá růžice velkých, podlouhlých a zvlněných listů. Ze středu růžice vyrůstají úhledné, skoro přisedlé, zvonkovité, zelenavě žluté až nafialovělé květy. Kořen roste velmi pomalu a dosahuje hloubky až 1 metr. Plodem jsou bledožluté bobule obsahující značné množství semen (o velikosti 5 – 7 mm), (Valíček, 2003). Název rostliny je zřejmě odvozen z řečtiny a lze volně přeložit jako „způsobující bolest dobytku“. Rostlina je pro hospodářská zvířata jedovatá (Hanuš et al., 2005).



Obr. 2: *Mandragora officinarum* (mandragora lékařská)

<http://dewrri.blog.cz/1203/mandragora-officinarum-lekarska>

Mandragora je rozšířená ve Středomoří, zvláště v Řecku. Celá rostlina je jedovatá, po požití jakékoli části z ní působí omamně, někdy i smrtelně. Zastoupení alkaloidů je obdobné jako u durmanu. Těmito alkaloidy jsou především hyoscyamin, atropin a skopolamin. Jedná se o jednu z nejslavnějších a nejstarších halucinogenních rostlin. První zmínky o účincích mandragory byly nalezeny ve starověkých východních rukopisech nebo v biblickém Starém Zákoně (kniha Genesis a Píseň písní). V minulosti patřila k vyhledávaným lékům, ve starém Egyptě lékaři používali šťávu z mandragory k narkóze, antický lékař Hippokrates léčil mandragorou nemoci žlučníku, arabský lékař Avicenna ji doporučoval při bolestech hlavy a také k léčbě padoucnice. V Evropě byla rostlina používána ve formě odvaru ve víně, který byl doporučován jako hypnotikum, narkotikum, anestetikum a k léčbě neplodnosti žen (Hanuš et al., 2005; Valíček, 2003).

Mandragora je obklopena řadou mýtů a pověr a to i přesto, že rostlina není více psychoaktivní než jiné z čeledi *Solanaceae*. Kořen mnohdy tvořil hlavní složku tzv. nápojů

lásky (Valíček, 2003). Specifikou je charakteristický tvar kořene připomínající lidskou postavu. V biblických knihách Starého Zákona jsou její plody nazývány „jablíčky lásky“. Ve středověku byla rozšířena pověra, že kořen může učinit člověka neviditelným, zahání rozmanité nemoci, otevírá poklady atd. Také Mathioli se ve svém Herbáři z r. 1596 o mandragore zmiňuje. Zdůrazňuje zejména, jak šejdři a podvodníci prodávají kořeny za přemrštěné sumy, přiřezávají kořen do lidské podoby a namlouvají lidem, že má kořen čarovné účinky (Polívka, 2010; Hanuš et al., 2005). V 10. století se hojně používala tzv. uspávací houba (*Spongia somnifera*). V benediktinském klášteře Monte Casino se zachoval návod na její výrobu, podle kterého se do roztoku připraveného smícháním vody, opia, výtažků z listů mandragory a bolehlavu namočila houba, která se před chirurgickým zákrokem připevnila nemocnému na obličej a používala jako analgetikum při některých chirurgických procedurách (Štenclová, 2010).

O mandragoru se neustále zvyšuje zájem, neboť je účinná při léčbě cukrovky a hypertenze. Některé obsahové látky rovněž potlačují růst a aktivitu nádorového bujení, zvláště leukémie, avšak jako u všech cytostatik působí i na zdravé nepozměněné buňky (Valíček, 2003).

2.1.1.3 Rod *Atropa*

Atropa bella-donna L. (rulík zlomocný), (Obr. 3)

Rulík zlomocný, je vytrvalá bylina s přímou nebo větvenou lodyhou, až 180 cm vysokou. Listy jsou střídavé, vejčité, zúžené v krátký řapík, s celokrajnou, kopinatě vejčitou čepelí (Valíček, 2003; Jahodář, 2011). Květy vyrůstají jednotlivě v úžlabí listů. Mají zvonkovitý kalich s pěti ušty a korunou s pěti cípy, zevně hnědě fialovou a uvnitř šedožlutou. Plodem je lesklá, černá, kulovitá bobule podobná třešni (Valíček, 2003). Záměna rostliny je téměř vyloučená (Kresánek a Kresánek, 2008).



Obr. 3: *Atropa bella-donna* (rulík zlomocný)

<https://www.planetdeadly.com/nature/most-poisonous-plants>

Název je odvozen zřejmě podle řecké bohyně osudu, Atropos. Vznik druhového jména je méně jednoznačný. Z rulíku je získáván atropin, který je používán pro výrobu atropinových kapek, způsobujících mydriázu. Dívky si proto prý vtíraly šťávu z rulíku do očí, aby měly větší zorničky. Odtud zřejmě pochází druhový název složený z italských slov označujících spojení „krásná paní“ (*bella-donna*), (Gardner a McGuffin, 2013).

Rulík obsahuje typické zástupce alkaloidů pro tuto čeleď, hyoscyamin, atropin a skopolamin, dále obsahuje belladonnin (Valíček, 2003). Atropin vzniká hlavně v sušené droze, racemizací L-hyoscyaminu, jehož obsah v rostlině tvoří asi 70 % ze všech obsažených alkaloidů (Kresánek a Kresánek, 2008). Lékopisnou surovinou je list, který je řazený mezi separanda (Jahodář, 2011). Listová droga omamně páchne a nahořkle ostře chutná (Valíček, 2003). K izolaci alkaloidů je využíván i kořen, který je bez pachu, chuti sladce slizovité, později hořké a nepříjemné (Jahodář, 2011; Valíček, 2003). Bylina obsahuje také třísloviny, kumariny a škrob. Celá rostlina je významně jedovatá, způsobující velmi závažné otravy. Její nebezpečí pro člověka vystihuje stará legenda, která praví, že ji vypěstoval sám ďábel (Kresánek a Kresánek, 2008; Valíček, 2003).

Ačkoli je rulík rozšířený po celé Evropě, v západní Asii a severní Africe, jeho výskyt je poměrně vzácný (Valíček, 2003). Jedná se o světlomilnou bylinu, rostoucí v lesích, na vápnité a humus bohaté půdě s dostatkem spodní vláhy (Kresánek a Kresánek, 2008).

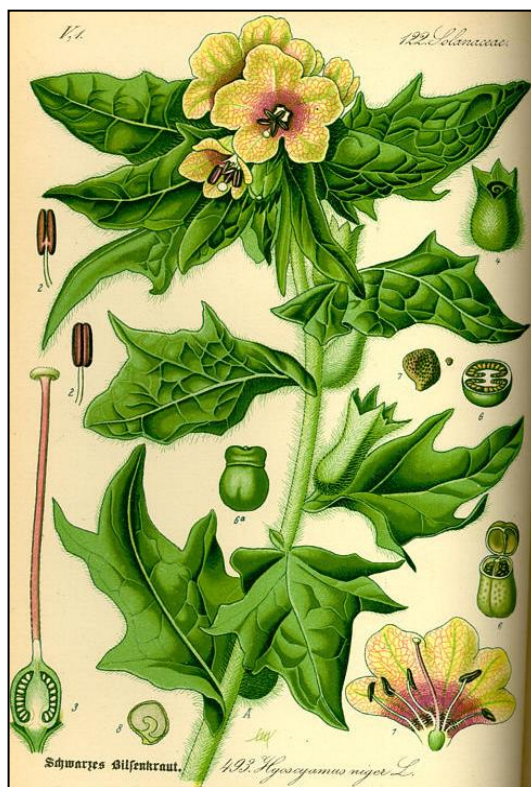
V evropské medicíně je jeho využívání známé od 17. století. Připravují se z něj galenika (tj. léky nepřipravované chemickou cestou) sloužící k odstranění křečí svalstva, k rozšíření zornic nebo k léčení Parkinsonovy choroby. Primárně je však droga využívána k izolaci atropinu a dalších alkaloidů (Valíček, 2003). Směs izolovaných alkaloidů následně tvoří složku mnohých spasmolytik, analgetik, mydriatik, antiparkinsonik, sedativ, laxancií atd. (Kresánek a Kresánek, 2008).

2.1.1.4 Rod *Hyoscyamus*

Hyoscyamus niger L. (blín černý), (Obr. 4)

Jedná se o dvouletou výrazně páchnoucí větvenou bylinu dorůstající do výšky 20 – 100 cm. Přízemní listy jsou dlouze řapíkaté, podlouhle vejčité a peřenolaločné. Lodyžní listy jsou přisedlé, objímavé podlouhle kopinaté, se 4 – 5 páry špičatých laloků. Květy vyrůstají v úžlabí lupenitých listenů a tvoří vijany. Kalich je zvonkovitě trubkovitý a síťnatě žilkovaný, koruna široce nálevkovitá, bledě žlutá, fialově žilkovaná s pěti tupými cípy. Tyčinky mají fialové prašníky a chlupaté nitky. Plodem je břichatá tobolka, s mnoha červenohnědými semeny, uložená v kalichu.

Blín vyžaduje humózní, živinami bohatou půdu v teplejších oblastech na rumišťích, úhorech a pustých místech v nížinách až do podhůří. Roste nejen u nás, ale i po celé Evropě, v Asii, severozápadní Africe, Severní Americe, Austrálii či na Novém Zélandu.



Obr. 4: *Hyoscyamus niger* (blín černý)

[http://www.malachim.cz/malachim/herbar-petra-z-
vlkova/738-blin-cerny.html](http://www.malachim.cz/malachim/herbar-petra-z-vlkova/738-blin-cerny.html)

Drogou jsou listy, popřípadě semena obsahující jedovaté alkaloidy L-hyoscyamin a skopolamin. Droga má slabý a omamný zápach a hořkoslanou chuť. Semena obsahují olej složený z kyselin linolové, palmitové a stearové (Valíček, 2003). Ve středověku měl blín využití jako anestetikum při operacích, jako narkotikum a jako součást čarodějných mastí a nápojů lásky. Listy a semena se také kouřily nebo přidávaly do vína (Alberts et al., 2004; Valíček, 2003). Droga se užívá jako účinný prostředek proti bronchiálnímu astmatu, k odstranění křečí při žlučkových a ledvinových kolikách, při zvýšené sekreci žaludečních šťáv a při žaludečních vředech. Pro své typické smrtelně jedovaté vlastnosti sloužil blín rovněž travičům (Valíček, 2003). Farmaceuticky je využíván hlavně k izolaci alkaloidů nebo k přípravě oleje ze semen, užívaného k masážím při revmatických bolestech (Alberts et al., 2004).

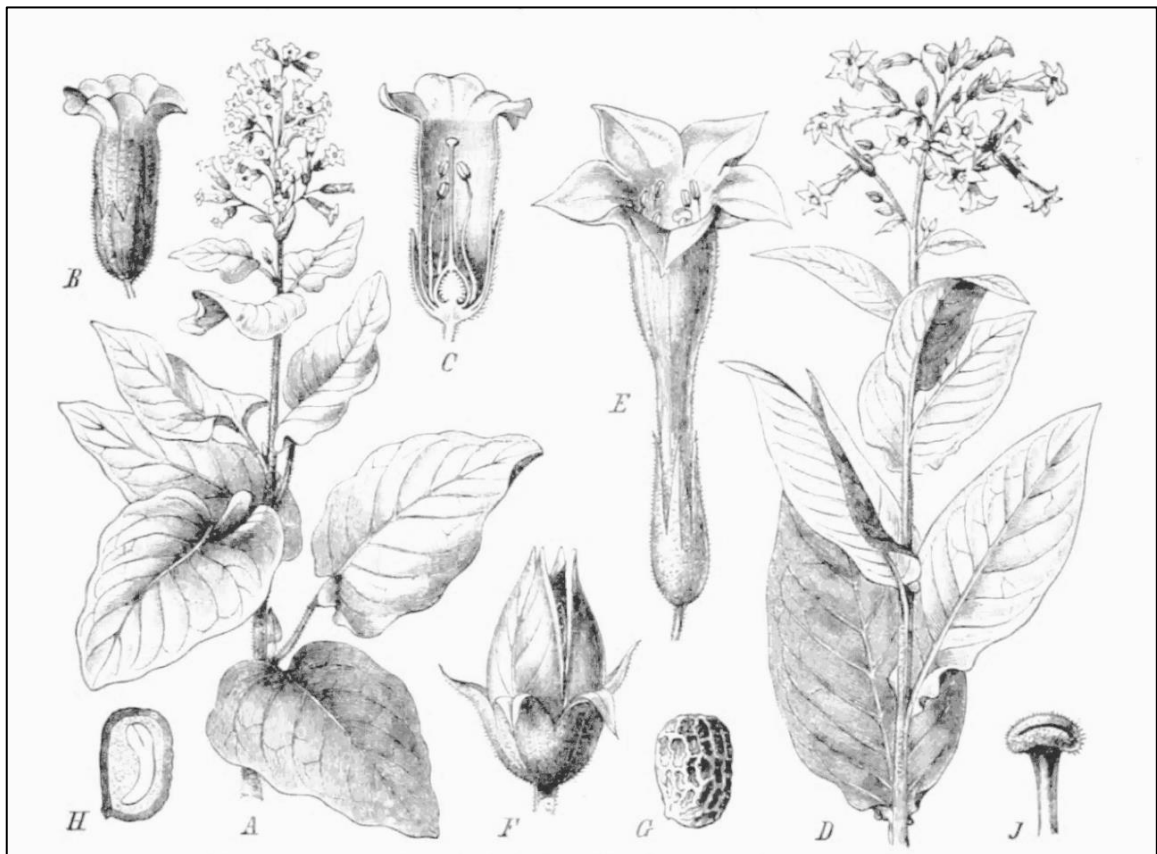
2.1.1.5 Rod *Nicotiana*

Rod *Nicotiana* (tabák) zahrnuje asi 100 domácích druhů převážně v Jižní a Střední Americe, na Sundských ostrovech, v Austrálii a Oceánii (Valíček, 2003). Jedná se o starou kulturní americkou rostlinu, do Evropy dovezenou v 16. století. Původně byl přivezen jako rostlina okrasná, teprve později byl pěstován pro výrobu tabáku (Baloun, 1989). Pěstuje se ve všech světadílech od rovníku až do teplejších oblastí mírného pásu. Mnohé druhy tabáku jsou stále pěstovány jako okrasné, zahradní i skleníkové byliny, většinou však slouží ke kouření, žvýkání a šňupání. Tabáky jsou statné jednoleté mělce kořenící byliny s jedinou přímou, až 2 m vysokou žláznatě chlupatou lodyhou, na které postupně dorůstají jednoduché, velké a celokrajné listy.

K získávání suroviny pro tabákové výrobky se pěstují především druhy *Nicotiana tabacum* (tabák virginský, obecný – Obr. 5, A – C) a *Nicotiana rustica* (tabák selský tzv. machorka – Obr. 5, D – J). Vzhledově se tyto druhy liší zejména listy a květy. Zatímco *N. tabacum* má listy široce kopinaté, řapík křídlatě rozšířený, květy s trubkovitými až nálevkovitými korunami, růžovými až červenými, *N. rustica* má listy výrazně řapíkaté, vejčitého tvaru a korunu řepicovitou a nazelenale žlutou (Valíček, 2003). Plodem tabáků jsou mnohosemenné vejčité tobolky otvírající se čtyřmi zuby (Baloun, 1989).

V listech tabáku se koncentruje až 10 % pyridinových alkaloidů, zvláště nikotinu, doprovázeného jeho deriváty nornicotinem, anabasinem a nicotyrinem (Jahodář, 2011; Baloun, 1989).

Kryštof Kolumbus roku 1492 objevil společně s Amerikou i tabák a mnoho dalších rostlin. Zásluhy o seznámení Evropanů s tabákem jsou však připisovány francouzskému diplomatovi Jeanu Nicotovi, který jej dovezl na francouzský královský dvůr ve formě šňupacího prášku a na jehož počest se jmenuje rod *Nicotiana* a alkaloid nikotin (Valíček, 2003).



Obr. 5: A – C *Nicotiana rustica* (tabák selský), D – J *Nicotiana tabacum* (tabák virginský),
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nicotiana_spp_GS443.png

2.1.1.6 Rod *Withania*

***Withania somnifera* Dunal** (Ashwagandha, vitánie snodárná, spánkonosná, opojná), (Obr. 6)

Vitánie snodárná, známá též pod názvem v sanskrtu, Ashwagandha (Ashwa – kůň, Gandha – síla) nebo též pod názvem indický ženšen, je vytrvalá, větvená, dřevnatějící bylina nebo keř dorůstající do výšky 50 – 200 cm. Listy jsou řapíkaté, vejčité, na vrcholku špičaté nebo tupé s klínovitou bází, v mládí jsou plstnaté – hustě chlupaté, později lysé nebo téměř lysé, dorůstající do délky 3 – 15 cm. Květy jsou zelené, později žlutozelené, oboupohlavné, na krátkých stopkách vytvářející úžlabní svazečky (po 4 – 6). Srostlý kalich je v době květu 5 mm dlouhý a má trojúhelníkovité cípy. Koruna



Obr. 6: *Withania somnifera* (vitánie snodárná)

<http://www.naturemania.com/produits/whitania.html>

je jen o málo větší než kalich a stejně jako kalich na vnější straně chlupatá. Plody vitánie jsou kulovité, oranžové, 5 – 8 mm velké bobule, uvnitř plodů se nachází žlutohnědá drobná semena. Kořeny jsou rozvětvené, světle hnědé a silně aromatické (www.efloras.org; Daniel, 2006). Vitánie má velmi široký areál v subtropích a tropech od západní Afriky až do Indie, avšak zjistit původní rozšíření není v detailu možné. Pravděpodobnými původními oblastmi jsou severozápadní Indie nebo Středomoří. Do Evropy byla kupci a cestovateli přivezena v 16. Století. Vitánii vyhovují nejlépe suchá až vyprahlá, často kamenitá místa, okraje cest, ale i ruderalní stanoviště. V subtropickém až tropickém prostředí se jí nejlépe daří v savanách a polopouštích (Daniel, 2006; www.botany.cz).

