

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Bakalářská práce

2015

Michal Orosz



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra ekologie lesa

***In vitro* množení *Plukenetia volubilis* L.
prostřednictvím nepřímé morfogeneze**

***In vitro* propagation of *Plukenetia volubilis* L.
via indirect morphogenesis**

Bakalářská práce

Vedoucí: Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Autor: Michal Orosz
2015

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Katedra ekologie lesa

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Michal Orosz

Inženýrská ekologie

Název práce

In vitro množení *Plukenetia volubilis* L. prostřednictvím nepřímé morfogeneze

Anglický název

In vitro propagation of *Plukenetia volubilis* L. via indirect morphogenesis

Cíle práce

Optimalizace protokolu pro získání embryogenního pletiva a popř. regenerantů druhu *Plukenetia volubilis* L., významné popínavé rostliny z oblasti peruánské Amazonie z čeledi Euphorbiaceae, nepřímou morfogenezi a následné zhodnocení genetické variability takto získaného rostlinného materiálu s využitím molekulárních metod (ISSR, průtoková cytometrie).

Specifické cíle:

1. Zjistit efektivitu tvorby kalusu z primárního explantátu zkoumané rostliny v závislosti na různých koncentracích vybraných auxinů a cytokininů v testovaných médiích.
2. Zjistit efektivitu vytváření regenerantů z kalusu v závislosti na testovaných médiích obohacených různými koncentracemi auxinů a cytokininů.
3. Zjistit vliv kultivačního procesu na genetickou stabilitu kultur in vitro s využitím molekulárních metod (ISSR, průtoková cytometrie).

Metodika

Odvození in vitro kultury bude provedeno převážně z řapíků a nodálních segmentů klíčících rostlin *Plukenetia volubilis* L. Bude provedena sterilizace explantátu a jeho umístění na média s proměnnou koncentrací rostlinných hormonů pro získání prorůstajících prýtů a kalusu. Indukované kultury budou přenášeny na proliferační média, za účelem rozrůstání nodálních segmentů a kalusu pro další fáze kultivace.

Kultivace bude probíhat za řízených podmínek v kultivačních boxech (23-25 stupňů Celsia, osvětlení 16h/8h). Přesazování kultur 1x za 14 dní. Při přesazování bude sledován a zaznamenán stav kultur.

Kultivované části rostlinného materiálu na médiích budou v závěru pokusu testovány molekulárními metodami (průtoková cytometrie, ISSR) z důvodu ověření genetické stability kultur.

Statisticky bude hodnocen vliv médií na odrůstání kultur v různých fázích kultivace in vitro.

Rozsah textové části

35-40 stran

Klíčová slova

Kalus, meristém, rostlinné regulátory růstu, Sacha Inchi, somaklonální variabilita, somatická embryogeneze

Doporučené zdroje informací

- Biradar, S.R., Waghmare, V., Pandhure, N., 2012. Induction of somatic embryos from cotyledon explant in *Jatropha curcas* (LINN.). *International Journal of Basic and Applied Research* 2(2): 18-23.
- Catapan, E., Luís M., da Silva, B., Moreno, F.N., Viana, A.M., 2002. Micropropagation, callus and root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 301-309.
- Catapan, E., Otuki, M.F., Viana, A.M., 2000. In vitro culture *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 195-202.
- Kalidass, C., Mohan, V.R., 2009. In vitro rapid clonal propagation of *Phyllanthus urinaria* Linn. (Euphorbiaceae) – a medicinal plant. *Researcher* 1(4): 56-61.
- Kondamudi, R., Murthy, K.S.R., Pullaiah, T., 2009. Euphorbiaceae – a critical review on plant tissue. *Tropical nad Subtropical Agroecosystems* 10: 313-335.
- Samma, S., Rao, B.R.P., 2013. In vitro embryo culture of *Croton scabiosus* Bedd. (Euphorbiaceae), an endemic plant of Southern Andhra Pradesh. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 5(2): 108-114.
- Siang, T.Ch., Soon, S.T., Yien, A.T.S., 2012. Plant regeneration studies of *Jatropha curcas* using induced embryogenic callus from cotyledon explants. *African Journal of Biotechnology* 11(31): 8022-8031.
- Solís-Ramos, L.Y., Carballo, L.M., Valdez-Melara, M., 2013. Establishment of cell suspension cultures of two Costa Rican *Jatropha* species (Euphorbiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 61(3): 1095-1107.
- Vijayanand, V., Senthil, N., Vellaikumar, S., Paramathama, M., 2009. Genetic diversity of Indian *Jatropha* species as revealed by morphological and ISSR markers. *J. Crop Sci. Biotech.* 12(3): 115-120.
- Yang, Z.S., Chen, G.D., Li, Y.X., Chen, J., 2009. Characterization of callus formation in leaf of *Euphorbia helioscopia*. *African Journal of Plant Science* 3(6): 122-126.

Vedoucí práce

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 25. 8. 2014

doc. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 27. 8. 2014

prof. Ing. Petr Sklenička, CSc.

Děkan FŽP ČZU

V Praze dne 19. 12. 2014

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „*In vitro* množení *Plukenetia volubilis* L. prostřednictvím nepřímé morfogeneze“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém soupisu literatury.

Praha, 12. dubna 2015

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Upřímné poděkování patří školiteli Ing. Janu Vítamvasovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi pomohly při vypracování předkládané bakalářské práce. Za možnost využití laboratoří Fakulty tropického zemědělství, a vytvoření dobrých pracovních podmínek děkuji Ing. Ivě Viehmannové, Ph.D.

Abstrakt v ČJ

Plukenetia volubilis L. je popínavá rostlina z oblasti peruánské Amazonie ceněná pro svá olejnatá semena. Patří k nejbohatším rostlinným zdrojům omega 3 a omega 6 polynenasycených mastných kyselin v doposud prozkoumané rostlinné říši. Má proto značný ekonomický potenciál nejen jako potravina, ale také jako zdroj alternativních biopaliv. V dnešní době je tato rostlina množena semeny, tato technika však zdaleka není schopná pokrýt poptávku trhu po kvalitních rostlinách pro výsadbu. Vhodnou alternativou je množení *P. volubilis* pomocí somatické embryogeneze, která by mohla vyřešit problém s nedostatkem kvalitních sazenic na trhu.

Hlavním cílem bakalářské práce bylo seznámit se s procesem somatické embryogeneze a sledovat vliv fytohormonů na kalusové kultury *P. volubilis* L. Jako výchozí materiál k odvození kalusových kultur byly použity řapíky děložních a pravých listů. Kultury byly během celé doby prováděných pokusů kultivovány v laboratorních podmínkách s osvitem 2000 lx a fotoperiodou 16/8 hodin nahrazující den/noc, při teplotě 25° C/20° den/noc. Ke kultivaci bylo s úspěchem použito MS médium s plnou a poloviční koncentrací solí.

Drobné kalusové kultury byly s úspěchem odvozeny na médiu obohaceném o rostlinné hormony v koncentracích 0,1 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,05 mg.l⁻¹BAP a 1 mg.l⁻¹ Dicamba + 1 mg.l⁻¹ TDZ. Ve fázi proliferace rostlinný materiál nejlépe reagoval na hormony BAP, TDZ a Picloram, na kterých kalusy dobře přirůstaly.

I přesto, že připravené roztakové preparáty ukázaly vznik meristemických center a byly pozorovány globulární stádia v mikroskopu, nepodařilo se odvodit zralá somatická embrya. Lze se proto domnívat, že druh *Plukenetia volubilis* L. je zvláště citlivý na poměry exogenně dodaných fytohormonů a je zapotřebí dalších studií k úplnému objasnění procesu vzniku somatických embryí u tohoto druhu.

Klíčová slova v ČJ

Euphorbiaceae, kalus, meristém, rostlinné regulátory růstu, Sacha Inchi, somaklonální variabilita, somatická embryogeneze, průtoková cytometrie

Abstrakt v AJ

Plukenetia volubilis L. is a climbing plant indigenous to the Peruvian Amazon Forest and it is highly prized for its oilseeds. *Plukenetia volubilis* L. is one of the richest plant sources of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids in vegetable lynch previously explored. Thus it has a considerable economic value not only as food but also as a source of alternative biofuels. Nowadays this plant is propagated by seeds, but this technique is far from being able to meet market demand. Suitable alternative to solve the problem of lack of good quality seedlings in the market is propagation by somatic embryogenesis.

The main objective of bachelor thesis has been to become familiar with the process of somatic embryogenesis and monitor the effect of phytohormones on callus culture of *P. volubilis* L. The starting materials used to derive callus cultures were used petioles of monocotyledoneous and true leaves. Cultures were carried out for the whole period of experiments cultivated in laboratory conditions of the light of 2000 lux and a photoperiod of 16/8 hours replacing day/night, at 25° C/20° C day/night. For the cultivation was successfully used MS medium with full and half salt concentrations.

Friable callus cultures were successfully achieved on a medium supplemented with hormones at concentrations of 0.1 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0.05 mg.l⁻¹ and 1BAP mg.l⁻¹ Dicamba + 1 mg.l⁻¹ TDZ. In the phase of proliferation, plant material preferably reacted hormones BAP, TDZ and Picloram on which callus accrete well.

Even if the preparations showed the formation of meristematic centers and globular stage were observed, we were not able to derive mature somatic embryos. It can be considered the species *Plukenetia volubilis* L. is particularly sensitive to the ratio of exogenously supplied phytohormones and further studies are needed to fully clarify the process of formation of somatic embryos in this species.

Keyword

Euphorbiaceae, callus, meristem, plant growth regulators, Sacha Inchi, somaclonal variation, somatic embryogenesis, flow cytometry

Obsah

Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	12
Seznam zkratk	13
1. Úvod a cíle práce	14
2. Literární přehled.....	16
2.1. <i>Plukenetia volubilis</i>	16
2.1.1. Taxonomie rodu <i>Plukenetia</i>	16
2.1.2. Podobnost s jinými druhy.....	16
2.1.3. Morfologie <i>Plukenetie volubilis</i>	16
2.1.4. Rozšíření	17
2.1.5. Ekologie	17
2.1.6. Výsadba a pěstování.....	18
2.1.7. Množení.....	19
2.1.8. Škůdci	19
2.1.9. Sklizeň a zpracování	19
2.1.10. Využití.....	20
3. Regenerace rostlin <i>in vitro</i>	21
3.1. Rostlinné explantáty.....	21
3.2. Primární explantát a jeho sterilizace.....	22
3.3. Somatická embryogeneze	23
3.4. Indukce embryogenního kalusu	23
3.5. Indukce somatických embryí.....	24
3.6. Maturace somatických embryí.....	24
3.7. Klíčení a výsadba rostlin	26
3.8. Odvození somatické embryogeneze <i>Plukenetie volubilis</i>	27
3.8.1. Živná média	27
3.8.2. Regulátory růstu rostlin.....	29

4.	Metody zjišťování genetické stability kultur v <i>in vitro</i> podmínkách	31
5.	Metodika práce	32
5.1.	Návrh média	32
5.1.1.	Iniciační médium (I):	32
5.1.2.	Proliferační médium (P):	33
5.1.3.	Maturační médium (M):	34
5.2.	Příprava rostlinného materiálu	35
5.3.	Sterilizace rostlinného materiálů	35
5.4.	Příprava živného média	35
5.5.	Zavedení kalusové kultury <i>in vitro</i>	36
5.6.	Průtoková cytometrie	36
5.7.	Hodnotící kritéria růstu, struktury a barvy	36
6.	Výsledky	39
6.1.	Sterilizace explantátů	39
6.2.	Odvození kalusových kultur	39
6.3.	Vliv fytohormonů na proliferaci kalusů a indukci somatických embryí	43
6.4.	Ověření genetické stability pomocí průtokové cytometrie	45
7.	Diskuze	47
7.1.	Sterilizace výchozího rostlinného materiálu	47
7.2.	Indukce embryogenních kultur	47
7.3.	Proliferace a zrání embryogenních kultur	48
8.	Závěr	51
9.	Přílohy	52
10.	Přehled použité literatury	53

Seznam obrázků

Obrázek 1.: Vývoj somatického embrya <i>P. abies</i> v maturační fázi.....	27
Obrázek 2.: Barvy kalusů <i>P. volubilis</i> L.....	38
Obrázek 3.: Vzhled buněk kalusu odvozených z řapíku děložního a pravého listu.....	40
Obrázek 4.: Vznik meristemických center.....	41
Obrázek 5.: Indukce kalusu <i>P. volubilis</i> L.....	42
Obrázek 6.: Průtoková cytometrie	46

Seznam tabulek

Tabulka 1.: Tabulka iniciačních médií.....	32
Tabulka 2.: Tabulka proliferačních médií.....	33
Tabulka 3.: Tabulka maturačních médií.....	34
Tabulka 4.: Tabulka úspěšnosti indukce kalusu <i>P. volubilis</i> L.....	39
Tabulka 5.: Tabulka vyzkoušených proliferačních médií.....	43
Tabulka 6.: Tabulka vyzkoušených maturačních médií.....	44
Tabulka 7.: Složení MS (Murashige a Skoog, 1962) média.....	52

Seznam zkratek

ABA – kyselina abscisová

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

BAP – 6-benzylaminopuryn

BA – benzyl adenin

B5 – (Gamborg et al., 1968), kultivační médium

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindol

DZ – dihydrozeatin

GA₃ – kyselina gibberelová

IAA – β-indolyloctová kyselina

IBA – β-indolylmásečná kyselina

ISSR – Inter-Simple Sequence Repeat Analysis

2-iP – N⁶-(D₂-isopentenyl)adenin

IPA – 6-dimethylaminopurin

KIN – kinetin

MS – Murashige and Skoog medium (Murashige a Skoog, 1962)

NAA – kyselina naftyloctová

PAA – kyselina fenylloctová

RR – regulátory růstu rostlin

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

TDZ – thidiazuron

pH – záporný dekadický logaritmus

2,4 D – kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová

1. Úvod a cíle práce

Amazonská oblast je nejdůležitější oblasti z hlediska biodiverzity. Jde o místo produkce důležitých plodin světového zemědělství např. kakao, maniok, ananas, a jiné (Křivánková et al., 2007).

Jedním z těchto druhů je taky druh *Plukenetia volubilis* L. *Plukenetia volubilis* L. je známa Andským národům už po tisíciletí jako Sacha Inchi nebo Incké arašidy (Guillén et al., 2003; Gutiérrez et al., 2011; Hamaker et al., 1992; Krivankova et al., 2007). Jde o popínavou trvalku, patřící do čeledi *Euphorbiaceae*, pocházející z deštných pralesů Jižní Ameriky (Gillespie, 1993, 2007; Hamaker et al., 1992).

Rostlina je ceněná pro svá semena, jež obsahují množství olejů a bílkovin ceněných pro svůj potenciál v agrotechnickém, farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Semena obsahují průměrně až 41 – 45% oleje a 25 – 27% bílkovin (Gutiérrez et al., 2011; Hamaker et al., 1992; Chirinos et al., 2013). Asi 85% z celkového množství oleje obsaženého v semenech je ve formě polynenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny alfa-linolenové a kyseliny linolenové (Fanali et al., 2011; Guillén et al., 2003). Polynenasycené mastné kyseliny mají blahodárné účinky na lidské zdraví a pomáhají při léčbě celé řady nemocí jako je artritida, rakovina, diabetes mellitus, hypertenze, poruchy pozornosti a různé zánětlivé onemocnění kůže (Cespedes, 2006; Gogus a Smith, 2010; Hanssen a Schmitz-Hübsch, 2011). Krom toho je vhodným vstupním zdrojem při výrobě bionafty (Zaccheria et al., 2009, 2012; Zuleta et al., 2012).

