

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství



**Fakulta tropického
zemědělství**

In vitro* indukovaná polyploidie u *Thymus camphoratus

Hoffmanns. & Link

Bakalářská práce

Praha 2022

Vypracoval:

Tomáš Šindelář

Vedoucí práce:

prof. Dr.Ing. Eloy Fernández Cusimamani

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma *In vitro* indukovaná polyploidie u *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link vypracoval samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedl v referencích.

V Praze dne

.....
Tomáš Šindelář

Poděkování

Rád bych poděkoval prof. Dr. Ing. Eloyi Fernández Cusimamanimu za jeho sdílení odborných znalostí při konání výzkumu, jeho odborné vedení, konzultace, užitečné rady a celkovou pomoc při zpracovávání práce. Dále bych rád poděkoval celému týmu v laboratoři rostlinných explantátů za pomoc a rady při experimentu a zpracování bakalářské práce. Poděkování taktéž patří Fakultě tropického zemědělství, která mi umožnila provést výzkum a zpracovávat bakalářskou práci v laboratoři rostlinných explantátů. A nakonec bych rád poděkoval své rodině za jejich podporu a oporu při psaní práce, ale zároveň i za podporu v mém studiu na České zemědělské univerzitě.

Abstrakt

In vitro indukovaná polyploidie u *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link

Thymus camphoratus Hoffmanns. & Link patří do čeledi hluchavkovité (Lamiaceae) je léčivá rostlina původem z Portugalska. V lidovém léčitelství se tato rostlina využívá na léčbu žaludečních křečí nebo zažívacích problémů, zánětů, dýchacích potíží nebo na povzbuzení trávicího traktu. Taktéž se přidává do koupelí anebo je využívána pro výrobu lihových masť při žaludečních křečích. V současné době je rozšířena po celém světě, nejčastěji pěstována na zahradách jako koření nebo bylina.

Cílem této práce bylo získat autoploidní rostliny z původních diploidních (mateřských) rostlin ($2n=2x=28$), pomocí *in vitro* indukované polyploidizace.

Polyploidie byla indukována u nodálních segmentů pěstovaných na MS médiu (Murashige & Skoog 1962). Jako antomitotické činidlo byl použit oryzalin v koncentracích 20, 40 a 60 $\mu\text{M/l}$ po dobu 24 a 48 hodin. Úroveň ploidie u ovlivněných rostlin byla stanovena pomocí průtokové cytometrie.

Celkem byla získána jedna tetraploidní a jedna mixoploidní rostlina. Tetraploidní rostlina byla získána v koncentraci oryzalinu 20 $\mu\text{M/l}$ po dobu působení 24 hodin a mixoploidní rostlina byla získána v koncentraci 60 $\mu\text{M/l}$ po dobu působení 24 hodin.

U nových genotypů byly zjištěny určité morfologické rozdíly oproti původním (mateřským) rostlinám. Nové genotypy měli např. vyšší vzrůst, vyšší počet větvení, větší kořenový systém, délku kořenů nebo větší velikost květů. Podle dostupných zdrojů byla metoda *in vitro* indukovaná polyploidie u *T. camphoratus* použita poprvé.

Klíčová slova: autotetraploid, *in vitro*, Lamiaceae, mikropropagace, mixoploid, oryzalin, polyploidie, průtoková cytometrie

Author's abstract

In vitro induced polyploidy in *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link

Thymus camphoratus Hoffmanns. & Link belonging to the Lamiaceae family, it is a medicinal plant native to Portugal. In folk medicine this plant is used to treat stomach cramps or digestive problems, inflammation, respiratory problems or to stimulate the digestive tract. It is also added to baths or used to make alcohol ointments for stomach cramps. Currently it is widespread throughout the world, most often grown in gardens as a spice or herb.

The aim of this work was to obtain autopolyploid plants from the original diploid (mother) plants ($2n=2x=28$), using *in vitro* induced polyploidization.

Polyploidy was induced in nodal segments grown on MS medium (Murashige & Skoog 1962). Oryzalin was used as an antimitotic agent at concentrations of 20, 40 and 60 $\mu\text{M/l}$ for 24 and 48 hours. The ploidy level of the affected plants was determined by flow cytometry.

A total of one tetraploid and one mixoploid plant was obtained. The tetraploid plant was obtained at an oryzalin concentration of 20 $\mu\text{M/l}$ for 24 hours and the mixoploid plant was obtained at a concentration of 60 $\mu\text{M/l}$ for 24 hours.

Some morphological differences were found in the new genotypes compared to the original (mother) plants. For example, the new genotypes had a taller stature, a higher number of branches, a larger root system, a longer root length or a larger flower size. According to available sources, the *in vitro* induced polyploidy method was used for the first time in *T. camphoratus*.

Key words: autotetraploid, *in vitro*, Lamiaceae, micropropagation, mixoploid, oryzalin, polyploidy, flow cytometry

Obsah

1. Úvod	- 1 -
2. Literární rešerše	- 2 -
2.1 Taxonomie, botanický a morfologický popis	- 2 -
2.1.1 Čeleď Lamiaceae	- 2 -
2.1.2 Rod <i>Thymus</i>	- 3 -
2.1.3 <i>Thymus camphoratus</i> Hoffmanns. & Link.....	- 4 -
2.2 Původ a rozšíření	- 5 -
2.3 Pěstování a rozmnožování	- 5 -
2.4 Využití	- 6 -
2.5 Mikropropagace	- 9 -
2.5.1 Mikropropagace léčivých rostlin	- 9 -
2.5.2 Mikropropagace rostlinných druhů z čeledi Lamiaceae	- 10 -
2.6 Šlechtění rostlin	- 11 -
2.7 Somatická indukovaná polyploidie <i>in vitro</i>	- 13 -
2.7.1 Antimitotická činidla.....	- 14 -
2.7.2 Metody stanovení ploidie.....	- 14 -
3. Cíl práce	- 17 -
4. Materiál a metodika	- 18 -
4.1 Rostlinný materiál.....	- 18 -
4.2 Množení rostlin <i>in vitro</i>	- 18 -
4.3 <i>In vitro</i> polyploidie	- 19 -
4.3.1 Indukce ploidie.....	- 19 -
4.4 Stanovení úrovně polyploidie	- 19 -
4.5 Statistické hodnocení výsledků.....	- 20 -
5. Výsledky a diskuze	- 22 -
5.1 Morfologické hodnocení polyploidů.....	- 25 -
6. Závěr	- 32 -
7. Reference	- 33 -

Seznam tabulek:

- Tabulka 1** Rozdělení rodu *Thymus* do sekcí podle haploidního chromozomového čísla
- Tabulka 2** Vliv působení oryzalinu na nodální segmenty v *in vitro* podmínkách na míru přežití a počet polyploidů u *T. camphoratus*
- Tabulka 3** Morfologické hodnocení kontrolní (diploidní), tetraploidní a mixoploidní rostliny po 9 týdnech kultivace v *in vitro* podmínkách
- Tabulka 4** Morfologické hodnocení rostlin kultivovaných z apikálních meristémů a nodálních segmentů po 8 týdnech kultivace v *in vitro* podmínkách

Seznam obrázků (a grafů):

- Obrázek 1** Karyotyp *Thymus thracicus*
- Obrázek 2** Porost *Thymus camphoratus*
- Obrázek 3** Květ *Thymus camphoratus*
- Obrázek 4** Hlavní chemické struktury terpenů (thymol, karvakrol a cymen) nalezených v tymiánové silici
- Obrázek 5** *Thymus vulgaris*
- Obrázek 6** *Thymus zygis*
- Obrázek 7** *Thymus hyemalis*
- Obrázek 8** *Thymus corydothymus*
- Obrázek 9** Počet chromozomů oktoploidní rostliny *Smallanthus sonchifolius* ($2n=2x=58$)
- Obrázek 10** Počet chromozomů hexadekaploidní rostliny *Smallanthus sonchifolius* ($2n=4x=36$)
- Obrázek 11** Průtokový cytometr – schéma
- Obrázek 12** Schéma indukce polyploidizace u *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link
- Obrázek 13** Histogram zobrazující obsah DNA v buňkách u kontrolní rostliny
- Obrázek 14** Histogram zobrazující DNA polyploidní (tetraploidní) rostliny P 68
- Obrázek 15** Morfologické rozdíly u kontrolní, mixoploidní a tetraploidní rostliny po 9 týdnech kultivace
- Obrázek 16** Morfologické změny květenství u *Thymus camphoratus*
- Obrázek 17** Morfologické rozdíly rostlin R_A a R_N

Seznam zkratek použitých v práci:

BAP	6-Benzylaminopurin
C₆H₈O₇	Kyselina citrónová
DAPI	4', 6–diamidin–2-fenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EO	Esenciální olej
KIN	Kinetin
MS médium	Médium Murashige & Skoog (1962)
NAA	Kyselina 1-naftyloctová
NaClO	Chlornan draselný
Na₂HPO₄	Hydrogenfosforečnan sodný
PGR	Regulátory růstu
M 18	Genotyp mixoploidní rostliny
P 68	Genotyp tetraploidní rostliny (2n=4x=56)
R_A	Rostlina kultivovaná z apikálního meristému
R_N	Rostlina kultivovaná z nodálního segmentu
Tween 20	Polysorbát 20 neintový detergent
WGD	Duplikace celého genomu

1. Úvod

Thymus camphoratus Hoffmanns. & Link je endemický druh a vytrvalá aromatická rostlina z čeledi hluchavkovité (Lamiaceae), která je často pěstovaná pro své okrasné, kulinářské a léčebné účely (Salgueiro et al. 1997; Shmeit et al. 2020).

Rostlina rodu *Thymus*, podskupiny *Thymastra*, pochází z Portugalska, kde bylo zaznamenáno jedenáct druhů rostlin tohoto rodu, zahrnuté v pěti sekcích, mezi které patří endemický *Thymus caespititius* ze severozápadního Pyrenejského poloostrova a Madeiry a Azorských, endemický *Thymus mastichina* na Pyrenejském poloostrově a endemický *T. camphoratus*, vyskytující se na jižním a jihozápadním portugalském pobřeží (Salgueiro et al. 1997; Miguel et al. 2004).

Obdobně jako pro jiné rostliny tohoto rodu, je přirozeným prostředím oblast středozemního moře, kde se *Thymus camphoratus* nalézá ve větším množství na nižších svazích hor, v podrostech, na pustých březích nebo na stinných stanovištích. Jedná se o vytrvalou a velmi větvenou rostlinu s lodyhou dosahující výšky 40 cm, přičemž u nás se pěstuje v zahradách a využívá se jako kuchyňské koření (Pohl 1885; Dlouhý 1900).

Bylinné léky získané z tymiánu se od starověku používaly k léčbě alopecie, bronchitidy, kašle, zánětů, kožních infekcí a gastrointestinálních potíží. V lidovém léčitelství se rostlina využívá na léčbu žaludečních křečí nebo zažívacích problémů, zánětů, dýchacích potíží nebo na povzbuzení trávicího traktu. Taktéž se přidává do koupelí anebo je využívána pro výrobu lihových mastí při žaludečních křečích (Dlouhý 1900; Shmeit et al. 2020; Navrátilová et al. 2021).

Rostlinná těla obsahují širokou škálu účinných látek a silic včetně, kafru, cineolu, karvakrolu, borneolu, linaloolu, flavonoidů aj. Obdobně jako u jiných rostlin rodu *Thymus*, je hlavní složkou oleje thymol, u kterého byly prokázány antibakteriální, antimykotické, antibiotické, antiseptické a protizánětlivé účinky, což má za následek jeho léčebné využití (Navrátilová et al. 2021).

U *T. camphoratus* je možné pomocí *in vitro* indukované polyploidie získat genotypy se specifickými morfologickými a fytochemickými vlastnostmi.

Polyploidie je považována za metodu zvyšování potenciálu rostlinné produkce a je známo, že genomické množení může zvýšit produkci sekundárních metabolitů a také kvalitativně zlepšit jejich biochemický profil (Tavan et al. 2015).

2. Literární rešerše

2.1 Taxonomie, botanický a morfologický popis

Thymus camphoratus patří do řádu hluchavkotvaré (Lamiales). Tento řád zahrnuje 28 čeledí a asi 28 tisíc druhů rostlin. Řád hluchavkotvaré zahrnuje čeledi př. Acanthaceae, Callitrichaceae, Lamiaceae, Oleaceae, Paulowniaceae a další.

Taxonomické zařazení *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link je:

- **Říše** rostliny (Plantae)
- **Oddělení** krytosemenné rostliny (Magnoliophyta)
- **Třída** vyšší dvouděložné rostliny (Rosopsida)
- **Řád** hluchavkotvaré (Lamiales)
- **Čeleď** hluchavkovité (Lamiaceae)
- **Rod** *Thymus*
- **Druh** *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link

(BioLib 2004; Global Biodiversity Information Facility 2022)

2.1.1 Čeleď Lamiaceae

Čeleď Lamiaceae je významná rostlinná čeleď, která se skládá z 250 rodů a více než 7 000 druhů. Široké množství druhů obývá různé ekosystémy a má velkou rozmanitost s kosmopolitním rozšířením (Stankovic 2020). Druhy rodu Lamiaceae jsou vytrvalé nebo jednoleté byliny se čtvercovými stonky s jednoduchými a opačně uspořádanými listy. Některé druhy jsou dřevité keře a polokeře, mnohem méně často jako listové sukulenty, křovité liány nebo stromy (Mennema 1989).

K čeledi Lamiaceae patří 12 hlavních podčeledí; Prostantheroideae (2 rody př. Westringieae, Chloantheae); Nepetoideae (3 rody př. Elsholtzieae, Ocimeae, Mentheae); Ajugoideae (4 rody př. Rotheceae, Teucriae, Ajugeae, Clerodendreae); Lamioideae (13 rodů př. Lamieae, Leonureae, Synandreae) a další. Charakteristickou vlastností mnoha druhů je většinou příjemné aroma, např. meduňky lékařské (*Melissa officinalis*). Mnoho druhů rostlin se pěstuje pro okrasný účel a rychle rostoucí teak (*Tectona grandis*) je nejčastěji pěstovaná dřevina v tropech, přičemž jeho dřevo má všestranné využití (Zhao et al. 2021).