Vitánie je jednou z nejdůležitějších rostlin využívaných v tradiční indické medicíně, v Ájurvédě, které sahá až do védského období, tedy 3000 let před naším letopočtem. Svými účinky je velmi podobná ženšenu pravému (*Panax ginseng*), a to i přesto, že ženšen patří do jiné čeledi (*Araliaceae*) a není vitánii fylogeneticky blízce příbuzný. Stejně jako u ženšenu je k terapeutickým účelům nejvíce využíván kořen.

Ve staré Mezopotámii se vitání používala jako narkotikum, v Ájurvédě jako životabudič a tonikum, v Arábii jako vykuřovadlo. Vitání je tedy spoutána s velmi všestranným využitím, její působení lze popsat jako adaptogenní, tj. zvyšující psychickou a fyzickou odolnost organismu (Daniel, 2006; Nick a Opatrný 2014). Zevně bývá používána jako obklad na popáleniny a otoky (Supe et al., 2011). Dále je účinná jako narkotikum, sedativum, afrodisiakum a omlazující prostředek. Uvolňuje napětí v hladkém svalstvu, působí protistresově a má vliv i na posílení imunity. Používá se při rekonvalescenci po těžkých nemocech a operacích, k léčbě neplodnosti, jako afrodisiakum, k léčbě zánětlivých onemocnění (např. revmatických), neurodegenerativních onemocnění, hypertenze i astmatu (Daniel, 2006; Nick a Opatrný 2014). Rostlina je výjimečná a atraktivní pro své antimikrobiální, protinádorové, protizánětlivé, imunosupresivní, kardiovaskulární a antidepresivní účinky. Používá se také při léčbě tuberkulózy, revmatismu, onemocnění srdce a jako prevence proti neurodegenerativním onemocněním (Maurya 2010; Autade et al., 2016). Dharajiya et al. (2014) analyzovali pomocí difuzní metody antibakteriální aktivitu *Withania somnifera*. Zjistili, že hexanový, methanolový a etyl-acetátový extrakt vitání je účinný proti gram negativním bakteriím *Esherishia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* a gram pozitivním bakteriím *Bacillus cereus*.

V rostlině bylo nalezeno více než 80 různých biologicky aktivních látek, což je zřejmě důvodem širokého spektra medicínálních účinků drogy, i když není vždy jasné, které látky jsou odpovědné za konkrétní léčebné účinky. Hlavními skupinami obsahových látek jsou steroidní alkaloidy a steroidní laktony zvané withanolidy. Významné farmaceutické účinky bývají přisuzovány dvěma hlavním withanolidům, withaferinu A a withanolidu A. Dalšími látkami obsaženými ve vitánii jsou alkaloidy (včetně tropanových, např. tropin), withanamidy, flavonoidy, saponiny, oligosacharidy a taniny (Nick a Opatrný, 2014; Supe et al., 2011).

2.2 Obsahové látky rostlin čeledi *Solanaceae*

Sekundární metabolity (SM) jsou klíčovou složkou systému vyšších rostlin. Pro rostlinu jsou tyto látky otázkou přežití, protože zprostředkovávají některé důležité interakce. Díky SM je rostlina schopna ochrany před mnoha viry, bakteriemi, býložravci a dalšími parazity. Pro člověka se postupně staly nenahraditelnými v mnoha odvětvích – ve farmacii, potravinářství, zemědělství i průmyslu. Plní také funkci pesticidů a jsou cílem šlechtění, protože ovlivňují barvu květů či jiné fenotypové projevy závislé na produkci SM. Rozmanitost těchto sloučenin je obrovská a zájem o ně stále vzrůstá (Chintapakorn a Hamill, 2008; Osorio et al., 2018). Obvykle v daném taxonu dominuje vždy jedna skupina chemicky příbuzných látek, jejíž složení se mění v závislosti na stupni vývoje rostliny a životních podmínkách (Štefková, 2014).

Z chemického hlediska jsou rostliny čeledi *Solanaceae* poměrně dobře prostudovány. Čeleď je bohatá na alkaloidy (zejména tropanové, pyridinové a steroidní), steroidní saponiny, steroidy, pentacyklické triterpeny, polyfenoly aj. (Jahodář, 2011). Nejvýznamnější skupinou obsahových látek jsou alkaloidy – bazické látky rostlinného původu. Asi 20 % rostlinných druhů produkuje alkaloidy a každý z nich se vyznačuje unikátním a definovaným spektrem těchto látek. Vzácně jsou obsaženy také v tělech obojživelníků či některých hub. Doposud bylo izolováno více než 12 000 různých alkaloidů, které se vyznačují silnou biologickou účinností (Chintapakorn a Hamill, 2008; Štefková, 2014). Alkaloidy jsou většinou bílé krystalické látky hořké chuti, bezbarvé, nepáchnoucí, nerozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (např. alkoholech, chloroformu), jen málo alkaloidů je tekutých (např. nikotin). Svůj název alkaloidy dostaly dle bazického charakteru, mají schopnost tvořit ve vodě rozpustné soli s organickými kyselinami, které se přirozeně vyskytují v organismech, např. s kyselinou šťavelovou, octovou, mléčnou a jablečnou. Jen málo alkaloidů je přítomno v rostlinách jako volné base, nejčastěji jde o slabé base, s výjimkou kvarterních basí amonných, jež jsou silněji zásadité. Některé alkaloidy mají tak slabě vyvinutý zásaditý charakter, že jejich soli jsou velmi nestálé a jsou ve vodním roztoku silně hydrolyzovány. I ve velmi malých množstvích jsou alkaloidy obvykle silně účinné na lidský i zvířecí organismus a mnoho z nich patří mezi vysoce toxické látky (např. atropin, hyoscyamin). Při častém požívání některých alkaloidů se na nich člověk stává závislým, mnohé se řadí mezi drogy, protože ovlivňují centrální nervovou soustavu (www.biotox.cz). Struktura alkaloidů se chemicky navzájem velmi liší, a tak je jejich farmakologický a toxický účinek různý.

Přesto je spojují některé společné vlastnosti: dusík je vázán převážně v heterocyklu, někdy i v postranním řetězci, avšak má vždy aminový charakter. Biosynteticky alkaloidy pocházejí z aminokyselin lysinu, ornithinu, fenylalaninu, tyrosinu nebo tryptofanu (Baloun, 1989). Toxikologicky nejvýznamnější alkaloidy čeledi *Solanaceae* jsou:

- **Piperidin-pyridinové alkaloidy** – příkladem jsou pyridinové alkaloidy nikotin a anabasin. Nikotin vzniká z aminokyseliny ornithinu a nikotinové kyseliny (jejími prekursory jsou glycerol a asparagová kyselina). Anabasin je syntetizován z lysinu a nikotinové kyseliny. Někdy se pod tuto skupinu zahrnují i tropanové alkaloidy. Biogeneze piperidin-pyridinových alkaloidů začíná u ornithinu, který dává vznik cyklickému pyrrolidinovému derivátu.
- **Tropanové alkaloidy** – biogeneze vychází z pyrrolidinového derivátu, kondenzací se třemi acetátovými jednotkami vzniká alkohol tropanol. Estery tohoto alkoholu s kyselinami (tropová, mandlová, benzoová) jsou nejtypičtějšími alkaloidy čeledi *Solanaceae* a řadíme mezi ně hyoscyamin, jeho racemát atropin a epoxidovaný derivát skopolamin. Tropanové alkaloidy vyvolají u člověka touhu po rychlém a neomezeném pohybu a další smyslové halucinace. Po intoxikaci je charakteristická ztráta schopnosti rozlišovat mezi skutečností a fantazií a intoxikovaný člověk následně upadá do hlubokého spánku, podobného alkoholickému deliriu. Za halucinogenní účinky je odpovědný především skopolamin (Baloun, 1989; Davidová et al., 2005). Několik tropanových alkaloidů se považuje za důležité léčebné sloučeniny pro léčbu onemocnění a poruch centrálního a periferního nervového systému, jako jsou Parkinsonova a Alzheimerova choroba, syndrom dráždivého tračníku a nemoc pohybu v důsledku antagonistické aktivity muskarinových cholinergních receptorů (Moussous et al., 2018).
- **Steroidní alkaloidy** – biogeneze těchto látek jde cestou tvorby skvalenu a jeho cyklizací. Jako důležitý intermediát zde vystupují deriváty cholesterolu. Tyto alkaloidy se často vyskytují ve formě glykoalkaloidů. Řadíme k nim cholestanové glykoalkaloidy lilku (*Solanum*) – solanin, tomatin, solasodin (Baloun, 1989). Při vyšších koncentracích v živém organismu jsou glykoalkaloidy obvykle toxické, avšak při správném dávkování mají některé z nich antibakteriální, antioxidační, protizánětlivé a protinádorové účinky (Almoulah et al., 2017).

Důležitými obsahovými látkami u čeledi *Solanaceae* jsou také steroidní laktony, jedná se o metabolity strukturně podobné steroidům, ty se nachází ve všech organismech od mikrobů po člověka. V rostlinné říši je většina steroidů zastoupena steroly (např. sitosteroly, brassinosteroidy). Steroidní laktony obsažené ve *Withania somnifera* (přezdívané withasteroidy) jsou od sterolů, typických steroidů rostlinné říše, strukturně odlišné. Mezi withasteroidy patří withanolidy, withanosidy, withaferiny, withasomniferiny, withanamidy atd. a jsou obsaženy pouze v rostlinách čeledi *Solanaceae* (Nick a Opatrný, 2014; Supe et al., 2011). Z hlediska biologické aktivity lze za nejvýznamnější steroidní laktón považovat withaferin A, který je např. schopen navodit apoptózu některých rakovinových buněk, a je tak v neustálém vědeckém zájmu v oblasti výzkumu rakoviny (Gardner a McGuffin, 2013). V roce 2010 byla poprvé publikována informace o objevu withanolidů u druhu *Mandragora officinarum* (mandragorolid A, mandragorolid B), (Suleiman et al., 2010).

Dalšími obsahovými látkami čeledi *Solanaceae* jsou polyfenoly, flavonoidy, kumariny, taniny, steroidní saponiny a sapogeniny, pentacyklické triterpeny a silice (Slavík a Štěpánková, 2011).

2.3 Biotechnologické metody

Mezi biotechnologické metody lze obecně zahrnout postupy využívající metabolismu živých organismů pro různé účely (hospodářské, medicínské aj.). Z tohoto hlediska lze za jedny z nejstarších procesů biotechnologií (bioprosesů) považovat kvasné procesy, které se využívají pro výrobu některých potravin a nápojů. Moderní biotechnologii lze rozumět jako záměrné genetické manipulace, prováděné zejména pro zlepšení užitkových vlastností organismů (Srivastava, 2011). Mezi biotechnologické metody patří také technika explantátových kultur (*in vitro*).

2.3.1 Explantátové kultury

Explantátové kultury rostlin znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek (Kováč, 1995).

Rostlinné buňky se na rozdíl od živočišných liší svou totipotencí – tj. schopnost buněk diferencovat se v jakékoliv typy tělních buněk (tedy i v ten dělivý). V každé somatické rostlinné buňce je obsažena celá genetická informace pro vývoj kompletního organismu. Totipotence umožňuje realizaci genetických změn vyvolaných v jednotlivých buňkách na úrovni celého organismu. I vysoce diferencované a specializované buňky si však uchovávají schopnost za určitých podmínek opět diferencovat a nabýt charakter meristemického pletiva s vysokou dělivostí. V rostlinném organismu je totipotentní nejen zygota a meristemická buňka, ale i kterákoli jiná rostlinná buňka (Špandelová, 2010). Pro odvození explantátové kultury je teoreticky vhodné jakékoliv pletivo, obsahující buňky s funkční genetickou informací (obsaženou nejčastěji v jádře). Pro některé druhy rostlin je rozmnožovací způsob využívající schopnosti totipotence, způsobem jediným (např. kyčelnice cibulkonosná, *Dentaria bulbifera* množící se výhradně pacibulkami), (Balážová et al., 2016).

Explantát je izolát rostlinného pletiva, se kterým se dále pracuje. Odebráním živného kusu pletiva z rostliny dojde k poranění a přerušení toku signalizace, který do orgánu proudil. Tyto faktory, za vhodně nastavených a kontrolovaných *in vitro* podmínek, „přinutí“ pletivo utvářet dělivá centra z již diferencovaných buněk, což lze zakončit kompletní regenerací celé rostliny. Namnožení jedinci si zachovávají rodičovskou genetickou informaci, jedná se o klony (pokud neuvažujeme spontánní vznik mutací), (Balážová et al., 2016).

Explantátem mohou být vegetativní i generativní orgány a to diferenciovaná pletiva, nediferenciovaná pletiva (nejčastěji ve formě kalusu) i jednotlivé izolované buňky a protoplasty.

Podle morfologických kritérií lze rostlinné explantáty rozdělit do skupin. Toto rozdělení však není zcela přesné, jelikož hranice mezi jednotlivými typy explantátů nejsou přesně vymezeny. Navíc jsou většinou tyto explantáty odvozovány jeden od druhého, tudíž spolu jejich původ úzce souvisí.

- **Orgánové kultury** – jedná se o rostlinné orgánové systémy, jednotlivé orgány nebo jejich části (např. kořeny, výhonky, listy). Buňky jsou diferencované, stavba a funkce orgánů jsou zachovány.
- **Buněčné kultury** – jsou kultury tvořeny jednotlivými volnými buňkami.
- **Kultury buněčných protoplastů** – jedná se o jednotlivé buňky zbavené buněčné stěny, obalené pouze cytoplazmatickou membránou. Získávají se enzymatickým štěpením buněčných stěn v hypertonickém prostředí (Sedláčková, 2014; Špandelová, 2010).
- **Kalusové kultury** – kalus představuje soubor nediferencovaných buněk. Jde o neorganizované shluky buněk, tvořící rostlinné pletivo. Přirozeně se kalusové pletivo tvoří na rostlinách po jejich poranění nebo napadení škůdci, proto se mu také říká pletivo hojivé. Kalusové kultury jsou historicky nejstaršími explantáty, poprvé byly odvozeny z kořenů mrkve, později z tabáku. Byly používány pro určení optimálního složení živných médií, ke studiu obsahu rostlinných fytotohormonů v médiích a studiu jejich role v diferenciaci rostlinných orgánů v podmínkách *in vitro* (Hradilík, 2005). U většiny dvouděložných bylin je možné odvodit kalus z různých zdrojů explantátů jako např. ze segmentu listů, stonků, kořenů, apikálních vrcholů, embryí atd. U jednoděložných je výběr pletiv vhodných k odvození kalusů menší. Růst kalusu je ve většině případů indukován umístěním explantátu na médium s relativně vysokou koncentrací auxinu (1 – 10 mg/l) v přítomnosti nižší koncentrace cytokininu. Přídavkem cytokininů a snížením koncentrace auxinů v živném médiu lze vyvolat u kalusových kultur diferenciaci a tvorbu výhonků, které lze využít k regeneraci celé rostliny. Po rozmělnění lze kalus použít jako výchozí materiál k odvození suspenzní kultury.
- **Suspenzní kultury** – jedná se o relativně homogenní populaci buněk a malých buněčných shluků v tekutém médiu. Kultivační nádoby se umísťují na roller nebo

na třepačku. Pohyb média zajišťuje aeraci a rozpad buněčných shluků. Buňky jsou v přímém kontaktu s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou jim rychle přístupné, což s dobrou výměnou dýchacích plynů umožňuje suspenzi velmi rychlý růst. Ideální buněčná suspenze je morfologicky a biochemicky homogenní, avšak při dlouhodobé kultivaci se stává značně heterogenní, zejména kvůli genetickým změnám, které jsou v suspenzních kulturách poměrně časté (Sedláčková, 2014; Špandelová, 2010).

Suspenzní nebo kalusové kultury vykazují při dlouhodobější kultivaci určitou nestabilitu. K nejčastěji pozorovaným změnám v kulturách *in vitro* patří polyploidie, aneuploidie, výskyt chimér, nebo redukce počtu chromozomů. Geneticky stabilní, a to i dlouhodobě, jsou kultury pěstované klasickými metodami mikropropagace odvozené z jednonodálních segmentů prýtu, nebo ze vzrostných vrcholů (Hradilík, 2005).

2.3.2 Využití explantátových kultur

Explantátové kultury rostlin nalézají uplatnění v různých odvětvích, mají využití jak pro účely výzkumné, tak pro účely farmaceutické nebo hospodářské. Techniky explantátových kultur jsou čím dál více využívány k vegetativnímu množení rostlin (mikropropagace), ozdravování od patogenů, dlouhodobému udržování genetických zdrojů a šlechtění rostlin. V šlechtitelském procesu se využívá zejména mikropropagace vzácných genotypů, produkce haploidních rostlin, regulace procesu oplození *in vitro* a tvorby nových odrůd indukovanou mutací nebo hybridizací vzdálených taxonomických druhů. Získávání klonů ohrožených rostlinných druhů napomáhá k udržování genofondu a ke studiu rostlinné integrity. Plně se využívá také metody předselektce rostlin, která představuje zvýšení efektivity a snížení nákladů na následné křížení a šlechtění (Hussain et al., 2012; Seman, 1990).