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem se naskýtá velký prostor pro využití v zemědělství. S tím souvisí i velký důraz na zajištění dostatečného množství kvalitních rostlin pro výsadbu. Jednou z možností je využití klasických metod vegetativního (řízkování, roubování) a generativního množení, které mohou zajistit produkci nových rostlin jen v menší míře – může se vyskytnout problém s nízkou rhizogenezí řízků, malým množstvím roubov a podnoží, s klíčivostí a množstvím semen. Pro namnožení velkého množství kvalitního sadebního materiálu se s výhodou mohou použít techniky *in vitro* – orgánové kultury (mikrořízkování) nebo somatická embryogeneze. Problematikou množení pomocí orgánových kultur se zabývali např. Bordignon et al. (2012) a Vega (2008). Somatickou embryogenezí, která by poskytla i tzv. umělá semena, se u tohoto druhu dosud nezabývala žádná autorská vědecká práce.

Kultivační techniky *in vitro* můžou být použity pro namnožení velkého množství rostlinného materiálu k uspokojení poptávky na trhu. Práce autorů Bordignon et al. (2012) a Vega (2008) se zabývají množáním *P. volubilis* prostřednictvím přímé morfogeneze. Vzhledem

k potenciálu této rostliny, neposkytují klasické metody vegetativního a generativního množení dostatečné výsledky k efektivnímu zásobení trhu rostlinami pro výsadbu, tenhle problém by mohl vyřešit úspěšně zvládnutý protokol somatické embryogeneze. Somatická embryogeneze neposkytuje jen výhodu v množství namnoženého materiálu a úspoře času potřebného k množení, plusem je také využití tzv. „umělých semen“, které výrazně snižují cenu výsledného produktu.

Práce si klade za cíl vypracovat protokol somatické morfogeneze schopný vyřešit tyto problémy s nedostatkem rostlinného materiálu na trhu v krátkém časovém období. A také objasnit vliv růstových regulátorů – auxinu 2,4 D (kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová), NAA (kyselina naftyloctová) a cytokininu BA (6-benzylaminopuryn), TDZ (thidiazuron) v různých poměrech a koncentracích na iniciaci somatických embryí kultivovaných z tkáně řapíku děložních a pravých listů v podmínkách *in vitro*.

2. Literární přehled

2.1. *Plukenetia volubilis*

2.1.1. Taxonomie rodu *Plukenetia*

Rod *Plukenetia* patří do čeledi *Euphorbiaceae*, který obsahuje 19 druhů (Gillespie, 1993, 1999), obývá převážně tropické oblasti. 12 druhů roste v Jižní a Střední Americe, zbylých 7 v Africe, Asii a na Madagaskaru. Čeď poprvé popsal Pax (1890), zatímco Gillespie (1994) popsal pylovou morfologii.

Jde o popínavé rostliny nebo liány obývající tropické deštné pralesy nebo křovité území. Rod se vyznačuje semeníky se čtyřmi plodolisty, plodem jsou srostlé tobolky. Rostliny mají popínavý stonek, charakteristicky chybí latex (Webster, 1975).

Většina z nich se vyskytuje ve výškách do 1000 metrů n. m. Gillespie (1994) ve své práci popisuje druhy rostoucí až do nadmořské výšky 2100 metrů. Z Venezuely je známý druh *Plukenetia multiglandulosa* Jabl. obývající horské lesy. *Plukenetia volubilis* L. většinou roste do nadmořské výšky 1000 metrů. Nicméně, Gillespie (1993) poznamenává, že sbírky z Peru označené jako *Plukenetia volubilis* vyskytující se v nadmořských výškách od 1600 až po 2100 metrů, mohou představovat různé druhy. Kompletní taxonomické zařazení je proto mimořádně důležité nejen z hlediska botanického, ale také pro možnost porovnat nároky a výnosy jednotlivých druhů (Tellez, 2008). Ty se zpravidla liší nejen počtem a velikostí semen, ale zejména také zoubkováním listové čepele.

2.1.2. Podobnost s jinými druhy

Nejbližší příbuzný druh *P. volubilis* je *P. stipellata*. Oba uvedené druhy mohou být však považovány za komplex druhů (Gillespie, 1993).

P. stipellata se od svého příbuzného liší velikostí a tvarem prašníku a pěti kališními lístky namísto šesti. Nalezená byla pouze ve Střední Americe. *P. volubilis* je možné zaměnit ještě s dalšími třemi druhy vyskytujícími se v Peru. Kromě velikosti a členitosti tobolky je tvar, báze listů a tyčinek dalším diagnostickým znakem druhů *P. polyandria* Muell, *P. brachybotrya* Muell a *P. lorentensis* Ule (Gillespie, 2007).

2.1.3. Morfologie *Plukenetia volubilis*

P. volubilis je jednodomá liána. Listy střídavé, jednoduché, řapík 2 – 7 cm dlouhý, listová čepel 7 – 12 × 9 – 17 cm, listy protáhle srdčité, základna klínovitá až mírně srdčitá, okraj listu jemně pilovitý, ze spodu listu 3 primární žilky. Květenství štíhle hroznovitá, 6 – 13 cm dlouhá,

oboupohlavně cizosprašné, obsahující 2 – 3 samčí květy v základně květního uzlu, v květu početné tyčinky, listeny vejčité a 2,5 – 4 mm dlouhé, tyčinkové stopky 1 – 2,5 mm dlouhé, samičí květy se 4 ojedinele s 5 kališními lístky, které jsou vejčité 2,5 – 3,5 mm dlouhé, 1,5 – 2,5 mm široké, okvěti chybí, semeník čtyř - členný, široký 2 – 3 mm, 1 – 3 mm dlouhý tvořící v dospělosti hvězdici. Semenné tobolky 4 ojedinele 6 členné 4 – 8 × 6 – 10 cm, na povrchu lysé. Semena čočkovitá, bočně zploštělá 1,5 – 2,5 cm dlouhá, 0,7 – 0,8 cm široká hnědé barvy s nepravidelně tmavšími skvrnami (Guillén et al., 2003).

2.1.4. Rozšíření

Rozšíření *P. volubilis* sahá od malých Antil přes severozápad venezuelského a kolumbijského povodí Amazonky v Ekvádoru, Peru, Brazílii a Bolívii (Gillespie, 1993, 1999; Webster et al., 1990). V Peru byl hlášen výskyt z oblasti Cusca, Junin, Pasco, San Martin a Madre de Dios (Brako et al., 1993; Gillespie, 1993).

2.1.5. Ekologie

Přírodní stanoviště zahrnuje oblasti do nadmořské výšky 1000 metrů n. m, na okraji tropických deštných lesů s pravidelně se střídajícím obdobím dešťů, trvajícím od listopadu do června, a obdobím sucha - tropického léta, trvajícím od července do října (Gillespie, 1994; Vásquez, 1997). Jedná se o rychle rostoucí liánu, která kvete po pěti měsících od vzejití semenáčku a kvete po celou dobu vegetačního období.

Rostliny Sacha Inchi vyžadují ke svému růstu a zrání plodů teploty charakteristické pro Peruánskou Amazonii - minimální 10 °C a maximální 36 °C. Některé skutečnosti nasvědčují tomu, že vyšší teploty způsobují nadměrné napadení kořenového systému hlísticemi. Rostliny rostoucí v provincii Alto Mayo, kde průměrné denní teploty dosahují 25 °C, při relativní vzdušné vlhkosti 78%, nevykazovaly skoro žádné známky napadení (DRASAM, 2008). Překročení maximálních teplot způsobuje opad květů a zárodků plodů. Při nízké intenzitě osvětlení rostliny vyžadují větší počet dnů k dosažení růstového cyklu. Snižuje se počet květů a tím pádem i produkce semen.

Pro svůj růst rostliny vyžadují trvalou dostupnost vláhy, ročně kolem 850 – 1000 mm. Je lépe, když jsou srážky rozloženy rovnoměrně. V suchých měsících je proto nezbytné zavlažování, protože dlouhá období sucha a nízké teploty způsobují pomalý a obtížný růst. Je třeba uvést, že přebytečná voda poškozuje rostliny a zvyšuje riziko napadení houbovým onemocněním (DRASAM, 2008).

2.1.6. Výsadba a pěstování

P. volubilis ve volné přírodě roste v podrostu v mírném až středním zastínění. Pro komerční využití se však pěstuje na odlesněných nezastíněných plochách. Cai (2009) zjistil, že rostliny pěstované na nezastíněných plochách vykazovaly rychlejší růst a dozrávání plodu než rostliny pěstované ve stínu, tento efekt je hlavně připisován vysoké fyziologické výkonnosti rostlin, hlavně z hlediska využití fotosyntézy asimilačním aparátem rostliny. Zatímco rostliny, které byly dlouhodobě vystavené stínu, vykazovaly zpožděné kvetení a snížení produkce biomasy, což mělo za následek v konečném důsledku snížení produkce semen (Cai, 2009).

Výsadba Sacha Inchi v peruánské Amazonii je podmíněna srážkami. Obecně platí, že přímý výsev se provádí v období s dostatečnými srážkami od listopadu až do dubna, s cílem zajistit dobrou klíčivost vysetých semen. V případě uměle zavlažované půdy mohou být semena vysévána během celého roku. Oliveira et al. (2013) uvádí, že klíčivost semen se může lišit na základě genotypu. Epigeické klíčení nastává při ideálních podmínkách po 18 až 42 dnech od výsevu, v období dešťů nastává klíčení průměrně o 6 dní dříve než v období sucha. Rozdíl v klíčení semen může být způsoben sníženou aktivitou slunečního záření v zimě a taky nižší teplotou, která bývá průměrně o tři stupně Celsia nižší než v létě. Nepřímé vysetí nebo přesazování by mělo proběhnout nejlépe během 45 – 60 dnů před začátkem období dešťů, tzn. od listopadu do července (DRASAM, 2008; Gillespie, 1994). Příprava půdy by měla být v souladu s fyzikálními podmínkami půdy, sklonem a odtokem vody. Výsadba Sacha Inchi může být provedena na rovinném pozemku jako i na zvlněných svazích, které jsou dobře odvodňovány. V oblasti San Martín a jinde v peruánské Amazonii se tradičně vysévají na místech vykácené a následně vypálené vegetace. Tyto postupy, zejména za doprovodu vypalování se nedoporučují, protože ničí půdní živiny a přerušují rozklad organického materiálu. Půda je pak ztuhlejší a nemůže tak absorbovat dešťovou vodu. Je vhodné používat pluh a brány jako systém přípravy pro výsadbu na rovinném pozemku, lze orat do hloubky 0,30 – 0,40 m a zapracovat mrvu skotu na zlepšení struktury půdy (Manco, 2006).

Sacha Inchi může být pěstována s ročními, pololetními nebo trvalými plodinami v jejich přirozeném prostředí. Na polích je vysazována s téměř všemi plodinami, jako je bavlna, banány, fazole, kukuřice, maniok, ovocné stromy, lesní stromy a jiné. Podle některých zkušeností je vhodnější pěstování luštěnin střední velikosti nebo krátce rostoucí druhy jako například fazole. Meziřádkový systém může být uplatněn s krátkým cyklem některých plodin jako arašídů nebo horská bavlna. *P. volubilis* je adaptována na různé druhy půd. Nejlepší půdy jsou středně texturované písčito - jílové, písčito - hlinité, jílovité a písčité hlíny. Nevhodné jsou půdy tvořené

těžkým jílem nebo naopak hodně písčité půdy. Rostlina roste v půdách s reakcí pH 5,5 – 7,7. Vega (2008) uvádí, že rostlina dobře roste i na půdách s vysokou koncentrací hliníku.

2.1.7. Množení

V současné době jsou hlavním prostředkem šíření *Sacha Inchi* semena (Bordignon, 2012; Céspedes, 2006; Manco, 2006). K dalšímu množení je velice důležité použití kvalitních semen, aby bylo dosaženo uspokojivých výsledků sklizně. Před výsevem je nutno semena dezinfikovat impregnačním insekticidem a fungicidem, aby se zabránilo houbovým onemocněním, které mají vliv na tvorbu kořenů rostlin.

Při přímém setí je zapotřebí 1,0 až 1,5 kg osiva na hektar. Vzdálenost mezi řádky by měla být 2,5 – 3 m s roztečí rostlin 3 m, hloubka setí kolem 2 – 3 cm.

V případě nepřímého setí je ideální vysévat semena do praného říčního písku v řádcích vzdálených 10 cm od sebe a hloubce 2 cm. Ještě před vznikem třetího páru pravých lisů je potřeba rostlinky přesadit nejlépe do černých polypropylenových sáčků s předem připraveným substrátem z lesní ornice. Výsadba dobře rostoucích sazenic na cílové stanoviště se provádí po cca 60 dnech od přesazení k instalovanému systému opory (DRASAM, 2008; Manco, 2006).

2.1.8. Škůdci

Rostliny do 2. roku od výsevu jsou nejnáchylnější k napadení hlísticí rodu *Aphelenchus*, *Helicotylenchus*, *Meloidogyne*, *Trichodorus Tylenchus* a *Xiphinema* z nichž mnohé napadají kořeny. Značné ztráty byly zaznamenány poškozením houbami rodu *Fusarium*, *Stagonospora*, *Leptosphaeria*, *Rhizoctonia* a *Cronartium*. Druh *Colletotrichum gloeosporioides* napadá listy a stonky jak u klíčících tak u dospělých rostlin. Jsou záznamy i o poškození rostlin slimáky (*Marisa cornuarietis*, *Pomacea canaliculata*) (Manco, 2006).

2.1.9. Sklizeň a zpracování

Sklizeň se provádí pouze u dostatečně zralých, hnědých tobolek, probíhá po 6,5 – 8 měsících od vysazení rostlin na místo. Plody jsou sklizeny každý 20. – 25. den převážně ručně trháním, s vyšší produkcí od listopadu do května, pak produkce plodů klesá v období od června do října, v období nízkých srážek (DRASAM, 2008; Gillespie, 1994). Sbírané jsou jenom tobolky, které nepřišly do kontaktu se zemí a tím pádem nemohou být zdrojem kontaminace celé sklizně (CIED, 2007). Rostliny dosahují produktivního věku cca po dobu 10 let. V prvním roce dosahují získané výnosy plodů 0,7 – 2,0 t.ha⁻¹ a postupně se sklizeň zvyšuje až do třetího roku od vysetí rostlin na místo, pak produkce pozvolna klesá a je potřeba vysadit rostliny nové, protože u starých rostlin klesají výnosy až k nerentabilní hranici (Chacón, 2014; Manco, 2006).

Po sklizni jsou čerstvě sklizené tobolky přepravovány na sušení a luštění většinou v pytlích o hmotnosti 25 – 30 kg. Sušení může být prováděno přírodním nebo umělým zdrojem tepla. Přírodní sušení se provádí rozprostřením tobolek na plachty s přímým dopadem slunečních paprsků, kde se pravidelně prohrabávají několikrát denně během celé doby sušení. Doba schnutí závisí do značné míry na ekotypu nebo odrůdě, protože některé tobolky mohou mít silnější oplodí než ostatní.

Sušení prováděné pomocí umělého tepla zajišťují řízené sušičky, které fungují na solární energii, palivové dřevo, oleje, nebo jiný zdroj energie. Je taky možné použít sušičky používané k sušení kaka, kávy, kurkumy, kukuřice a dalších produktů. Chacón (2014) doporučuje sušení tobolek v sušičkách, jelikož na přímém slunci se mohou tobolky nadměrnou teplotou přehřát a tak zhoršit výslednou kvalitu oleje. Vyluštěná a usušená semena jsou tradičně skladována v jutových pytlích o hmotnosti 50 – 70 kg v suchém prostředí.

2.1.10. Využití

Semena *P. volubilis* mají vysoký obsah bílkovin (25 – 27%) a oleje (41 – 45%) (Cai et al., 2009; Hamaker et al., 1992) a tím vysokou ekonomickou hodnotu. Olej získaný ze semen je jedním z nejbohatších zdrojů rostlinných omega mastných kyselin nezbytných pro lidský organizmus (Cai et al., 2009).