2.1.2 Rod *Thymus*

Rod *Thymus* zahrnuje více než 190 druhů rostlin, z nichž většina původem pochází z Pyrenejského poloostrova, oblasti Středomoří a Afriky. Odlišuje se počtem a morfologií chromozomů. V rámci některých studií, je publikováno několik druhů s různými chromozomovými čísly od $2n=24$ až $2n=60$. Rod *Thymus* zahrnuje 8 sekcí, které jsou rozdělené na bázi společného haploidního chromozomového čísla. *Thymus camphoratus* ($2n=28$ a 30) se řadí do sekce „*Thymus*“ společně s *Thymus vulgaris* ($2n=28$ a 30) a *Thymus zygis* ($2n=14, 28$ a 58). Sekce *Serpyllum* pokrývá největší část v celém regionu, kromě Madeiry a Azorských ostrovů (Jalas & Kaleva 1967; Stahl-Biskup & Sáez 2003).

Tabulka 1: Rozdělení rodu *Thymus* do sekcí podle haploidního chromozomového čísla

Sekce	Společné haploidní chromozomové číslo	Příklady druhů spadajících do sekce	Původní výskyt
Micanthes	n=15	<i>T. caespititius</i>	Pyrenejský pol. a SZ Afrika
Mastichina		<i>T. mastichina</i> a další	Endemické na Pyrenejském pol.
Thymus		<i>T. vulgaris</i> , <i>T. camphoratus</i> , <i>T. zygis</i> , <i>T. carnosus</i> , <i>T. hyemali</i>	Z Středomoří a S Afrika
Piperella	n=14	<i>T. piperella</i>	Endemité na V Španělska
Teucrioides		<i>T. teucrioides</i> , <i>T. thracicus</i> a další	Endemické na Balkáně, Albánie a Řecka
Pseudothymba		<i>T. moroderi</i> , <i>T. cephalotos</i> , <i>T. longiflorus</i> , <i>T. membranaceus</i>	Pyrenejský pol. a SZ Afrika
Hyphodromi		<i>T. cilicicus</i> , <i>T. comptus</i>	Středomoří, Malá Asie, oblast Černého moře
Serpyllum		<i>T. comosus</i> , <i>T. doerfleri</i> , <i>T. herba-barona</i> , <i>T. longicaulis</i> a další	Celý region, kromě Madeiry a Azorských ostrovů

Zdroje: (Jalas & Kaleva 1967; Stahl-Biskup & Sáez 2003; Kondo et al. 2008; Mahdavi & Karimzadeh 2010), sestaveno do tabulky

2.1.3 *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link

Thymus camphoratus je diploidní rostlina, která je známá také pod názvy *Thymus mastichina* var. *camphoratus* (Hoffmanns. & Link) Malag., *Thymus algarbiensis* Lange, *Thymus camphoratus* subsp. *congestus* F.M.Vázquez, Pinto Gomes & Paiva Ferr. V České republice je obecně známá pod názvem důška, tymián, kafr nebo mateřídouška.

Je to vytrvalý keř s životností přibližně 10 až 15 let, planě rostoucí v jižní Evropě a nejvíce rozšířený je na jižním a jihozápadním portugalském pobřeží. Dnes se tato rostlina pěstuje po celém světě (Miguel et al. 2004; Shyamapada & Manisha 2016).

Rostlina je dvoudomá a v rostlinných společenstvích se vyskytují jak hermafroditní, tak samičí jedinci. Plně vzrostlá rostlina může být 30 až 50 cm vysoká, se čtyřhranným stonkem a větvemi; kdy stoněk s věkem dřevnatí a má vodorovný i vzpřímený habitus (Naumann 1886; Mustafa et al. 2020).

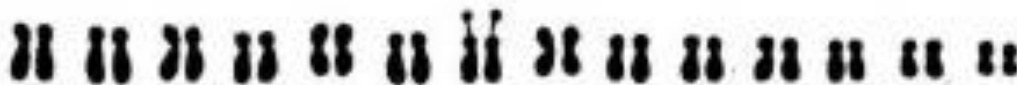
Bezlodyžné listy jsou vstřícné, kratičce řapíkaté, vejčité až trojúhelníkovité nebo kosníkovité, které jsou 6-12 mm dlouhé a 2–4,5 mm široké. Listy jsou na líci zelené, lysé nebo chlupaté, jehož povrch je poset s hustými žlutavými kulovitými žlázkami. Listy jsou rubu bělavě plstnaté, slabě podvinuté, na vrcholu tupé nebo špičaté (Šír 1889; Shyamapada & Manisha 2016).

Květenství má podobu shloučených lichopřeslenů s nerovným kalichem. Listeny jsou střechovité nebo vejčité, které mají žlutou, bílou nebo fialovou barvu. Kalich květu má zvonkovitý tvar a koruna je pyskatá, kdy dolní pysk má nestejně velké laloky. Tyčinky jsou vyniklé a semeník má gynobazickou čnělku. Rostlina kvete v červnu až červenci. Plodem jsou tvrdky, které mají elipsoidní tvar tmavohnědé barvy, obsahující velmi malá kulatá semena, která si zachovávají klíčivost po dobu 3 let (Dlouhý 1900; Mewes et al. 2008; Shyamapada & Manisha 2016).

Mnohé studie uvádí u *T. camphoratus* somatický počet chromozomů $2n=2x=28$ (Mewes et al. 2008) a $2n=2x=30$ (Jalas & Kaleva 1967; Pirbalouti et al. 2015).

Fotografie z vědecké studie o flóře Středomoří (Mediterránu) znázorňuje karyotypy u *Thymus thracicus*. Ten se řadí do sekce Teucrioides o chromozomovém čísle $2n=28$ a vzhled karyotypů je velmi podobný jako u *T. camphoratus* (viz. Obrázek 1) (Kamari et al. 1994).

L 1759



L 1351



Obrázek 1: Karyotyp *Thymus thracicus*

Autor: Kamari et al. (1994)

2.2 Původ a rozšíření

Thymus camphoratus je endemický druh malého území na atlantickém pobřeží Portugalska (Obrázek 2), lokality leží přibližně mezi městy Sinis a Lagos, který patří do sekce *Thymus*, podsekce *Thymastra* (Salgueiro et al. 1997).

2.3 Pěstování a rozmnožování

Ve volné přírodě a v zahradnictví se převážně rozmnožuje semeny. Na zahradách se osivo vysévá časně z jara mělce do půdy. V zahradnictví lze vysévat jak na jaře, tak i na podzim do skleníku (Bílý 1927; Plants Future 2021). Klíčení může být nepravidelné. Jakmile jsou sazeničky dostatečně velké, aby se s nimi dalo manipulovat, přesadí se do jednotlivých květináčů a pěstují se ve skleníku alespoň první zimu. Dorostlé rostliny se následně vysazují do půdy v létě nebo následující rok na jaře (Kalandra 1927).

Thymus camphoratus lze množit i ve skleníku pomocí kořenových řízků, řízkováním mladých výhonků, nebo odřezků z polovyzrálého dřeva v letním období anebo oddělováním trsů na jaře nebo na podzim (Özgüven & Tansi 1998; Dajić-Stevanović et al. 2008; Shyamapada & Manisha 2016; Plants Future 2021).

Thymus camphoratus preferuje lehkou, dobře propustnou vápenitou půdu a slunné stanoviště. Rostliny snášejí občasné sešlapávání a lze je pěstovat ve spárách cest nebo v květináčích. Tymián dobře snáší sucho a nemá rád vlhké podmínky,

zejména v zimě. Po odkvětu je nutné rostlinu seříznout (Bílý 1927; Kalandra 1927; Plants Future 2021).



Obrázek 2: Porost *Thymus camphoratus*

Autor: Fleurs des Montagnes (2011)

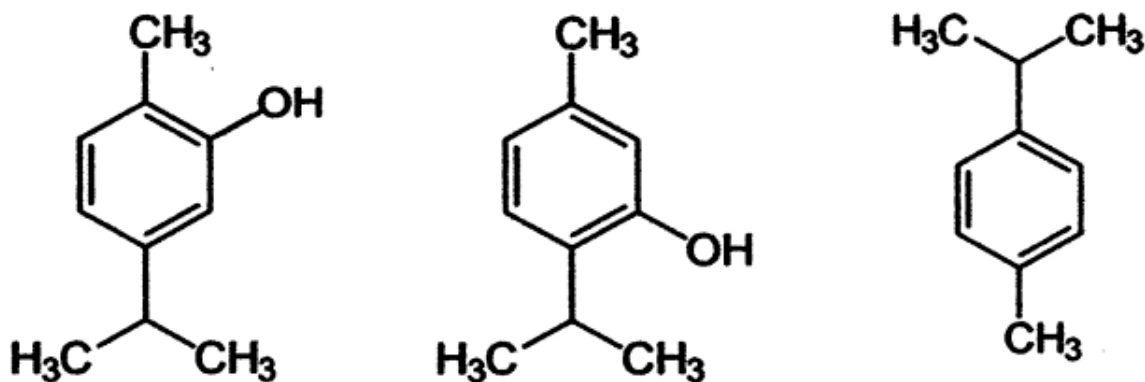


Obrázek 3: Květ *Thymus camphoratus*

Autor: BOTANY.cz (2017)

2.4 Využití

Rostliny z čeledi Lamiaceae zahrnují významné aromatické léčivé rostliny, které se v zemích Středomoří používají v tradiční medicíně již tisíce let a produkují pozoruhodné množství těkavých sloučenin a extrahují se jako esenciální oleje (EO). Používaly se již ve starověku pro své cenné zdravotní vlastnosti, které jsou spojeny s léčivými látkami a jejich chemickými složkami, zejména EO. Mezi těmito druhy jsou *Thymus vulgaris* a *Thymus camphoratus* běžně používané rostliny jako léčivý prostředek a kulinářská bylina a mají také dlouhou historii používání pro různé potravinářské, kosmetické nebo léčebné účely (Salehi et al. 2018). Mezi hlavní EO z mateřídoušky patří fenolové monoterpenové deriváty cymenu, thymolu a karvakrolu (Obrázek 4) (Hosseinzadeh et al. 2015; Salehi et al. 2019).



Obrázek 4: Hlavní chemické struktury terpenů (thymol, karvakrol a cymen) nalezených v tymiánové silici

Autor: Nieto (2020)

Thymus vulgaris (Obrázek 5) a *Thymus zygis* (tymián španělský, tymián bílý) mají velký hospodářský význam díky vysokému obsahu thymolu. Z obchodního hlediska jsou složky, které mají největší hospodářský význam u těchto rostlin thymol (68,1 %) a karvakrol (10 %), které tvoří většinu a nejvíce účinných látek v rostlinách. EO však obsahují více než 60 složek, z nichž většina má významné příznivé účinky, včetně antiseptických, antirevmatických, antioxidačních, antimikrobiálních, protinádorových a mnohých dalších vlastností (Nabavi et al. 2015; Salehi et al. 2019; Nieto 2020).

U všech druhů a odrůd tymiánu se komerčně využívají hlavně listy, a to k různým účelům, od koření až po bylinkářství. Dalším důležitým využitím, které se týká především druhů *T. zygis*, *Thymus hyemalis*, *Thymus corydanthum* (Obrázek 6, 7 a 8) a některých dalších, je získávání silic destilací. Esence z tymiánu má mnohostranné využití jak v lékařství, tak v parfumerii. Z tymiánové silice se získávají balzamické, vermucidní a baktericidní látky pro velmi rozmanité použití (Nabavi et al. 2015; Nieto 2020).

Stejně jako *T. vulgaris* se *T. camphoratus* od starověku používal jako účinné léčivo k hojení a léčbě proti infekcím hrudníku a vyvolání slin. Rostlina se používala také ke hnojení a v lidovém léčitelství se užívá z několika důvodů, například pro své protikřečové, močopudné, protihlístové a expektorační vlastnosti. Čerstvé listy se dnes užívají jako koření k ochucení pro svou chuť při vaření nebo k úlevě od bolesti v krku. Rostlina se také používá jako účinný prostředek při zánětech dýchacích cest a plic (bronchitida, faryngitida, černý kašel) a také k léčbě parazitů u dětí. (Bílý 1927; Verdaguer 1929; Fachini-Queiroz et al. 2012; Shyamapada & Manisha 2016).

Olej a výtažky z *T. camphoratus* mají i širokospektrální antibakteriální účinky proti bakteriím způsobujícím kažení potravin a otravy potravin a proti bakteriím souvisejícím s onemocněními lidí z potravin (Hosseinzadeh et al. 2015; Shyamapada & Manisha 2016). Studie taktéž prokázaly, že esenciální olej má antiseptické, antioxidační, antivirové, antimikrobiální, svalové relaxační a karminativní vlastnosti (Shyamapada & Manisha 2016; Labiad et al. 2022). Složky esenciálního oleje, thymol a karvakrol, představují účinky na zánětlivou reakci (Bílý 1927; Verdaguer 1929; Fachini-Queiroz et al. 2012; Shyamapada & Manisha 2016).



Obrázek 5: *Thymus vulgaris*

Autor: Nieto (2020)



Obrázek 6: *Thymus zygis*

Autor: Nieto (2020)



Obrázek 7: *Thymus hyemalis*

Autor: Nieto (2020)



Obrázek 8: *Thymus corydorythymus*

Autor: Centre of Natural and Cultural Heritage (2022)

2.5 Mikropropagace

Mikropropagace je technika pěstování rostlinných tkáňových kultur, která se používá k pěstování izolovaných rostlinných buněk, pletiv a orgánů v axenických podmínkách (*in vitro*) za účelem regenerace a množení celých rostlin. Tato technika má oproti konvenčnímu vegetativnímu množení mnoho výhod, jako např. množení velkého počtu rostlin bez patogenů v krátkém čase a s vysokou uniformitou (Iliev et al. 2010; Kumar & Reddy 2011).

Úspěšnost mikropropagace ovlivňuje několik faktorů, jako je složení kultivačního média, kultivační prostředí a genotyp. Určité druhy plodin patří mezi primární produkční modely pro komerční metody a systémy mikropropagace. Mezi tyto druhy patří: květiny a okrasné druhy (orchideje); plantážní plodiny (banány, ananas, cukrová třtina); zeleninové plodiny (brambory) atd. Mikropropagace se stala důležitou součástí komerčního pěstování mnoha rostlin, protože má své výhody jako systém množení (Iliev et al. 2010; Loberant & Altman 2010).