Ve farmaceutickém průmyslu, lze explantátové kultury uplatnit pro alternativní přípravu produktů dosud získávaných z rostlin v polní kultuře, nebo k získání produktů obsažených v nesnadno pěstovatelných rostlinách (Gaosheng a Jingming, 2012; Sedláčková, 2014). Z některých rostlinných explantátů, byly izolovány látky, které nebyly nalezeny v mateřských rostlinách, z nichž byly kultury odvozeny. Tento poznatek umožňuje využívat explantáty také pro získání nových látek vytvořených v důsledku změn metabolismu explantovaných rostlinných buněk (Špandelová, 2010).

Suspenzní kultury se využívají jako modelový systém při studiu procesů sekundárního metabolismu, indukci enzymů, projevů genové exprese a jako výchozí materiál pro izolaci enzymů. Buněčné suspenzní kultury jsou také využívány pro mutační šlechtění rostlin a k produkci somatických embryí (Hradilík, 2005).

K výzkumným účelům slouží explantáty ve formě kalusových biotestů, pomocí nichž se hodnotí aktivita studovaných látek v konkrétním biologickém procesu. Jako příklad lze uvést měření cytokininové aktivity, které je založeno na schopnosti cytokininu stimulovat buněčné dělení tzv. cytokinin-dependentního kalusu, který vzniká pouze za přítomnosti cytokininů v živném médiu. Po stimulaci cytokininem dochází k nárůstu kalusu, který se po 4 týdnech zváží. Aktivita cytokininu přímo souvisí s nárůstem hmotnosti ovlivněného kalusu. Hmotnost kalusu tedy odpovídá míře cytokininové aktivity studované látky. V médiu, které neobsahuje cytokininy, nedochází k dělení a narůstání hmotnosti kalusu (Murashige a Skoog, 1962; Lefnar, 2014). Jedná se o technicky náročný biotest s dlouhou dobou kultivace a prací ve sterilních podmínkách, proto jej často nahrazují modernější metody. Nevýhodou je i možný rozklad testované látky, a proto je vhodnější používat receptorový test, kde kultivační doba nepřesahuje 24 hodin (Dohnálková, 2012). Kromě měření aktivity cytokininů lze jako další příklad použití kalusového testu uvést zkoumání fytotoxicity, kdy se sleduje nárůst nebo úbytek kalusového pletiva v závislosti na koncentraci zkoumaného toxikantu v živném médiu. Výsledkem testu je růstová křivka závislosti rychlosti růstu kalusu na čase (Kočí a Mocová, 2009).

Výhodou celého kultivačního procesu je kultivace za řízených umělých podmínek bez přítomnosti škůdců, použití insekticidů a herbicidů, bez závislosti na úrodnosti půdy, ročním období nebo klimatických podmínkách. Genetická stejnorodost klonů usnadňuje pokusy, kde je potřeba mít stejné rostliny, aby se vyloučil vliv odlišného genotypu při vyhodnocování výsledků (Balážová et al., 2016; Gaosheng a Jingming, 2012).

2.3.2.1 Využití *in vitro* technik pro produkci SM

Využití explantátů pro produkci látek průmyslově, nebo farmaceuticky využitelných je jednou z významných perspektiv rostlinných biotechnologií.

Vyšší rostliny jsou cenným zdrojem řady léčiv, aromatických látek, esenciálních olejů, pigmentů, ochucovadel, látek s antimikrobiální aktivitou a mnoha dalších produktů, pro něž člověk nacházel a stále nachází nová uplatnění (Hradilík, 2005; Klouček et al., 2005).

Nejčastější model používaný při hledání nových látek začíná etnobotanickým průzkumem. U perspektivních rostlin s požadovaným účinkem následuje ověření možného využití, izolace a identifikace aktivních látek. Dalším krokem je zajištění produkce takového množství látky, které by za racionálních ekonomických podmínek pokrylo poptávku. V případě, že daná rostlina vytváří cílenou látku, je potřeba zvolit nejvhodnější způsob pro zajištění jejího obnovitelného zdroje. Jestliže z nějakého důvodu není možné nebo výhodné využít přirozeně pěstovaný rostlinný materiál, je nezbytné hledat alternativní cesty. K těm patří např. hledání jiného druhu produkujícího stejnou látku, chemická syntéza nebo produkce látek z rostlin pěstovaných *in vitro* (Klouček et al., 2005; Srivastava, 2011). Chemická syntéza mnoha SM, zejména alkaloidů, je často omezena vysokými výrobními náklady, komplexní strukturou a stereochemií molekul, což činí produkci metabolitů buněčnými kulturami výhodnější alternativou (Isah et al., 2017). Další výhodou *in vitro* techniky je syntéza probíhající v řízeném prostředí za umělých podmínek bez negativních biologických vlivů (např. škůdců) snižujících produkci SM a bez zatěžování přírodních zdrojů. Automatizací řízení buněčného růstu a regulací metabolických procesů může klesat výrobní cena a stoupat produkce (Hradilík, 2005).

V explantátové kultuře lze selektovat kultivary s vyšší produkcí SM, případně aplikovat některý ze způsobů zvýšení produkce SM v explantátových kulturách.

2.3.2.2 Techniky pro zvýšení produkce SM v rostlinách pěstovaných *in vitro*

Přirozenými procesy rostlin, zvyšujícími akumulaci SM jsou obranné reakce rostlin vůči stresovým faktorům. Zahrnují tvorbu specifických stresových proteinů a syntézu chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem. Tyto sekundární metabolity s ochrannou funkcí jsou u některých druhů rostlin přítomny trvale, avšak při infekci je produkce výrazně vyšší. Patří k nim některé flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy. Skupinu specifických nízkomolekulárních obranných látek tvoří fytoalexiny, které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují a začínou se vytvářet až po napadení patogenem. U systematicky příbuzných druhů se obvykle vyskytují podobné druhy fytoalexinů, např. u rostlin čeledi *Solanaceae*, to mohou být seskviterpeny (Procházka et al., 1998; Jahodář, 2011).

Rostliny pěstované *in vitro* většinou nedosahují tak intenzivní biosyntézy a jejich produkce je až na některé výjimky nižší než u intaktní rostliny (tj. původní, mateřské, pěstované v přirozených podmínkách), proto jsou hledány techniky, které by produkci a akumulaci SM zvýšily (Zdražilová, 2009; Isah et al., 2017). Pro nalezení ideálních parametrů je nezbytné čelit testování a optimalizaci technik pro zvýšení produkce. Mezi tyto techniky patří selekce vysokoprodukčních buněčných linií, optimalizace složení a pH živného média (poměr živin, hormonů), výběr nejvhodnější kultivační strategie a další specifické techniky:

– Využití imobilizovaných rostlinných buněk a suspenzních kultur

Produkcí SM, lze významně ovlivnit vhodným zvolením kultivační strategie. Suspenzní kultura byla a je hlavní cestou pro studium sekundárního metabolismu rostlinné buňky. Tento typ kultivace zahrnuje zpravidla nediferencované nebo částečně diferencované buňky, a proto je nevhodný pro syntézu produktů spojenou s určitým stupněm organizace pletiva (Payne, 1992). Prodloužením period subkultivace klesá produktivita suspenzních kultur. Pokles může být způsoben genetickými změnami z podmínek prostředí, které limitují genovou expresi nebo ze selekce rychle rostoucího buněčného typu z heterogenní populace buněk v kultuře. Kvůli pomalému růstu a nízké produktivitě rostlinných buněk musí být suspenzní kultury udržovány za aseptických a kontrolovaných podmínek mnoho týdnů. Při delší kultivaci se v důsledku metabolických i genetických změn původní homogenní kultura stává kulturou heterogenní (Payne 1992; Hradilík, 2005). Suspenzní kultury se mohou projevit rychlým růstem spojeným s vysokou akumulací požadovaných metabolitů v krátké době. Tato technologie může být účinným prostředkem k produkci

komerčně významných rostlinných produktů (Fuss, 2003). Pro kontinuální kultivaci buněčných suspenzí se používají bioreaktory s automatickou kontrolou hustoty suspenze, obsahu živin, kyslíku a se stálou regulací pH (Hradilík, 2005). Bioreaktory jsou velkokapacitní biotechnologická zařízení, ve kterých probíhá reakce v důsledku působení enzymu nebo živých buněk. Umožňují kultivovat buňky ve sterilním prostředí obsahující živiny a látky potřebné pro růst a jeho regulaci (Kaštánek, 2001). Bioreaktory slouží buď k biotransformacím, nebo až ke komplexním syntézám (Hradilík, 2005).

Jako velmi perspektivní způsob kultivace vhodný pro zvýšení produkce látek, je využití imobilizovaných rostlinných buněk, u kterých byla v porovnání s běžnými buněčnými kulturami, prokázána vyšší produkce SM (Hradilík, 2005). Jedná se o způsob kultivace, při kterém jsou buňky imobilizovány. Imobilizace je proces, kterým dosáhneme znehybnění buňky na určitém nosiči, což umožňuje mnohem efektivnější a jednodušší manipulaci s materiálem (Kaštánek, 2001). Organizace a diferenciaci rostlinných buněk je spojena s vyšší produkcí SM. Tato metoda napodobuje jejich přirozené rozmístění. Katalyticky aktivní enzymy a buňky jsou přichyceny na pevné fázi a je zabráněno jejich vstupu do fáze kapalné, kterou jsou omývány (Ramachandra a Ravishankar, 2002). Lze ji dělit na dva druhy, a to na imobilizaci aktivní, při níž se buňky uzavírají do polymerů (např. alginát sodný, agar, agaróza, polyakrylamid), kde dojde po smíchání buněk s monomery k polymerizaci, která způsobí imobilizaci; a na imobilizaci pasivní, která je založena na umístění buněk do porézního materiálu, nejčastěji polyuretanové pěny (molitan), (Hradilík, 2005). Imobilizované buňky jsou následně kultivovány v bioreaktorech a používají se k jedno- nebo i více krokovým biotransformacím prekurzorů na požadované produkty, ale i pro biosyntézu SM *de novo* (Payne, 1992).

– Aplikace prekurzorů

K vytváření hodnotnějších produktů lze do média přidat prekurzory příslušných produktů. Prekurzory jsou chemické sloučeniny předcházející jiné sloučenině na metabolické dráze. Tento postup optimalizace je založený na biotransformační reakci, umožňující dokončení syntéz finálních látek, které nelze syntetizovat uměle. V tomto případě lze do média přidat prekurzory vyrobené např. synteticky a rostlinné buňky provedou jejich konečnou úpravu. Použití syntetických náhrad vedle přirozených substrátů může mít za následek produkci nových sloučenin, které by mohly mít farmakologické využití (Payne, 1992; Hradilík, 2005). Mezi komerčně dostupné prekurzory, které biosyntézu podporují, patří například L-fenylalanin a koniferylalkohol (Fuss, 2003). Pro optimální produkci je nutné

dbát na vhodnou koncentraci prekurzoru, načasování dávky a vstup prekurzoru do cílové biosyntetické dráhy. První pokusy přidávání prekurzorů do médií byly prekurzory pro syntézu alkaloidů v roce 1965 (Isah et al., 2017).

Ve studii Lee et al. (2007), byly jako prekurzory pro výrobu SM α -solaninu, solanidinu a solasodinu, použity exogenní rostlinné steroly jako jsou cholesterol, stigmasterol a směs sterolů (β -sitosterolu, campesterolu a dihydrobrassicasterolu). Z výsledků studie je zřejmé, že žádný z použitých prekurzorů neměl vliv na růst buněk, ale zvyšoval hladiny metabolitů v buňkách. Obsah solasodinu byl po podání stigmasterolu až 10x vyšší než obsah v kontrole.

– Aplikace elicitorů

Dalším způsobem zvýšení produkce SM je aplikace elicitorů. Elicitace je metoda, která je z hlediska zvýšení produkce SM, považovaná za nejefektivnější. Pro zvýšení produkce využívá obranných (stresových) mechanismů rostlin (Isah et al., 2017).

Elicitory jsou signální látky, které dávají podnět k expresi genů nezbytných pro syntézu antimikrobiálně působících sekundárních látek (fytoalexinů). Aktivují určité enzymy, které katalyzují tvorbu fytoalexinů, i jiných stresových látek s charakterem SM (Kováč, 1995). Použitím elicitorů se zkrátí doba potřebná k dosažení vysoké koncentrace produktu. Na základě dosavadních znalostí se předpokládá, že elicitory indukovaná produkce a akumulace fytoalexinů a jiných stresových metabolitů rostlinnými kulturami *in vitro* je regulována stejnými mechanismy jako v případě intaktní rostliny. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (tzv. *second messengers*). Ti pak přenášejí signály v buňce trasdukcí signálními cestami, což vede ke genové expresi a biochemickým změnám (Zdražilová, 2009; Isah et al., 2017).

Elicitory mohou být biotické i abiotické. V souvislosti s akumulací produktů v suspenzních kulturách mohou působit jako mediátory při jejich syntéze nebo jako stresové faktory. Biotické elicitory jsou obvykle účinné již při velmi nízkých koncentracích. Řadí se mezi ně signální organické molekuly (např. kyselina salicylová, methyljasmonát), buněčné extrakty (chitosan, kvasinkový extrakt), patogenní i nepatogenní organismy nebo jejich části (bakterie, viry, kvasinky, mykoplasmata) atd. Abiotické elicitory zahrnují chemické a fyzikální vlivy, které rostlinu stresují a tím spouštějí tvorbu fytoalexinů. Mezi abiotické elicitory se řadí anorganické soli, těžké kovy, fyzikální vlivy (UV záření), alkalita, osmotický tlak atd. Oproti biotickým faktorům mají tu výhodu, že

jsou chemicky zcela definované a lze je tak aplikovat v přesném množství. Podmínkou úspěšné elicítace je nalezení správného druhu elicítoru o vhodné koncentraci a jeho optimální doby působení na tuto kulturu (Isah et al., 2017).

Moussous et al. (2018) testovali vliv biotických elicítorů (*Pseudomonas fluorescens*) na explantáty transgenních kořenů *Datura innoxia*, *D. stramonium* a *D. tatula*, založených pomocí kmene *Agrobacterium rhizogenes*. Explantáty kořenů *Datura* spp. jsou geneticky stabilní a produkují vysoké hladiny tropanových alkaloidů. Pro ještě větší výnos byly jako biotické elicítory použity tři kmeny *Pseudomonas fluorescens*, bylo zjištěno, že všechny tři kmeny *P. fluorescens* zvýšily výtěžky hyoscyaminu a skopolaminu ve srovnání s neošetřenými kulturami.

Hong et al. (2012) sledovali vliv elicítorů chitosanu, hydrolyzátu kaseinu, kvasnicového extraktu a d-sorbitolu na zvýšení produkce tropanových alkaloidů. Rostlinným materiálem byl *Hyoscyamus niger*. Z výsledků však vyplývá, že pro produkci skopolaminu a hyoscyaminu nebyla nutná elicítace, protože nedošlo k žádnému významnému navýšení produkce tropanových alkaloidů. Autoři dosáhli nejlepšího výsledku optimalizací složení média, při němž použili MS médium doplněné o 0,5 mg/l IBA.

Sivanandhan et al. (2012) použili jako elicítory pro stimulaci produkce withanolidů *Withania somnifera*, methyljasmonát a kyselinu salicylovou. Materiálem byly indukované kořeny odvozené z kalusů z listů. Studie prokázala, že pro produkci withanolidů, je kyselina salicylová vhodnějším elicítorem než methyljasmonát, ačkoli i ten měl vyšší výnosy metabolitů než neošetřené kultury. Oba elicítory zlepšily produkci jak hlavních withanolidů (withanolid A, withanolid B, withaferin A a withanon), tak těch méně významných (withanosidy aj.).

– **Permeabilizace**

Metabolické produkty jsou často uloženy ve vakuolách rostlinných buněk, ale ne vždy jsou schopny se dostat z vakuoly do cytoplasmy, proto se používají látky, které jsou schopny ovlivnit tyto membránové bariéry tak, aby se díky vytvořeným pórům staly pro tyto metabolity propustné. Mezi využívané látky patří některá organická rozpouštědla, jako jsou isopropanol a dimethylsulfoxid. Dále je pro permeabilizaci membrány možné použít polysacharid chitosan nebo ultrazvuk (Ramachandra a Ravishankar, 2002)

– **Odstranění produktu *in situ***

Jestliže je vytváření produktu předmětem zpětnovazebné inhibice nebo intracelulární degradace, odstranění a izolace produktu může zvýšit jeho celkovou produkci. Produkované sekundární metabolity se hromadí v cytoplazmě nebo vakuolách. Aby nedošlo k zastavení jejich produkce, je nutné tyto metabolity odčerpávat bez narušení metabolické aktivity buňky. K adsorpci SM jsou používány hydrofobní materiály, například polymerní pryskyřice (Payne, 1992).

– **Metabolické a genové inženýrství**

Metabolické inženýrství je podoblast genového inženýrství. Zabývá se zejména studiem bioaktivity metabolických produktů a její optimalizací související s enzymatickými, transportními a regulačními funkcemi. Metabolické inženýrství umožňuje modifikaci struktury sekundárního metabolismu za účelem získání nových molekul s lepšími terapeutickými a biologickými vlastnostmi. Využívá technologií genových manipulací zaměřujících se na zesílení exprese (over-exprese) genu a umožňuje změnu biosyntetických cest, tak aby docházelo ke zvýšení obsahu SM. Nadměrná exprese určitých genů účastnících se biosyntetické dráhy však nemusí vždy nutně znamenat vyšší produkci, jak je patrné i u některých alkaloidů. Kromě zesílení exprese genu (over-exprese) lze pro vyšší produkci metabolitů využít také *knockdownu* exprese genu (*silencing*) (Isah et al., 2017; Klouček et al., 2005).