V celkovém množství oleje v semenech je až 55% mastných kyselin, z nichž podstatnou část (85 – 96 %) tvoří nenasycené kyseliny (Hamaker et al., 1992). Největší zastoupení mají: kyselina omega-6 (25 – 32%) a kyselina linoleová, kyselina omega-3 (45 – 61%) z celkového množství oleje. Semenné bílkoviny obsahují zejména cystein, tyrosin, threonin a tryptofan (Fanali et al., 2011; Hamaker et al., 1992; Maurer et al., 2012). Semena jsou také bohatá na vitamíny A a E (Bussmann et al., 2009; Guillén et al., 2003; Tellez, 2008; Vega, 2008).

Semena se mezi Amazonskými obyvateli používají různě upravená už po několik staletí. Archeologické záznamy nasvědčují, že historie využívání produktů ze semen Sacha Inchi je stará nejméně 1500 let stará (Brack, 1999; Tellez, 2008; Vega, 2008). Olej se používá při přípravě různých jídel, semena jsou konzumována pečená (Fanali et al., 2011). V amazonské oblasti jsou používána jako tradiční lék k léčbě revmatických problémů a bolestí svalů. Bylo prokázáno, že rostlinné steroly jako i další látky, které jsou ve velké míře obsaženy v semenech Sacha Inchi, snižují hladinu cholesterolu v krvi a vedou ke snížení vzniku některých druhů rakoviny (Lagarda et al., 2006, Moreau et al., 2002).

3. Regenerace rostlin *in vitro*

3.1. Rostlinné explantáty

Termín „tkáňová kultura“ je historicky starší a někdy se používá nepřesně i k označení buněčných kultur, event. jako obecný pojem pro všechny metody pěstování buněk v podmínkách *in vitro*. V zahraniční terminologii se pod tímto termínem rozumí jenom primární rostlinné tkáně nebo orgán v kultuře *in vitro*. Rostlinné tkáňové kultury se používají jako důležitý experimentální článek ve výzkumu fyziologie rostlin a genetiky (Luštinec a Zárský, 2005).

Teoreticky jsou všechny živé buňky schopné přetvářet se v kompletní rostliny, tento jev se nazývá totipotence. Kalus je aktivně dělen a tvořen více či méně nediferencovanými tkáněmi. Může být izolován z orgánů, tkání a embryí v *in vitro* podmínkách.

Při vytváření explantátové kultury je nejprve část rostlinného orgánu či tkáně izolována z rostlin v aseptických podmínkách. Dále je převedena do kapalného nebo pevného kultivačního média, které je taky zbaveno mikroorganismů a je umístěná v kultivační nádobě ze skla nebo plastu. Kromě složení kultivačního média má na následující vývoj explantátů kromě jiných faktorů vliv hodnota pH, také teplota prostředí, zastínění nebo přítomnost osvětlení (Luštinec a Zárský, 2005; Taurus et al., 1991).

Kultury vzniklé odvozením z orgánu rostlin jako například kořeny, listy, pupeny a řapíky jsou nazývané meristémové (orgánové). Tyto organizované struktury rostlinného organismu představují systém udržení vysoké genetické stability materiálu. Kultivace organizovaných struktur, zejména meristémů v *in vitro* podmínkách umožňuje hromadně množit geneticky identické klony nepohlavní cestou. Tyto meristémové kultury jsou fenotypově jednotné, geneticky stabilní a ozdravené (zbavené virů a patogenů) (Seman, 1990).

Pokud je do vývinového cyklu explantátové kultury zahrnuta fáze dediferenciace a neorganizovaného růstu (kalusové buňky), hovoříme o tzv. somatické embryogenezi. Velké populace buněk, z kterých každá je potenciálním zdrojem celého rostlinného organismu, je možné dlouhodobě kultivovat a za kontrolovaných podmínek regenerovat v kompletní rostliny. V případě indukce procesu somatické embryogeneze celá rostlina pochází z jediné somatické buňky. Somatická embryogeneze je ve většině případů daleko efektivnější cestou množení rostlin ve srovnání s organogenezí. Klade ovšem podstatně větší nároky na poznání a optimální zvládnutí celého procesu u daného rostlinného druhu (Hrubíková et al., 2009).

3.2. Primární explantát a jeho sterilizace

Explantáty pro namnožení *in vitro* kultur, které byly odebrány z volné přírody nebo skleníku, jsou kontaminovány mikroorganismy a jinými nečistotami. Tyto mikroorganismy, jako jsou bakterie a viry, musí být před přenesením do aseptických podmínek odstraněny, jinak by mohlo dojít až k usmrcení explantátu buď z důvodu jejich přemnožení, nebo uvolnění toxických látek do prostředí explantátu. Potencionální zdroje znečištění mimo rostlinného materiálu jsou taky pracovní nástroje, inkubační místnost jako i prostředí oblasti převodu materiálu. Ve skutečnosti se může úroveň kontaminace lišit dle ročního období (Dodds a Roberts, 1995). Mezi nejčastěji používané sterilizační prostředky pro získání aseptických tkání jsou chlornan sodný (NaClO) a chlornan vápenatý (Ca(ClO)₂). Chlornan sodný je dostupný také jako komerční bělidlo Clorox nebo dezinfekční přípravek Savo. Girija et al. (1999) využívá pro získání aseptických apikálních a axiálních pupenů z *Crossandra infundibuliformis* (L.) 0,5% (w/v) roztok chlornanu sodného po dobu působení 15 – 20 min. Al-Wasel (2000) používá 20% (w/v) roztok chlornanu sodného pro sterilizaci semen *Acacia seyal* Del. Jako dezinfekční činidlo může být místo chlornanu sodného použitý chlorid rtuťnatý (HgCl₂), v současné době málo využíván kvůli své toxicitě. Ang et al. (2004) prokázali, že k efektivní sterilizaci nodálních segmentů *Spilanthes acmella* může být použitý 0,08% (w/v) roztok HgCl₂. Rai a Misra (2005) sterilizují povrch apikálních pupenů *Catharanthus roseus* v 0,5% roztoku HgCl₂ nebo 1% NaClO v různých časových intervalech.

Obecně platí, že explantát by měl být zdravý s vysokou schopností růstu. Důležitou roli také hraje věk rostlin, což platí hlavně u dřevin, kde může být tvorba kalusu zahájena převážně z mladých tkání. Matkowski (2004) uvádí, že kalusy odvozené z kmenových a řapíkových segmentů dospělých rostlin rostly velice pomalu, po čase se staly nekrotické a nakonec uhynuly, zatímco kalus odvozený z mladých stonků a řapíků *Pueraria lobata* (Wild.) poskytoval uspokojivý růst. Naptoti tomu Sahoo et al. (1997) uvádí, že kalus byl úspěšně indukován z internodia pět let staré rostliny *Morus indica* L. Úspěšnost zahájení tvorby kalusu také závisí na tom, zda je matečná rostlina pěstována ve skleníku nebo ve volném prostředí. Roční období při sběru rostlinného materiálu také mohou ovlivnit tvorbu kalusu. Obecně je úspěšnost tvorby kalusu vyšší z rostlin pěstovaných ve volné půdě (George a Sherrington, 1984). Podle Yeomana a Macleoda (1973) může být indukována většina rostlinných buněk z izolovaných meristémů obsahujících mitoticky aktivně se dělící buňky, a následně je možná regenerace v plnohodnotné rostliny. Velikost a tvar počátečního explantátu přitom není zásadní, i když proliferace nemusí nastat u explantátu pod kritickou velikostí. Obecně platí, že poměrně velké kalusy mají větší pravděpodobnost k získání životaschopné kultury. Jedním z důvodů je větší množství buněk v kalusu. Dle Yeomana a Macleoda (1973) je proto poměr povrch/objem klíčový při žádaném maximálním růstu.

3.3. Somatická embryogeneze

Za normálních okolností vyvíjející se somatické embryo nejprve prochází typickou kulovitou fází, následně přechází do tvaru srdce a torpéda, až se vyvine do zralého somatického embrya (Sun, 2003). Tyto fáze byly jasně viditelné u odvození somatických embryí dřevin, jako jsou *Azadirachta excelsa* nebo *Azadirachta excelsa* (Te-chato a Rungnoi, 2000). Somatická embryogeneze odvozená z kalusové kultury je obecně účinná metoda s vysokým počtem regenerovaných rostlin (Choi, 1999). Pro následný vývoj je klíčové udržení buněk v nedospělých stádiích diferenciaci, aby byla zachována jejich regenerační schopnost. V případě, že by byly buňky v kultuře plně diferencovány, může dojít ke ztrátě totipotence a následné ztrátě regenerační kapacity (Tian, 2002).

3.4. Indukce embryogenního kalusu

Je dobře zdokumentován vliv exogenně dodaných auxinů přednostně 2,4-D (kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová) na indukci somatických embryí. Bylo dokázáno, že přítomnost auxinů v kultivačním médiu ovlivňuje tvorbu proembryí, které mají vliv na další vývoj somatických embryí ve fázi zrání (Silveira, 2003). Na druhé straně, cytokininy působí přímo na buněčný cyklus, kde jsou pravděpodobně využívány při regulaci syntézy proteinů (Richard et al., 2002). Hussein et al. (2005) uvádí ve své práci, že rovnováha mezi auxiny a cytokininy je pravděpodobně důležitější než jejich absolutní koncentrace k zahájení tvorby embryogenních kultur, i když absolutní koncentrace rostlinných růstových regulátorů je také důležitá.

Jako zdroj uhlíku v živných médiích je používána sacharóza. Koncentrace sacharózy je jedním z důležitých faktorů v médiích tkáňových kultur. Bylo zjištěno, že zvýšení koncentrace sacharózy v kultivačním médiu může mít za následek zvýšenou produkci sekundárních metabolitů (Dicosmo a Misawa, 1995). Účinek sacharózy byl úspěšně pozorován v kultuře *Coleus blumei* s obsahem kyseliny rozmarýnové, kde se její obsah zvýšil až šestkrát v prostředí obsahující 5% sacharózy ve srovnání s kontrolním médiem obsahujícím 2% sacharózy (Petersen et al., 1992).

U krytosemenných dvouděložných rostlin je embryogenní kalus primárně odvozen za použití samotných auxinů. Praxe ukazuje, že pouze auxiny se silnými účinky, jako je Picloram, Dicamba, nebo 2,4-D jsou schopny zahájit embryogenezi. Řada autorů využila pro získání embryogenního kalusu čeledi *Euphorbiaceae* auxin 2,4-D. Autoři Stamp a Henshaw (1987) použili s nejlepším výsledkem koncentraci 4 mg.l⁻¹ 2,4-D na odvození kalusu a zároveň iniciaci somatických embryí z *Manihot esculenta*. Jednalo se o inkubaci explantátu po dobu 24 – 30 dní na bazálním MS médiu. Mathews et al. (1993) použil také MS médium se stejnou koncentrací 2,4-D po dobu kultivace 20 dnů k indukci embryogenního kalusu z *Manihot esculenta*. Jako vhodný auxin k odvození

embryogenních kultur se také používá Dicamba. Siang et al. (2012) odvodili embryogenní kalus z děložních explantátů *Jatropha curcas* na MS médiu s přídavkem $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ Dicamba a 3% (w/v) sacharózy. Jako vhodné se projevilo použití také $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ 2,4-D na rozdíl od použití Picloramu, IAA a IBA, které neindukovali tvorbu kalusu. Dicambu použili jako vhodný auxin při *Gentiana* spp také autoři Fiuk a Rybezyński (2008) v koncentraci 1 mg.l^{-1} v kombinaci s 1 mg.l^{-1} TDZ nebo BAP. K indukci embryogenních tkání z listů *Manihot esculenta* Crantz použili autoři Taylor et al. (2001) $\frac{1}{2}$ MS médium doplněné $50 \mu\text{M}$ Picloramu a drobný embryogenní kalus byl vytvořen po 28 dnech kultivace.

3.5. Indukce somatických embryí

Impulzem k tvorbě somatických embryí je obvykle v *in vitro* kulturách přenesení na médium obsahující vhodné fytohormony. Vyžadovaný je obvykle nižší poměr cytokininů, gibberelinů a kyseliny abscisové, nebo kombinace zmíněných rostlinných hormonů. Proces vytváření somatických embryí tvoří obvykle jedna nebo více fází, které jsou spojené hlavně s obsahem rostlinného hormonu v médiích dle druhu rostliny a použitých rostlinných regulátorů v různých koncentracích. Stamp a Henshaw (1987) studovali vliv růstových regulátorů 2,4-D a BAP v kultivačním médiu na vývoj a regeneraci embryí u *Manihot esculenta*. Jako nejlepší se projevila kultivační média obohacená o $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ 2,4-D a $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP. Odstranění nebo zvýšení koncentrace auxinů mělo negativní vliv na počet odvozených somatických embryí. Siang et al. (2012) použili k regeneraci drobného kalusu $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP a $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ GA_3 . Použití BAP bylo účinnější, podařilo se regenerovat 83,3% embryí namísto 73,3% regenerovaných na médiu s GA_3 . Jha et al. (2007) použili k indukci somatických embryí bazální MS médium s různými koncentracemi Kin v kombinaci s IBA. Jako neúčinnější se ukázala koncentrace $2,3 \mu\text{M}$ Kin a $1 \mu\text{M}$ IBA, při které se podařilo indukovat somatická embrya u 58% kalusů. Autoři Iqbal et al. (2011) použili médium MS doplněné o $0,15 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP a $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ IAA, které vykazovalo nejlepší reakce pro regeneraci. Z kalusu se podařilo regenerovat celkem 78% somatických embryí.

3.6. Maturace somatických embryí

Další vývoj somatických embryí je stimulován přechodem na změněné kultivační podmínky. V této fázi je nutné snížit nebo úplně odstranit z kultivačního média auxiny a cytokininy a nahradit je vhodnými regulátory růstu navozující vyžrávání vzniklých embryí (Stasolla et al. 2001). Dle dosavadních výzkumů je za vyžrávání somatických embryí zodpovědná hlavně kyselina abscisová (ABA). Krom její nezastupitelné funkce při regulaci embryogeneze, má ABA také význam při regulaci jiných fyziologických funkcí v rostlině. Např. obsah ABA v pletivech se výrazně (až o 1-2 řády) zvyšuje při nedostatku vody, zasolení, chladu, poranění nebo infekci. ABA se také účastní

zrání semen, kdy ztráta vody je nejen tolerována, ale je součástí vývoje semene a embrya. Hromadění ABA ve zrajících semenech předchází dehydrataci semen. Kyselina abscisová zastaví rozmnožování bipolárních útvarů a tak stimuluje jejich další vývoj.