2.5.1 Mikropropagace léčivých rostlin

Již od pradávna bylo mnoho léčivých rostlin využíváno k léčení mnoha nemocí. Starověké písemné záznamy mnoha civilizací (např. egyptské, římské, čínské) podávají přesvědčivé důkazy o používání léčivých rostlin. V současné době existuje mnoho zavedených bylinných a rostlinných léčebných postupů (ájurvédská medicína v Indii), které jsou populární v mnoha částech světa. V posledních dvou desetiletích došlo k velkému nárůstu výzkumu a studií léčivých rostlin a byla objevena řada nových léčivých látek a došlo k pokroku ve výrobě. Mezi léčivými rostlinami se většina výzkumných studií zabývá produkcí a biotransformací farmakologicky účinných látek pomocí tkáňových kultur, které jsou široce využívány pro komerční množení velkého počtu druhů rostlin, včetně mnoha léčivých rostlin (Bajaj et al. 1988; Rout et al. 2000; Sidhu 2010).

Farmaceutické společnosti jsou z velké části závislé na materiálech získávaných z přirozeně se vyskytujících porostů, které se rychle vyčerpávají. Přibližně 40 % sloučenin používaných ve farmaceutickém průmyslu pochází přímo nebo nepřímo z rostlin, protože chemická syntéza těchto sloučenin buď není možná nebo není

ekonomicky výhodná. Světová zdravotnická organizace (WHO) uvádí, že 80 % lidí v rozvojovém světě používá léčivé rostliny k primární zdravotní péči (Rout et al. 2000; Sidhu 2010).

V oblasti mikropropagace je často věnována pozornost rostlinám, které obsahují sloučeniny užitečné v lékařství a farmacii, neboť mikropropagace zajišťuje dobrý pravidelný přísun léčivých rostlin s využitím minimálního prostoru a času. Mezi tyto rostliny patří například *Catharanthus roseus*, který obsahuje dimerní alkaloidy vinkristin a vinblastin používané jako protinádorové látky (Oncovin a Velban), *Dioscorea deltoidea* se steroidním sapogeninem-diosgeninem používaným k výrobě steroidů nebo druh *Digitalis* obsahující kardenolidy jako digoxin a digitoxin a mnohé další druhy rostlin (Bajaj et al. 1988; Chaturvedi et al. 2007).

Existuje mnoho faktorů ovlivňující *in vitro* propagaci léčivých rostlin. Růstové hormony regulují různé fyziologické a morfologické procesy v rostlinách a do kultur je lze přidávat za účelem zlepšení růstu rostlin a zvýšení syntézy metabolitů. V případě *Aloe vera*, která byla kultivována na MS médiu obsahující 2,0 mg l⁻¹ BAP, 0,5 mg l⁻¹ KIN a 0,2 mg l⁻¹ NAA, rostlina vykazovala rychlé množení výhonů a na MS médiu obsahující 1,0 mg l⁻¹ BAP a 0,2 mg l⁻¹ rostlina vykazovala nejlepší růst a největší počet výhonů (Sidhu 2010).

Sekundární metabolity u rostlin se používají jako léčiva, agrochemikálie, aromatické látky a potravinářské přísady. Chemická syntéza mnoha z těchto metabolitů je možná pouze v rostlinách, což vede k nadměrnému využívání a hrozbě vyhynutí mnoha druhů léčivých rostlin. Tkáňová kultura nabízí účinnou a potenciální alternativu produkce metabolitů, protože množství sekundárních metabolitů produkovaných v tkáňových kulturách může být vyšší než v rodičovských rostlinách (Chaturvedi et al. 2007; Sidhu 2010).

2.5.2 Mikropropagace rostlinných druhů z čeledi Lamiaceae

Mikropropagační techniky vyvinuté pro velkoplošné množení rostlin patřících do čeledi Lamiaceae jsou založeny především na explantátech, ačkoli kombinace růstových regulátorů se liší. Jan et al. (2016) uvádí, že léčebně významné rostliny z čeledi Lamiaceae byly úspěšně mikropropagovány pomocí tkáňových kultur, kdy ve většině případů se používalo MS médium s různými koncentracemi auxinů a cytokininů,

a to buď samostatně, nebo v různých kombinacích. Mezi lékařsky významné druhy rostlin, které byly úspěšně mikropropagovány ve velkém měřítku patří: *Ocimum*, *Mentha*, *Ajuga*, *Lavandula*, *Thymus*, *Salvia*, *Rosmarinus*, *Prunella* a *Coleus* (Jan et al. 2016).

2.6 Šlechtění rostlin

Šlechtění rostlin je aplikovaná, multidisciplinární věda. Jde o aplikaci genetických principů a postupů spojených s vývojem kultivarů, které více vyhovují potřebám člověka oproti schopnostem rostlin přežít ve volné přírodě. Tradiční (klasické) šlechtitelské metody jsou primárně založeny na kombinování zajímavých znaků a vlastností po křížení rodičovských rostlin. Těmito metodami je možné vytvořit odrůdy, které budou mít lepší vlastnosti než rostlina původní (např. větší výnos, vyšší odolnost vůči suchu a rostlinným škůdcům nebo odolnost vůči mrazu). Do tradičních konvenčních metod šlechtění se zařazují metody výběru, křížení, heterozního šlechtění či mutačního a polyploidního šlechtění (Čurn 1995; Graman & Čurn 1997; Gepts & Hancock 2006; Šmarda 2016).

Metoda výběru je nejstarší šlechtitelskou metodou, která zahrnuje výběr z populací konkrétních rodičovských jedinců šlechtěných druhů, kteří vynikali svými prospěšnými a žádoucími vlastnostmi. V minulosti tak došlo k výběru planých druhů travin jako předků pro dnešní obiloviny. Výběrem se zároveň vylučují jedinci s nežádoucími kombinacemi znaků a vlastností. Přírodní výběr je daleko pomalejší metodou oproti umělému výběru, a proto se v dnešní době využívá zejména druhé varianty. Touto metodou lze efektivněji selektovat druhy rostlin s určitými znaky a vlastnostmi, kdy jedinci s nevhodnými znaky jsou z procesu vyřazováni (Graman & Čurn 1997; Šmarda 2016)

Druhou nejstarší šlechtitelskou a nejpoužívanější metodou je metoda křížení (hybridizace). Křížení je termín, kterým se označuje rozmnožování jedinců dvou odlišných druhů rostlin, jejichž potomek je následně označován jako kříženec (hybrid). Křížením dochází ke splynutí genetických informací dvou nebo více rodičovských rostlin, kdy se tyto jedinci odlišují svým genetickým základem a jsou nositeli určitých znaků nebo vlastností. Ke vzniku rostliny o novém genetickém obsahu dochází splynutím samčích a samičích pohlavních buněk (přenesení pylu z pestíků jedné rostliny na bliznu rostliny druhé). U rostlin může docházet ke křížení jak vnitrodruhovému, kdy rodičovskými komponenty jsou dvě rostliny stejného druhu, tak ke křížení

mezidruhového, kdy rodičovskými komponenty jsou dvě rostliny druhu odlišného (Čurn 1995; Graman & Čurn 1997; Rieseberg & Carney 1998; Šmarda 2016).

Ve 20. století se povedlo křížením získat hybrida *Dianthus caryophyllus barbatus*, kterou vytvořil Thomas Fairchild křížením *Dianthus barbatus* a *Dianthus caryophyllus* (Rieseberg & Carney 1998).

Heterozní šlechtění je proces, při němž nevznikají trvalé odrůdy, nýbrž odrůdy typu F1, které se musí každý rok ze známých rodičovských komponent znovu vytvářet. Touto metodou je možné vytvářet rostliny, u kterých lze pozorovat zvětšení a mohutnost růstu jednotlivých orgánů, zvýšení výnosu, životnosti, plodnosti, ranosti a odolnosti vůči nepříznivým podmínkám. Tato generace vznikne křížením geneticky rozdílných genotypů rostlin (Graman & Čurn 1997).

Metoda mutačního šlechtění je založena na náhlé dědičné změně genotypu rostliny, která se dědí na potomstvo. K mutacím může docházet u rostlin samovolně (spontánně) nebo mohou být uměle vyvolané (indukované). Samovolné (spontánní) mutace jsou poměrně vzácné, neboť u rostlin vznikají chybou v replikačním a reparačním mechanismu DNA. Mutace indukované jsou naopak uměle vyvolány za použití mutagenů, jako je např. ionizující záření nebo chemické látky (D'Amato & Otto Hoffmann-Ostenhof 1956; Sigurbjörnsson 1971; Graman & Čurn 1997).

Polyploidizace je nejrychlejší metodou šlechtění rostlin a způsobuje zvýšení počtu chromozomů a zdvojnásobení množství DNA v rostlinné buňce. Polyploidie je genomová mutace, přičemž jejími prvními výzkumníky v letech 1910–1930 byli vzdělaní genetici Hogo DeVries, který identifikoval autotetraploidní mutanty *Oenothera biennis* nebo Arne Müntzing, který zkoumal polyploidii u *Dactylis glomerata*, *Secale cereale* a *Galeopsis* spp. a zároveň sledoval vývoj u dalších taxonů (Ramsey & Ramsey 2014). První polyploidizace byla zaznamenána u tabáku v podmínkách *in vitro* (Salma et al. 2017). Metoda je založena na působení antimitotického činidla, inhibující činnost a vznik mitotického vřeténka, vedoucí ke zvýšení počtu setů chromozomů v buňce vlivem abiotického stresu nebo dalších faktorů. Polyploidizace u rostlin se vyznačuje výraznými morfologickými změnami např. většími květy, listovou plochou, velikostí, vyšším počtem průduchů a chloroplastů, vyšším počtem a délkou kořenů nebo naopak zmenšením rostlinných orgánů apod. (Graman & Čurn 1997; Van der Peer et al. 2017; Shmeit et al. 2020).

Mezi netradiční (nekonvenční) metody šlechtění řadíme biotechnologické a molekulární metody používané až v posledních desetiletích. Klíčovým momentem pro rozvoj moderních biotechnologií bylo objevení struktury DNA v padesátých letech 20. století. Mezi tyto metody patří techniky mikropropagace rostlin pomocí rostlinných explátů *in vitro*, techniky zachovávající původní genotyp a zvyšující genetickou variabilitu. Nekonvenční metody šlechtění představují zejména využití *in vitro* technik nukleové kyseliny, včetně rekombinantní DNA a použití přímé injekční aplikace nukleové kyseliny do buněk nebo organel (Čurn 1995).

Mikropropagace se v posledních letech stala důležitou součástí komerčního pěstování kvůli rychlému množení rostlinného materiálu (viz kapitola 2.5).

Genové inženýrství je poměrně nová metoda, která umožňuje přímý zásah do genomu organismu pomocí moderních DNA technologií. Tyto techniky se uplatňují zejména ve snaze o vytváření produktivnějších rostlinných odrůd vnášením cizorodé DNA do genomu (modifikací genomu), kdy cílem je získání genotypů rezistentních vůči rostlinným škůdcům, houbovým chorobám nebo vůči nepříznivým podmínkám. U této metody lze pro modifikaci rostlinného genomu využít i živočišné geny (Čurn 1995; Graman & Čurn 1997; Punja 2001).

2.7 Somatická indukovaná polyploidie *in vitro*

U rostlin byla polyploidie objevena před sto lety a je považována za důležitý rys evoluce chromozomů. Její široký výskyt v přirozených populacích naznačuje, že představuje významnou evoluční sílu, která pohání speciaci i diverzifikaci rostlin. Polyploidie je obecně definována jako přítomnost tří nebo více kompletních kopií jaderné sady chromozomů (De Storme & Geelen 2013).

Umělou polyploidizaci lze rychleji a spolehlivěji vyvolat pomocí antimitotických látek, jako je např. kolchicin, oryzalin, trifluralin, a další (Eng & Ho 2019).

Polyploidie neboli duplikace celého genomu (WGD) je u rostlin častým jevem, zejména u kvetoucích rostlin. Odhaduje se, že přibližně 15 % případů speciace u angiospermů zahrnuje změnu ploidie (Dodsworth et al. 2016; Eng & Ho 2019).

2.7.1 Antimitotická činidla

Mezi antimitotická činidla patří sloučeniny herbicidů dinitroanilinu, které představují třídu chemických látek se strukturou obsahující dvě nitroskupiny a aromatický amin, anilin. V zemědělství se dinitroaniliny používají především jako preemergentní herbicidy k regulaci trav a některých širokolistých plevelů. Mezi dosud komercializované dinitroanilinové herbicidy patří trifluralin, pendimethalin, ethalfluralin, oryzalin, butralin, benefin/benfluralin a prodiamin. Při indukci polyploidů se používá několik typů antimitotických činidel, např. kolchicin, oryzalin, trifluralin, amiprofosmethyl a N₂O, avšak u rostlinných druhů se nejčastěji používají kolchicin a oryzalin. O všech těchto chemických látkách je známo, že se vážou na dimery tubulinu, čímž zabráňují tvorbě mikrotubulů, a tedy i vřetenovitých vláken během buněčného dělení. Tím brání migraci chromatid k opačným pólům. Proces je znám jako mitotický skluz, a kromě toho nedochází k cytokinezi (Talebi et al. 2017; Chen et al. 2021).

Kolchicin je další silné antimitotické činidlo, které indukuje polyploidizaci v rostlinách. Často je označován jako antimikrotubulární a antimitotická látka. Mechanismus působení kolchicinu v buňkách byl studován již od 50. let 20. století a dnes je široce používán u rostlin k oddělení chromozomů v metafázi a k vyvolání polyploidie. Sloučenina zároveň inhibuje tvorbu vřetenka, a tím zabráňuje anafázi. Avšak postupem času byl kolchicin nahrazen herbicidy, které mají schopnost daleko lépe inhibovat mitózu (oryzalin, trifluralin apod.), díky vyšší afinitě k tubulinu. Kolchicin je přírodní alkaloid, který se získává z celých rostlin *Colchicum autumnale* L., a z *Gloriosa superba*, které patří do čeledi Colchicaceae. Tato látka byla nejčastěji používaná jako mutagen v rostlinách díky své účinnosti a spolehlivosti při vyvolávání polyploidizace (Bhattacharyya et al. 2008; Eng & Ho 2019).