Například byl vytvořen transgenní rulík zlomocný (*Atropa belladonna*), který produkuje skopolamin. Tato rostlina běžně produkuje pouze hyoscyamin, ale byl do ní vložen gen z blínu černého (*Hyoscyamus niger*) pro enzym hyoscyamin-6 β -hydroxylázu, která katalyzuje přeměnu hyoscyaminu ve skopolamin (Yun et al., 1992).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Rostlinný materiál

K experimentům byla použita semena *Datura stramonium* (durman obecný), *D. inoxia* (durman neškodný), *Mandragora officinarum* (mandragora lékařská), *Nicotiana rustica* (tabák selský), *N. tabacum* (tabák virginský), *Withania somnifera* (vitánie spánkonosná), kořen *Mandragora officinarum*, kořen a prýty *Withania somnifera*, (Tab. 1).

Tab. 1: Rostlinný materiál použitý během experimentů

Druh	Část rostliny	Původ
<i>Datura stramonium</i>	semena	Botanická zahrada UP
<i>Datura inoxia</i>	semena	Centrum léčivých rostlin Brno
<i>Mandragora officinarum</i>	semena, kořen	Centrum léčivých rostlin Brno
<i>Nicotiana rustica</i>	semena	Botanická zahrada UP
<i>Nicotiana tabacum</i>	semena	Centrum léčivých rostlin Brno
<i>Withania somnifera</i>	semena, kořen, prýty	Centrum léčivých rostlin Brno

3.2 Příprava rostlinného materiálu

3.2.1 Povrchová sterilizace a příprava semen *Datura stramonium*, *D. inoxia*, *Nicotiana tabacum*, *N. rustica*, *W. somnifera* a *Mandragora officinarum*

a) Standardní postup sterilizace semen

Nepoškozená semena (10 – 50 ks) byla povrchově sterilizována následujícím postupem:

- Vložení semen do injekční stříkačky (objem 20, 50 ml). V případě, že průměr otvoru (hrdla) injekční stříkačky byl větší než průměr semen, byla semena nejprve zabalena do uhelony (72 µm) a svázána nití.
- Nasátí 70% ethanolu, doba působení 1 – 5 min (Tab. 2).
- Odstranění ethanolu, nasátí 2.5% chloraminu T nebo 36% roztoku Sava s kapkou smáčedla (Tween).
- Umístění na třepačku (IKA KS basic 130, 240 otáček/min) po dobu 30 – 40 min (Tab. 2).
- Přenesení stříkaček do prostředí flowboxu, odstranění chloraminu T nebo Sava.
- Opláchnutí konců stříkaček 96% ethanolem v oblasti, která byla v kontaktu se sterilní vodou.
- Promývání semen ve sterilní destilované vodě, 3x po dobu 5 min.

- Výsev semen do Petriho misek (ø 6 nebo 9 cm) obsahujících médium MS nebo filtrační papíry zvlhčené sterilní destilovanou vodou. Experimenty byly opakovány minimálně 3x.

Tab. 2: Doba působení sterilizačních roztoků semen (v minutách)

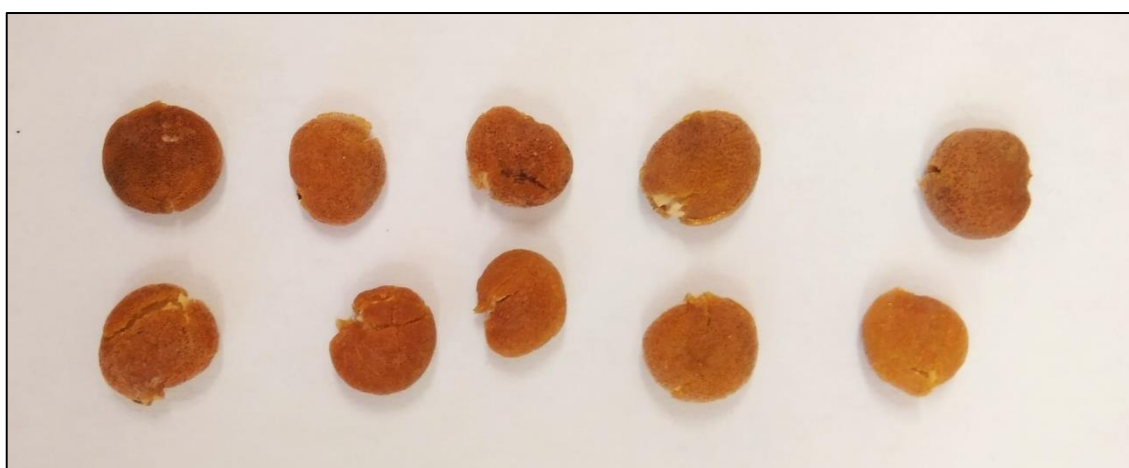
Druh	70% ethanol	2.5% chloramin T	36% Savo
<i>Datura stramonium</i>	5	30	–
<i>Datura inoxia</i>	5	30	–
<i>Nicotiana tabacum</i>	1 – 2	–	30
<i>Nicotiana rustica</i>	1 – 2	–	30
<i>Withania somnifera</i>	3 – 4	–	30
<i>Mandragora officinarum</i>	5	–	40

Optimalizace standardního postupu sterilizace semen *Mandragora officinarum*:

V dalších opakováních byla pozměněna příprava semen mandragory následujícími způsoby:

- Semena (10 ks) byla před sterilizací lehce obroušena smirkovým papírem (tak, aby bylo narušeno osemení ale nebylo porušeno embryo).
- Semena (10 ks) byla naklepnuta kladívkem (tak, aby bylo narušeno osemení ale nebylo porušeno embryo), (Obr. 7).

Z důvodu vnitřních kontaminací byla semena při některých opakováních vyseta na filtrační papíry navlhčené 1% roztokem Plant Preservative Mixture (PPM) v Petriho miskách.



Obr. 7: Semena *Mandragora officinarum* naklepnutá kladívkem

b) Sterilizace semen *Mandragora officinarum* založena na principu simulace trávického traktu

Nepoškozená semena byla povrchově sterilizována následujícím postupem:

- Vložení semen (10 ks) do kádinky s 0.01M HCl (kyselina chlorovodíková).
- Umístění kádinky na třepačku (IKA KS basic 130, 240 otáček/min) po dobu 2 hodin.
- Promytí sterilní destilovanou vodou, 4x po dobu 5 min.
- Vložení semen do 70% ethanolu, doba působení 1 min.
- Vložení semen do 36% roztoku Sava, doba působení 15 min.
- Výsev semen do Petriho misek (ø 6 nebo 9 cm) s filtračními papíry navlhčenými sterilní destilovanou vodou.

Petriho misky (ø 6 a 9 cm) byly uzavřeny parafilmem a kultivovány v termostatu ve tmě při 25 °C, kontrola probíhala v týdenních intervalech po dobu 6 týdnů.

3.2.2 Povrchová sterilizace kořene *Mandragora officinarum* a *Withania somnifera*

Pomocí skalpelu bylo odebráno několik segmentů kořene *W. somnifera* a *M. officinarum* (Příloha 2: Obr. 20). Postup sterilizace a kultivace kořenů:

- Mechanické očištění kořenů kartáčem, promývání pod tekoucí vodou po dobu 30 min.
- Vložení kořene do injekční stříkačky (50 ml).
- Nasátí 70% ethanolu, doba působení 1 – 2 min.
- Odstranění ethanolu a nasátí 2.5% chloraminu T.
- Umístění stříkačky na třepačku (IKA KS basic 130, 240 otáček/min), po dobu 20 min.
- Přenesení kořene do prostředí flowboxu, opláchnutí sterilní destilovanou vodou.
- Nasátí 4% roztoku Plant Preservative Mixture (PPM), doba působení 20 hodin.
- Odstranění PPM, nařezání segmentů kořene pomocí pinzety a skalpelu (tloušťka 0.3 – 0,5 mm), přenesení segmentů na MS médium obsahující PPM (1 ml PPM na 1 l média), (Příloha 2: Obr. 23).
- Vážení segmentů kořene (180 – 200 mg).

Petriho misky (ø 6 cm) byly uzavřeny parafilmem a kultivovány v termostatu ve tmě při 25 °C, kontrola misek probíhala v týdenních intervalech.

3.2.3 Povrchová sterilizace a odvození kultur z prýtů *Withania somnifera*

Byly odebrány prýty kořene *Withania somnifera* rostoucí v perlitu ve skleníku (Příloha 2: Obr. 21)

Postup sterilizace a kultivace rostliny:

- Nařezání segmentů prýtů *W. somnifera*: listy a nodální segmenty (Příloha 2: Obr. 22)
- Vložení nařezaných segmentů (zvláště) do 2 stříkaček (20 ml), (Obr. 8).
- Načerpání roztoku 70% ethanolu, doba působení 2 – 3 min.
- Odstranění ethanolu, nasátí 2.5% chloraminu T.
- Umístění stříkaček na třepačku (IKA KS basic 130, 240 otáček/min) po dobu 15 min.
- Přenesení stříkaček do prostředí flowboxu, opláchnutí konců stříkaček 96% ethanolem v oblasti, která byla v kontaktu se sterilní vodou.
- Promývání segmentů ve sterilní destilované vodě, 3x po dobu 2 min.
- Odřezání nekrotizujících částí vzniklých působením sterilizačních roztoků.
- U listů odřezání hlavní žilky a okraje listu, položení segmentů (velikost min. 1 x 1 cm) palisádovou – svrchní stranou na médium MS, zanoření okrajů segmentu do média.
- Zanoření nodálních segmentů (délka 0.7 – 1 cm) do Petriho misky s MS médiem bazální částí segmentu do média.

Petriho misky (ø 6 cm) byly uzavřeny parafilmem a kultivovány v termostatu ve tmě při 25 °C. Petriho misky byly kontrolovány v týdenních intervalech. Tento postup byl proveden ve třech opakováních. Při jednom z opakování byly navíc připraveny segmenty řapíků (délka min. 0.5 cm) pro iniciaci kalusů.



Obr. 8: Segmenty prýtů (listy, nodální segmenty) *Withania somnifera* v injekčních stříkačkách

3.2.4 Mikropropagace *W. somnifera* a kalogeneze u *M. officinarum* a *W. somnifera*

Pro mikropropagaci a iniciaci kalusů (kalogenezi) bylo použito sedm kultivačních médií (MS, MSC I, MSC II, MSC III, W1, W2 a W3). Každé médium obsahovalo 7.4 g/l agaru, 4.405 g/l média MS (Duchefa Biochemie, složení Tab. 8) a 30 g/l sacharózy (PENTA). Vzájemně se média lišila obsahem růstových regulátorů uvedeným v Tab. 3. Pro iniciaci kultivace segmentů bylo použito médium MS, které neobsahovalo žádné růstové regulátory.

Tab. 3: Složení kultivačních médií – obsah růstových regulátorů

	Označení média	Médium	BAP [mg/l]	NAA [mg/l]	IBA [mg/l]
Iniciace kultury	MS	MS	–	–	–
	MSC I	MS	1.0	2.5	–
Iniciace kalusu	MSC II	MS	2.0	5.0	–
	MSC III	MS	–	–	1.5
Mikropropagace	W1	MS	0.5	1.5	–
	W2	MS	0.5	–	–
	W3	MS	1.0	–	–

Postup přípravy médií:

- Do kádinky (1000 ml) bylo naváženo 7.4 g agaru (Duchefa Biochemie), bylo přidáno 600 ml destilované vody a směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě.
- Za stálého míchání na magnetické míchače (Heidolph MR Hei-Standard) bylo ve 400 ml destilované vody rozpuštěno 4.405 g média MS (Duchefa Biochemie, složení uvedené v Tab. 8) a 30 g sacharózy (PENTA). Poté byly do roztoku přidány růstové regulátory (viz Tab. 3).
- Oba dva roztoky byly smíchány a pH bylo upraveno pomocí 0.1 M NaOH nebo 0.1 M HCl na 5.7. K měření pH byl použit pH metr (Mettler Toledo FiveEasy FE20) a pH papírky pro orientační kontrolu.
- Médium bylo rozlito do skleněných lahví se závitkem (objem lahve 250 ml a 500 ml) a bylo sterilizováno v autoklávu (121 °C, 100 kPa) po dobu 30 min.

3.2.4.1 Iniciační kalus u *M. officinarum* a *W. somnifera*

Pro iniciaci kalusů byl použit sterilizovaný kořen *M. officinarum* a *W. somnifera* (viz 3.2.2) a listy a řapíky *W. somnifera* (viz 3.2.3). Iniciační segmentů probíhala v Petriho miskách s MS médiem doplněným o PPM (1 ml PPM na 1 l média). Po týdnu byly segmenty přeneseny na média MSCI a MSCII. Pro optimalizaci iniciace kalusů u listů *W. somnifera* bylo použito médium MSCIII. Složení médií v Tab. 3.

Petriho misky byly kultivovány v termostatu při 25 °C, ve tmě. Některé Petriho misky byly umístěny do fytotronu s denním režimem 16/8 hod den/noc a teplotou 22 ± 2 °C. Pasážování explantátů probíhalo v týdenních intervalech po dobu 4 týdnů. Před přenesením explantátu na čerstvé médium byly odřezány nekrotické části.

3.2.4.2 Mikropropagace *W. somnifera* z nodálních segmentů

Pro mikropropagaci *W. somnifera* byly použity sterilizované nodální segmenty (viz 3.2.3). Iniciační kultury probíhala v Petriho miskách s MS médiem (Obr. 9). Po prorostení úžlabních pupenů byly takto iniciované segmenty převedeny do Erlenmayerových baněk obsahujících médium W1, W2 nebo W3, (viz Tab. 3). Médium W3 bylo použito po vyřazení média W1, v rámci optimalizace metody.

Petriho misky byly kultivovány v termostatu při 25 °C, ve tmě. Explantáty v Erlenmayerových baňkách byly umístěny do kultivační místnosti – fytotronu s denním režimem 16/8 hod den/noc a teplotou 22 ± 2 °C. Pasážování explantátů probíhalo po 4 týdnech kultivace, po dobu 16 týdnů. Během pasážování byly odřezávány nekrotické části, žluté listy a kalus na bázi explantátu.



Obr. 9: Nodální segment *Withania somnifera* na iniciačním médiu MS, foceno v den založení kultury

4 VÝSLEDKY

Cílem experimentální části bylo testování klíčivosti semen *W. somnifera*, *M. officinarum*, *Datura stramonium*, *D. inoxia*, *N. tabacum* a *N. rustica*, iniciace kalusů u *M. officinarum* a *W. somnifera* a mikropropagace *W. somnifera*. Některé postupy byly průběžně optimalizovány. Experimenty probíhaly v laboratořích Oddělení tkáňových kultur a rostlinných biotechnologií Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období od října 2016 do července 2017.

4.1 Povrchová sterilizace semen a testování klíčivosti

Experimenty byly prováděny minimálně ve 3 opakováních. Výskyt kontaminací a klíčivost semen jsou průměrem zjištěných hodnot všech opakování vyjádřených v procentech. Hodnocení semen probíhalo v týdenních intervalech po dobu 6 týdnů. Získané výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Testování klíčivosti semen u vybraných zástupců čeledi *Solanaceae*

	Počet semen	Způsob kultivace	Klíčivost [%]	Kontaminace [%]
<i>Datura stramonium</i>	30	MS médium	0	3.1
<i>Datura stramonium</i>	30	FP + H ₂ O	0	4.5
<i>Datura inoxia</i>	50	FP + H ₂ O	0	4.0
<i>Nicotiana tabacum</i>	75	FP + H ₂ O	72.0	1.3
<i>Nicotiana rustica</i>	75	FP + H ₂ O	62.6	4.0
<i>Withania somnifera</i>	50	FP + H ₂ O	0	0
<i>Mandragora officinarum</i>	20	FP + H ₂ O	0	20.0
<i>Mandragora officinarum</i>	20	FP + 1% PPM	0	0
<i>M. officinarum</i> – obroušení	20	FP + H ₂ O	0	13.3
<i>M. officinarum</i> – naklepnutí	20	FP + H ₂ O	0	13.0
<i>M. officinarum</i> – simulace traktu	20	FP + H ₂ O	0	0

Pozn.: FP – filtrační papír

4.1.1 Povrchová sterilizace semen a klíčivost u *Datura stramonium* a *D. inoxia*

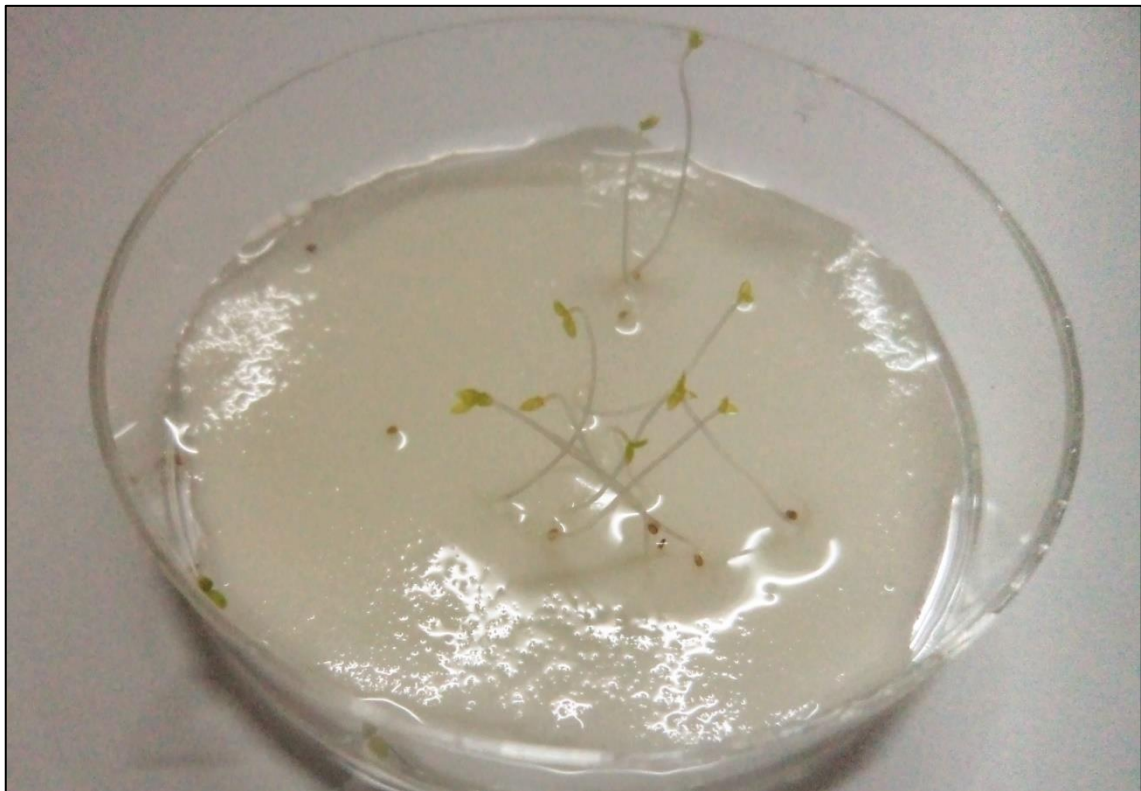
Bylo vysazeno 60 semen *Datura stramonium* (Příloha 2: Obr. 15) a 50 semen *Datura inoxia* (Příloha 2: Obr. 14). Sterilizace byla provedena pomocí 70% roztoku ethanolu a 2.5% chloraminu T (viz Tab. 2). Semena byla vysazena na MS médium a na filtrační papír navlhčený sterilní vodou.