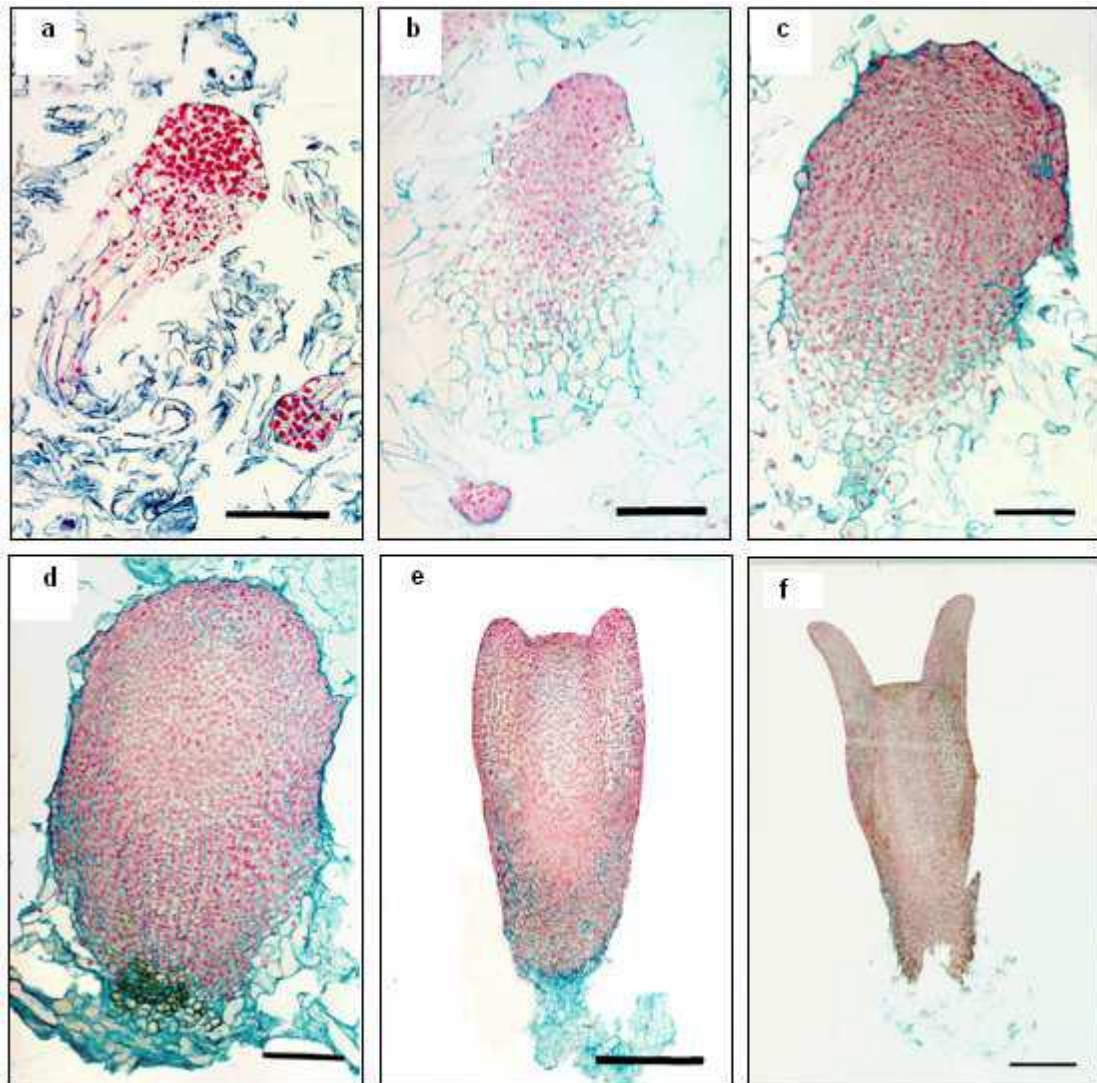
Změna kultivačních podmínek může být postupná nebo náhlá v závislosti na druhu rostliny. Lze použít jednotýdenní kultury nezralých somatických embryí na médiu s přidavkem aktivního uhlí. Aktivní uhlí především odstraňuje účinek zbylých fytohormonů, což potvrdila i řada prací různých autorů (Becwar et al., 1988; Harry a Thorpe, 1994). V následném kroku je možné přenést somatická embrya na tzv. maturační médium obsahující ABA a jiné složky. První zprávy o použití ABA všeobecně naznačovaly, že koncentrace pod 8 – 12 mmol.l⁻¹ působí příznivě (Becwar et al., 1988, Hakman et al., 1988). Všeobecně platí, že optimální koncentrace ABA musí podporovat dozrávání somatických embryí, a je potřebné je empiricky určit pro každý konkrétní druh a genotyp zvlášť. Siang et al. (2012) zkoumali dvě metody vyžrávání somatických embryí. V první použili MS médium obohaceno o 0,6 ABA mg.l⁻¹ a 4% PEG 6000 (w/v) s úspěšností 77,8% oproti kontrolnímu vzorku. V druhém případě výsledky ukázaly, že nejvyšší regenerace rostlin, 83,3% byla získána na MS médiu obsahujícím 0,3 mg.l⁻¹ BAP, zatímco 73,3% regenerovaných rostlin bylo získáno z MS média obsahujícího 0,4 mg.l⁻¹ GA3. Autoři Thilaga et al. (2013) použili s nejlepším výsledkem k procesu zrání MS médium s přidavkem 3,78 mmol.l⁻¹ ABA, poté co embrya vyklíčila na médiu MS obsahujícím 0,45 mmol.l⁻¹ 2,4-D v kombinaci s 22 mmol.l⁻¹ BAP. Práce Raemaekers et al. 2001; Stamp a Henshaw, 1987; Szabados et al. 1987 a dalších autorů, zabývajících se somatickou embryogenezí rostlin čeledi *Euphorbiaceae* převážně manioku, poukazují na to, že redukce cytokininů je potřebná z toho důvodu, že cytokininy podporují raná stádia dozrávání a organizaci embryogenních oblastí. Pro pochopení úlohy cytokininů při regulaci embryogeneze rostlin z čeledi *Euphorbiaceae* jsou potřebné ještě další studie. Dalším možným krokem pro skoré dozrávání je zvyšování koncentrace látek působících v živných médiích jako osmotika.

Osmóza ve spojení s ABA velice ovlivňuje maturaci somatických embryí rostlin. U jehličnanů nebyly jednoduché cukry a soli tak účinné, jako sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností např. polyetylénglykol (PEG) (Stasolla et al., 2003). Koncentrace 0 – 60% PEG 6000 v kombinaci s ABA vedla k trojnásobné frekvenci dozrávání somatických embryí *Carica papaya* a dodala somatickým embryím lepší vzhled, například v podobě lépe vyvinutých klíčnicích listů. Somatická embrya též vykazovala zvýšenou akumulaci zásobních látek v pletivech, a tím měla vyšší schopnost přežití v suchých podmínkách (Heringer et al., 2013). V některých případech měly pozitivní úlohu jako osmotikum například sacharóza nebo maltóza (Salajová et al., 1999).

3.7. Klíčení a výsadba rostlin

Somatická embrya jsou po úspěšné maturaci schopná klíčit a regenerovat v rostliny. Předpokladem pro zahájení klíčení je celková zralost somatických embryí. Média, které stimulují klíčení, už neobsahují růstové regulátory. Na zakládání a růst meristémů obvykle postačují zbytkové koncentrace ABA v pletivech z předchozí kultivace na maturačních médiích obsahujících ABA (Salajová et al., 1999, Stasolla et al., 2003). Během kultivace na klíčících médiích se po uplynutí průměrně 20 dní obvykle začne prorůstat kořínek z radikuly.

Z mnoha embryogenních kultur byly získány zralá embrya, které však nebyly schopny následného klíčení. Bylo zjištěno, že velice užitečným postupem pro dokončení zrání embryí je desikační vysoušení. V průběhu vysoušení embrya dosahují fyziologické zralosti a prostřednictvím vodního stresu dochází k mnoha změnám v celkovém buněčném metabolismu (Finer et al., 1989). Ztráta vody je přirozeně se vyskytující událostí, která představuje důležitý mezistupeň mezi ukončením vývoje a následným klíčením. Vysoušení (desikace) je nyní už běžnou praxí mezi fází zrání a klíčení. Autoři Taylor et al. (2001) provedli vícestupňový proces klíčení a regenerace. Fázi klíčení zahájili na ½ MS doplněném o 10 µM 2,4-D po dobu 3 týdnů, následně byly kultury převedeny na ½ MS s 5 µM NAA na další 2-3 týdny, kotyledonární fáze byla zastavena použitím ½ MS s přidavkem 5 mg.l⁻¹ (w/v) aktivního uhlí. O sedm dní později byla zralá embrya přenesena na ½ MS médiu doplněném o 5 µM BAP. Vyklíčené rostlinky byly udržovány na ½ MS médiu. Význam vysoušení dokládá také pozorování autorů Webster et al. (1990), kteří srovnávali procento vyklíčených embryí *P. glauca* x *P. engelmannii* ve dvou variantách, kdy jedna varianta představovala fázi vysoušení embrya a druhá ne. Ukázalo se, že po jednom týdnu vysoušení se počet klíčících embryí výrazně zvýšil. Taky se výrazně zvýšila kvalita klíčících rostlin (Li et al. 2008). Embrya po desikaci byla neprůhledně bílá. Po jednom týdnu embrya zezelenala, po pěti týdnech kultivace byly dobře vyvinuté kořeny, které po 8 týdnech kultivace dosáhly délky 2 – 2,5 cm. Boční kořeny vyrostli po 10 týdnech kultivace. Rostliny s postranními kořeny, které jsou dostatečně velké, je možné přenést do prostředí *ex vitro*, např. do skleníku, kde jsou pěstovány v přiměřené teplotě a vysoké vzdušné vlhkosti při tlumeném světle (Vágner et al. 2005). Další možností, v dnešní době zatím ještě ne úplně zvládnuté často z fyziologického ale i ekonomického hlediska, je obalení somatických embryí po desekaci v gelu (alginátu), tím získáme tzv. „umělá“ semena, které je možné vysévat běžnými metodami a celý proces tak o něco více zautomatizovat.



Obrázek 1.: Vývoj somatického embrya *P. abies* v maturační fázi: **a** Rané somatické embryo v 1. týdnu kultivace. **b** Cylindrické embryo v 2. týdnu kultivace. **c** Prekotyledonární embryo v 3. týdnu kultivace, viditelná diference kořenové čepičky a kolumelly. **d** Prekotyledonární embryo v 4. týdnu kultivace, kořenová čepička je již utvořena. **e** Kotyledonární embryo v 5. týdnu kultivace, pozorovatelné formování a růst děloh. **f** Kotyledonární embryo v 6. týdnu kultivace, kořenová čepička se začala rozpadat, úsečka v obrázcích odpovídá a-d, 200 μm , e - f 500 μm . K barvení byla použita alcianová modř a pravá červeň jádrová. Převzato ze Svobodová et al., 1999.

3.8. Odvození somatické embryogeneze *Plukenetie volubilis*

3.8.1. Živná média

Minerální prvky můžeme dle zastoupení v rostlinném organismu rozdělit na makro a mikroživiny. Makroživiny jsou přítomné alespoň v 1% suché hmotnosti, mikroživiny obsahují méně jak 0,1% hmotnosti rostlinného těla. Mikroživiny zahrnují 6 základních prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru. Dusík je nejčastěji dodáván ve formě nitrátů a amonných solí, draslík

ve formě chloridu anebo dusičnanů. Optimální koncentrace dusičnanů je mezi 20 – 40 mmol.l⁻¹, amoniak se nejčastěji dodává v koncentracích 2 – 20 mmol.l⁻¹. Koncentrace fosforu, hořčíku a síry v médiu je 20 – 30 mmol.l⁻¹. Mezi mikroelementy důležité pro růst *in vitro* kultur patří bór, zinek, měď, železo, mangan a molybden. V některých případech se do média přidává sodík, chlór, kobalt a jód (Gamborg a Phillips, 1995).

Sacharidy jsou používány v kultivačním médiu jako zdroj uhlíku, který je nutný z důvodu heterotrofní výživy u explantátů. V kultivačních médiích může být použita sacharóza, glukóza, fruktóza nebo maltóza. Pro *in vitro* kultury dřevin je nejčastěji používána sacharóza nebo maltóza. Koncentrace sacharózy se pohybuje v rozmezí 2 – 3% (w/v). U osmotických médií, která mají za cíl zvýšení účinnosti transformace, je obsažen manitol nebo sorbitol (Coffin et al., 1976; Kovač, 1992; Oka a Ohyama, 1982; Popelka a Altpeter, 2001; Ward a Jordan, 2001).

Mezi další organické látky přidávající se do kultivačního média patří zejména aminokyseliny a vitamíny. Přítomnost některých aminokyselin, např. alanin, asparagin, glutamin anebo prolin, může stimulovat růst explantátů. Tyto látky se používají pro rostliny jako rychlý zdroj organického dusíku.

Vitamíny jsou nezbytné pro katalýzu mnoha metabolických procesů. Pozitivní vliv na rozvoj tkáňové kultury byl prokázán zejména v případě thiaminu (vitamin B1), pyridoxinu (vitamin B6) a myo-inositolu. Často přidávaný vitamín je také kyselina nikotinová (Dodds a Roberts, 1995; Kovač, 1992; Trigiano a Gray, 2005).

Živé médium představuje složitý systém. Aby byl schopen rostlinný materiál z tohoto prostředí látky přijímat, musí mít médium správné pH. Rozsah pH se u médií nejčastěji pohybuje od 5 do 6,5. Pro čeleď *Euphorbiaceae* je to nejčastěji hodnota pH 5,7 (Bordignon et al., 2012; Jha et al., 2007; Mathew et al., 1993). Toho lze docílit úpravou pomocí KOH či HCl. Během kultivace rostlinného materiálu dochází ke změnám složení živého média, rostlina látky z média přijímá a jiné do něj vylučuje. Zpravidla po několika týdnech, někdy měsících, je nutné přenesení materiálu na čerstvé médium. Délka tohoto intervalu je dána kultivovaným materiálem a mírou jeho metabolismu, nebo požadavkem na dodání určité látky do média, pokud má dojít ke změně v růstu a vývoji daného kultivovaného materiálu. Po přípravě média je nutná jeho sterilizace. Nejčastěji již v kultivačních nádobách z vhodného materiálu, skla a sterilizovatelného plastu, uzavíraná víčkem z alobalu, buničiny nebo vaty zajišťující výměnu plynů, ale bránící vnikání mikroorganismů. Sterilizace autoklávováním probíhá zpravidla při teplotě 121°C a tlaku 0,12 MPa po dobu dvaceti až třiceti minut.

Krom jiných v praxi běžně používaných médií, jako jsou například B5 a WPM médium, bylo pro odvození *in vitro* kultur rostlin z čeledi *Euphorbiaceae* s výhodou využito MS médium s plnou nebo poloviční koncentrací solí a vitamínů (½ MS) (Tabulka 1., 2., 3.) (Feitosa et al., 2007; Gamborg et al., 1968; Loyd a McCown, 1980; Szabados et al., 1987).

3.8.2. Regulátory růstu rostlin

Nejobvyklejší skupiny rostlinných regulátorů růstu (RR) používané k výskumu *in vitro* kultur jsou auxiny a cytokininy. Množství RR v kultivačním médiu je zásadní podmínkou pro regulaci růstu a morfogenezi rostlinných tkání (Skoog a Miller, 1957). Obecně se uvádí, že tvorbu kalusu vyvolá rovnovážný účinek auxinů a cytokininů v médiu, který je zodpovědný za proliferaci buněk a tvorbu kalusu. Na druhé straně nízká koncentrace auxinů a vysoká koncentrace cytokininů v médiu má za následek indukci výhonů. Auxiny samotné, nebo s přidavkem nízké koncentrace cytokininů hrají důležitou roli při indukci kořenových primordií (Pierik et al., 1997). Existuje celá řada přirozeně se vyskytujících auxinů (IAA, IBA, PAA, 4-chlor-indolyloctová kyselina,) a cytokininů (DZ,2-iP, IPA). Protože přirozené auxiny snadno degradují na světle, při zvýšené teplotě a působením mikroorganismů v roztoku, jsou široce užívány pro tvorbu médií syntetické auxiny (Epstein et al., 1989).

Nejčastěji používané auxiny jsou kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová (2,4-D), kyselina 1-naftyloctová (NAA) a β -indolylmásečná kyselina (IBA). Obdobně se používají i jiné chemické látky jako například Dicamba (kyselina 3,6-di-chlor-o-anisová) nebo Pikloram (4-amino-3,5,6-trichlorpyridin-2-karboxylová kyselina). Obě tyto sloučeniny se ve vyšších koncentracích využívají jako herbicidy (Davies, 1987). V mnoha případech postačuje použití jednoho z uvedených auxinů k odvození a tvorbě kalusu, nicméně je možné použití kombinací vícero auxinů a cytokininů, zejména když je tkáň neochotná vytvářet kalus (George a Sherrington, 1984). Tkáňové kultury byly u jednoděložných rostlin, zejména obilnin a palem, v některých případech odvozeny za pomoci poměrně vysokých dávek syntetických auxinů, jako je 2,4-D. Vysoké hladiny auxinů by mohly působit jako herbicidy, ale v nepřítomnosti exogenního cytokininů bylo často dosaženo proliferace buněk. Formování somatických embryí bylo pozorováno, když byly z média odstraněny auxiny nebo byla snížena jejich koncentrace v kultivačním médiu (Martin et al., 2005; Wang et al., 2006).