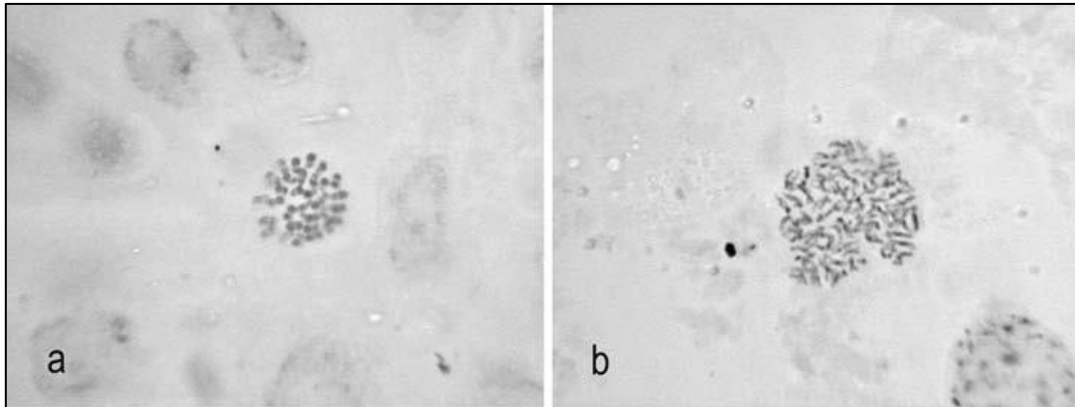
2.7.2 Metody stanovení ploidie

Metody pro stanovení úrovně ploidie mohou být přímé (počítání chromozomů, a průtoková cytometrie) nebo nepřímé (velikost stomat, počet chloroplastů v ochranných buňkách a morfologická pozorování). Ke stanovení ploidie se běžně využívá průtoková cytometrie. Měření ploidní úrovně má největší význam v závěrečných fázích haploidních indukčních programů. (Bohanec 2003; Shmeit et al. 2020)

Průtoková cytometrie má schopnost měřit optické a fluorescenční charakteristiky jednotlivých buněk nebo jakýchkoli jiných částic, jako jsou mikroorganismy, jádra a chromozomové preparáty v proudě tekutiny při průchodu světelným zdrojem. Základní princip průtokové cytometrie souvisí s rozptylem světla a emisí fluorescence, ke které dochází při dopadu světla z excitačního zdroje (obvykle laserového paprsku) na pohybující se částice (viz Obrázek X). Získané údaje mohou poskytnout cenné informace o biochemických, biofyzikálních a molekulárních aspektech částic. Rozptyl světla přímo souvisí se strukturálními a morfologickými vlastnostmi buňky, zatímco emise fluorescence získaná z fluorescenční sondy je úměrná množství fluorescenční sondy vázané na buňku nebo buněčnou složku. Analýza DNA je následně zobrazena v počítačovém programu v podobě histogramů, ve kterém dochází k růstu dominantního píku, který odpovídá počtu jader ve fázi G1 buněčného cyklu (viz Obrázek 11). Výhodou této metody je rychlejší testování pokusných rostlin (Macey & Macey 2007; Jahan-Tigh et al. 2012; Adan et al. 2017).

Průtoková cytometrie byla použita při různých výzkumech polyploidie rostlin např. *Smallanthus sonchifolius* (Viehmannová et al. 2009), *Thymus vulgaris* (Shmeit et al. 2020), *Hedychium muluense* R. M. Smith (Sakhanokho et al. 2009), *Ocimum basilicum* L. (Omidbaigi et al. 2010) a mnoha dalších druhů rostlin.

U *Smallanthus sonchifolius* byla úroveň ploidie testována v průtokovém cytometru. Pro potvrzení úrovně ploidie byly následně spočítány chromozomy u somatických buněk, které byly získány z mladé listové tkáně (viz Obrázek 9 a 10) (Viehmannová et al. 2009).

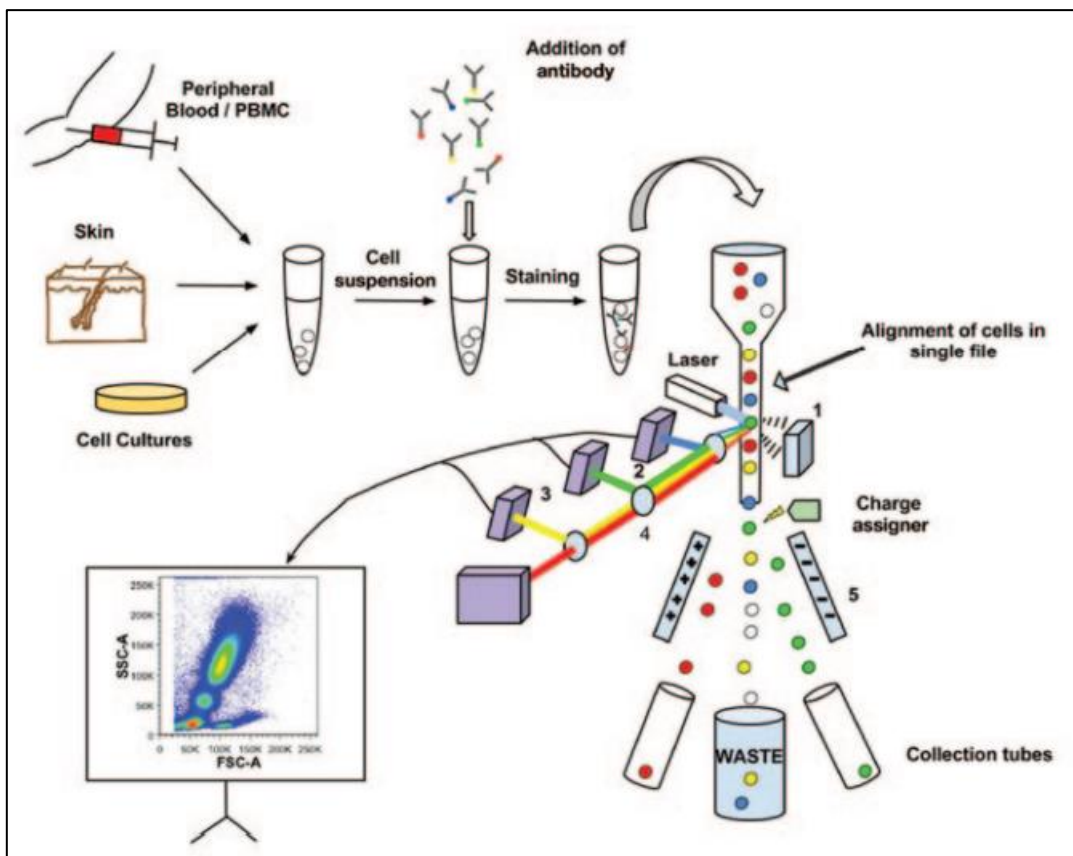


Obrázek 9: Počet chromozomů oktoploidní rostliny *Smallanthus sonchifolius* ($2n=2x=58$)

Autor: Viehmannová et al. (2009)

Obrázek 10: Počet chromozomů hexadekaploidní rostliny *Smallanthus sonchifolius* ($2n=4x=116$)

Autor: Viehmannová et al. (2009)



Obrázek 11: Průtokový cytometr – schéma

Autor: Jahan-Tigh et al. (2012)

3. Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo získat autopolyploidní rostliny z diploidních rostlin ($2n=2x=28$) pomocí *in vitro* indukované polyploidizace u *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link.

Cíl práce byl stanoven dle následujících hypotéz:

H1: Oryzalin je účinné antimitotické činidlo pro polyploidizaci *T. camphoratus*

H2: Pomocí polyploidie lze v *in vitro* kulturách získat nové genotypy *T. camphoratus* s rozdílnými morfologickými a biochemickými znaky

4. Materiál a metodika

4.1 Rostlinný materiál

Thymus camphoratus ($2n=2x=28$) byl získán ze sbírky rostlin Fakulty tropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze, Česká republika. Rostliny byly udržovány ve skleníkových podmínkách v plastových květináčích (5×5 cm), které obsahovaly směs písku; zeminy; rašelinového mechu a vermikulitu v poměru 1:1:1:1. Průměrná teplota ve skleníku byla 22,5 °C a relativní vlhkost vzduchu se pohybovala v rozmezí 70 % až 80 %.

4.2 Množení rostlin *in vitro*

Před založením samotného pokusu bylo potřeba dostatečně namnožit rostlinný materiál. Výhonky (1,5 cm dlouhé) z jedné dospělé rostliny byly sterilizovány a poté kultivovány na MS médiu v podmínkách *in vitro*. Nodální segmenty byly důkladně promyty pod tekoucí destilovanou vodou po dobu 1 h, namočeny v 70 % ethanolu po dobu 30 s, sterilizovány 1 % roztokem NaClO obsahujícím dvě kapky Tween 20 (detergent) po dobu 25 min a poté třikrát propláchnuty sterilizovanou destilovanou vodou. Každý nodální segment byl kultivován ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách na MS médiu (Murashige & Skoog 1962) bez růstových regulátorů. V jedné 100 ml Erlenmeyerové baňce bylo pěstováno 5-6 rostlin.

Kultury nodálních segmentů byly kultivovány při teplotě $25/20 \pm 0,3$ °C a fotoperiodě 16/8 h (světlo/tma) s intenzitou světla 3500 lx. Nodální segmenty byly několikrát pasážovány a kultivovány po dobu 2 měsíců, dokud nebyl získán dostatečný počet rostlin určených pro vlastní pokus.

V rámci namnožených rostlin byl pokus rozšířen o mikropropagaci rostlin z apikálních meristémů (R_A) a nodálních segmentů (R_N) u *T. camphoratus*. Rostliny byly pěstovány ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách po jedné rostlině na MS médiu bez růstových regulátorů po dobu 8 týdnů.

Pokus byl založen, aby se optimalizovala rychlejší metoda mikropropagace z hlediska počtu nově vytvořených nodálních segmentů (koeficient mikropropagace).

4.3 *In vitro* polyploidie

4.3.1 Indukce ploidie

Jako antimitotické činidlo pro indukci polyploidizace v *in vitro* podmínkách byl vybrán oryzalin. K jeho přípravě (10 mM) bylo naváženo 0,0346 g oryzalinu a následně rozpuštěno v 10 ml rozpouštědla dimethylsulfoxidu (DMSO) ve sterilní Erlenmeyerově baňce. Jelikož DMSO má sterilizační účinek, nebylo nutné roztok oryzalinu sterilizovat v autoklávu.

Nodální segmenty *T. camphoratus* byly následně ovlivněny antimitotickým činidlem oryzalinem v koncentracích 20, 40 a 60 μM oryzalinu po dobu 24 a 48 hodin (tabulka č. 2). Pro každou variantu pokusu bylo vysazeno a ošetřeno přibližně 40 nodální segmentů na MS médiu (Murashige & Skoog 1962) bez růstových regulátorů, kdy roztok oryzalinu byl následně opatrně přidáván do kultivační nádoby pomocí sterilní pipety s pumpičkou.

Po ošetření byly ovlivněné nodální segmenty vyjmuty z roztoku oryzalinu a třikrát opláchnuty ve sterilizované destilované vodě. Rostliny byly následně jednotlivě kultivovány na stejném multiplikačním médiu v Erlenmeyerových baňkách po šesti rostlinách nebo zkumavkách po jedné rostlině (viz Obrázek 12).

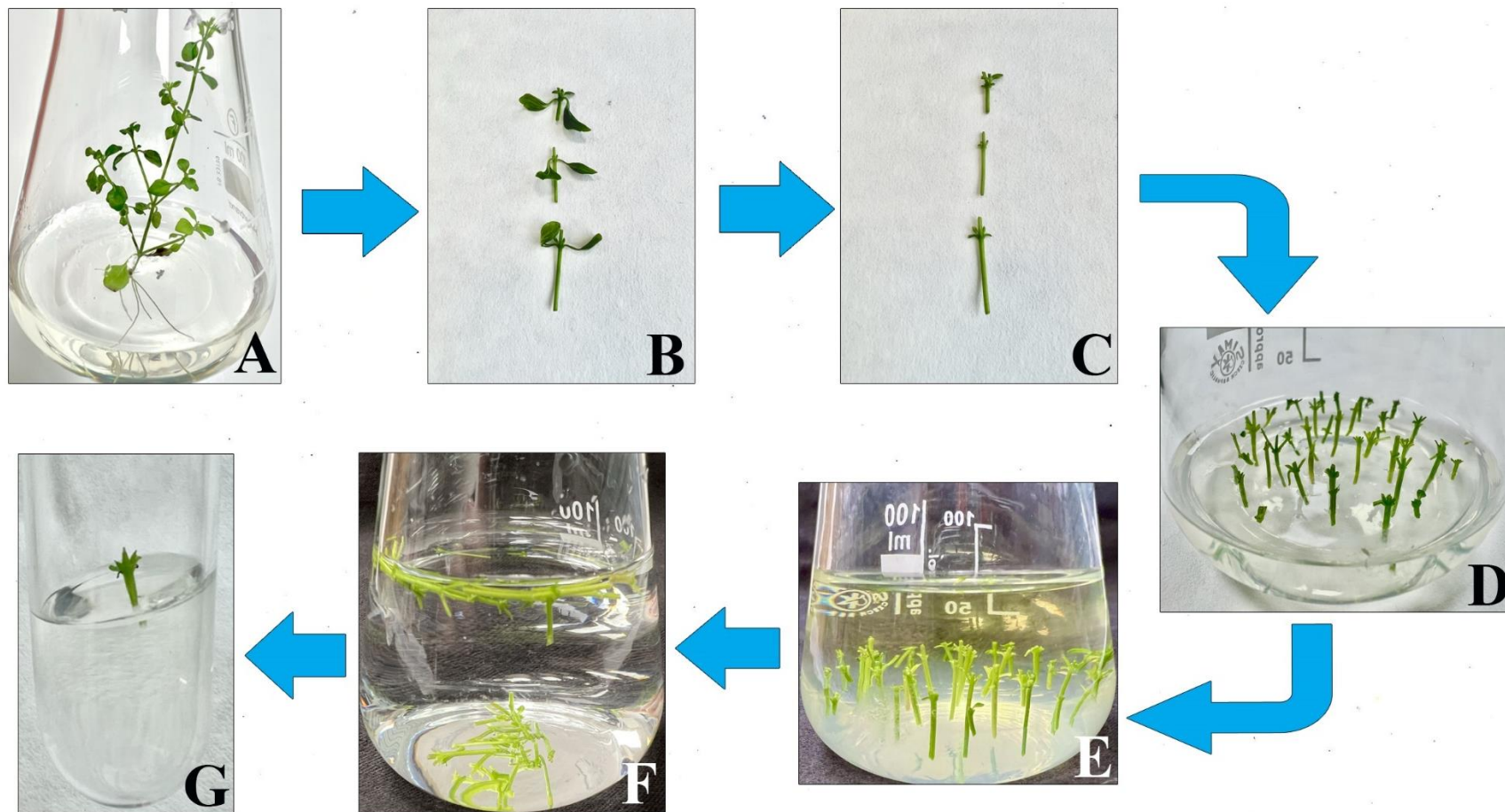
4.4 Stanovení úrovně polyploidie

Pro zjištění úrovně ploidie ovlivněných rostlin *T. camphoratus* byla použita průtoková cytometrie. Ovlivněné rostliny byly kultivovány na MS médiu bez přídavku hormonů (PGR), pasážovány a po 2 měsících kultivace byl z každé rostliny odebrán vzorek z listu. Malé části listové tkáně pro rozrušení pletiva byly nasekány žiletkou do Petriho misky obsahující 500 μl Ottova I pufru (0,1 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 0,5 % Tween 20). Získané vzorky surové suspenze obsahující izolovaná jádra byly následně přefiltrovány přes 50 μM nylonovou síťku do malých zkumavek. K přefiltrovaným vzorkům byl následně přidán 1 ml Ottova II pufru (0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) obsahujícího

fluorescenční barvivo DAPI v koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$. Všechna měření ke zjištění ploidních úrovní byla prováděna v relativní intenzitě fluorescence nejméně 3000 jader a byla zaznamenána pomocí průtokového cytometru Partec PAS vybaveného vysokotlakou rtuťovou obloukovou lampou. Histogramy obsahu DNA byly vyhodnoceny pomocí softwarového balíku Flomax.