Nejméně kontaminací bylo zjištěno u semen kultivovaných na MS médiu (Příloha 2: Obr. 16) Vyšší procento kontaminací vykazovala semena kultivovaná na navlhčeném filtračním papíře (kontaminace 4 %). U rodu *Datura* nebyla získána žádná klíčící semena. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.

4.1.2 Povrchová sterilizace semen a klíčivost u *Nicotiana tabacum* a *N. rustica*

Bylo vysazeno 75 semen *Nicotiana tabacum* a 75 semen *Nicotiana rustica*. Sterilizace byla provedena pomocí 70% roztoku ethanolu a 36% roztoku Sava (viz Tab. 2). Semena byla vysazena na filtrační papír navlhčený sterilní destilovanou vodou.

Kontaminace *Nicotiana tabacum* byla 3x nižší než u rodu *Nicotiana rustica*. Klíčivost u semen *Nicotiana tabacum* (Obr. 10) a *Nicotiana rustica* (Příloha 2: Obr. 17) byla 72.0 a 62.7 %. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.



Obr. 10: Klíčící semena *Nicotiana tabacum*, foceno po týdnu od vysazení

4.1.3 Povrchová sterilizace semen a klíčivost u *Withania somnifera*

Bylo vysazeno celkem 50 semen *Withania somnifera*. Sterilizace byla provedena pomocí 70% roztoku ethanolu a 36% roztoku Sava (viz Tab. 2). Semena byla vysazena na filtrační papír navlhčený sterilní destilovanou vodou.

Ze semen *Withania somnifera* nebyly získány klíčící rostlinky, kontaminace a klíčivost byla 0 % (Příloha 2: Obr. 18). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.

4.1.4 Povrchová sterilizace semen a klíčivost u *Mandragora officinarum*

Bylo vysazeno celkem 100 semen *Mandragora officinarum*. U 80 semen byla sterilizace provedena pomocí 70% roztoku ethanolu a 36% roztoku Sava (viz Tab. 2). Dalších 20 semen bylo sterilizováno na principu simulace trávicího traktu, přičemž byl použit 0.01M roztok HCl a 36% roztok Sava (Příloha 2: Obr. 19). Semena byla vysazena na filtrační papír navlhčený sterilní destilovanou vodou nebo 1% roztokem PPM.

Nejvyšší kontaminace (20 %) byla u semen vysazených na filtračním papíře navlhčeném sterilní destilovanou vodou. U obroušených a naklepnutých semen byla kontaminace přibližně stejná (13.3 a 13.0 %). Semena kultivovaná na filtračním papíře s 1% PPM a semena sterilizovaná na principu simulace trávicího traktu nevykazovala žádné známky kontaminace, ale nebyla získána žádná klíčící semena *Mandragora officinarum*. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.

4.2 Iniaci kalusu u *Mandragora officinarum* a *Withania somnifera*

Pro iniciaci kalusů byly použity kořeny *M. officinarum* a *W. somnifera* a listy a řapíky *W. somnifera*. Kontroly probíhaly v týdenních intervalech po dobu 4 týdnů. Získané výsledky jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Iniciace kalusu u *Mandragora officinarum* a *Withania somnifera*

		Médium	Segmenty*	Kalus	Beze změny	Kontaminace / nekrotizace
<i>Mandragora officinarum</i>	kořen	MSCI	12	7	3	2
		MSCII	12	7	2	3
<i>Withania somnifera</i>	kořen	MSCI	11	0	3	8
		MSCII	9	2	2	5
	list	MSCI	20	10	8	2
		MSCII	20	15	3	2
řapík	MSCI	4	1	3	0	
	MSCII	4	2	2	0	

*počet segmentů

4.2.1 Iniciace kalusu u kořene *M. officinarum*

Pro iniciaci kalusů u kořene *M. officinarum* bylo připraveno 24 kořenových segmentů, z nichž 12 bylo kultivováno na médiu MSC I a 12 na médiu MSC II (složení v Tab. 3). Výsledky iniciace kalusů u kořene *M. officinarum* jsou uvedeny v Tab. 5, velikosti kalusů jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6: Velikost kalusů u *M. officinarum*

Velikost [cm]	Počet
1 – 2	6
< 1 cm	2
minimální kalus*	6

*viditelné známky kalogeneze na povrchu segmentů kořene

Kalogeneze u explantátů kořene *M. officinarum* byla 58.3 %, jejich průměrná hmotnost byla 433.8 mg, což byl více než dvojnásobný hmotnostní nárůst segmentů (původní průměrná hmotnost segmentů byla 190 mg). Průměrná kontaminace na obou médiích byla 20.83 %. Pro iniciaci kalusů u *M. officinarum* byla obě média (MSC I i MSC II) srovnatelná.

Byl úspěšně odvozen kalus (Obr. 11, Příloha 2: Obr. 24), ale následná kultivace a pasážování bylo problematické. Po 5 týdnech od iniciace kultury kalusy postupně hnědly v důsledku nekrotizace.



Obr. 11: Kalus u segmentu kořene *Mandragora officinarum*, médium MSCI, foceno po 2 týdnech kultivace

4.2.2 Iniciace kalusu u kořene *W. somnifera*

Pro iniciaci kalusů u kořene *W. somnifera* bylo připraveno 20 kořenových explantátů. Kořeny byly kultivovány na médiích MSCI a MSCII (složení v Tab. 3). Výsledky iniciace kalusů u kořene *W. somnifera* jsou uvedeny v Tab. 5.

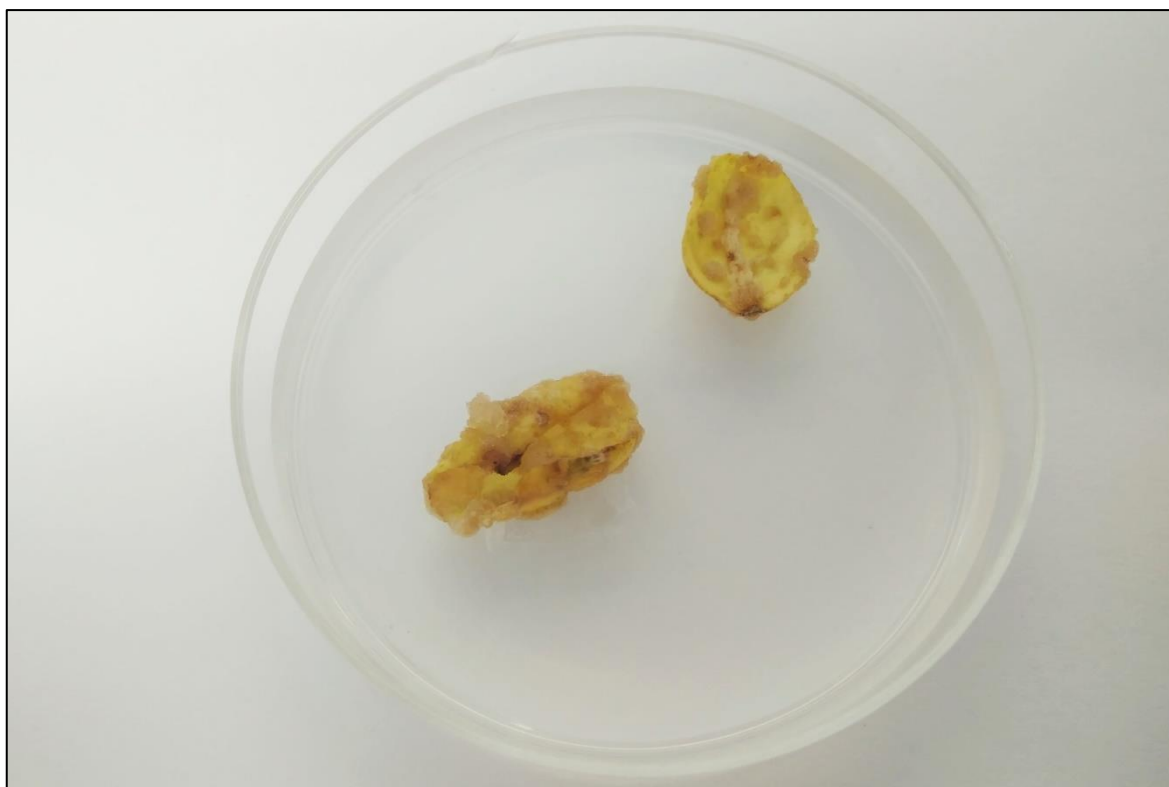
Kořenové explantáty byly velmi pevné, hnědly a nekrotizovaly. Z kořenového segmentu byly získány pouze 2 kalusy (Příloha 2: Obr. 25), nekrotizovalo 65 % (Příloha 2: Obr. 26).

4.2.3 Iniciace kalusu u listů a řapíků *W. somnifera*

Pro iniciaci kalusů u listů a řapíků *W. somnifera* (Příloha 2: Obr. 31) bylo připraveno 40 segmentů listů (Příloha 2: Obr. 27) a 8 segmentů řapíků. Segmenty pocházely z intaktní rostliny a byly po kultivaci na iniciačním médiu MS kultivovány na médiích MSCI

a MSCII (složení médií v Tab. 3). Výsledky iniciace kalusů u listů a řapíků *W. somnifera* jsou uvedeny v Tab. 5.

Nejvhodnější médium pro kalogenezi listů a řapíků *W. somnifera* bylo médium MSCII. Kalogeneze u segmentů listů na MSCII byla 75% (Obr. 12, Příloha 2: Obr. 29), na MSCI 50% (Příloha 2, Obr. 29). Na médiu MSCI i MSCII kontaminovalo 10 % explantátů. Během následných kultivací a dalšího pasážování docházelo k hnědnutí a drobení kalusů (Příloha 2: Obr. 30). Pro optimalizaci kalogeneze, bylo vybráno médium MSCIII, které na rozdíl od MSCI a MSCII neobsahovalo BAP a NAA, ale obsahovalo 1.5 mg/l IBA. Médium MSCIII nebylo pro optimalizaci vhodné.



Obr. 12: Iniciace kalusů u listových segmentů *Withania somnifera*, médium MSCII, foceno po 2 týdnech kultivace

4.3 Mikropropagace *W. somnifera* z nodálních segmentů

Pro mikropropagaci byly použity nodální segmenty *W. somnifera*. Iniciační kultura probíhala v Petriho miskách na médiu MS, u všech segmentů prorostly úžlabní pupeny a kontaminace při iniciaci kultur byla 0 %. Následně byly segmenty kultivovány na médiích W1, W2 a W3 v Erlenmayerových baňkách.

Bylo pozorováno, že médium W1 obsahující BAP i NAA, podporovalo iniciaci kalusů na bázi prýtů (Obr. 13, Příloha 2: Obr. 32). Po 12 týdnech bylo od kultivace na médiu W1, z důvodu vysoké kalogeneze a minimální mikropropagace, upuštěno. Médium bylo nahrazeno médiem W3 (Obr. 33), které obsahovalo dvojnásobné množství BAP obsažené v médiu W2. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Mikropropagace *W. somnifera* z nodálních segmentů

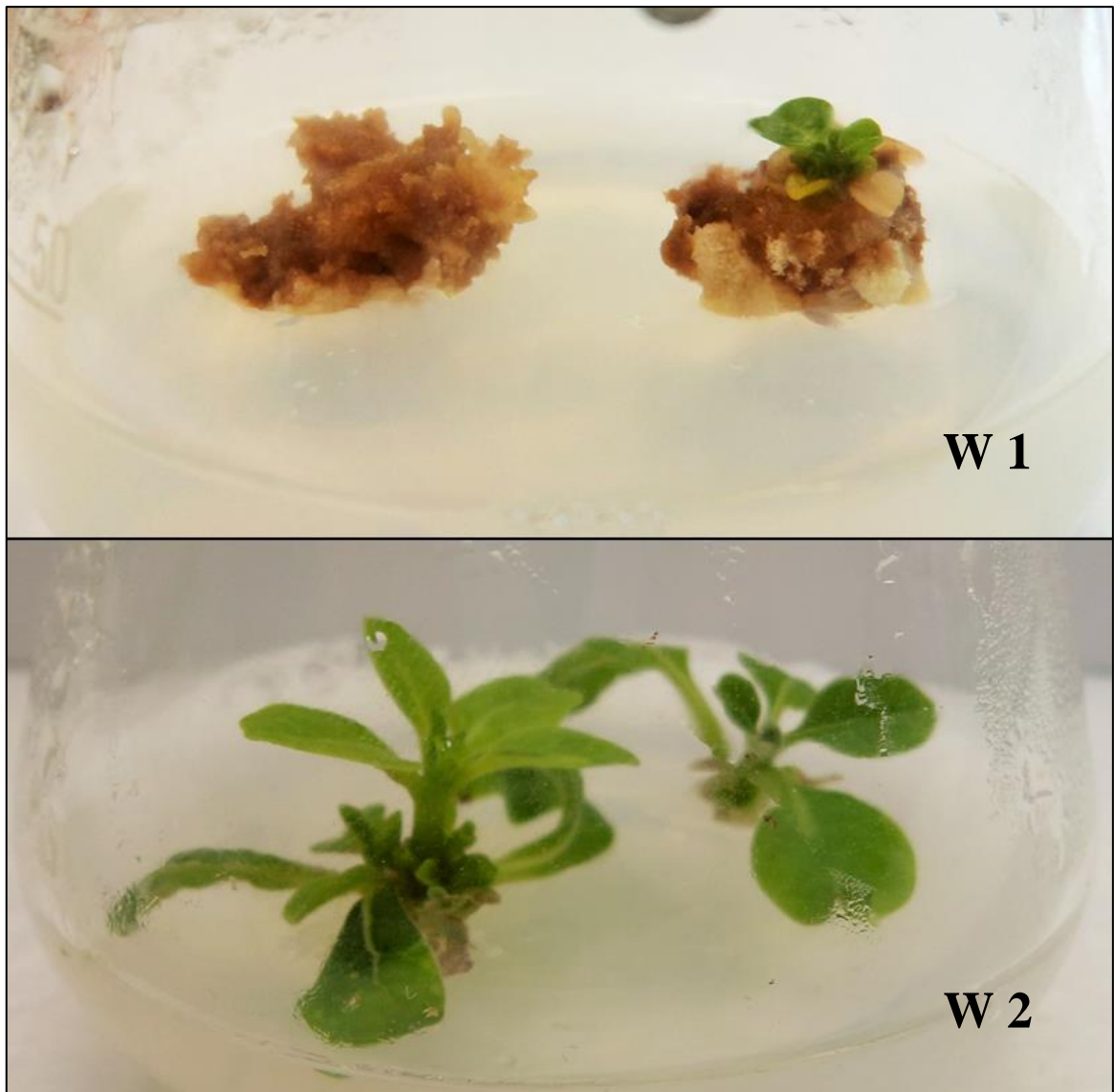
Médium	BAP [mg/l]	NAA [mg/l]	Koeficient zmnožení (\pm SE)*
W1	0.5	1.5	0.7 \pm 0.4
W2	0.5	–	1.9 \pm 0.1**
W3	1.0	–	1.0 \pm 0.2

*koeficient zmnožení je průměrný počet nových výhonků na jeden původní explantát po 4 týdnech; hodnota \pm SE udává střední chybu průměru;

**maximální počet prýtů: 3

Pozn.: počet segmentů na variantu byl 15

Nejvyšší koeficient zmnožení byl na médiu W2 (1.9 \pm 0.1), (Obr. 13), z čehož plyne, že je pro mikropropagaci *W. somnifera*, dle našich výsledků, nejvhodnější.