Cytokininy, deriváty adeninů jsou charakterizovány schopností indukovat buněčné dělení v tkáňových kulturách, obvykle v přítomnosti auxinů. Nejběžněji se vyskytujícím cytokininem v rostlinách je zeatin (ZEA). V praxi je často používaný syntetický cytokinin – kinetin (KIN), který je přibližně 10× silnější než přirozeně se vyskytující cytokininy. Do kultivačních médií je občas přidán benzyl adenin (BA), který se chová jako slabý cytokinin podporující tvorbu prýtů. (Beyl, 2005). Dle

Murphyho et al. (2000) je u neochotných tkání možné použít i další silné regulátory růstu, jako je TDZ (thidiazuron).

Kyselina giberelová (GA3), konečný produkt metabolismu *Gibberella fujikuroi*, je komerčně dostupná již řadu let. Její aplikace na pupeny nebo semena rostlin ve vegetačním klidu může mít za následek různé účinky na růst. Je známo, že může vyvolat tvorbu prašníků u dvoudomých rostlin (Metzger, 1987). GA3 v tkáňových kulturách stimuluje mitózu, mimo jiné je používána k prodlužování stonků, navození dozrávání pletiv a může pozitivně ovlivnit klíčení zralých embryí.

4. Metody zjišťování genetické stability kultur v *in vitro* podmínkách

V procesu somatické embryogeneze může vlivem použitých hormonů a podmínek kultivace docházet k různým změnám genetické stability buněk (například DNA ploidie) (Winkelmann et al., 1998). Existuje mnoho metod testování genetické variability.

V současné době jde hlavně o DNA markery založené na testování metodami PCR (AFLP; FLP; ISSR). Markery vypovídají o genetické podobnosti (příbuznosti) jedince na základě repetitivních sekvencí (bází) v molekule DNA. Co je možné v praxi využít při identifikaci klonů, zjištění jejich variability respektive či vlivem kultivačních podmínek nedochází k změnám v genetické struktuře. Je také možné sledování vlivu introdukovaných genotypů na genetickou stabilitu původní populace na hlubší, molekulárně genetické úrovni. Výše zmíněné techniky jsou nejen finančně velice náročné ale také značně časově zdlouhavé.

Méně nákladnou je rychle se rozvíjející metoda průtokové cytometrie. Její velkou výhodou je fakt, že je možné analýzu vlastností na úrovni buňky provádět ve vzorku o velkém počtu buněk během velmi krátkého časového úseku. Části buňky, jsou obaleny unášecí kapalinou a pod tlakem hnány do prostoru, kde dochází ke křížení dráhy paprsku laseru a procházející buňkou, detekované částice jsou přeneseny z optického na elektronický signál a kvantitativně počítačem vyhodnoceny. Výstupem je graf, který na základě velikosti, počtu a tvaru vrcholu (piku) vypovídá o zkoumaném materiálu (Ormerod, 1994).

5. Metodika práce

5.1. Návrh média

Na základě použitých fytohormonů u jiných autorů byly navrženy a vyzkoušeny různé varianty médií:

5.1.1. Iniciační médium (I):

Tabulka 1.: Tabulka iniciačních médií.

Označení	Médium	Fytohormon (mg.l ⁻¹)						Sacharóza (g.l ⁻¹)	Návrh dle autora
		Auxiny			Cytokininy				
I		2,4 D	Dicamba	Picloram	BAP	KIN	TDZ		
1	MS	0,1							Pilco (2014)
2	MS	0,1			0,05			30	Pilco (2014)
3	MS		5					30	Wang et al. (2006)
4	MS		1				1	30	Fiuk and Rybezynski (2008)
5	MS		3		0,5		0,3	30	
6	MS		3		0,9		0,1	30	
7	MS			5				30	Taylor et al. (2001)/ Kordestani and Karami (2008)

U variant I1 a I2 byly k odvození kalusu použity řapíky děložních a pravých listů, varianty I3 až I7 byly odvozeny z řapíku pravých listů.

5.1.2. Proliferační médium (P):

Tabulka 2.: Tabulka proliferačních médií.

Označení P	Médium	Fytohormon (mg.l ⁻¹)											Jiné přidavky	Sacharóza (g.l ⁻¹)	Návrh dle autora
		Auxiny						Cytokininy			Kys. abscisová	Gibereliny			
		2,4 D	Dicamba	NAA	IAA	IBA	Picloram	BAP	KIN	TDZ	ABA	GA ₃			
1	MS													30	
2	MS	0,1												30	Pilco (2014)
3	MS	0,1						0,05						30	Pilco (2014)
4	MS	0,01						0,15						30	Stamp and Hanshaw (1987)
5	MS	0,05						0,1						30	Stamp and Hanshaw (1987)
6	MS	0,05						0,3						30	Stamp and Hanshaw (1987)
7	MS	0,5						0,1						30	Stamp and Hanshaw (1987)
8	MS	0,5						1						30	Stamp and Hanshaw (1987)
9	MS	1						3						30	Stamp and Hanshaw (1987)
10	MS	0,1					0,05	0,05						30	
11	MS		5											30	
12	MS		1							1				30	Fiuk and Rybezyrski (2008)
13	MS		3					0,5		0,3				30	
14	MS		3					0,9		0,1				30	
15	MS			0,1						0,1				30	
16	MS			0,1						0,3				30	
17	MS			0,3										30	Taylor et al. (2001); Iqbal et al. (2011)
18	MS			0,01				0,1				1		30	Mathews et al. (1993)
19	MS			0,5								1		30	Kordestani and Karami (2008)
20	MS				0,3									30	Rambabu et al. (2006)
21	MS				0,15		0,1							30	Iqbal et al. (2011)
22	MS					1								30	
23	MS					0,2						3		30	
24	MS					0,4		1,8						30	Bordigon et al. (2012)
25	MS					0,4			3					30	Jha et al. (2007)
26	MS						0,1							30	Taylor et al. (2001);
27	MS						0,2							30	Kordestani and Karami
28	MS						5							30	(2008)
29	MS								1					30	
30	MS										10		60 PEG	30	Siang et al. (2012)
31	MS										20		80 PEG	30	Siang et al. (2012)
32	MS											1		30	Siang et al. (2012)
33	MS													80	Kordestani and Karami (2008)
34	1/2 MS	0,05						0,1						30	
35	1/2 MS	0,05						0,3						30	
36	1/2 MS			0,1						0,1				30	
37	1/2 MS			0,1						0,3				30	
38	1/2 MS									0,1				30	Pilco (2014)

5.1.3. Maturační médium (M):

Tabulka 3.: Tabulka maturačních médií.

Označení M	Médium	Fytohormon (mg.l ⁻¹)											Jiné přidávky	Sacharóza (g.l ⁻¹)	Návrh dle autora	
		Auxiny						Cytokininy			Kys. abscisová	Gibereliny				
		2,4 D	Dicamba	NAA	IAA	IBA	Picloram	BAP	KIN	TDZ						ABA
1	MS														30	
2	MS	0,1													30	Pilco (2014)
3	MS	0,01						0,15							30	Stamp and Hanshaw (1987)
4	MS	0,05						0,1							30	Stamp and Hanshaw (1987)
5	MS	0,05						0,3							30	Stamp and Hanshaw (1987)
6	MS	0,5						0,1							30	Stamp and Hanshaw (1987)
7	MS	0,5						1							30	Stamp and Hanshaw (1987)
8	MS	1						3							30	Stamp and Hanshaw (1987)
9	MS	0,2						6							80	Stamp and Hanshaw (1987)
10	MS	0,1					0,05	0,05							30	
11	MS	0,2						6							80	Stamp and Hanshaw (1987)
12	MS	0,1							0,1				1g AU		30	
13	MS	0,2							0,1				1g AU		30	
14	MS	0,2							0,5						30	Hussein et al. (2005); Jha et al. (2007)
15	MS		5												30	
16	MS		1							1					30	Fiuk and Rybezyński (2008)
17	MS		3						0,5	0,3					30	
18	MS		3						0,9	0,1					30	
19	MS			0,1						0,1					30	
20	MS			0,1						0,3					30	
21	MS			0,3											30	Taylor et al. (2001); Iqbal et al. (2011)
22	MS			0,01				0,1					1		30	Mathews et al. (1993)
23	MS			0,5									1		30	Kordestani and Karami (2008)
24	MS				0,3										30	Rambabu et al. (2006)
25	MS				0,15			0,1							30	Iqbal et al. (2011)
26	MS					1									30	
27	MS					0,2							3		30	
28	MS					0,4			1,8						30	Bordignon et al. (2012)
29	MS					0,4				3					30	Jha et al. (2007)
30	MS							0,1							30	
31	MS							0,2							30	Taylor et al. (2001)/ Kordestani and Karami (2008)
32	MS							5							30	
33	MS									1					30	
34	MS										10		60 PEG		30	Siang et al. (2012)
35	MS										20		80 PEG		30	Siang et al. (2012)
36	MS												1		30	Siang et al. (2012)
37	MS														80	Kordestani and Karami (2008)
38	1/2 MS	0,05						0,1							30	
39	1/2 MS	0,05						0,3							30	
40	1/2 MS			0,1						0,1					30	
41	1/2 MS			0,1						0,3					30	
42	1/2 MS									0,1					30	Pilco (2014)

5.2. Příprava rostlinného materiálu

Semena poskytnutá Fakultou tropického zemědělství ČZU byla vysety do běžného zahradnického substrátu 18. 5. 2014, po celou dobu kultivace byla udržována v pokojových podmínkách. Po vyklíčení rostlin (6 různých fenotypů)¹, byl následně odebrán rostlinný materiál z řapíků děložních a pravých listů (po 35 dnech růstu).

5.3. Sterilizace rostlinného materiálu

Řapíky 2 – 4 cm dlouhé byly sterilizovány v 96% etanolu po dobu 30 sekund, následně byly povrchově sterilizovány v 1% roztoku chlornanu sodného (SAVO) 10 min. Takto vysterilizované části řapíků byly v sterilním prostředí laminárního boxu (flow – boxu) dvakrát promyty sterilní destilovanou vodou a nakráčeny na cca 1 cm dlouhé segmenty.

5.4. Příprava živného média

K indukci kalusů *P.volubilis* bylo použito MS médium (Murashige a Skoog, 1962). Z předem připravených zásobních roztoků mikro a makroelementů bylo odměřené potřebné množství těchto roztoků (Tabulka 7.), které byly v kádince smíchány. Do roztoku se přidala navážka myo-inositolu, sacharózy a požadované množství fytohormonů (Tabulka 1., 2., 3.). Po důkladném rozpuštění všech složek média, bylo konečné pH upraveno na hodnotu 5,7 pomocí elektrického pH metru (zvyšování hodnoty pH pomocí 1 M KOH, snižování pH pomocí kyseliny askorbové). V druhé kádince bylo rozpuštěno potřebné množství agaru (Carl Roth).

V poslední fázi bylo provedeno zahřátí obou kádinek v mikrovlnné troubě, jejich smíchání a doplnění horkou destilovanou vodou na požadovaný výsledný objem. Takto připravené médium bylo rozlito do Erlenmayerových baněk (o objemu 100 ml) cca po 20 ml do každé a uzavřené víčkem z hliníkové fólie. Připravené varianty médií byly před sterilizací popsány. Sterilizace probíhala při teplotě 121°C po dobu 20 minut a tlaku 1,2 kg.cm⁻¹.

¹ 6 fenotypů rostlin bylo tvořeno dvěma genotypy ADO15 – populace Aguas de Oro, poměrně izolovaná osada u řeky Huallaga, zeměpisná šířka 6°17,570' Juh, zeměpisná délka 76°39,200' Západ, nadmořská výška 385 m n. m., tvořena čtyřmi rostlinami. Zbylé dvě patřily ke genotypu 2DM08 – populace Dos de Mayo, zeměpisná šířka 6°47,573' Juh, zeměpisná délka 76°32,108' Západ, nadmořská výška 335 m n. m. Sběr proběhl v červenci 2012.

5.5. Zavedení kalusové kultury *in vitro*

Vysterilizované části řapíku byly přeneseny na média (Tabulka 1.) ve flow-boxu a následně umístěny do kultivační místnosti, kde byly ponechány v kultivačních stojanech při teplotě $25 \pm 2^\circ\text{C}$ přes den a teplotě $21 \pm 2^\circ\text{C}$ během noci. Intenzita osvitů byla regulována na 16/8 hodin (světlo/tma) s intenzitou 2000 lx. Aseptické explantáty byly použity pro následné studie.

5.6. Průtoková cytometrie

K zjištění relativní velikosti DNA jader ve vzorcích listů a kalusů byla použita metoda průtokové cytometrie. Příprava vzorku dle zjednodušené metodiky Doležela et al. (2007) spožívala v nasekání čepele listů o velikosti $0,5\text{ cm}^2$ nebo kalusu přibližné hmotnosti 20 mg v 0,5 ml ledově chladném pufru Otto I ($0,1\text{ M}$ kyselina citrónová, 0,5% (v/v) Tween 20). Vzniklá suspenze se přefiltrovala přes $42\text{ }\mu\text{m}$ nylonovou síťovinu, a po 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě byl vzorek obarven pufrům Otto II o objemu 1 ml ($0,4\text{ M Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$); $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, (4',6-diamidino-2-fenylindol) (DAPI) a $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (β -merkapt ethanol). Hodnota relativní fluorescence byla měřena použitím cytometru CyFlow (Partec GmbH, Münster, Německo) pro přibližně 2000 jader, následná analýza dat byla vyhodnocena pomocí softwaru FloMax (Partec, GmbH, Münster, Německo) ve formě grafů s píky (vrcholy) (Obrázek 6.).

5.7. Hodnotící kritéria růstu, struktury a barvy

Cílem práce bylo seznámení se se zkoumanou problematikou somatické embryogeneze a zjištění vlivu různých fytohormonů na rostlinný materiál. Proto byl přírůstek kalusů hodnocen pohledovou metodou, jelikož k přesnějšímu zjištění by bylo nutné část rostlinného materiálu z každé zkoumané varianty zvážit v nesterilních podmínkách laboratoře a tím zkoumaný vzorek kontaminovat (znehodnotit).