4.5 Statistické hodnocení výsledků

Během pokusu byly pozorovány a hodnoceny morfologické změny rostlin. Naměřená data z morfologického hodnocení byla statisticky zhodnocena dle Kruskal-Wallisova testu na hladině významnosti 0,05. Rozdíly mezi variantou kontrolní, M 18 a P 68 jsou shrnuté v tabulce č. 3. Rozdíly mezi rostlinami R_A a R_N jsou shrnuté v tabulce č. 4.



Obrázek 12: Schéma indukce polyploidizace u *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link: **A** – rostlina *in vitro*; **B** a **C**- získané nodální segmenty (o délce cca 1,5 cm); **D**- nodální kultura ($2n=2x=28$); **E**- aplikace oryzalinu na nodální kulturu (20, 40 a 60 $\mu\text{M/l}$, doba působení 24 a 48 h); **F**- promývání nodálních segmentů sterilní destilovanou vodou; **G**- kultivace ovlivněného nodálního segmentu ($2n=4x=56$)
Autor: Vlastní zpracování autora (2022)

5. Výsledky a diskuze

Polyploidizací bylo ovlivněno celkem 318 rostlin. V průběhu pokusu některé rostliny uhynuly a výsledný počet ovlivněných rostlin byl 148. Úspěšnost polyploidizace byla testována pomocí průtokové cytometrie, kde bylo analyzováno postupně všech 148 vzorků a vzorek rostliny kontrolní.

Nejlépe rostliny reagovaly při koncentraci oryzalinu o 20 $\mu\text{M/l}$ a 60 $\mu\text{M/l}$. Vliv na míru přežití rostlin měla i doba trvání pokusu. Rostliny lépe reagovali na koncentraci oryzalinu při kratším časovém úseku (24 h). Výsledný počet rostlin po ukončení pokusu byl tudíž ovlivněn jak mírou koncentrace oryzalinu, tak i časovým intervalem trvání pokusu. Účinnost polyploidizace byla u nově získaných genotypů odlišná (viz Tabulka 2).

Celkem byla získána jedna mixoploidní rostlina, která byla označena jako M 18 a jedna tetraploidní rostlina, která byla označena jako P 68. Tetraploidní rostlina byla získána při koncentraci oryzalinu 20 $\mu\text{M/l}$ po dobu kultivace 24 hodin, zatímco mixoploidní rostlina byla získána při koncentraci oryzalinu 60 $\mu\text{M/l}$ po dobu kultivace 24 hodin (viz Tabulka 2).

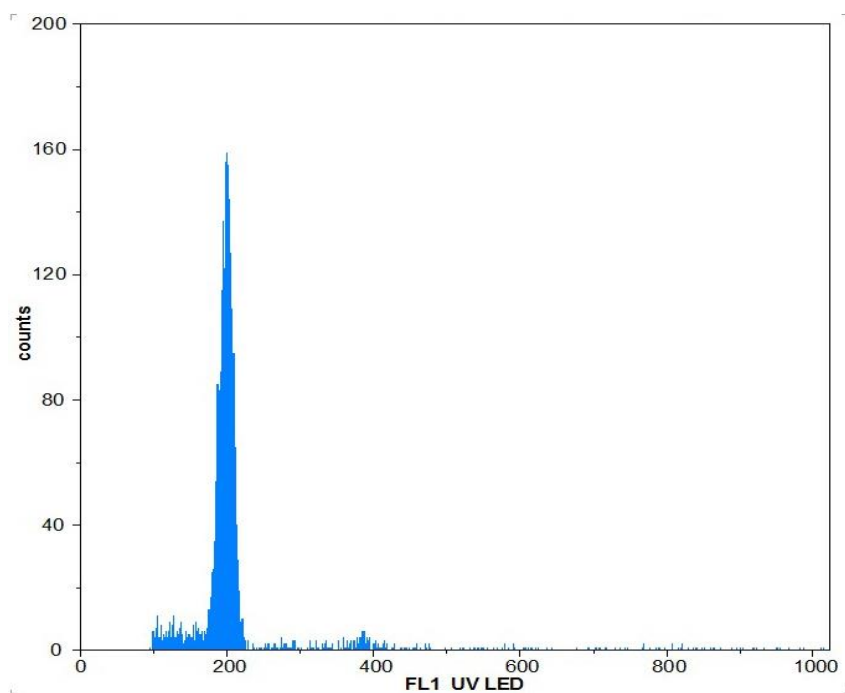
Během pokusu byly sledovány oba získané genotypy M 18 a P 68 společně s kontrolní rostlinou.

Tabulka 2: Vliv působení oryzalinu na nodální segmenty v *in vitro* podmínkách na míru přežití a počet polyploidů u *T. camphoratus*

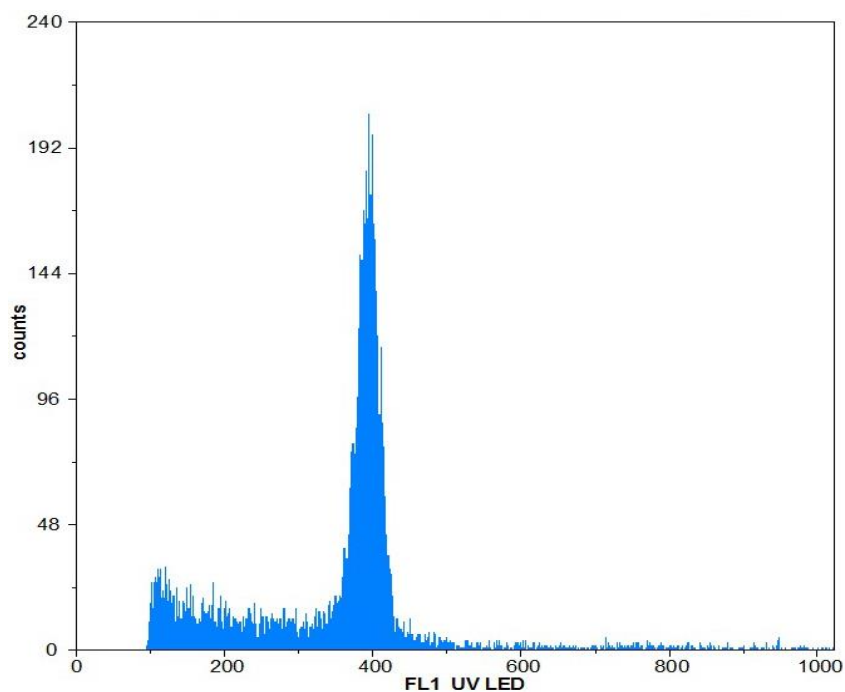
Koncentrace oryzalinu (μM/l)	Doba působení (hodiny)	Počet rostlin	Počet rostlin po ukončení pokusu	Míra přežití (%)	Počet tetraploidních rostlin	Počet mixoploidních rostlin	Účinnost polyploidizace (%)
20	24	56	24	42,86	1	0	4,17
	48	62	37	59,68	0	0	0
40	24	46	29	63,04	0	0	0
	48	54	29	53,7	0	0	0
60	24	50	17	34	0	1	5,88
	48	50	12	24	0	0	0
Celkem		318	148	46,54	1	1	

Autor: Vlastní zpracování autora (2022)

U tetraploidní rostliny ukázal histogram dvojnásobný počet chromozomů (Obrázek 14) oproti kontrolní rostlině (Obrázek 13).



Obrázek 13: Histogram zobrazující obsah DNA v buňkách u kontrolní rostliny ($2n=2x=28$) –pík na kanálu 200 odpovídá jádrům kontrolní rostliny

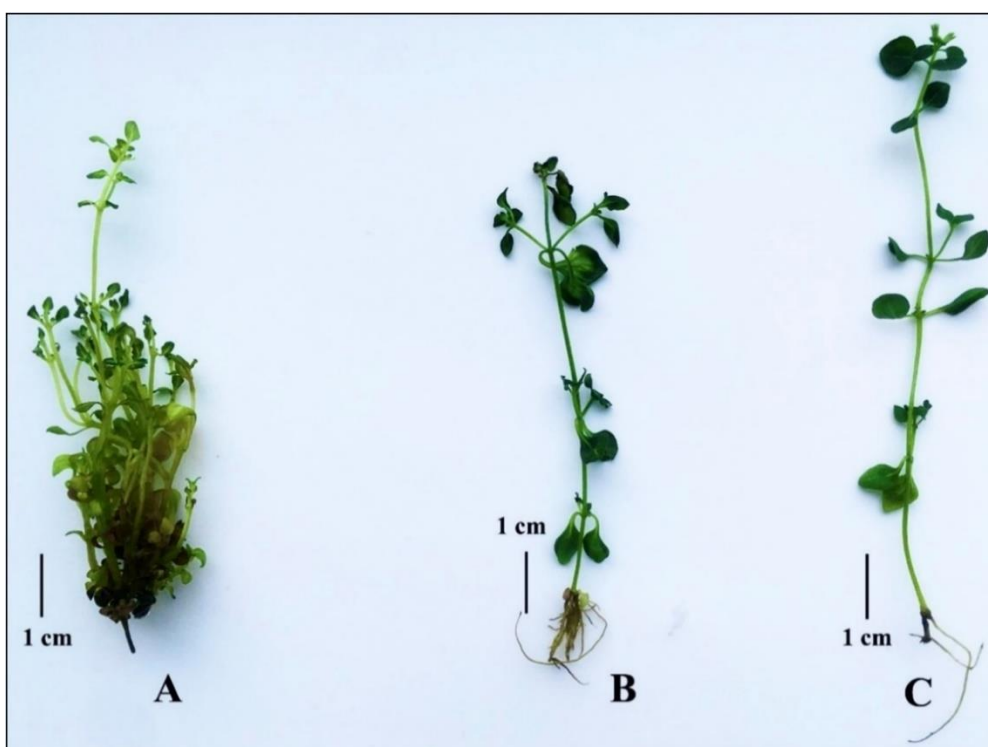


Obrázek 14: Histogram zobrazující DNA polyploidní (tetraploidní) rostliny P 68 ($2n=4x=56$) - pík na kanálu 400 odpovídá jádrům tetraploidní rostliny po působení oryzalinu o koncentraci $20 \mu\text{M}$ po dobu 24 hodin

5.1 Morfologické hodnocení polyploidů

Nově získaná tetraploidní rostlina genotypu P 68 a rostlina mixoploidní genotypu M 18 byly kultivovány na MS medium bez přídavku růstových regulátorů. Sledována byla i kontrolní mateřská (diploidní) rostlina, kdy každá rostlina byla namnožena a následně pak samostatně umístěna do Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml nebo zkumavky. Rostliny byly kultivovány po dobu 9 týdnů a během jejich doby kultivace byly hodnoceny jejich morfologické změny. Rozdíly mezi kontrolní rostlinou a autopolyploidními rostlinami (tetraploidní a mixoploidní) jsou shrnuté v tabulce č. 3.

Získané výsledky byly statisticky zhodnoceny dle Kruskal-Wallisova testu na hladině významnosti 0,05. U tetraploidní a mixoploidní rostliny byly pozorovány významné změny oproti kontrolní (diploidní) matečné rostlině. Největší průměrná výška rostlin ($6,97 \pm 2,47$ cm) byla pozorována u genotypu P 68 (viz Tabulka č. 3). Tyto rostliny měly také mnohem větší listy oproti kontrolní rostlině (viz Obrázek 15).