Obr. 13: Mikropropagace *Withania somnifera*: médium W1 (0.5 mg/l BAP, 1.5 mg/l NAA) – kalus na bázi prýtů, médium W2 (0.5 mg/l BAP) – zmnožení prýtů, foceno po 8 týdnech kultivace (před 3. pasáží)

5 DISKUZE

Metody explantátových kultur jsou ovlivněny řadou exogenních a endogenních faktorů, které mnohdy významně komplikují interpretaci výsledků. Postupy a metody, které mohou mít pozitivní výsledky u jednoho genotypu a typu explantátu, nemusí mít stejné výsledky u jiného explantátu.

Předložená práce studuje možnost využití některých metod explantátových kultur u vybraných léčivých rostlin z čeledi *Solanaceae*. Byla sledována úspěšnost sterilizace rostlinného materiálu, klíčivost semen, iniciace a růst kalusů a mikropropagace.

5.1 Povrchová sterilizace semen a testování klíčivosti

Velmi důležitým krokem pro založení *in vitro* kultury je sterilizace rostlinného materiálu. V experimentech této práce byla při standardním postupu sterilizace semen použita běžně využívaná sterilizační činidla: 70% ethanol, 36% Savo a 2.5% chloramin T. Doba působení sterilizačních roztoků se lišila podle velikosti a tvrdosti semen. V našich experimentech byly pozorovány kontaminace, jejich výskyt se lišil v závislosti na použitém sterilizačním postupu a na rostlinném rodu a druhu.

Hradilík (2005) uvádí, že mikrobiální kontaminace se liší v různých obdobích roku a také záleží na stanovišti, stáří semen i podmínkách jejich skladování. U semen, která nebyla skladována v optimálních podmínkách nebo byla více než 1 rok od sklizně, se předpokládá, že procento vnitřních kontaminací se bude zvyšovat a klíčivost snižovat. Proto je potřeba zvolit takový postup povrchové sterilizace, který zajistí co nejúčinnější eliminaci kontaminací.

V našich experimentech byla u semen rodu *Datura* poměrně nízká kontaminace (3 – 4.5%), ale nebyla získána žádná klíčící semena. Důvodem neklíčivosti mohl být např. vysoký obsah fenolických látek, nevhodný postup sterilizace, špatná vyzrálост nebo špatné uchovávání semen.

Abbaspour et al. (2016) studovali vliv dusíku (dusíkatých hnojiv) a zavlažování na klíčení semen *Datura stramonium*. Při studiu zjistili, že ve vztahu ke klíčivosti, hraje významnou roli umístění semen na mateřské rostlině. Uvádějí, že semena, která byla na rostlině umístěna výše, měla významně vyšší klíčivost než semena odebrána ze střední a spodní části rostliny. Tento poznatek lze přiřadit k možným faktorům vedoucím k neklíčivosti semen i v této práci, protože byla použita semena z neznámé části rostliny a neznámého stanoviště.

Klíčivost rodu *Nicotiana* lze považovat za úspěšnou, obdobný postup přípravy semen lze použít pro další experimenty. Kontaminace *N. tabacum* byla oproti *N. rustica* nižší, což odpovídá i tomu, že u *N. tabacum* byla vyšší klíčivost.

Silva a Senarath (2009) uvádějí, že procento klíčivosti semen *Withania somnifera* kultivovaných *in vitro* je nízké kvůli přítomnosti určitých inhibičních látek obsažených v plodech *W. somnifera* a že s časem klesá, v důsledku hromadění produkovaných látek semen. Sen a Sharma (1991) dosáhli u *Withania* klíčivosti semen 80 %. Pro sterilizaci semen byl však použit 0.1 % roztok HgCl₂ (chlorid rtuťnatý), jehož použití jsme se chtěli vyhnout, z důvodu jeho toxických účinků. Khanna et al. (2013) studovali klíčivost dvou typů *W. somnifera* (trpasličí, šlechtěný typ a vysoký *wild type*). Uvádějí, že klíčovými podmínkami pro získání klíčících semen jsou kontinuální světlo a teplota 25 °C. Pro sterilizaci semen použili 0.3% fungicid Dithane M 45. Semena 3 hodiny hydratovaná pod tekoucí vodou, měla klíčivost 67 % pro trpasličí typ a 55 % pro *wild type*. Nejeftektivnější postup pro získání klíčících semen je podle autorů ošetření semen kyselinou giberelovou (GA₃) o koncentraci 150 µg/ml a následná kultivace semen při kontinuálním světle a teplotě 25 °C, za těchto podmínek dosáhli klíčivosti až 98 % pro trpasličí typ a 60 % pro *wild type*. Dále autoři uvádí, že je důležité semena před sterilizací dobře vysušit, protože obsah vlhkosti oddaluje iniciaci klíčení až po dobu několika měsíců.

V našich experimentech byla u semen *Withania somnifera* kontaminace i klíčivost 0 %. Důvodem mohl být právě vysoký obsah inhibičních látek v semenech, sterilizace, která poškodila semena nebo tma, ve které byla semena kultivována. V případě optimalizace našeho experimentu by bylo vhodné dbát na dobré vysušení semen, změnit sterilizační postup, kultivovat semena při kontinuálním světle, hydratovat semena pod tekoucí vodou, případně ošetřit semena kyselinou GA₃.

Pandol (2013) získal klíčící rostlinky ze semen *Mandragora officinarum*, klíčivost byla 71.4 %. Ke sterilizaci použil 70% ethanol, kyselinu trichlorisokyanurovou (TCCA; o koncentraci 16.6 g/l) a roztok Tween 20. Semena klíčila až v případě, kdy pomocí skalpelu pečlivě ořezal osemení hydratovaných semen, která umístil na kultivační médium. Tuto metodu se však při našem experimentu, z důvodu tvrdosti semen, nepodařilo napodobit.

Při standardním postupu sterilizace (70% ethanol, 36% Savo) semen *Mandragora officinarum* byla kontaminace 20 %, postup přípravy semen byl proto několikrát optimalizován. Pro zvlhčení filtračního papíru byl použit 1% roztok PPM namísto sterilní

vody. Další optimalizační metody byly založeny na narušení osemení (skarifikaci). Postup skarifikace byl zvolen kvůli tvrdosti semen *Mandragora* a silné tloušťce osemení. Cílem skarifikace je usnadnění pronikání vody a plynů do semena, aby došlo k urychlení klíčení. Ošetření proběhlo pečlivě, tak aby nedošlo k poškození embrya. Při mechanickém narušení osemení – opatrným obroušením semen smirkovým papírem a naklepnutím semen kladívkem, byla kontaminace u obou způsobů přibližně 13 %. Broušením smirkovým papírem došlo pravděpodobně k poškození embrya v důsledku tepla vytvářeného třením a semena neklíčila. U semen naklepnutých kladívkem mohlo být také mechanicky poškozeno embryo. Další postup skarifikace byl chemický, založený na principu simulace trávicího traktu. Při sterilizaci byla použita 0.01% HCl, neprojevila se žádná kontaminace, ale semena opět neklíčila. V případě opakování experimentu, by bylo vhodné změnit sterilizační postup nebo použít semena jiného zdroje.

5.2 Iniacie kalusu

Jedním z cílů této práce bylo zvládnutí iniciace kalusové kultury u kořene *Mandragora officinarum* a kořene, listu a řapíku *Withania somnifera*. Před samotným odvozením kalusu bylo nutné nalézt vhodný způsob sterilizace rostlinného materiálu. V této práci byl použit 70% ethanol, 2.5% chloramin T a 4% PPM.

Kalogeneze u segmentů kořene *Withania somnifera* byla pouze s 10% úspěšností. Hradilík (2005) spojuje nízkou úspěšnost iniciace kalusů s použitím příliš vysoké koncentrace sterilizačního roztoku, nebo dlouhou dobou jeho působení. V dalších experimentech by bylo vhodné zkusit snížit koncentraci sterilizačního roztoku, nebo zkrátit dobu jeho působení.

Pandol (2013) inicioval kalus z hypokotylu *M. officinarum*, který následně použil pro suspenzní kulturu. Nejvyšší přírůstek kalusové biomasy sledoval na médiu MS doplněném o 2 mg/l 2,4-D a 2 mg/l BAP. Procházka a Šebánek (1997) uvádějí, že 2,4-D podporuje tvorbu kalusu i u rostlinných druhů nebo explantátů, u kterých jsou jiné růstové regulátory neúčinné. Kyselina 2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetová) je herbicid se silnými dráždivými účinky na oči a gastrointestinální systém, což je důvod proč jsme ji v této práci nepoužili (www.medvik.cz). Z *M. officinarum* byl v našich experimentech úspěšně odvozen kalus z kořenových segmentů, kalogeneze 58.3 %, na médiích MSC I a MSC II.

Chakraborty et al. (2012) testovali vliv růstových regulátorů pro iniciaci kalusu u listu *W. somnifera* a jako nejvhodnější médium vyhodnotili médium MS doplněné

o 0.5 mg/l 2,4-D a 0.2 mg/l kinetinu. Adhikari a Pant (2013) uvedli jako nejvhodnější médium pro kalogenezi z listů a řapíků u *W. somnifera* MS doplněné o 0.5 mg/l BAP a 1.5 mg/l NAA. V našich experimentech, byly u listů a řapíků *W. somnifera* úspěšně iniciovány kalusy na médiích s vyššími koncentracemi růstových regulátorů, a to MSCI (1 mg/l BAP, 2.5 mg/l NAA) a MSCII (2.5 mg/l BAP, 5 mg/l NAA). Během následných kultivací a pasážování však docházelo k hnědnutí a rozpadu kalusů a jejich postupné nekrotizaci. Singh a Khan (2011) získali z listu *W. somnifera* na médiu MS obsahujícím 1.5 mg/l IBA maximální výtěžek kalusu, který byl i po osmi týdnech kultivace zelenožlutý a kompaktní, bez následného hnědnutí. Na základě těchto výsledků bylo pro následnou kultivaci kalusů (záchrana kalusů) vybráno médium MSCIII (1.5 mg/l IBA), na které byly kalusy z MSCI a MSCII přeneseny. Nebyla pozorována vitalita a růst kalusů, a proto by v navazujících experimentech bylo vhodné na médiu MSCIII kultivovat nové listové segmenty. Chakraborty et al. (2012) uvádějí, že hnědnutí pletiva může být důsledek přirozených stresových reakcí na podmínky *in vitro*. Předpokládají, že v případě *W. somnifera* dochází k hnědnutí kalusu spíše kvůli enzymatickým aktivitám, než kvůli akumulaci fytotoxických látek, avšak pro nalezení specifitější příčiny je potřeba další výzkum. Hradilík (2005) uvádí, že někdy se účinně zabrání hnědnutí rostlinných pletiv použitím antioxidantů, např. kyseliny askorbové, kyseliny citrónové, L-cysteinu, floroglucinu, glutathionu a merkaptoethanolu. Obranou proti hnědnutí je také častější pasážování na čerstvé médium. V příštích experimentech by tedy bylo vhodné použít antioxidanty v médiu nebo jinou metodu vedoucí k eliminaci hnědnutí a následnou nekrotizaci kalusů.

U řapíků *W. somnifera* byla kalogeneze úspěšnější na médiu MSCII oproti MSCI, avšak ve srovnání listů a řapíků pro kalogenezi jsou dle našich výsledků vhodnější listy.

5.3 Mikropropagace u *Withania somnifera*

Koeficient zmnožení je základním ukazatelem úspěšnosti mikropropagace. Cílem mikropropagace bylo vybrat médium, na kterém budou mít kultivované rostliny co nejvyšší počet zmnožených prýtů.

Autade et al. (2016) dosáhli nejvyššího zmnožení (5.3 ± 0.4) na médiu MS obsahujícím 0.5 mg/l BAP a 1.5 mg/l NAA. V našem případě bylo MS médium obsahující stejné množství růstových regulátorů (W1), vyhodnoceno jako nevhodné pro mikropropagaci, z důvodu vysoké tvorby kalusů na bázi prýtu a minimálního koeficientu zmnožení (0.7 ± 0.4).

Média W2 a W3 byla vybrána na základě výsledků experimentů Kulkarni et al. (2000), kde autoři dosáhli nejvyššího zmnožení na médiu MS obsahujícím 0.5 mg/l BAP (médium W2), (4.53 ± 1.1), a na médiu MS obsahujícím 1 mg/l BAP (médium W3), (4.58 ± 1.1). V našich experimentech byla mikropropagace méně úspěšná, bylo dosaženo nižšího koeficientu zmnožení na médiu W2 (1.9 ± 0.1).

Nilanjan et al. (2012) doporučují pro mikropropagaci *W. somnifera* MS médium obsahující 2 mg/l BAP, na kterém dosáhli zmnožení 7.6 ± 0.4 . Autoři použili také médium MS obsahující 0.5 mg/l BAP (médium W2), na kterém dosáhli zmnožení 2.4 ± 0.5 a médium MS obsahující 1 mg/l BAP (médium W3), na kterém dosáhli zmnožení 6.0 ± 0.44 . Z výsledků studií Kulkarni et al. (2000) i Nilanjan et al. (2012), vyplývá, že bychom měli dojít k vyššímu koeficientu zmnožení na médiu W3 oproti médiu W2, a to se v našich experimentech nepotvrdilo.

6 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce se zabývá biotechnologickými metodami u vybraných léčivých rostlin čeledi *Solanaceae* u rodů *Nicotiana*, *Datura*, *Mandragora* a *Withania*.

- Byla vypracována literární rešerše na zadanou problematiku.
- Úspěšně klíčila semena u *Nicotiana tabacum* (72.0 %) a *N.rustica* (62.7 %).
- Optimální postup sterilizace semen u rodu *Nicotiana* – sterilizace 70% ethanolem (1 – 2 min) a 36% Savem (30 min), kultivace v Petriho miskách na filtračním papíře navlhčeném sterilní destilovanou vodou, v termostatu, ve tmě při 25 °C.
- Ze segmentů kořene *Mandragora officinarum* byl úspěšně odvozen kalus (kalogeneze 58.3 %). Média MS obsahující 1 mg/l BAP a 2.5 mg/l NAA (MSCI) a 2 mg/l BAP a 5 mg/l NAA (MSCII) byla pro kalogenezi srovnatelná.
- Byl odvozen kalus ze segmentů kořene *Withania somnifera*, ale je nutné optimalizovat postup sterilizace, z důvodu odstranění nekrotizace kalusů v průběhu kultivace.
- Byl odvozen kalus ze segmentů listů a řapíků *Withania somnifera*. Vhodnějším explantátem pro odvození kalusu jsou listy. Vhodnějším médiem bylo médium MS obsahující 2 mg/l BAP a 5 mg/l NAA (MSCII).
- Nejvyššího zmnožení u *Withania somnifera*, bylo na médiu MS obsahující 0.5 mg/l BAP (W2), koeficient zmnožení byl 1.9 ± 0.1 prýtu na explantát.

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Abbaspour R., Cici S. Z. H., Abbaspour N. (2016). Effects of vermicompost and nitrogen fertilizers on growth of jimson weed (*Datura stramonium* L.) as a medicinal plant. *International Journal Of Medical Research & Health Sciences* 5: 371-376.
2. Adhikari S. R., Pant B. (2013). Induction and proliferation of *in vitro* mass of callus of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Research In Plant Sciences* 3: 58-61.
3. Alberts A., Mullen P., Šírová-Motyčková, K. (2004). Přírodní afrodisiaka. Praha: Svojtka & Co.
4. Autade R. H., Fargade S. A., Savant A. R., Gangurde S. S., et al. (2016). Micropropagation of Ashwagandha (*Withania somnifera*). *Biotechnological Communication* 9: 88-93.
5. Balážová A., Kolář F., Fíla J., Mikát M., Baláž, V. (2016). Rozmnožování z pohledu evoluce: námluvy, sňatky a podvody v říši živočichů a rostlin. Praha: Academia.
6. Baloun J. (1989). Rostliny způsobující otravy a alergie. Praha: Avicenum.
7. Cronquist A. (1988). The evolution and classification of flowering plants (2nd ed). Bronx, New York: New York Botanical Garden.
8. Daniel M. (2006). Medicinal plants: chemistry and properties. Enfield, NH: Science Publishers.
9. Davidová L., Maxnerová I., Handschuhová S., Patočka, J. (2005). Atropin a jeho místo v současné medicíně. *Časopis Kontakt* 7: 200 - 398.
10. Dharajiya D., Patel P., Patel M., Moitra N. (2014). *In vitro* antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Withania somnifera* (L.) Dunal extracts. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences Review And Research* 27: 349-354.
11. Dohnálková E. (2012). Studium biologické aktivity C-8 substituovaných purinových derivátů cytokininů (bakalářská práce). Olomouc: Univerzita Palackého PřF.
12. Almoulah N. F., Voynikov Y., Gevrenova R., Schohn H, et al. (2017). Antibacterial, antiproliferative and antioxidant activity of leaf extracts of selected *Solanaceae* species. *South African Journal Of Botany* 112: 368-374.