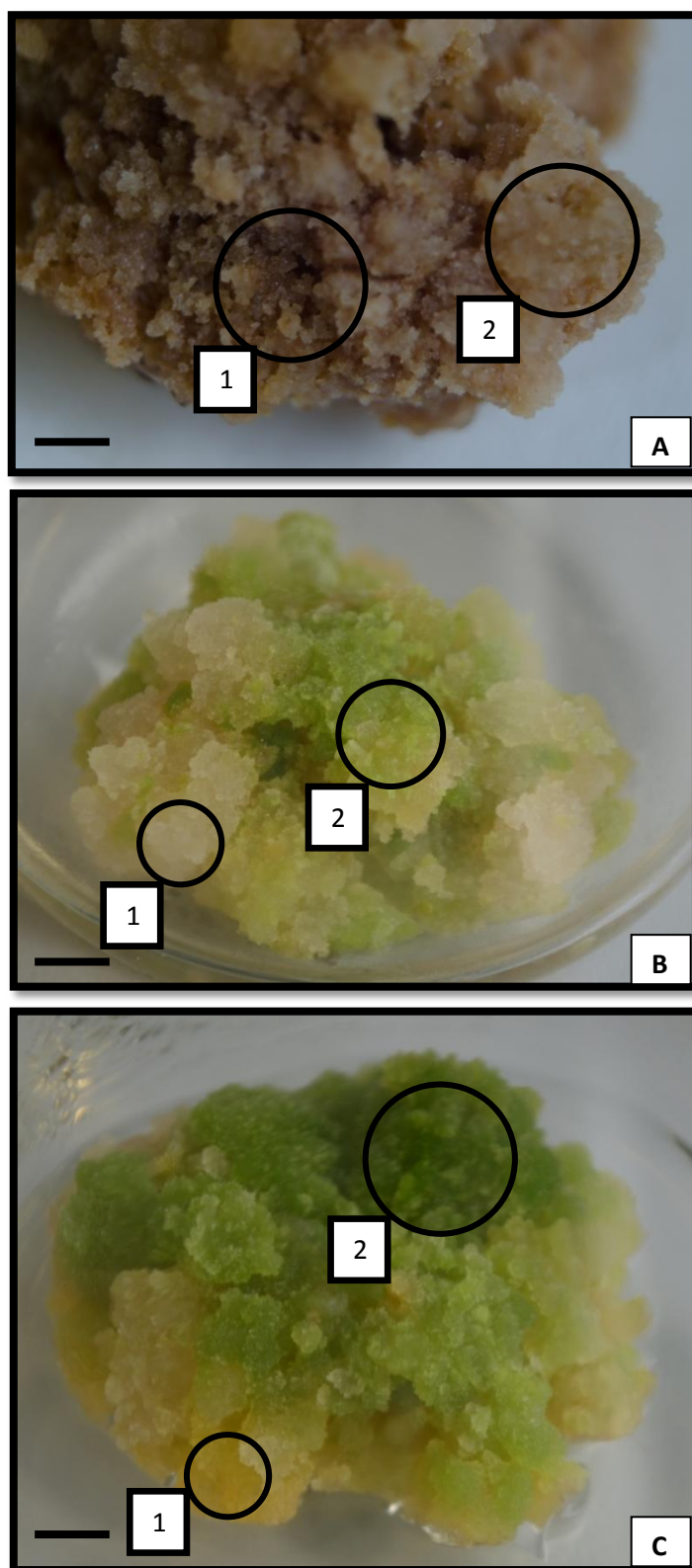
Byla vytvořena škála čtyř hodnotících kritérií přírůstku kalusů. Kontrola byla prováděná každých 14 ± 4 dní od posledního pasážování. Symbol (-) charakterizoval kalus nepřirůstající, (+) označoval kalus, který nabyl na objemu nově přirostlých buněk o méně jak o polovinu své původní velikosti. Přírůstek kalusů (++) tvořil minimálně dvojnásobek poloviny původního objemu a kalusy (+++) zvětšily svůj objem nově přirostlými buňkami více jak o trojnásobek své původní velikosti.

Strukturou byla označena drobitost nebo kompaktnost shluku vzniklých buněk. Kompaktními (Obrázek 5. B) byly označeny kalusy, které bylo možné během pasážování vyzvednout jako celek, a k dělení je bylo potřeba nařezat skalpelem. Zatímco drobitý (Obrázek 5. A) kalus nebylo možné vyzvednout v celku a při práci se vlivem tlaku pinzety shluk buněk rozpadl.

Hodnocení kalusu pod mikroskopem

K pravidelnému hodnocení vývoje kalusu byly používány roztlakové preparáty. V sterilních podmínkách flow boxu byly odebírány části kalusu (o velikosti zhruba 1 – 2 mm³), které vykazovaly vizuální změny oproti okolnímu kalusu. Následně byly tyto části položeny na podložní mikroskopické sklíčko, zakápnuty acetokarmínem a roztlačeny krycím sklíčkem. Vzniklý preparát byl pozorován optickým mikroskopem při 100 násobném zvětšení. Byly hledány meristematická centra, tzn místa s nejvyšší buněčnou aktivitou (Obrázek 4.).

Kritéria hodnocení barvy



Obrázek 2.: Barvy kalusů *P. volubilis*: **A 1** Hnedý kalus (H). **A 2** Světle hnedý kalus (SH). **B 1** Bílý kalus (B). **B 2** Světle zelený kalus (SZ). **C 1** Světle žlutý kalus (SŽ). Zelený kalus (Z). Úsečka v obrázcích odpovídá 5 mm.

6. Výsledky

6.1. Sterilizace explantátů

Při sterilizaci explantátů bylo postupováno dle sterilizačního protokolu Pilco (2014), který byl během procesu optimalizován. K lepšímu smáčení povrchu rostlinného materiálu byl použit 96% etanol po dobu 30 sekund, poté následovalo následné ponoření explantátu do roztoku chlornanu sodného po dobu 10 minut. V rámci pokusů byla stanovena optimální koncentrace NaClO na 1% roztok, zvyšování koncentrace mělo i při kratším časovém intervalu fatální účinky na rostlinná pletiva, která byla vysokou koncentrací NaClO spálena. Tato koncentrace se ukázala jako dostačující při sterilizaci rostlinného materiálu pěstovaném v pokojových podmínkách. Pokus ukázal, že také méně vyztřálá pletiva, která jsou obecněji vhodnější pro odvození kalusových kultur, zvládala 10 minutovou sterilizaci 1% roztokem bez ztráty vitality.

6.2. Odvození kalusových kultur

Tabulka 4.: Tabulka úspěšnosti indukce kalusu *P. volubilis*.

Označení	Struktura	Barva	Růst	Úspěšnost indukce
1	kompaktní	B-SŽ	++	100%
2	drobivá	SŽ	+++	100%
3	drobivá	SZ	+++	100%
4	kompaktní	Ž	+	100%
5	kompaktní	SŽ	+	20%
6	kompaktní	SŽ	++	100%
7	drobivá	B-SŽ	+	20%

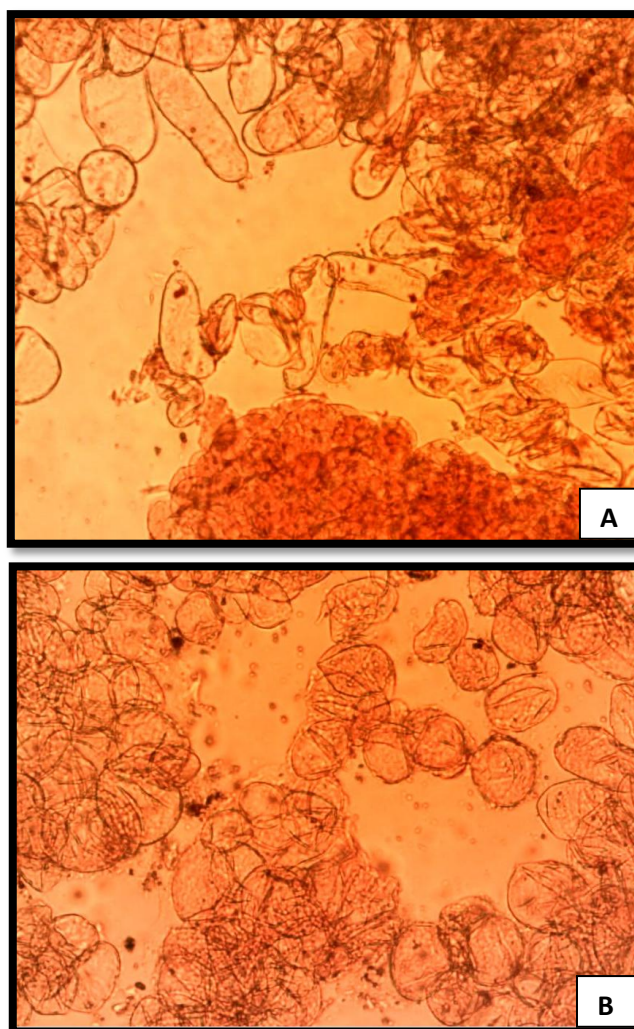
Koncentrace hormonů viz Kapitola 5. 1., Tabulka 1.

Indukce kalusu *P. volubilis* L. byla vyvolána na bazálním MS médiu z řapíku pravých a děložních listů. Na médiích I 1 a I 2 byl kalus odvozován z řapíku pravých a děložních listů, zatímco na médiích I 3 – I 7 byl kalus odvozen z řapíku pravých listů. Z celkového počtu 6 fenotypů se kalus podařilo odvodit u všech fenotypů, nebyly pozorovány změny přírůstku mezi jednotlivými fenotypy a typem použitého materiálu.

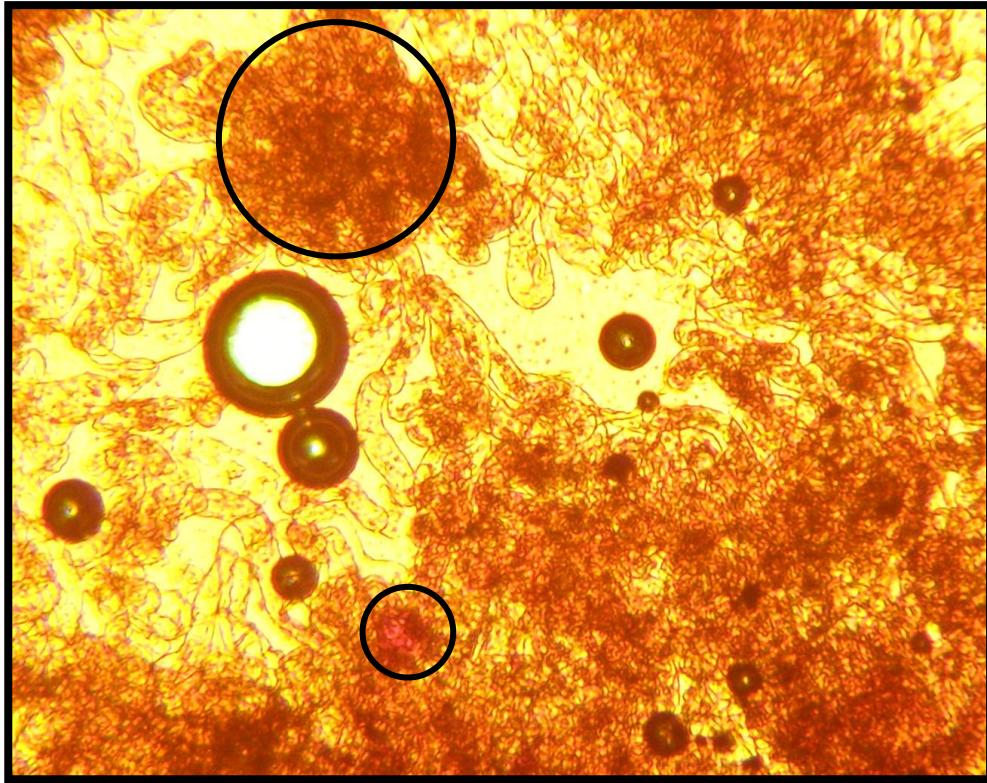
Nejlépe se projevilo médium I 2 a I 3 (s auxiny 2,4-D; Dicamba). Médium s použitým cytokininem BAP vykazovalo rychlejší degradaci a stárnutí pletiv v porovnání s médiem obsahujícím cytokinin TDZ, kalus na nich však přirůstal s nejvyšší intenzitou ze všech testovaných médií. Jako nejméně vhodné médium k indukci kalusu se ukázalo médium I 7 (Picloram), na kterém se podařilo indukovat jediný kalus. Kalusy na médiu I 1, I 2, I 3 a I 6 byly použity v dalších fázích množení.

U kultur kalusů, které byly odvozeny na bazálních médiích I 1 a I 2 jako první, bylo po 6 měsících od odvození kalusu pozorováno výrazné stárnutí a změna struktury, kompaktní kalusy se staly více drobnými. Má se za to, že by bylo potřebné k dalšímu zachování těchto kultur pozměnit složení média nebo upravit koncentraci fytohormonů.

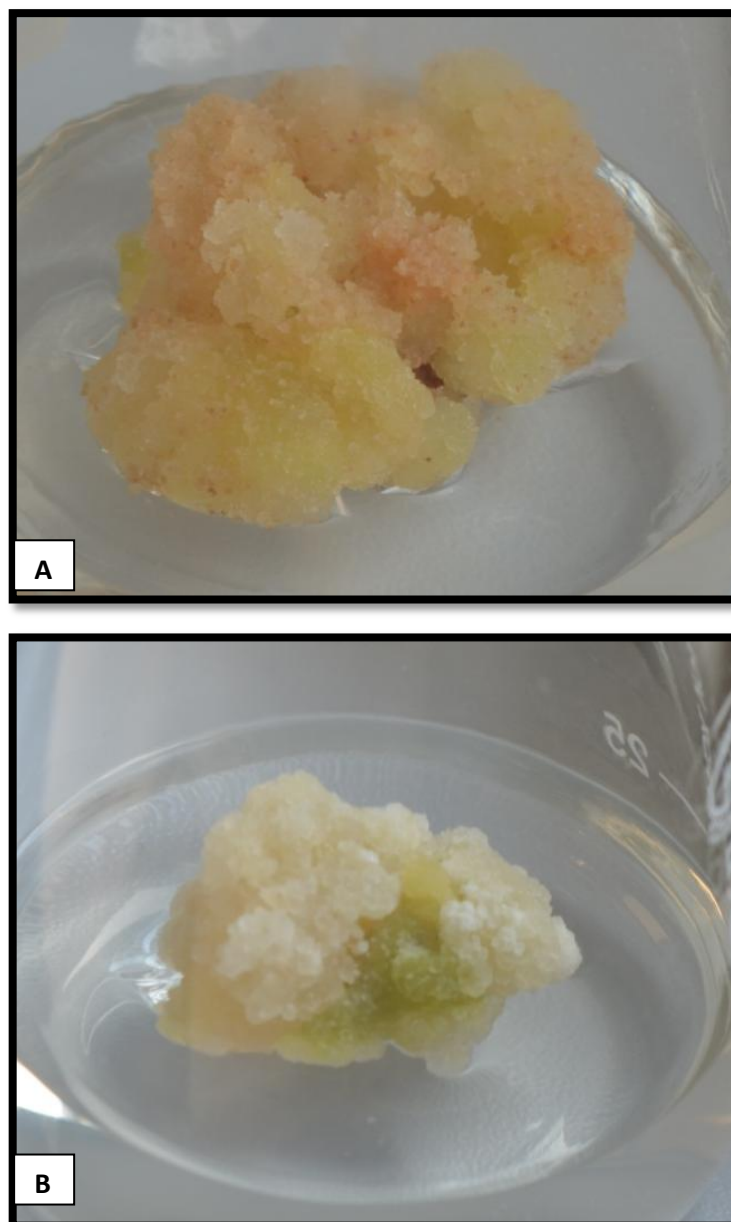
Výrazná odlišnost byla pozorována ve tvaru buněk kalusu při sledování v mikroskopu, které se výrazně lišily u řapíků z pravých (Obrázek 3. B) a z děložních listů (Obrázek 4. A). Řapíky z pravých listů tvořily buňky více okrouhlé, řapíky z děložních listů naopak buňky protáhlé, které jsou obecně vhodnější k indukci somatických embryí. Ani na jednom z iniciačních médií nebyl po celou dobu kultivace pozorován vznik raných somatických embryí i navzdory tomu, že byl pozorován vznik meristemických center (Obrázek 4.).



Obrázek 3.: Vzhled buněk kalusu odvozených z řapíku děložního a pravého listu: **A** Kalus z řapíku děložního listu po 45 dnech kultivace na médiu M 4, který byl indukovaný na médiu I 1, zvětšení 100×; **B** Kalus z řapíku pravého listu po 60 dnech kultivace na médiu M 5, který byl indukovaný na médiu I 2, zvětšení 100×.



Obrázek 4.: Vznik meristematických center: Zvýrazněné oblasti ukazují meristematické centra kalusu odvozeného z řapíku děložního listu po 66 dnech kultivace na médiu I 1, zvětšení 100×, Vzorek byl obarven acetokarminem.



Obrázek 5.: Indukce kalusu *P.volubilis*. **A** Drobivý kalus indukovaný na MS + 0,1 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,05 mg.l⁻¹ BAP 39 dní od zavedení po dvou pasážováních, **B** Kompaktní kalus indukovaný na MS + 0,1 mg.l⁻¹ 2,4-D 56 dní od zavedení po třech pasážováních.