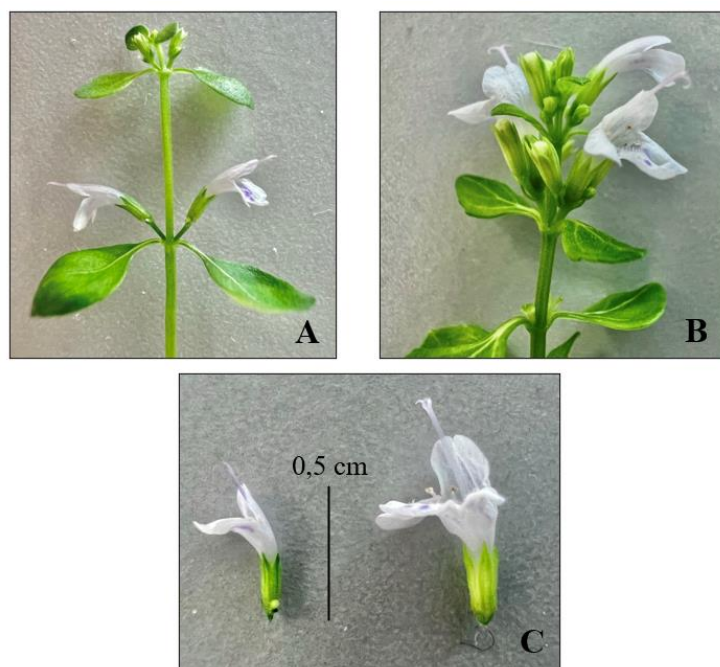
Obrázek 15: Morfologické rozdíly u kontrolní, mixoploidní a tetraploidní rostliny po 9 týdnech kultivace: **A** – Kontrolní rostlina ($2n=2x=28$); **B** – Mixoploidní rostlina M 18; **C** – Tetraploidní rostlina P 68 ($2n=4x=56$)

Největší počet kořenů byl pozorován u genotypu M 18 ($5,08 \pm 3,68$ kořenů), oproti genotypu P 68 ($2,67 \pm 2,53$ kořenů) a kontrolní rostlině, kdy kontrolní rostlina po dobu

kultivace nevytvářela kořeny žádné (viz Obrázek 15). Nejdelší kořeny byly taktéž pozorovány u genotypu M 18 ($1,44 \pm 0,93$ cm), stejně tak jako tloušťka hlavního stonku ($0,97 \pm 2,51$ mm) a počet větvení ($4,17 \pm 0,12$ větvení) oproti genotypu P 68 a kontrolní rostlině (viz Tabulka č. 3).

Naopak u genotypu P 68 byl zaznamenán nejvyšší počet nodů ($6,08 \pm 1,08$ nodů) a největší průměrná velikost internodu ($1,13 \pm 0,27$ cm), oproti kontrolní rostlině ($5,17 \pm 1,03$ nodů a $0,68 \pm 0,21$ cm) a genotypu M 18 ($5,5 \pm 2,66$ nodů a $1,11 \pm 1,17$ cm). Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Během kultivace docházelo u kontrolní rostliny a genotypu P 68 k tvorbě květenství. Genotyp M 18 květenství nevytvářel. U genotypu P 68 byla vyzorována větší velikost a počet květů v květenství oproti kontrolní rostlině (viz Obrázek 16). Květ u kontrolní rostliny dosahoval velikosti 0,5 cm, zatímco u tetraploidní rostliny genotypu P 68 dosahoval květ velikosti 0,7 cm. Koruna květu tetraploidní rostliny oproti květu rostliny kontrolní byla větší společně s dvoumocnými tyčinkami. Horní a dolní pysky dosahovaly širší velikosti a kalich květu byl taktéž vyšší a širší. Barva květu u kontrolní rostliny a genotypu P 68 byla beze změny (viz Obrázek 16 C). U genotypu M 18 a P 68 byla taktéž pozorována větší velikost listů, obzvláště u genotypu P 68 (viz Obrázek 15).



Obrázek 16: Morfologické změny květenství u *Thymus camphoratus*: **A** – Květenství kontrolní rostliny ($2n=2x=28$) **B** – Květenství tetraploidní rostliny P 68 ($2n=4x=56$)
C – Porovnání květů kontrolní a tetraploidní rostliny

Morfologické a biochemické vlastnosti tetraploidní a mixoploidní rostliny bude potřeba nadále sledovat v *in vitro* i v *ex vitro* podmínkách.

Získané výsledky potvrzují obě hypotézy H1 i H2. Vlivem oryzalinu byla získána tetraploidní rostlina, tudíž pokus *in vitro* indukované polyploidie u *T. camphoratus* byl úspěšný a potvrzuje se tím hypotéza H1. Tetraploidní a mixoploidní rostlina měla odlišný genotyp oproti kontrolní rostlině a byly u nich pozorovány statistické rozdíly oproti kontrolní rostlině (viz Tabulka č. 3), čímž se potvrdila i hypotéza H2.

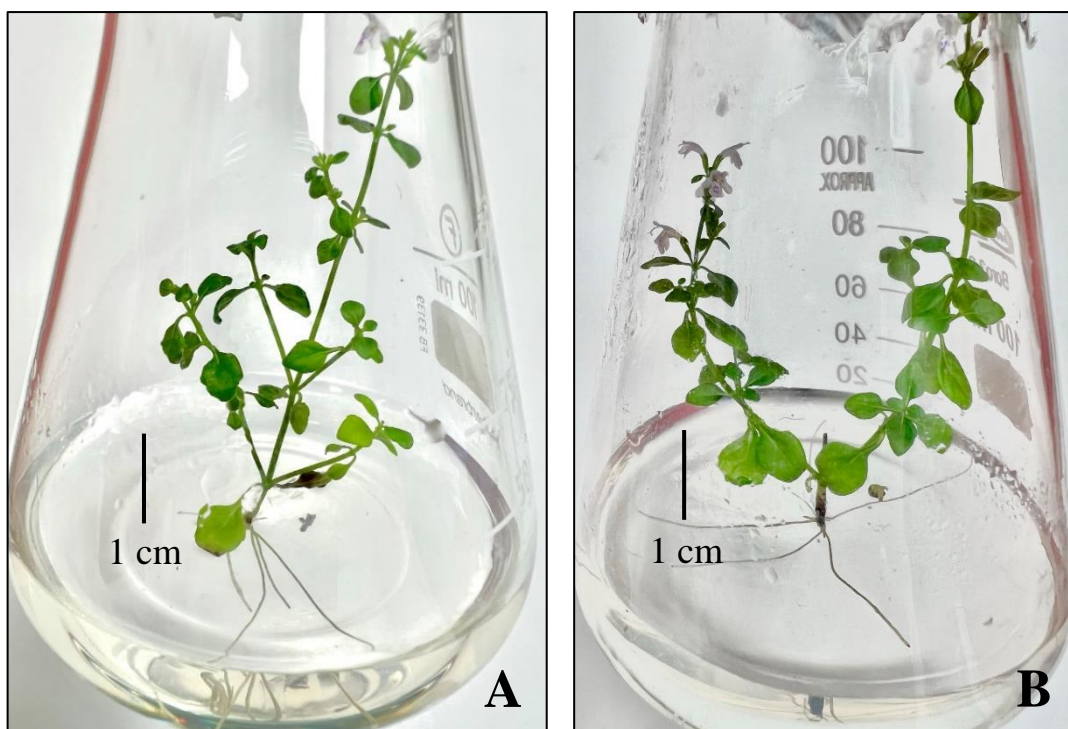
Avšak jelikož míra úmrtnosti rostlin vlivem oryzalinu byla vysoká a zisk autopolyploidních rostlin byla pouze jedna tetraploidní a jedna mixoploidní rostlina, při následujícím studiu bude potřeba provést další pokusy polyploidizace. Snížení koncentrace oryzalinu po delší dobu působnosti může být účinnější metodou pro polyploidizaci u *T. camphoratus*. Je pravděpodobné, že vysoké koncentrace oryzalinu mohli být pro nodální segmenty toxické, což způsobilo vysokou úmrtnost rostlin. Zároveň bude potřeba provést polyploidizaci za použití jiných antimitotických činidel, jako je kolchicin nebo trifluralin.

Tetraploidní rostlina a rostlina mixoploidní by mohly sloužit k dalšímu výzkumu morfologických a zejména biochemických vlastností této rostliny. Při následujícím studiu bude potřeba provést morfologická pozorování v podmínkách *ex vitro* a zároveň pro zjištění rozdílů biochemických vlastností mezi kontrolní (diploidní) rostlinou a rostlinou tetraploidní a mixoploidní bude potřeba provést biochemické analýzy.

Během pokusu byly pozorovány morfologické změny i u rostlin pěstovaných z apikálních meristémů (R_A) a nodálních segmentů (R_N) (Obrázek 17). U rostlin R_A byly naměřeny nejvyšší průměrné hodnoty jako je výška rostlin ($4,37 \pm 1,81$ cm), počet větvení ($5,28 \pm 1,84$ větvení), průměrná velikost internodu ($0,79 \pm 0,37$ cm), počet kořenů ($4,78 \pm 3,28$ kořenů) a délka kořenů ($2,59 \pm 2,02$ cm). Rostliny R_N dosahovaly průměrných hodnot u výšky rostliny $4,37 \pm 1,81$ cm, počtu větvení $3,22 \pm 2,29$, průměrné velikosti internodu $0,61 \pm 0,33$ cm, počtu kořenů $0,94 \pm 2,1$ a délky kořenů $0,81 \pm 1,8$ cm. Hodnoty tloušťky hlavního stonku u R_A ($0,76 \pm 0,2$ mm) a R_N ($0,76 \pm 0,22$ mm) byly bez rozdílu. Hodnoty o morfologických změnách jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Získané výsledky prokázali, že rostliny kultivované z apikálních meristémů (R_A) dosahují daleko lepších hodnot oproti rostlinám kultivovaných z nodálních segmentů (R_N). Důvodem lepších výsledků u rostlin R_A je kultivace z apikálních meristémů, neboť se jedná o primární dělivé pletivo, umístěné na vrcholu u některých rostlinných orgánů.

Naopak u rostlin pěstovaných z nodálních segmentů byla pozorována změna v počtu stonků. Zatímco rostliny varianty R_A vytvářely jeden hlavní stoněk, rostliny varianty R_N vytvářely dva rostlinné stonky, z nichž jeden byl stonkem hlavním a druhý stonkem vedlejším (viz Obrázek 17 B). Z hlediska počtu nově vytvořených nodů (koeficient mikropropagace), rostliny množené z apikálních meristémů vytvořily v průměru $5,28 \pm 1,84$ nodů a rostliny množené z nodálních segmentů vytvořily $5,56 \pm 2,15$ nodů. Statisticky mezi nimi není žádný rozdíl. To znamená, že pro množení rostlin můžeme používat jak rostliny pěstované z apikálních meristémů, tak rostliny pěstované z nodálních segmentů.



Obrázek 17: Morfologické rozdíly rostlin R_A a R_N : **A** – Rostlina R_A **B** – Rostlina R_N

Tabulka 3: Morfologické hodnocení tetraploidních rostlin a rostliny kontrolní po 9 týdnech kultivace *in vitro*

Rostlinný materiál/varianta	Výška rostliny (cm)*	Tloušťka hl. stonku (mm)*	Počet větvení*	Počet nodů*	Prům. velikost internodu (cm)*	Počet kořenů*	Délka kořenů (cm)*
Kontrolní rostlina	3,9 ± 1,74 ^a	0,75 ± 0,18 ^a	4 ± 1,65 ^a	5,17 ± 1,03 ^a	0,68 ± 0,21 ^a	0 ^a	0 ^a
M 18	5,56 ± 2,47 ^a	0,97 ± 2,51 ^a	4,17 ± 0,12 ^a	5,5 ± 2,66 ^a	1,11 ± 1,17 ^b	5,08 ± 3,68 ^b	1,44 ± 0,93 ^b
P 68	6,97 ± 2,47 ^b	0,88 ± 0,16 ^a	2,92 ± 1,73 ^a	6,08 ± 1,08 ^a	1,13 ± 0,27 ^b	2,67 ± 2,53 ^b	0,92 ± 0,86 ^b

*Čísla v sloupci označená stejným písmenem nejsou od sebe významně odlišná (Kruskal-Wallisův test, $p < 0,05$)

Autor: Vlastní zpracování autora (2022)

Tabulka 4: Morfologické hodnocení rostlin kultivovaných z apikálních meristémů a nodálních segmentů po 8 týdnech kultivace *in vitro*

Rostlinný materiál/varianta	Výška rostliny (cm)*	Tloušťka hl. stonku (mm)*	Počet větvení*	Počet nodů*	Prům. velikost internodu (cm)*	Počet kořenů*	Délka kořenů (cm)*
R_A	4,37 ± 1,81 ^a	0,76 ± 0,2 ^a	5,28 ± 1,84 ^a	5,28 ± 1,13 ^a	0,79 ± 0,37 ^a	4,78 ± 3,28 ^a	2,59 ± 2,02 ^a
R_N	2,87 ± 1,49 ^b	0,76 ± 0,22 ^a	3,22 ± 2,29 ^b	5,56 ± 2,15 ^a	0,61 ± 0,33 ^a	0,94 ± 2,1 ^b	0,81 ± 1,8 ^b

*Čísla v sloupci označená stejným písmenem nejsou od sebe významně odlišná (Kruskal-Wallisův test, $p < 0,05$)

Autor: Vlastní zpracování autora (2022)

Pokus *in vitro* indukované polyploidie za použití oryzalinu u *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link byl úspěšný. Oryzalin byl efektivním činidlem pro indukci ploidie zejména u různých druhů rostlin, například u rostlin Alokázie (Thao et al. 2003), tymiánu (Shmeit et al. 2020), motýlovce (Sakhanokho et al. 2009), jakonu (Viehmánová et al. 2009), různých druhů orchidejí (Miguel & Leonhardt 2011) a u mnohých dalších rostlin.

Tetraploidní a mixoploidní rostlina u *T. camphoratus* vykazovaly morfologické změny jako je větší výška rostlin, tloušťka hlavního stonku, počet větvení a nodů, průměrná velikost internodu a počet a délka kořenů. K podobným výsledkům došli autoři (Omidbaigi et al. 2010) u bazalky pravé a (Portela de Carvalho et al. 2005) u oreláníku barvířského, u kterých polyploidizací došlo k morfologickým změnám a ke zvýšení hmotnosti biomasy rostlin. Zvýšení množství biomasy vykazovaly také polyploidní rostliny *Thymus persicus*, které vykazovaly další změny jako například větší velikost průduchů na listech, větší produkci listů, které měli výrazně více trichomů a v nich i vyšší obsah účinných látek (Tavan et al. 2015). U tetraploidních rostlin chmele (*Humulus lupulus*) byla naopak pozorována nižší tvorba bočních výhonů, tenčích bazálních stonků, menších listů a květů oproti původní diploidní rostlině (Trojak-Goluch & Skomra 2013).