13. Fuss E. (2003). Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochemistry Reviews* 2: 307-320.
14. Gaosheng H., Jingming J. (2012). Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants. *Recent Advances in Plant *in vitro* Culture* Laura Rinaldi: 197-210.
15. Gardner Z., McGuffin M. (2013). *American Herbal Products Association's botanical safety handbook* (2nd ed.). Boca Raton: American Herbal Products Association.
16. Graeser J. B., Rowe A. H. (1935). Inhalation of epinephrine for the relief of asthmatic symptoms. *Journal Of Allergy* 6: 415-420.
17. Hanuš L. O., Řezanka T., Spížek J., Dembitsky V. M. (2005). Substances isolated from *Mandragora* species. *Phytochemistry* 66: 2408-2417.
18. Hong M. L. K., Bhatt A., Keng C. L. (2012). Detection of elicitation effect on *Hyoscyamus niger* L. root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. *Romanian Biotechnological Letters* 17: 7340-7351.
19. Hradilík J. (2005). *Rostlinné explantáty*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.
20. Hussain M. S., Rahman M. A., Fareed S., Ansari S., et al. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences* 4: 10-20.
21. Chakraborty N., Banerjee D., Ghosh M., Pradhan P., et al. (2012). Influence of plant growth regulators on callus mediated regeneration and secondary metabolites synthesis in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Physiol Mol Biol Plants* 19: 117–125.
22. Chintapakorn Y., Hamill J. D. (2008). Antisense-mediated reduction in ADC activity causes minor alterations in the alkaloid profile of cultured hairy roots and regenerated transgenic plants of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 68: 2465-2479.
23. Isah T., Umar S., Mujib A., Sharma, M. P., et al. (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture* 132: 239-265.
24. Jahodář L. (2011). *Farmakobotanika: semenné rostliny* (Vyd. 3.). Praha: Karolinum.

25. Kaštánek F. (2001). Bioinženýrství. Praha: Academia.
26. Khanna P. K., Kumar A., Chandra R., Verma V. (2013). Germination behaviour of seeds of *Withania somnifera* (L.) Dunal: a high value medicinal plant. *Physiology And Molecular Biology Of Plants* 19: 449-454.
27. Kincl L. (1993). Biologie rostlin pro 1. ročník gymnázií: Učebnice pro gymnázia a další střední školy. Praha: Fortuna.
28. Klouček P., Landa P., Vaněk T. (2005). Rostliny *in vitro* – továrny na léčiva?. *Živa* 6: 246-248.
29. Kočí V., Mocová K. (2009). Ekotoxikologie pro chemiky. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.
30. Korbelař J., Endris Z. (1968). Naše rostliny v lékařství (Vyd. 2.). Praha: SZdN.
31. Kováč J. (1995). Explantátové kultury rostlin. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého.
32. Kresánek J. ml., Kresánek J. st. (2008). Atlas léčivých rostlin a lesných plodov. Slovensko: Osveta.
33. Kulkarni A. A., Thengane S. R., Krishnamurthy K. V. (2000). Direct shoot regeneration from node, internode, hypocotyl and embryo explants of *Withania somnifera*. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture* 62: 203-209.
34. Lee M. H., Cheng J. J., Lin C. Y., Chen Y. J., Lu M. K. (2007). Precursor-feeding strategy for the production of solanine, solanidine and solasodine by a cell culture of *Solanum lyratum*. *Process Biochemistry* 42: 899-903.
35. Lefnar R. (2014). Biologická aktivita derivátů cytokininů odvozených od močoviny (bakalářská práce). Olomouc: Univerzita Palackého PřF.
36. Lüllmann H., Mohr K., Hein L. (2012). Barevný atlas farmakologie (Vyd. 4.). Praha: Grada.
37. Maurya R. (2010). Chemistry and pharmacology of *Withania coagulans*: an Ayurvedic remedy. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology* 62: 153-160.
38. Moussous A., Paris C., Khelifi-Slaoui M., Bekhouche M., et al. (2018). *Pseudomonas* spp. increases root biomass and tropane alkaloid yields in transgenic hairy roots of *Datura* spp. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 54: 117-126.
39. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures 15: 473-497.

40. Nick, P., Opatrný, Z. (2014). Applied plant cell biology: cellular tools and approaches for plant biotechnology (1st ed.). Berlin: Springer.
41. Novák J., Skalický M. (2012). Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika (Vyd. 3.). Praha: Powerprint.
42. Osorio C. E., Amiard V. S. E., Aravena-Calvo J., Udall J. A., Doyle J. J., Maureira-Butler I. J. (2018). Chromatographic fingerprinting of *Lupinus luteus* L. (*Leguminosae*) main secondary metabolites: a case of domestication affecting crop variability. *Genet Resour Crop Evol* 65: 1281–1291.
43. Pandol G. (2013). Priprava rastlinske tkivne kulture *Mandragora officinarum* v celični suspenziji za produkcijo sekundarnih metabolitov (diplomová práce). Ljubljana: Univerza v Ljubljani Bf.
44. Payne G. (1992). Plant cell and tissue culture in liquid systems. New York: John Wiley.
45. Polívka F. (2010). Užitékové a paměťihodné rostliny cizích zemí (Vyd. 3.). Praha: Volvox Globator.
46. Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., et al. (1998). Fyziologie rostlin. Praha: Academia.
47. Procházka S., Šebánek J. (1997). Regulátory rostlinného růstu. Praha: Academia.
48. Ramachandra R. S., Ravishankar G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
49. Roossinck M. J. (2011). The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 9: 99-108.
50. Sedláčková V. (2014). Kultury léčivých rostlin *in vitro* – XVI (diplomová práce). Hradec Králové: Univerzita Karlova FaF HK.
51. Seman I. (1990). Biotechnologické metody v šľachtení poľných plodín (1st ed.). Bratislava: Príroda.
52. Silva, M. A. N., Senarath W. T. P. S. K. (2009). *In vitro* mass propagation and greenhouse establishment of *Withania somnifera* (L.) Dunal (*Solanaceae*) and comparison of growth and chemical compounds of tissue cultured and seed raised plants. *Journal Of The National Science Foundation Of Sri Lanka* 37: 249-255.
53. Sen J., Sharma A. K. (1991). Micropropagation of *Withania somnifera* from germinating seeds and shoot tips. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture* 26: 71-73.

54. Singh S., Khan B. S. (2011). Callus induction and *in vivo* and *in vitro* comparative study of primary metabolites of *Withania Somnifera*. *Advances In Applied Science Research* 2: 47-52.
55. Sivanandhan G., Rajesh M., Arun M., Jeyaraj M., et al. (2013). Effect of culture conditions, cytokinins, methyl jasmonate and salicylic acid on the biomass accumulation and production of withanolides in multiple shoot culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal using liquid culture. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 715-728.
56. Slavík B., Štěpánková J. (2011). *Květena České republiky*. Praha: Academia.
57. Srivastava A. K. (2011). *Medicinal plants: biodiversity, conservation and traditional knowledge* (2nd ed.). Delhi: Swastik Publications.
58. Suleiman R. K., Zarga M. A., Sabri S. S. (2010). New withanolides from *Mandragora officinarum*: First report of withanolides from the Genus *Mandragora*. *Fitoterapia* 81: 864-868.
59. Supe U., Dhote F., Roymon M. G. (2011). A review on micro propagation of *Withania somnifera* – A medicinal plant. *Journal Of Agricultural Technology* 7: 1475-1483.
60. Špandelová V. (2010). *Kultury léčivých rostlin in vitro – VIII* (diplomová práce). Hradec Králové: Univerzita Karlova FaF HK.
61. Štefková M. (2014). *Sekundární metabolity rostlin – přínos pro rostlinu i člověka* (bakalářská práce). Brno: Masarykova univerzita PřF.
62. Štenclová A. (2010). *Opium – chemické složení, využití a možnosti zneužívání* (diplomová práce). Hradec Králové: Univerzita Karlova FaF HK.
63. Valíček P. (2002). *Užitkové rostliny tropů a subtropů* (Vyd. 2). Praha: Academia.
64. Valíček P. (2003). *Léčivé rostliny a omamné drogy*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.
65. Yun D. J., Hashimoto T., Yamada Y. (1992). Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa-belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 89: 799-803.
66. Zdražilová L. (2009). *Biotická elicitace explantátové kultury Trifolium pratense L.* (diplomová práce). Hradec Králové: Univerzita Karlova FaF HK.

SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ (aktivních k 30. 4. 2018):

1. <http://biotox.cz/naturstoff/biologie/bi-2d-06-makzem.html>
2. <http://biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php>
3. <http://botany.cz/cs/withania-somnifera>
4. <http://britannica.com/plant/Solanaceae>
5. <http://britannica.com/plant/Solanales#ref595956>
6. http://efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200020616
7. <http://kvetenacr.cz/celed.asp?IDceled=13>
8. <http://www.medvik.cz/link/D015084>

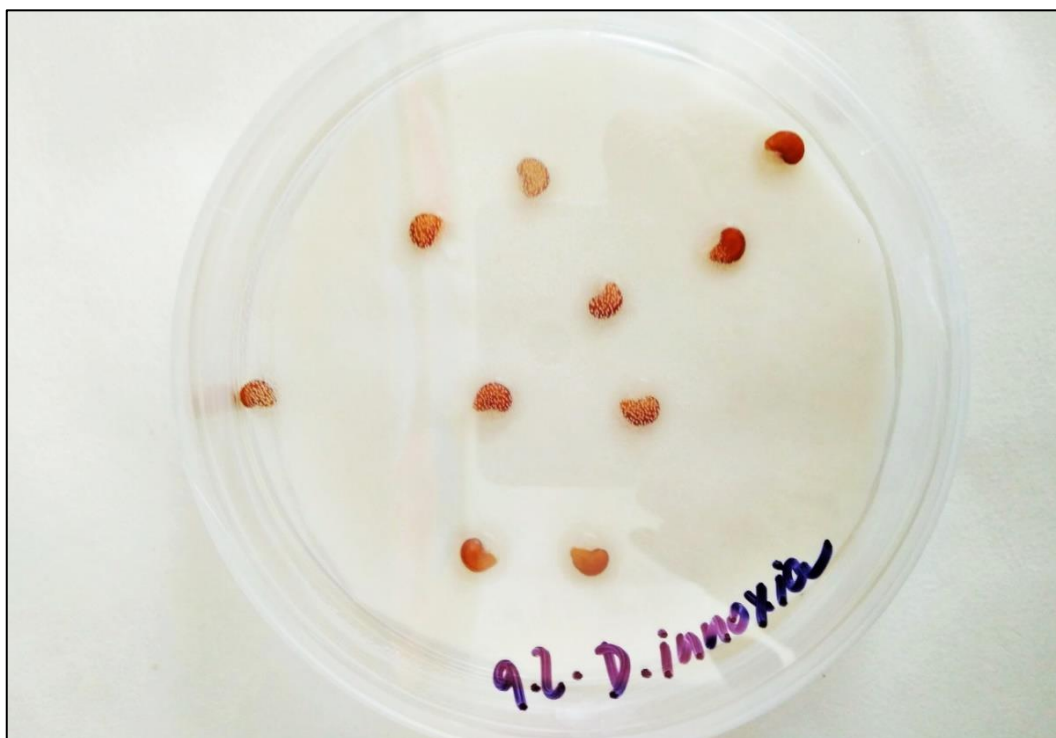
8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Složení MS média

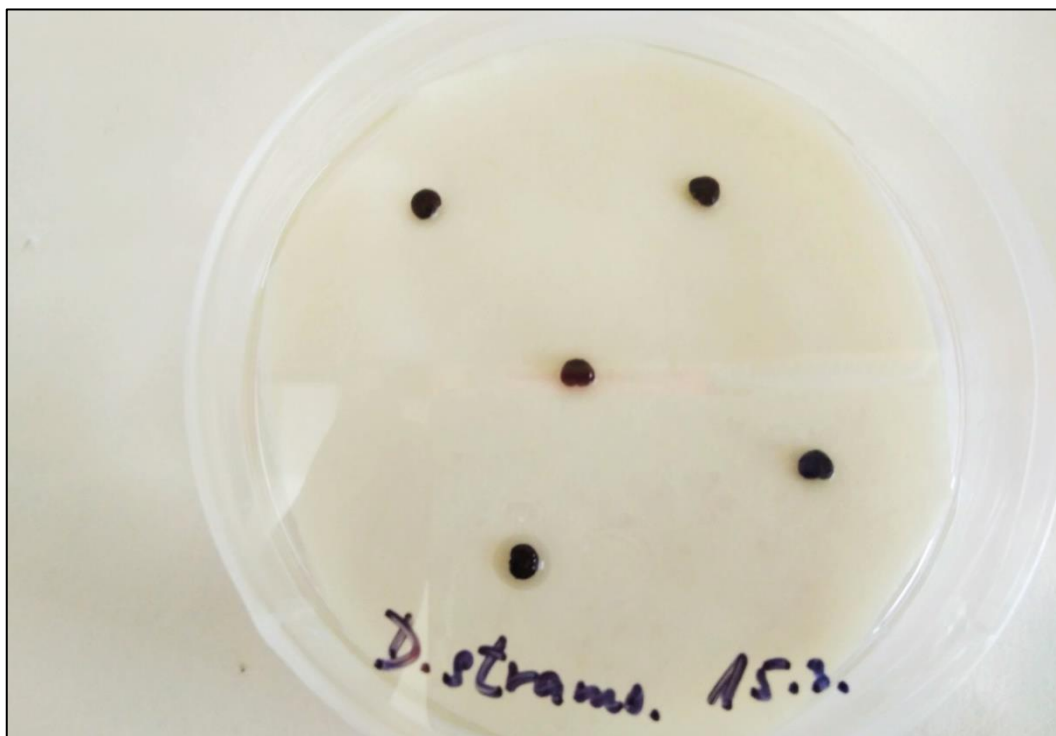
Tab. 8: Složení MS média (Murashige a Skoog, 1962)

Makroelementy	mg/l
CaCl ₂	332.02
KH ₂ PO ₄	170.00
KNO ₃	1900.00
MgSO ₄	180.54
NH ₄ NO ₃	1650.00
Mikroelementy	mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.03
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.03
FeNaEDTA	36.70
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
Vitamíny	mg/l
Thiamin	0.10
Pyridoxin	0.50
kyselina nikotinová	0.50
Glycin	2.00
myo-inositol	100.00
sacharóza 30g/l, agar 8g/l, pH 5,8	

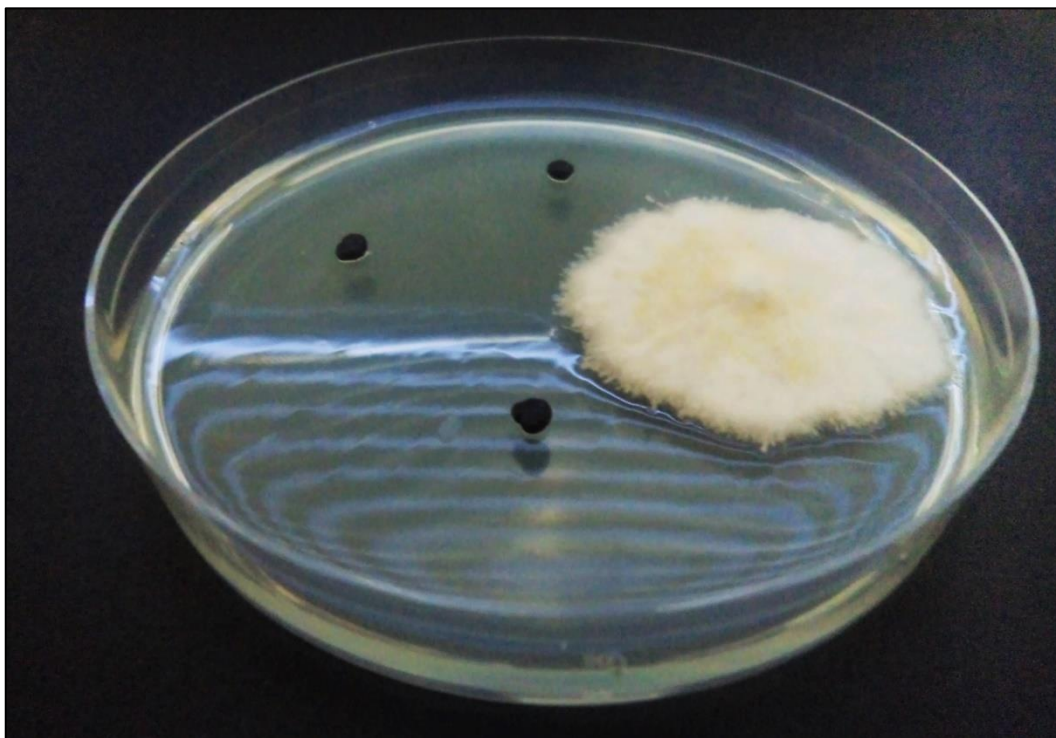
Příloha 2: Obrazové přílohy



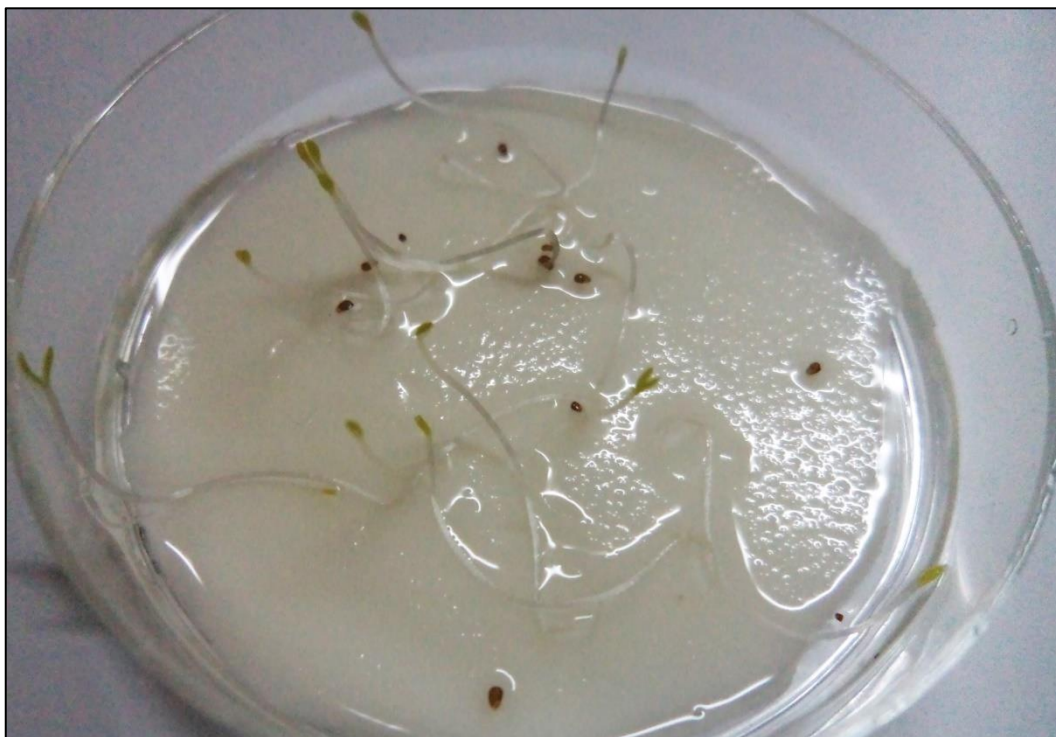
Obr. 14: Semena *Datura inoxia* kultivovaná na navlhčeném filtračním papíře, foceno po 3 týdnech od vysazení