6.3. Vliv fytohormonů na proliferaci kalusů a indukci somatických embryí

Tabulka 5.: Tabulka vyzkoušených proliferačních médií.

Označení				Indukovaná somatická embrya
P	Struktura	Růst	Barva	
1	drobivá	-	SH-H	0
2	drobivá	++	B-Ž	0
3	drobivá	++	Ž-SH	0
4	drobivá	+++	Ž-SH	0
5	drobivá	++	Ž-SH	0
6	drobivá	+++	Ž-SH	0
7	drobivá	++	Ž-SH	0
8	drobivá	+++	Ž-SH	0
9	drobivá	++	SH-H	0
10	drobivá	++	SŽ-Ž	0
11	drobivá	++	Ž-SH	0
12	drobivá	+++	SŽ-SH	0
13	drobivá	+	Ž-SH	0
14	drobivá	++	Ž-SH	0
15	drobivá	+++	SŽ-SZ	0
16	drobivá	++	SŽ-SZ	0
17	drobivá	++	SŽ-SZ	0
18	drobivá	+	SŽ-SH	0
19	drobivá	-	SŽ-H	0
20	drobivá	-	SŽ-H	0
21	drobivá	+	Z-SH	0
22	drobivá	++	Z-SH	0
23	drobivá	++	SH-H	0
24	drobivá	++	Z-SH	0
25	drobivá	++	Z-SH	0
26	drobivá	++	B-SŽ	0
27	drobivá	+++	B-SŽ	0
28	drobivá	++	B-SŽ	0
29	drobivá	+	SŽ-SH	0
30	drobivá	+	SŽ-SH	0
31	drobivá	-	SŽ-H	0
32	drobivá	-	SH-H	0
33	drobivá	+	SŽ-SH	0
34	drobivá	++	Ž-SH	0
35	drobivá	++	Ž-SH	0
36	drobivá	++	SŽ-SZ	0
37	drobivá	+++	SŽ-SZ	0
38	drobivá	++	Z-SH	0

Tabulka 6.: Tabulka vyzkoušených maturačních médií.

Označení			Indukovaná somatická embrya
M	Struktura	Růst	
1	drobivá	-	0
2	drobivá	++	0
3	drobivá	+++	0
4	drobivá	++	0
5	drobivá	+++	0
6	drobivá	++	0
7	drobivá	+++	0
8	drobivá	++	0
9	drobivá	+	0
10	drobivá	++	0
11	drobivá	+	0
12	drobivá	-	0
13	drobivá	-	0
14	drobivá	+	0
15	drobivá	++	0
16	drobivá	+++	0
17	drobivá	+	0
18	drobivá	++	0
19	drobivá	+++	0
20	drobivá	++	0
21	drobivá	++	0
22	drobivá	+	0
23	drobivá	-	0
24	drobivá	-	0
25	drobivá	+	0
26	drobivá	++	0
27	drobivá	++	0
28	drobivá	++	0
29	drobivá	++	0
30	drobivá	++	0
31	drobivá	+++	0
32	drobivá	++	0
33	drobivá	+	0
34	drobivá	+	0
35	drobivá	-	0
36	drobivá	-	0
37	drobivá	+	0
38	drobivá	++	0
39	drobivá	++	0
40	drobivá	++	0
41	drobivá	+++	0
42	drobivá	++	0

Po úspěšné indukci kalusu byly vybrané části přeneseny na proliferační médium pro další růst a případné formování somatických embryí (Tabulka 2.). Nejlépe přirůstaly kalusy kultivované na médiích s použitým cytokininem TDZ (P 12, P 15, P 37). Z výsledků vyplývá, že vliv na rychlost přírůstu neměl poměr použitých fytohormonů (v $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), ale jejich koncentrace použité v médiu. Poměr 1:1 při koncentraci hormonů $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ měl v médiu P 12 za následek kalus drobné struktury bez známek diferenciaci, který si během celé doby kultivace zachovával světle žlutou až světle hnědou barvu. Kalusy kultivované při snížené koncentraci fytohormonů (médium P 15) vykazovaly také drobnou strukturu, byly více diferencované a byl na nich pozorován vznik meristemických center. Při plné koncentraci solí v živném médiu a zvyšování koncentrace cytokininů TDZ (médium P 16) se růst kalusu zpomaloval, na rozdíl od MS média s poloviční koncentrací solí. Dobrý přírůstek kalusu byl pozorován taktéž na médiích s použitím cytokininů BAP (P 4, P 6, P 8). Pokusy ukázaly, že poměr jednotlivých fytohormonů nemá na strukturu kalusu zásadní vliv, ale je zásadní pro udržení dlouhodobé životaschopnosti kalusu. Vyšší koncentrace cytokininů vykazovaly vyšší přírůstek kalusu, ale kalusy se rychle staly nekrotickými a odumřely. Z médií, kde byl jako auxin použit Pikloram, se vzhledem k nejlepšímu přírůstu ukázala koncentrace $0,2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Picloramu, kalusy vykazovaly na těchto médiích drobnou strukturu a udržovaly si bílou až světle žlutou barvu během celé doby kultivace.

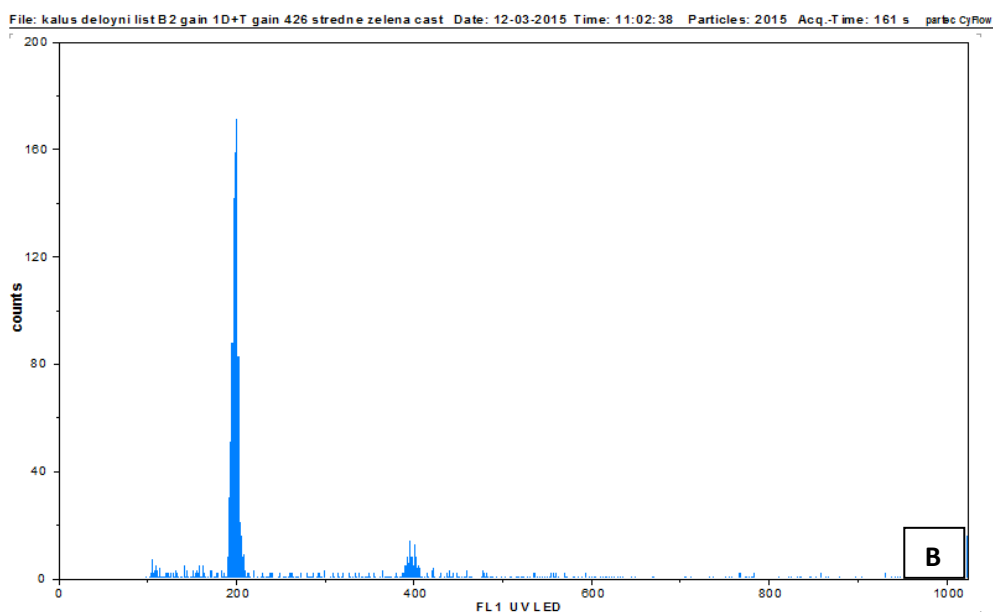
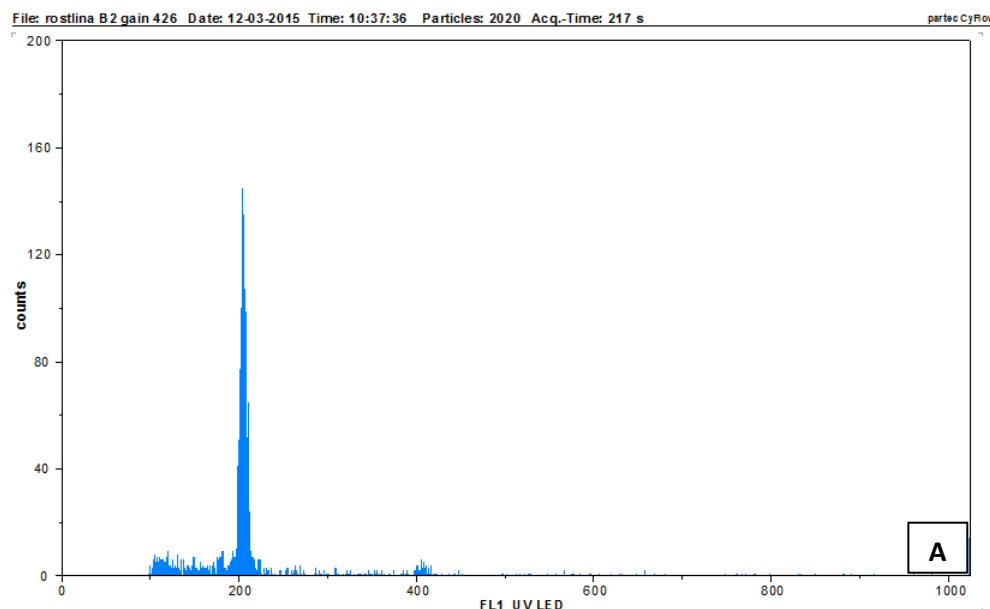
Po úspěšné proliferaci, kdy se během růstu kalusů zakládaly rané stádia embryí a vznikaly tak zárodky somatických embryí, by měly tyto raná stádia embryí na vhodném maturačním médiu růst a dozrát do životaschopných klíčících embryí. Z tohoto důvodu byly části kalusů přeneseny na maturační média (Tabulka 3.). Ani na jednom z použitých maturačních médií nebyla pozorována, během probíhající maturace, prorůstající somatická embrya.

6.4. Ověření genetické stability pomocí průtokové cytometrie

Hodnocením genetické stability pomocí průtokového cytometru se podařilo potvrdit, že během procesu kultivace nedochází ke změnám genetické struktury kalusů *P. volubilis* L.. Toto zjištění vychází ze získaných histogramů relativní velikosti jaderné DNA měřených vzorků listů výchozích rostlin a z nich odvozených kultivovaných kalusů. Získané histogramy měly ve všech zkoumaných vzorcích shodně vrcholy na stejné pozici na vodorovné ose histogramu, což odpovídá stavu nezměněného genomu buněk během procesu pěstování v *in vitro* podmínkách.

Obrázek 6. A odpovídá velikosti jader ve fázi G₀/G₁ buněčného cyklu vzorku odebraného z pravého listu původní rostliny, Obrázek 6. B představuje vzorek velikosti jader kalusu *P. volubilis* L. ve G₀/G₁ fázi. DNA původní rostliny a kalusu, kultivovaných na různých kultivačních

médiích, se teda nelišila. V případě odlišnosti velikosti genomu kalusu oproti rostlině by na Obrázku 6. B vykazoval vrchol G1 posun na vodorovné ose histogramu oproti vrcholu G1 na Obrázku 6. A.



Obrázek 6.: Průtoková cytometrie: **A** Grafický výstup z průtokového cytometru vyhodnocen softwarem FloMax (Partec, GmbH, Münster, Německo) pro pravý list rostliny. **B** Grafický výstup z průtokového cytometru vyhodnocen softwarem FloMax (Partec, GmbH, Münster, Německo) pro kalus děložního listu odvozený na médiu I 2, kultivaci po dobu 45 dnů na médiu P 38, a následném přepasážování na P 11, kde byl vzorek odebrán po 64 dnech kultivace.

7. Diskuze

Výhodou *in vitro* množení, a zejména množení pomocí somatické embryogeneze, je při úspěšně zvládnutém protokolu dosaženo značného multiplikačního koeficientu množení v krátkém časovém intervalu. Mimo to, je možné rostliny množit během celého roku, což představuje značnou výhodu oproti běžným generativním a vegetativním metodám množení.

Cílem práce bylo obeznámení se s problematikou kalusových kultur a zároveň zhodnocení vlivu různých fytohormonů při růstu a multiplikaci embryogenních pletiv *Plukenetia volubilis* L.. Experiment byl rozdělen do tří fází: fáze sterilizace, odvození embryogenních kultur a jejich následná proliferace a maturace.

7.1. Sterilizace výchozího rostlinného materiálu

Při povrchové sterilizaci je nutné dezinfikovat odebranou tkáň z matěřského jedince s minimálním množstvím poškození buněk. K sterilizaci rostlinného materiálu se v běžné praxi používá roztok chlornanu sodného pro jeho nižší netoxičnost, oproti činidlům na bázi rtuti, která jsou velmi toxická. Chlornanu rtuťnatého se využívá hlavně u citlivého materiálu na sterilizaci (mladá nevyzrálá pletiva), jelikož méně poškozuje rostlinná pletiva a dobře působí proti kontaminacím vzorku. Táto problematika je bližšie popsaná v kapitole 3.2. V praxi je používaná koncentrace NaClO od 0,5% až po 20% v roztoku Rai a Misra (2003) po rôznu dobu pôsobení sterilizace. Ta závisí hlavně na období, v kterém byl rostlinný materiál odebrán. Autoři Gamborg a Phillips (1995) uvádí, že nejideálnější je odebrání rostlinného materiálu ještě před létem, jelikož na něm neulpělo mnoho patogenů.

V pokusech se ukázala jako dostatečná koncentrace 1% NaClO pro sterilizaci rostlinného materiálu, odebraného z rostlin pěstovaných v pokojových podmínkách. Optimální časový interval sterilizace byl pokusně stanoven na dobu 10 min. Prodlužování doby sterilizace mělo výrazný vliv na přežívání rostlinného materiálu, který byl delší dobou působení NaClO poškozen. Zkracování doby sterilizace vedlo k výrazné kontaminaci explantátů.

7.2. Indukce embryogenních kultur

V této studii se podařilo indukovat kalusy kompaktní a drobivé struktury (Tabulka 1.) Kompaktní vykazovaly nižší rychlost růstu ve srovnání s drobivými kalusy. Studie mnoha autorů naznačují, že embryogenní kalusy mají většinou drobivou strukturu, což ale nemusí být pravidlem. Autorům Mohajer et al. (2012) se podařilo indukovat somatická embrya *Onobrychis sativa* z kompaktního kalusu indukovaném na MS médiu s přidavkem BAP a IBA v různých koncentracích.

Na indukovaných kalusech byly pozorovány podobné vlastnosti s embryogenními kalusy jako v pracích autorů Mathews et al., 1993; Raemaekers et al., 2001; Iqbal et al., 2011. K začátku indukce kalusu došlo u všech variant médií do 16 dnů od zavedení, což ukazuje na rychlou reakci tvorby kalusu ve srovnání s jinými druhy z čeledi *Euphorbiaceae*. Jedině na médiu s použitím Picloramu se kalus začal vytvářet až po 25 dnech inkubace. Meristematická centra byla pozorována na médiích s použitím cytokininu TDZ nebo BAP. TDZ tvořil kalus drobné struktury, který si udržoval vysokou životaschopnost a světle zelenou až zelenou barvu. Kalusy odvozené v kombinaci s cytokininem BAP měly tendenci k rychlému stárnutí, jejich barva se měnila ze světle žluté přes světle hnědou až po hnědou. Jelikož se po celou dobu provádění pokusů nepodařilo odvodit somatická embrya, je možné se domnívat, že je zapotřebí použít jiné fytohormony, případně použít jiné zastoupení mikro a makroprvků v kultivačním médiu. Lo Schiavo et al. (1989) popisují synergický účinek auxinu, jako například 2,4-D, který hraje zásadní roli v indukci embryogenních kultur, v jehož důsledku dochází k různým vlivům ve tkáních explantátu, způsobených tímto růstovým regulátorem. Kromě role auxinů při dělení a diferenciaci buněk, způsobují auxiny epigenetické změny v DNA rostlin změnou stavu methylace, což naznačuje, že vzhled diferencovaných buněk je podobný buňkám embryogenním (Smulders a Klerk, 2011). Také koncentrace dodaných hormonů v médiu může určit reakci buněk, jak uvádí Anandan et al. (2012), který tvrdí, že tvorba embryogenních kultur (drobný kalus s bílou barvou) *Carica papaya* L. byla ovlivněna množstvím přidaného 2,4-D. Při vysokých koncentracích ($54,3 \mu\text{M.l}^{-1}$) vznikl kalus neembryogenní nedrolivý, tmavě zbarvený.