Biochemické analýzy u nově získaných genotypů *T. camphoratus* (tetraploidní rostlina a rostlina mixoploidní) zatím nebyly provedeny. V následujících studiích bude potřeba nadále sledovat a provést biochemické analýzy v *in vitro* i *ex vitro*, neboť lze předpokládat, že u tetraploidní a mixoploidní rostliny došlo k biochemickým změnám. Po vystavení antimitotickým činidlům byly podobné efekty pozorovány u jiných druhů rostlin. Například u hexaploidních a oktoploidních rostlin jakonu byl detekován nižší obsah sacharózy a zvýšený obsah fruktózy a glukózy (Viehmánová et al. 2009). Vyšší obsah silic byl detekován u tetraploidních rostlin *Thymus vulgaris* (Shmeit et al. 2020). Navýšení různých druhů látek polyploidizací bylo pozorováno také u *Tetradenia riparia* (Hannweg et al. 2016), *Achillea millefolium* (Hofmann et al. 1992), *Trachyspermum ammi* L. (Noori et al. 2017) a *Lippia integrifolia* (Iannicelli et al. 2016).

Polyploidizace u *T. camphoratus* byla provedena poprvé, zatímco u jiných druhů z čeledi Lamiaceae byla již provedena, například u *Thymus vulgaris* (Shmeit et al. 2020), *Thymus persicus* (Tavan et al. 2015), *Thymus loscosii* (Lopéz-Pujol et al. 2004) a mnohých dalších druhů.

Pro rychlou mikropropagaci *T. camphoratus* lze použít jak apikální meristémy, tak axilární meristémy (nodální segmenty) na MS médiu bez přidaných růstových

regulátorů. Podobné výsledky se uvádí pro mikropropagaci u *T. vulgaris* a *T. persicus*. Pro mikropropagaci u *T. vulgaris* a *T. persicus* se používají nodální segmenty kultivované na MS médiu doplněném 3 % sacharózy a 0,8 % agaru u *T. vulgaris* a na 0,8 % agaru ztuženém MS médiu doplněném 100 mg l⁻¹ myoinositolu a 30 g l⁻¹ sacharózy u *T. persicus* bez přídavku růstových regulátorů (Tavan et al. 2015; Shmeit et al. 2020).

6. Závěr

Pomocí indukované polyploidizace v *in vitro* podmínkách bylo získána jedna tetraploidní rostlina a jedna rostlina mixoploidní u *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. Podle dostupných zdrojů byla metoda *in vitro* indukovaná polyploidie u *T. camphoratus* použita poprvé.

Použití antimitotického činidla oryzalinu pro indukci polyploidie u *T. camphoratus* v *in vitro* podmínkách bylo úspěšné. Avšak pro zvýšení účinnosti polyploidizace a míry přežití rostlin bude zapotřebí otestovat nové míry koncentrace oryzalinu po odlišnou dobu působení, případně jiné druhy antimitotických činidel.

Vzhledem k tomu, že tento druh má široké využití zejména jako léčivá bylina, nově získané genotypy bude zapotřebí nadále sledovat v *in vitro* i *ex vitro* podmínkách z hlediska morfologických a biochemických vlastností nových genotypů.

Nově získané genotypy rozšiřují variabilitu u *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link a mohou se použít jako nový genetický materiál ve šlechtitelských programech tohoto druhu.

7. Reference

- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology* **37**:163–176.
- Bajaj Y, Furmanowa M, Olszowska O. 1988. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. Pages 60–103 *Medicinal and aromatic plants I*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin.
- Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, Banerjee M. 2008. Anti-Mitotic Activity of Colchicine and the Structural Basis for Its Interaction with Tubulin. *Medicinal Research Reviews*, **28**:155–183.
- Bílý V. 1927. *Zelinářství: praktické pokyny ku zakládání a vedení zelinářských zahrad*. A. Neubert, Praha.
- Bohanec B. 2003. Ploidy determination using flow cytometry. Pages 397–403 *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Springer, Dordrecht.
- Chaturvedi H, Jain M, Kidwai N. 2007. Cloning of medicinal plants through tissue culture - A review. *Indian Journal of Experimental Biology* **45**:937–948.
- Chen J, Yu Q, Patterson E, Sayer C, Powles S. 2021. Dinitroaniline Herbicide Resistance and Mechanisms in Weeds. *Frontiers in Plant Science*:(e634018) DOI: 10.3389/fpls.2021.634018.
- Čurn V. 1995. *Rostlinné biotechnologie: Využití kultur rostlinných explantátů v genetice a šlechtění*. Jihočeská Univerzita, České Budějovice.
- Dajić-Stevanović Z, Šošarić I, Marin P, Stojanović D, Ristić M. 2008. Population variability in *Thymus glabrescens* Willd. from Serbia: morphology, anatomy and essential oil composition. *Archives of Biological Sciences* **60**:475–483.
- D'Amato F, Otto Hoffmann-Ostenhof O. 1956. Metabolism and spontaneous mutations in plants. *Advances in Genetics* **8**:1–28.
- De Storme N, Geelen D. 2013. Sexual polyploidization in plants—cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytologist* **198**:670–684.
- Dlouhý F. 1900. *Léčivé rostliny (Herbář): jejich popis, pěstování a upotřebení*. I.L. Kober, Praha.
- Dodsworth S, Chase M, Leitch A. 2016. Is post-polyploidization diploidization the key to the evolutionary success of angiosperms? *Botanical Journal of the Linnean Society* **180**:1–5.

- Eng W, Ho W. 2019. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. *Scientia Horticulturae* **246**:604–617.
- Fachini-Queiroz F, Kummer R, Estevao-Silva C, Carvalho Md, Cunha J, Grespan R, Bersani-Amado C, Cuman R. 2012. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*:(e657026) DOI: 10.1155/2012/657026.
- Gepts P, Hancock J. 2006. The Future of Plant Breeding. *Crop Science* **46**:1630–1634.
- Graman J, Čurn V. 1997. Šlechtění rostlin: (obecná část) / Josef Graman, Vladislav Čurn. Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Hannweg K, Visser G, de Jager K, Bertling I. 2016. In vitro-induced polyploidy and its effect on horticultural characteristics, essential oil composition and bioactivity of *Tetradenia riparia*. *South African Journal of Botany* **106**:186–191.
- Hofmann L, Fritz D, Nitz S, Kollmannsberger H, Drawert F. 1992. Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* ‘complex.’ *Phytochemistry* **31**:537–542.
- Hosseinzadeh S, Jafarikukhdan A, Hosseini A, Armand R. 2015. The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine* **6**:635–642.
- Iannicelli J, Elechosa M, Juárez M, Martínez A, Bugallo A, Bandoni A, Escandón A, van Baren C. 2016. Effect of polyploidization in the production of essential oils in *Lippia integrifolia*. *Industrial Crops and Products* **81**:20–29.
- Iliev I, Gajdošová A, Libiaková G, Jain M. 2010. *Plant Micropropagation*. Page Plant Cell Culture. Wiley, New York.
- Jahan-Tigh R, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. 2012. Flow cytometry. *The Journal of investigative dermatology* **132**:1–6.
- Jalas J, Kaleva K. 1967. Chromosome studies in *Thymus* L. (Labiatae). V. *Annales Botanici Fennici* **4**:74–79.
- Jan M, Singh S, Maqbool F. 2016. Micropropagation of some medicinally important plant species of Family Lamiaceae – A review. *International Journal of BioSciences & Technology* **9**:64–73.
- Kalandra Č. 1927. Domáci zahrada. Milotický hospodář, Milotice nad Bečvou.

- Kamari G, Felber F, Garbari F. 1994. Mediterranean chromosome number reports - 4. *Flora Mediterranea* **4**:233–301.
- Kondo K, Damdinsuren O, Funamoto T, Motohashi T, Tatarenko I, Smirnov S. 2008. A comparison of chromosome characters in three species of *Thymus* (Lamiaceae) collected in Russia and Mongolian Altai. *Chromosome Botany* **3**:1–6.
- Kumar N, Reddy M. 2011. In vitro Plant Propagation: A Review. *Journal of Forest Science* **27**:61–72.
- Labiad M, Belmaghraoui W, Ghanimi A, El-Guezzane C, Chahboun N, Harhar H, Egea-Gilabert C, Zarrouk A, Tabyaoui M. 2022. Biological properties and chemical profiling of essential oils of *Thymus* (*vulgaris*, *algeriensis* and *broussonettii*) grown in Morocco. *Chemical Data Collections*:(e100797) DOI: 10.1016/j.cdc.2021.100797.
- Loberant B, Altman A. 2010. Micropropagation of plants. Pages 1–17 *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*. Wiley, New York.
- Lopéz-Pujol J, Bosch M, Simon J, Blanché C. 2004. Allozyme Diversity in the Tetraploid Endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). *Annals of Botany* **93**:323–332.
- Macey M, Macey M. 2007. *Flow cytometry*. Springer, Berlin.
- Mahdavi S, Karimzadeh G. 2010. Karyological and nuclear dna content variation in some Iranian endemic *Thymus* species (Lamiaceae). *Journal of Agricultural Science and Technology* **12**:447–458.
- Mennema J. 1989. *A Taxonomic Revision of Lamium (Lamiaceae)*. E. J. Brill, Netherlands.
- Mewes S, Krüger H, Pank F. 2008. Physiological, morphological, chemical and genomic diversities of different origins of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Genet Resour Crop Evol* **55**:1303–1311.
- Miguel G, Simões M, Figueiredo A, Barroso J, Pedro L, Carvalho L. 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry* **86**:183–188.
- Miguel T, Leonhardt K. 2011. In vitro polyploid induction of orchids using oryzalin. *Scientia Horticulturae* **130**:314–319.

- Mustafa S, Hina S, Mahmood S, Mueen-ud-Din G, Alam M, Faisal F, Quddoos F, Zahra S, Mumtaz S. 2020. Exploring phytochemical potential of nature's bliss *Thymus vulgaris* L. Mini review. *International Journal of Botany Studies* **5**:493–496.
- Nabavi S, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi S. 2015. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry* **173**:339–347.
- Naumann L. 1886. Koření kuchyňské. Listy zahradnické: ilustrovaný časopis, věnovaný zájmům štěpařství, zelinářství, vinařství, květinářství a zahradnictví vůbec **10**:2–18.
- Navrátilová B, Švécarová M, Bednář J, Ondřej V. 2021. In Vitro Polyploidization of *Thymus vulgaris* L. and Its Effect on Composition of Essential Oils. *Agronomy* **11**:596–596.
- Nieto G. 2020. A Review on Applications and Uses of *Thymus* in the Food Industry. *Plants* **9**:961–989.
- Noori S, Norouzi M, Karimzadeh G, Shirkool K, Niazian M. 2017. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **130**:543–551.
- Omidbaigi R, Mirzaee M, Hassani M, Moghadam M. 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International Journal of Plant Production* **4**:87–98.
- Özgüven M, Tansi S. 1998. Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **22**:537–542.
- Pirbalouti A, Bistghani Z, Malekpoor F. 2015. An overview on genus *Thymus*. *Journal of Herbal Drugs* **6**:93–100.
- Plants Future. 2021. *Plants for Your Food Forest: 500 Plants for Temperate Food Forests and Permaculture Gardens*. Independently Published, London.
- Pohl O. 1885. Výroba silic v Grasseu. *Časopis českého lékárnictva* **4**:19–21.
- Portela de Carvalho J, de Carvalho C, Otoni W. 2005. In vitro induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **80**:69–75.

- Punja Z. 2001. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens - a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Pathology* **23**:216–235.
- Ramsey J, Ramsey T. 2014. Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery. *Philosophical Transactions* **369**:1–20.
- Rieseberg L, Carney S. 1998. Plant hybridization. *New phytologist* **140**:599–624.
- Rout G, Samantaray S, Das P. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* **18**:91–120.
- Sakhanokho H, Rajasekaran K, Kelley R, Islam-Faridi N. 2009. Induced Polyploidy in Diploid Ornamental Ginger (*Hedychium muluense* R. M. Smith) Using Colchicine and Oryzalin. *HortScience* **44**:1809–1814.
- Salehi B et al. 2018. Nepeta species: From farm to food applications and phytotherapy. *Trends in Food Science* **80**:104–122.
- Salehi B et al. 2019. Thymus spp. plants - Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science & Technology* **85**:287–306.
- Salgueiro L, Vila R, Tomi F, Tomas X, Canigual S, Casanova J, Cunha A, Adzet T. 1997. Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus camphoratus*. *Phytochemistry* **46**:1177–1183.
- Salma U, Kundu S, Mandal N. 2017. Artificial polyploidy in medicinal plants: advancement in the last two decades and impending prospects. *Journal of crop science and biotechnology* **20**:9–19.
- Shmeit Y, Cusimamani E, Novy P, Kloucek P, Orosz M, Kokoska L. 2020. Autopolyploidy effect on morphological variation and essential oil content in *Thymus vulgaris* L. *Scientia Horticulturae*:(e109095) DOI: 10.1016/j.scienta.2019.109095.
- Shyamapada M, Manisha D. 2016. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oils. Page Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Academic Press, India.
- Sidhu Y. 2010. In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture. *The Plymouth Student Scientist* **4**:432–449.
- Sigurbjörnsson B. 1971. Induced mutations in plants. *Scientific American* **224**:86–95.
- Šír V. 1889. Herbář: seznam všech léčivých bylin v Čechách a na Moravě ... s udáním, proti kterým nemocím a jakým způsobem se jich užívá, jak u lidí, tak i u dobytka ... a seznam rostlin jedovatých, kterých jest se chrániti. M. Knapp, Praha.

- Šmarda J. 2016. Rostlinné geneticky manipulované organismy (GMO) a naše výživa. *Universitas* **2**:8–17.
- Stahl-Biskup E, Sáez F. 2003. *Thyme: the genus thymus*. Taylor and Francis, London and New York.
- Stankovic M. 2020. *Lamiaceae: Biology, Ecology and Practical Uses*. MDPI, Switzerland.
- Talebi S, Saharkhiz M, Raouf Fard F, Kermani M, Sharafi Y. 2017. Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). *Caryologia* **70**:184–193.
- Tavan M, Mirjalili M, Karimzadeh G. 2015. In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **122**:573–583.
- Thao N, Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y, Okubo H. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **72**:19–25.
- Trojak-Goluch A, Skomra U. 2013. Artificially induced polyploidization in *Humulus lupulus* L. and its effect on morphological and chemical traits. *Breeding Science* **63**:393–399.
- Van der Peer Y, Mizrachi E, Marchal K. 2017. The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics* **18**:411–424.
- Verdaguer J. 1929. *Květy Mariiny*. Československá akciová tiskárna, Praha.
- Viehmannová I, Cusimamani E, Bechyne M, Vyvadilová M, Greplová M. 2009. In vitro induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **97**:21–25.
- Zhao F et al. 2021. An updated tribal classification of Lamiaceae based on plastome phylogenomics. *BMC Biology*:(e17417007) DOI: 10.1186/s12915-020-00931-z.
- Webové stránky:**
- BioLib. 2004. Druh *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. Available from <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id1093528/> (accessed March 2022).
- BOTANY.cz. 2017. THYMUS CAMPHORATUS Hoffmanns. et Link – mateřídouška / důška. Available from <https://botany.cz/cs/thymus-camphoratus/> (accessed March 2022).