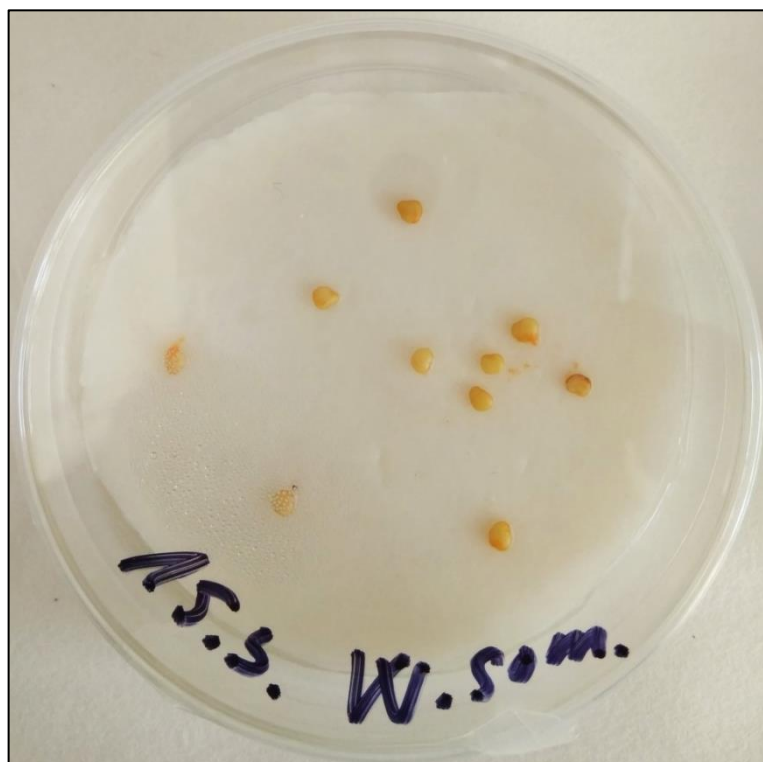
Obr. 15: Semena *Datura stramonium* kultivovaná na navlhčeném filtračním papíře, foceno po 3 týdnech od vysazení



Obr. 16: Kontaminace semen *Datura stramonium* kultivovaných na médiu MS, foceno po týdnu od vysazení



Obr. 17: Klíčící semena *Nicotiana rustica*, foceno po týdnu od vysazení



Obr. 18: Semena *Withania somnifera* kultivovaná na navlhčeném filtračním papíře, foceno po 3 týdnech od vysazení



Obr. 19: Semena *Mandragora officinarum* – nehydratovaná (vlevo), nabobtnaná 0.01M roztokem HCl (vpravo)



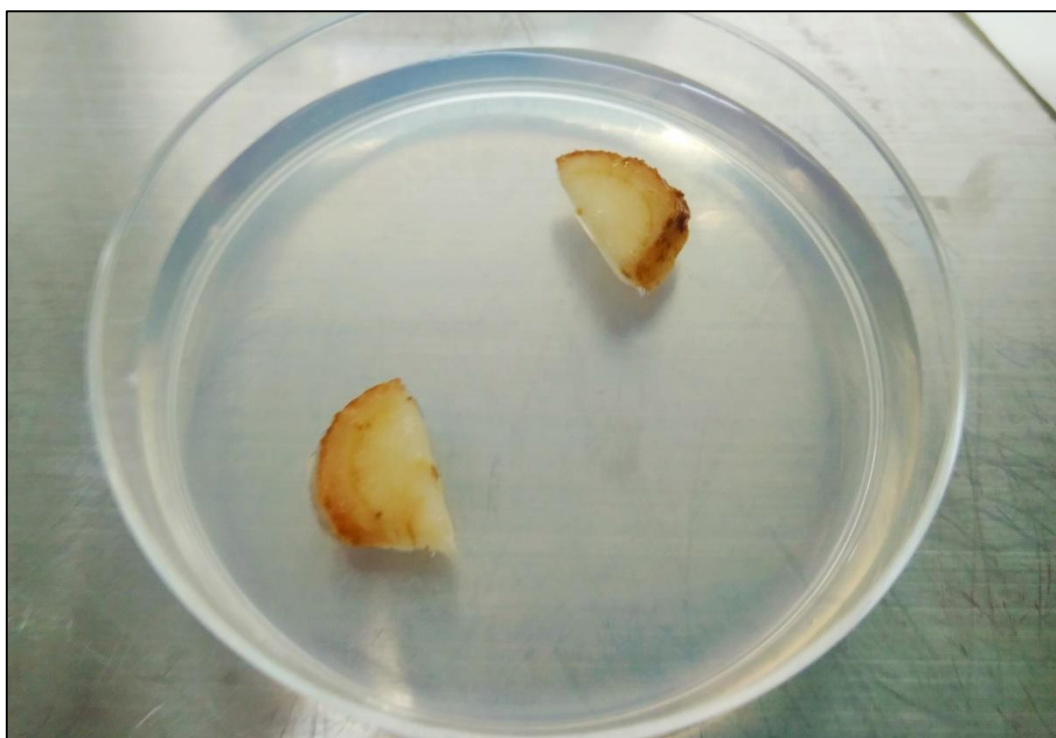
Obr. 20: Kořen *Mandragora officinarum*



Obr. 21: *Withania somnifera* rostoucí v perlitu



Obr. 22: Segmenty prýtů *Withania somnifera* před sterilizací; nodální segmenty a listy



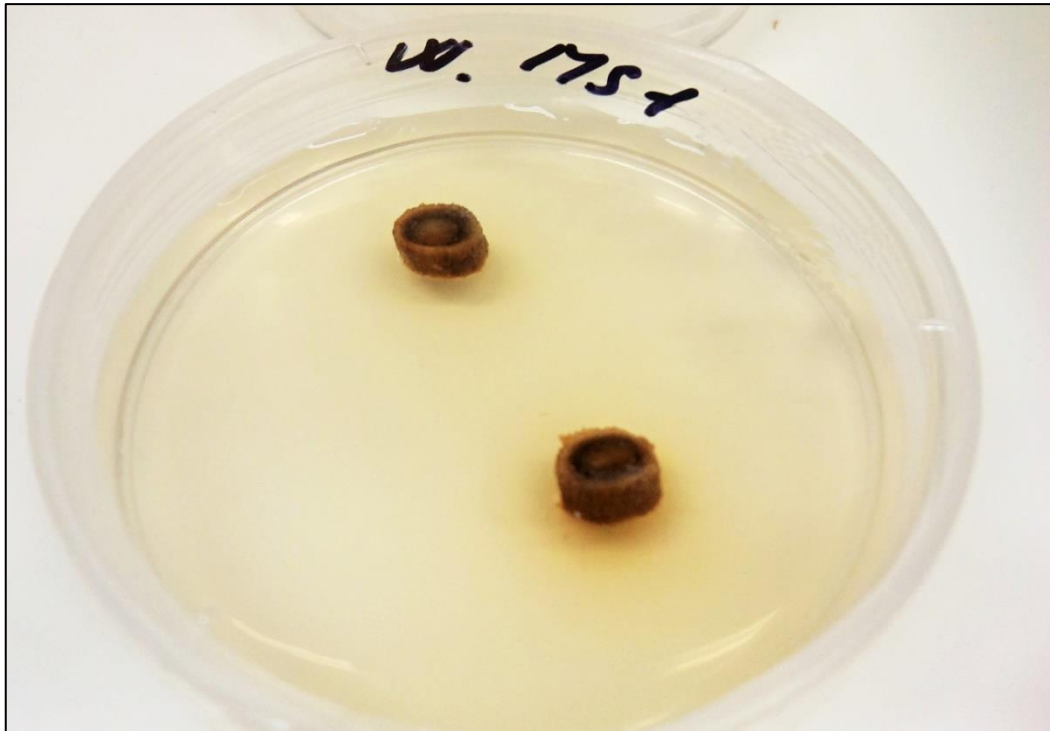
Obr. 23: Segmenty kořene *Mandragora officinarum* na iniciačním médiu MS, foceno v den založení kultury



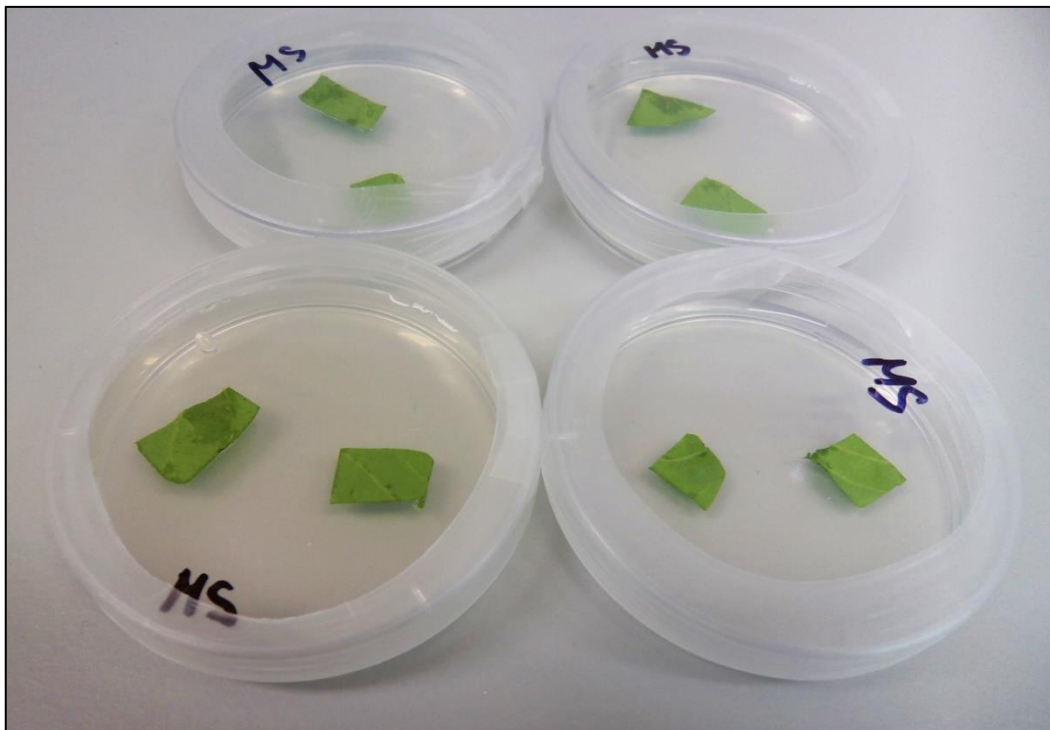
Obr. 24: Detail kalusového pletiva u kořene *Mandragora officinarum*, médium MSCII, foceno po 2 týdnech kultivace (fotoaparátém OLYMPUS SP 350 s použitím adaptéru na binokulární lupu OLYMPUS SZ2-ST)



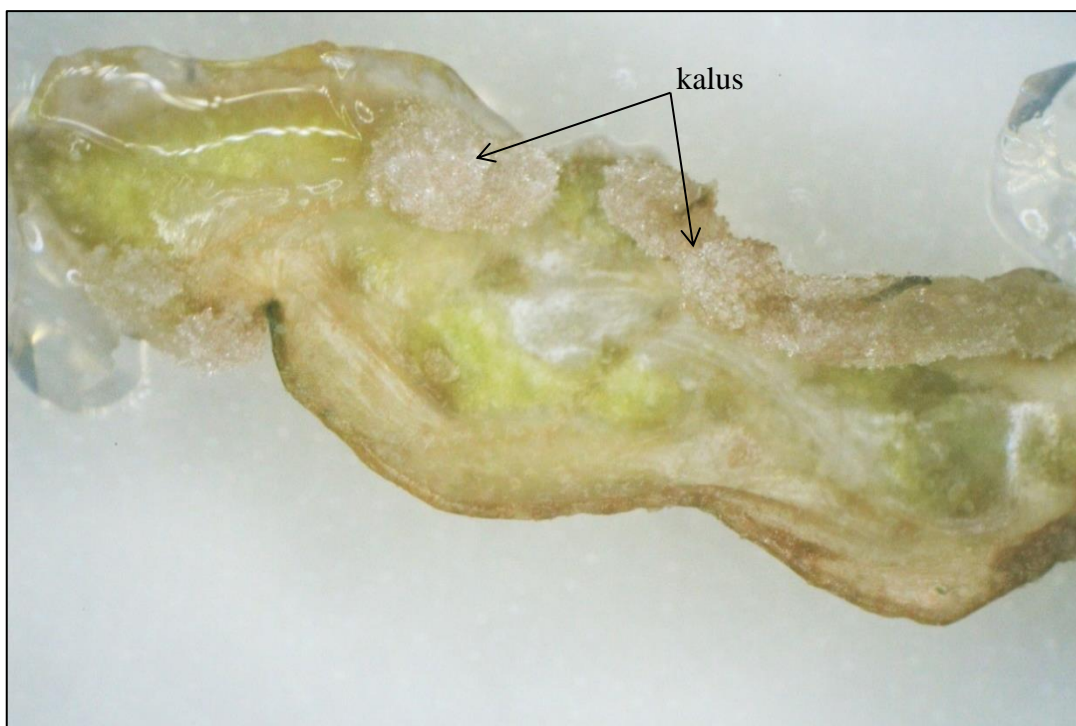
Obr. 25: Kalus u segmentu kořene *Withania somnifera*, médium MSCII, foceno po 3 týdnech kultivace



Obr. 26: Nekrotizace segmentů kořene *Withania somnifera*, médium MSCI, foceno po 4 týdnech kultivace



Obr. 27: Segmenty listů *Withania somnifera* na iniciačním médiu MS, foceno v den založení kultury



Obr. 28: Detail kalusu u segmentu listu *Withania somnifera*, médium MSC I, foceno po týdnu kultivace (fotoaparátém OLYMPUS SP 350 s použitím adaptéru na binokulární lupu OLYMPUS SZ2-ST)



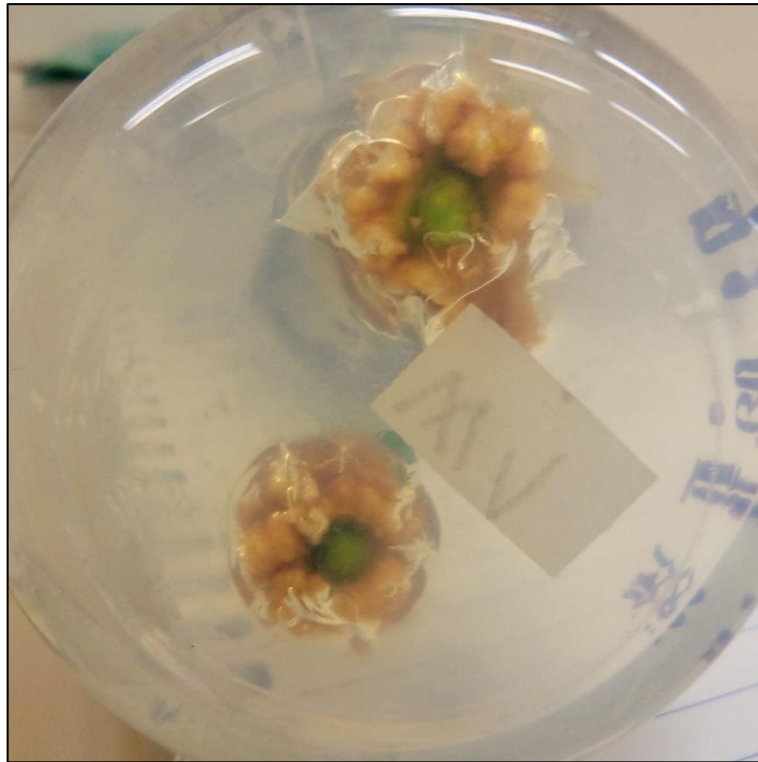
Obr. 29: Detail kalusu u segmentu listu *Withania somnifera*, médium MSC II, foceno po týdnu kultivace (fotoaparátém OLYMPUS SP 350 s použitím adaptéru na binokulární lupu OLYMPUS SZ2-ST)



Obr. 30: Hnědnutí kalusů u listových segmentů *Withania somnifera*, médium MSCII, foceno po 5 týdnech kultivace



Obr. 31: Kalus u řapíku *Withania somnifera*, médium MSCII, foceno po 2 týdnech kultivace



Obr. 32: Kalus na bázi prýtu *Withania somnifera*, médium W1 (určené pro mikropropagaci), pohled na bázi prýtu, foceno po 12 týdnech kultivace



Obr. 33: Kultivace prýtu *Withania somnifera*, médium W3, foceno po 3 týdnech kultivace