Global Biodiversity Information Facility. 2022. Species *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link. Available from <https://www.gbif.org/species/171094081> (accessed March 2022).

Obrázky:

Obrázek 1

Kamari G, Felber F, Garbari F. 1994. Mediterranean chromosome number reports - 4. *Flora Mediterranea* **4**:233–301.

Obrázek 2

Fleurs des Montagnes. 2011. *Thymus camphoratus*. Available from <http://www.fleurs-des-montagnes.net> (accessed March 2022).

Obrázek 3

BOTANY.cz. 2017. THYMUS CAMPHORATUS Hoffmanns. et Link – mateřídouška / dúška. Available from <https://botany.cz/cs/thymus-camphoratus/> (accessed March 2022).

Obrázek 4; 5; 6; 7

Nieto G. 2020. A Review on Applications and Uses of *Thymus* in the Food Industry. *Plants* **9**:961–989.

Obrázek 8

Centre of Natural and Cultural Heritage. 2022. Aromatic herbs. Available from <http://heritage.org.cy/aromatic-herbs> (accessed March 2022).

Obrázek 9; 10

Viehmannová I, Cusimamani E, Bechyne M, Vyvadilová M, Greplová M. 2009. In vitro induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **97**:21–25.

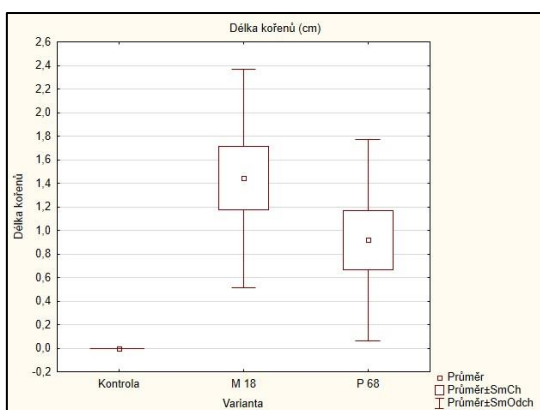
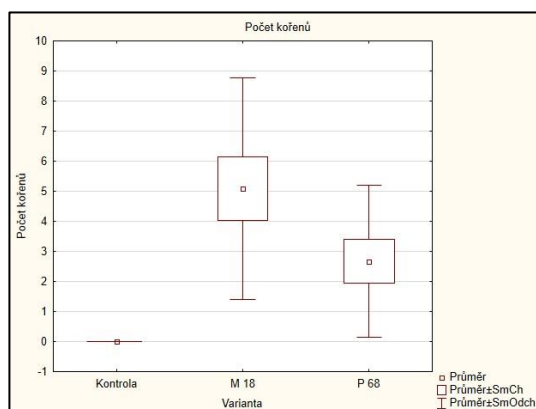
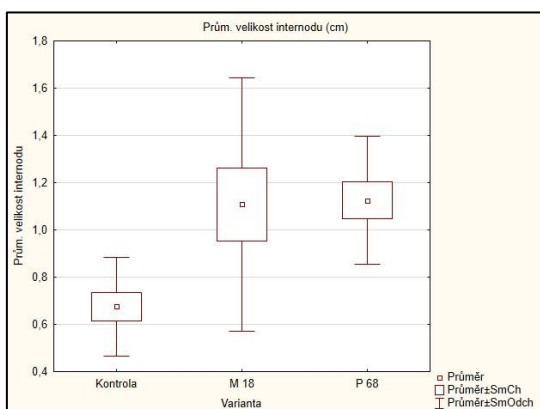
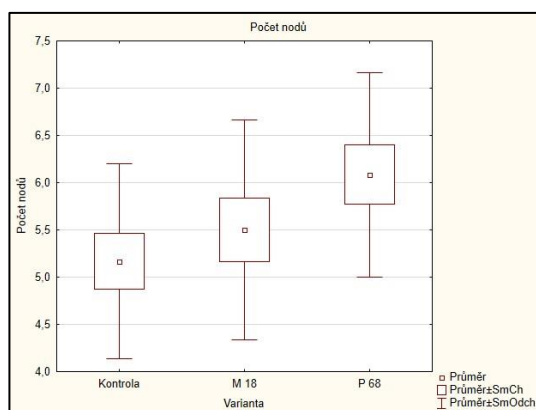
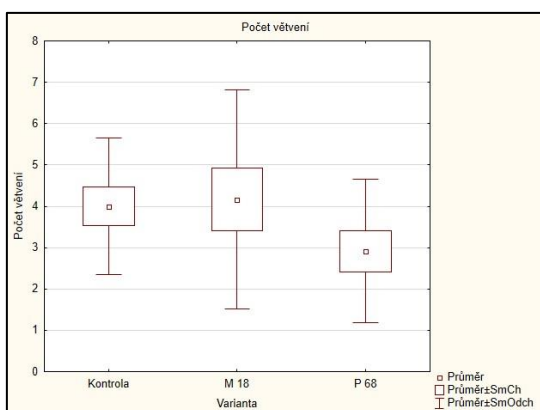
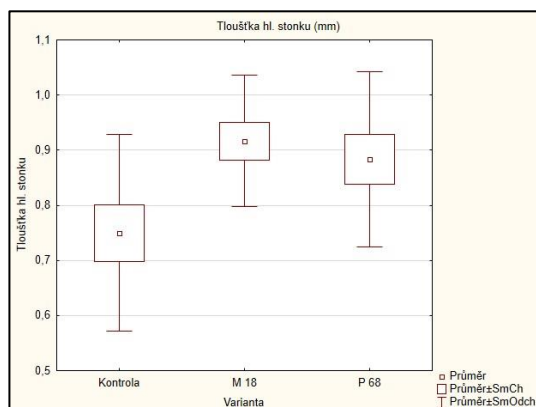
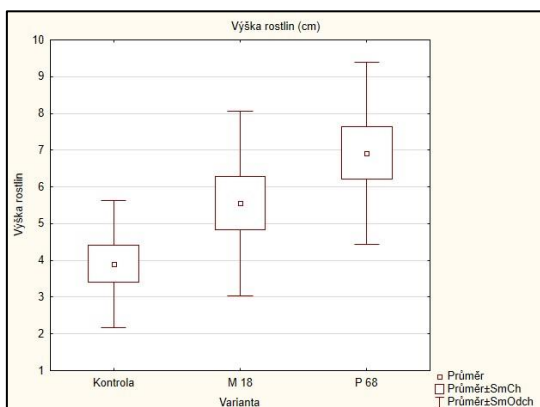
Obrázek 11

Jahan-Tigh R, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. 2012. Flow cytometry. *The Journal of investigative dermatology* **132**:1–6.

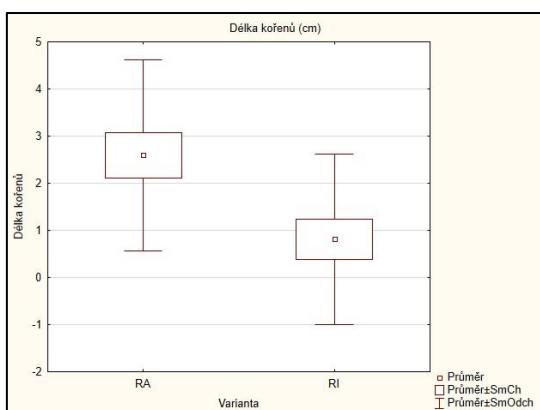
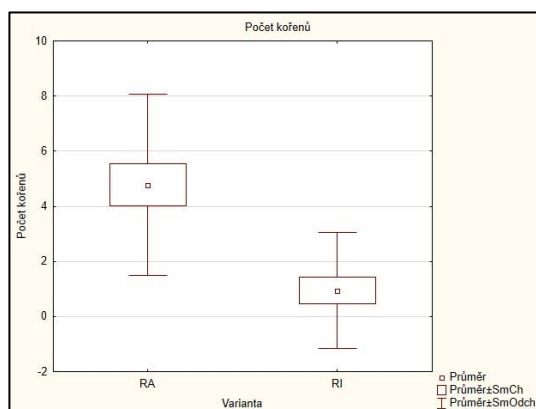
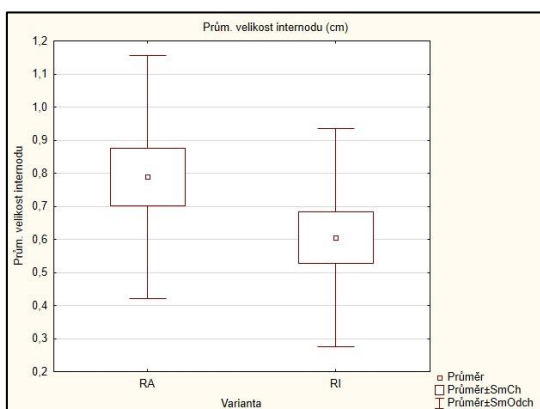
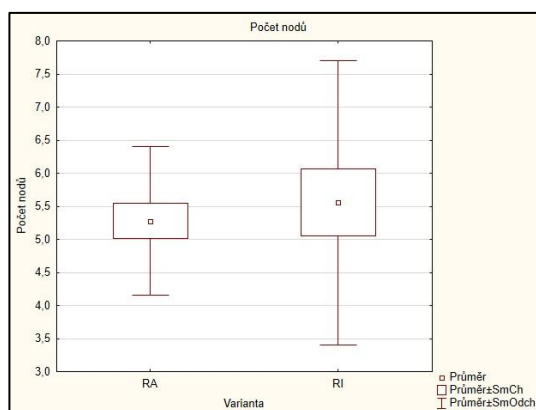
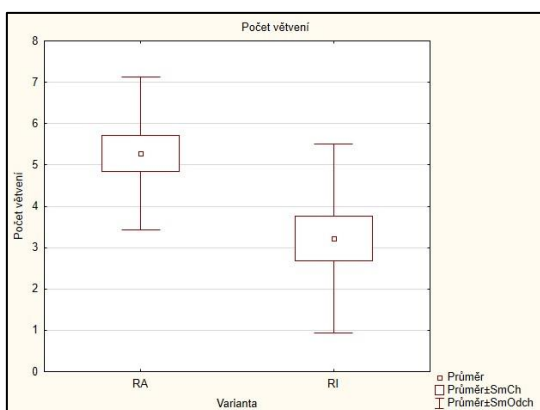
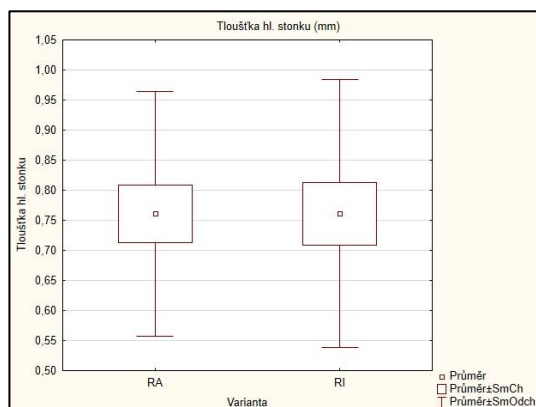
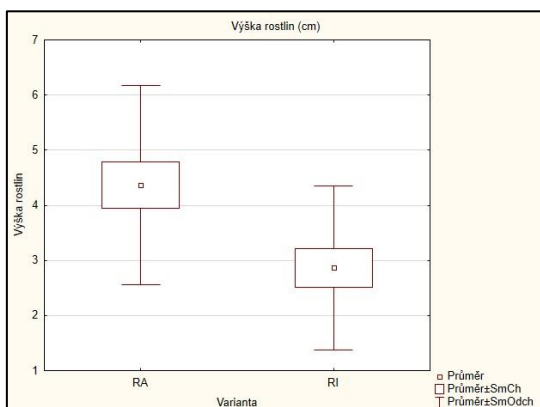
Přílohy

- Tabulka 1** Složení MS média (Murashige & Skoog 1962)
- Příloha 1** Grafické znázornění průměrných hodnot naměřených při hodnocení morfologických vlastností u varianty kontrola, M 18 a P 68
- Příloha 2** Grafické znázornění průměrných hodnot naměřených při hodnocení morfologických vlastností u varianty R_A a R_N

Příloha 1: Grafické znázornění průměrných hodnot naměřených při hodnocení morfologických vlastností u varianty kontrola, M 18 a P 68



Příloha 2: Grafické znázornění průměrných hodnot naměřených při hodnocení morfologických vlastností u varianty R_A a R_N



Tabulka 1: Složení kultivačního média MS (Murashige & Skoog 1962)

Médium Murashige – Skoog			
Živné roztoky do 1 l dest. H ₂ O		Navážky na 1 l živného roztoku	Médium pH 5,7 na 1 l odměřit
A	NH ₄ NO ₃	16,5 g	100 ml
	KNO ₃	19 g	
	CaCl ₂	3,3 g	
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3,7 g	
	KH ₂ PO ₄	1,7 g	
B	H ₃ BO ₃	620 mg	10 ml
	MnSO ₄ · 4 H ₂ O (H ₂ O)	2,23 g (1,69 g)	
	ZnSO ₄ · 4H ₂ O (7H ₂ O)	860 mg (1,06 g)	
C	KI	83 mg	10 ml
	NaMoO ₄ · 4 H ₂ O	23 mg	
D	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	2,5 mg	10 ml
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	2,5 mg	
E	NA ₂ EDTA	3,72 g	10 ml
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,78 g	
V	Kyselina nikotinová	50 mg	10 ml
	Pyridoxin (B6)	50 mg	
	Thiamin (B1)	10 mg	
	Glycin (aminokyselina)	200 mg	
Přímá navážka do média:		Myo-inositol	100 mg
		Sacharóza	30 g
		Agar	8 g

Autor: Murashige & Skoog (1962)