7.3. Proliferace a zrání embryogenních kultur

Některé druhy rostlin vyžadují pro optimální reakci doplnění cytokininů spolu s auxiny, aby se zabránilo nekrotizaci kalusů. Tento požadavek na přítomnost exogenních cytokininů by mohla být spojena s udržováním vhodné rovnováhy mezi auxiny a cytokininy, jež působí synergicky a regulují tak buněčné dělení. Cytokininy dodávány rostlinným buňkám nejen stimulují dělení buňek prostřednictvím regulace specifických genů, ale také působí při snížení integrity buněčných membrán, což může mít za následek formování buněk v meristematická centra, která se přímo podílejí na vzniku somatických embryí (Omar, 2003).

Během provedených pokusů změnilly všechny kalusy vlivem použitých proliferačních (Tabulka 2.) a maturačních (Tabulka 3.) médií svoji strukturu, která se stala drobnou. Na růst kultur nejlépe působila média I 15 ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) a I 37 ($0,3 \text{ mg.l}^{-1}$) s nízkou koncentrací cytokininu TDZ v kombinaci s $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA. Vysoké koncentrace TDZ bez dodání exogenních auxinů měly na kalusy nepříznivý vliv, který se projevil jejich rychlou nekrotizací. Podobně cytokinin BAP se na růst ve vysokých koncentracích ($1,8 \text{ mg.l}^{-1}$; 3 mg.l^{-1}) projevil inhibičně. Bylo zjištěno, že

Pikloram působící jako auxin, měl na růst buněk při iniciaci kalusu *P. volubilis* negativní vliv, kdy se podařilo odvodit jediný kalus (Tabulka 1.). Pokud byl tento fytohormon použit při proliferaci, vykazovaly buňky dobrý růst, udržovaly si bílou až světle žlutou barvu během celé doby kultivace. Největší přírůstek ze zkoumané škály vykazovala koncentrace $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ Picloramu, avšak nedošlo k tvorbě embryí, na rozdíl od práce autorů Kordestani a Karami (2008), kterým se podařilo na MS médiu obohaceno o 2 mg.l^{-1} Picloramu odvodit embryogenní kalus *Fragaria ananassa* L.

Sacharóza je v *in vitro* kulturách zdrojem uhlíku, ve vyšších koncentracích působí jako osmotikum, což dokázala řada autorů (Coffin et al., 1976; Richard et al., 2002). Kordestani a Karami (2008) použili k indukci kalusu a vzniku somatických embryí MS médium obohaceno o různé koncentrace sacharózy, kdy zvýšení koncentrace sacharózy až na hodnotu 80 g.l^{-1} mělo za následek zvýšení počtu vzniklých somatických embryí. V této práci byla vyzkoušená koncentrace 80 g.l^{-1} sacharózy v médiích bez rostlinných růstových hormonů, avšak účinek zvýšené koncentrace sacharózy se neprojevil na formování somatických embryí. Podobná koncentrace sacharózy na médiu s přídavkem $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ 2,4-D a 6 mg.l^{-1} BAP zpomalila stárnutí kalusu, avšak vyvíjející se embrya ani v tomto případě nebyla na kalusech pozorována.

Za předpokladu, že je odvozený kalus embryogenní, musí projít ještě dalším zráním, na kterém se podílí celá škála procesů a látek. Přidáním promotorů, jako je například PEG (Siang et al., 2012; Stasolla et al., 2003), kyselina abscisová (Siang et al., 2012; Thilaga et al., 2013), kyselina gibberelová (Kordestani a Karami, 2008) a aktivní uhlí (Taylor et al., 2001), má zásadní význam pro podporu zrajících somatických embryí a jejich přeměnu v rostliny. Úspěšného vývoje somatických embryí je někdy dosaženo pouhou změnou fytohormonů koncentrace stejných jako při indukci kalusu.

Je dokázáno, že díky účinku PEGu v rostlinných tkáních, nedojde k poškození pletiv v souvislosti s nestálým vodním stresem (Stasolla et al., 2003). V této studii byly sledovány dvě koncentrace PEG v kombinaci s ABA - 60 g.l^{-1} PEG s přídavkem 10 mg.l^{-1} ABA a 80 g.l^{-1} PEG s přídavkem 20 mg.l^{-1} ABA. Kalusy na médiu s vyšší koncentrací PEG se staly nekrotické a odumřely do 10 ± 4 dnů od zavedení kultury na médium. Kalusy na médiu s koncentrací 60 g.l^{-1} PEG 6000 přežívaly ale ani po 60 dnech kultivace se na kalusu somatická embrya nevytvořila.

Langhansov et al. (2004), dospěl k závěru, že somatická embrya *Panax ginseng*, kultivovaná na médiu doplněném o PEG byla schopna dosáhnout větší strukturální rozvoj, což bylo prokázáno pozorováním jejich anatomie během jejich vývoje. Tito autoři také zjistili, že rostliny získané z živných médií obsahujících PEG, vytvářely následně více kořenů, což usnadnilo jejich následný přenos do podmínek *ex vitro* a jejich aklimatizaci. Koehler et al. (2013) uvádějí, že přidání

50 g.l⁻¹ PEG 6000, spolu s 2 g.l⁻¹ aktivního uhlí a 5 µg.l⁻¹ ABA, vedlo ke zlepšení kvality somatických embryí *Carica papaya* a lepšímu formování vzniklých rostlin. Tyto studie naznačují, že PEG je jedním z induktorů zrání v procesu vývoje somatických embryí.

8. Závěr

Plukenetie volubilis L. má značný hospodářský potenciál, který není v dnešní době využit pro nedostatek rostlinného materiálu na trhu. I přes to, že je poměrně dobře zvládnut protokol množení *in vitro* *P. volubilis* L. prostřednictvím prýtlů, množství vyprodukovaného rostlinného materiálu ani zdaleka nepokryje celý potenciaální trh. Tento problém by mohl vyřešit úspěšně zvládnutý protokol somatické embryogeneze.

V práci jsem se zaměřil na odvození, růst a dozrávání kalusových kultur *P. volubilis* L. Vzorky byly každých 14 dní pravidelně pasážovány, během celé doby kultivace byly u vzorků sledována kritéria přírůstu kalusů, tvorby embryí a barvy kalusů. Pokusy prováděné na rostlinném materiálu přinesly řadu nových výsledků a poznání.

Výzkum určil jako optimální koncentraci NaClO v procesu sterilizace 1% roztok po dobu trvání 10 minut, který se ukázal dostačující, bez ztráty vitality rostlinného materiálu a vzniku kontaminací explantátu na médiu.

Sterilní materiál, jehož zdrojem byly řapíky pravých a děložních listů, byl přenesen na iniciační média. Kalus se podařilo odvodit na všech navržených indukčních médiích, výrazně se ale lišily účinky médií v počtu zdařilých indukcí a přírůstu kalusu. Nejlépe přirůstaly kalusy na médiích, u kterých byl použit cytokinin BAP a TDZ. Na těchto médiích tvořily kultury drobný kalus, který by měl být vhodný k odvození somatických embryí.

Po úspěšné indukci kalusu následovala fáze proliferace, kdy se jako nejlépe osvědčila média s použitým cytokininem TDZ (MS + 1 mg.l⁻¹ Dicamba + 1 mg.l⁻¹ TDZ; MS + 0,1 mg.l⁻¹ NAA + 0,1 mg.l⁻¹ TDZ; ½ MS + 0,1 mg.l⁻¹ NAA + 0,3 mg.l⁻¹ TDZ) pro jejich rychlý přírůst kalusu. V této fázi je nutné, aby v kalusu vznikala meristematická centra pro tvorbu raných stádií somatických embryí. Tyto meristematická centra byla pozorována na některých typech kalusů, které rostly na médiích obsahujících nízké koncentrace TDZ.

I přesto, že byla vyzkoušena široká škála fytohormonů a jejich koncentrací, nepodařilo se navodit další proces vývoje somatických embryí. Je proto zapotřebí další výzkum, při kterém by bylo vhodné se zaměřit například na jiná, v praxi používaná média (B6, NN). Rozšířit škálu fytohormonů a určit konkrétnější koncentrace vyhovující druhu *P. volubilis* L. při procesu množení pomocí somatické embryogeneze.

9. Přílohy

Tabulka 7.: Složení MS (Murashige a Skoog, 1962) média.

MS			
		koncentrace [g.l] ⁻¹	Množství zásobního roztoku na 1l média [ml]
Makroživiny	KNO ₃	19	100
	NH ₄ NO ₃	16,5	100
	CaCl ₂	3,3	100
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,7	100
	KH ₂ PO ₄	1,7	100
	Na ₂ EDTA	3,72	10
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	2,78	10
Mikroživiny	H ₃ BO ₃	0,62	10
	MnSO ₄ x 4H ₂ O	2,23	10
	ZnSO ₄ x 4H ₂ O	0,86	10
	KI	0,083	10
	Na ₂ MoO ₄ x 4H ₂ O	0,025	10
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0025	10
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,0025	10
Vitamíny	Thiamin	0,01	10
	Kyselina nikotinová	0,05	10
	Pyridoxin	0,05	10
	Myoinositol	0,01	
Ostatní složky média	Glycin	0,2	10
	Sacharoza	30	
	Agar	8	

10. Přehled použité literatury

- [1]. Al-Wasel S. 2000: Micropropagation of *Acacia seyal* Del. in vitro. *Journal of Arid Environments* 46: 425-431.
- [2]. Anandan R., Sudhakar D., Balasubramanian P., Gutierrez-Mora A. 2012: In vitro somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. *Scientia Horticulturae* 136: 43-49.
- [3]. Ang H., Tan L., Chan L. 2004: Effect of reduced N 6 -Benzyladenine, explant type, explant orientation, culture temperature and culture vessel type on regeneration of adventitious shoot and in vitro plantlets of *Spilanthes acmella*. *Journal of Plant Biology*, Vol. 47 (1), pp. 15-20.
- [4]. Becwar M. R., Wann S.R., Johnson M.A., Verhagen S.A., Feier R.P., Nagmani R. 1988: Development and characterization of *in vitro* embryogenic systems in conifers. In: *Somatic Cell Genetics of Woody Plants*. Ed. Ahuja M. R., Kluwer Academic publishers, Dordrecht, 1988, p. 1-18.
- [5]. Beyl C. A. 2005: *Getting Started with Tissue Culture: Media Preparation, Sterile Technique, and Laboratory Equipment*. CRC Press LLC, London, p. 27. ISBN 0-8493-1614-6.
- [6]. Bordignon S. R., Ambrosano G.M.B., Rodrigues P.H.V. 2012: In vitro propagation of *Sacha inchi*, *Ciência Rural. Santa Maria*, v. 42, n. 7, 1168-1172, ISSN 0103-8478.
- [7]. Brack E. A. 1999: *Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú.*- PNUD - CBC, Cusco.
- [8]. Brako L., Zarucchi J. L. 1993: *Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 45: i-xi, 1-1286.
- [9]. Bussmann R.W., Tellez C., Glenn A. 2009: *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (*Euphorbiaceae*) from the upper Amazon of Peru. *Nordic Journal of Botany* 27: 313-315.
- [10]. Cai Z. Q., Wang H., Yang J., Cai C.T. 2009: Growth, photosynthesis and root reserpine concentrations of two *Rauvolfia* species in response to a light gradient. *Ind. Crops Prod.* 30: 220-226.
- [11]. Centro de Investigación, Educación y Desarrollo (CIED) 2007: *Cultivo del Sacha inchi*. Liberio Ríos Artes Gráficas. Huancayo, Perú.
- [12]. Céspedes E. I. M. 2006: *Cultivo de Sacha Inchi*. Tarapoto, San Martín, Peru: INIIA, Subdirección De Recursos Genéticos Y Biotecnología: 11 p.
- [13]. Coffin R., Taper C. D., Chong C. 1976: Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. *Canadian Journal of Botany* 54: 547-551.
- [14]. Davies P. J. 1987: *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions, Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 681 p.
- [15]. Dicosmo F., Misawa M. 1995: Plant cell and tissue culture alternative for metabolite production. *Biotechnology Advances* 13(3): 425-453.
- [16]. Dirección Regional Agraria San Martín (DRASAM) 2008: *Cadena productiva de sachá inchi en la Región San Martín*. Gobierno Regional de San Martín.
- [17]. Dodds J. H., Roberts L.W. 1995: *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University, Press 2nd ed., ISBN 0521304784.
- [18]. Doležel J., Johann Greilhuber J., Suda J. 2007: Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2, 2233-2244.

- [19]. Epstein E., Chen K.H., Cohen J.D. 1989: Identification of indole-3-butyric acid as an endogenous constituent of maize kernels and leaves. *Plant Growth Regulation* 8: 215-223.
- [20]. Fanali C., Dugu L., Cacciola F., Beccaria M., Grasso S., Dachá M., Dugo P., Mondello L. 2011: Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 13043-13049.
- [21]. Feitosa T., Bastos J.L.P., Ponte L. F. A., Jucá T. L., Campos F.A.P. 2007: Somatic Embryogenesis in Cassava Genotypes from the Northeast of Brazil. *An International Journal*, 50 pp. 201-206.
- [22]. Finer J. J., Kriebel H.B., Becwar M.R. 1989: Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Plant Cell Reports* 8: 203-206.
- [23]. Fiuk A., Rybezyński J. J. 2008: Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 44: 90-99.
- [24]. Gamborg O. L., Phillips G. 1995: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 25.s, ISBN 3-540-58068-9.
- [25]. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. 1968: Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- [26]. George E. F., Sherrington P. D. 1984: *Plant propagation by tissue culture : handbook and directory of commercial laboratories*, Basingstoke : Exegetics, ISBN 0950932507 (hbk.).
- [27]. Gillespie L. J., 1993: A synopsis of Neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species. *Systematic Botany* 18: 575-592.
- [28]. Gillespie L. J. 1994: Pollen morphology and phylogeny of the tribe Plukenetieae (Euphorbiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 317-348.
- [29]. Gillespie L. J. 1999: *Plukenetia* L. In: Steyermark J., Berry P. E., Yatskievych K., Holst K. [eds]: *Flora of the Venezuelan Guayana Project*, Missouri Botanical Garden Press, 5: 207-211.
- [30]. Gillespie L. J. 2007: A revision of paleotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species from Madagascar. *Systematic Botany*. 32: 780-802.
- [31]. Girija S., Ganapathi A., Vengadesan G. 1999: Micropropagation of *Crossandra infundibuliformis* (L.) Nees. *Scientia Horticulturae* 82: 331-337.
- [32]. Gogus U., Smith C. 2010: Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science & Technology* 45: n-3, 417-436.
- [33]. Guillén M. D., Ruiz A., Cabo N., Chirinos R., Pascual G. 2003: Characterisation of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and H-1 NMR. Comparison with linseed oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 80: 755-762.
- [34]. Gutiérrez L.F., Rosada L.M., Jiménez A. 2011: Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas Aceites* 62: 76-83.
- [35]. Hakman I., Arnold S. 1988: Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce). *Physiological Plantarum* 72: 579-587
- [36]. Hamaker E., Valles C., Gilman R., Hardmeier R., Clark D., Garcia H. et al. 1992: Amino acid and fatty acid profile of the Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *American Association of Cereal Chemists* 69 (4): 461-465.

- [37]. Hanssen H. P., Schmitz-Hübsch M. 2011: Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) nut oil and its therapeutic and nutritional uses. In: Victor R. P., Ronald Ross W., Vinood B. P. [eds], Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. Academic Press, San Diego, 991-994, ISBN 978-0-12-375688-6
- [38]. Harry I. S., Thorpe T. A. 1994: Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of jack pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37 (2) 159-164.
- [39]. Heringer A.S., Vale E. M., Barroso T., Santa-Catarina C., Silveira V. 2013: Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 25 (2): 116-124, ISSN 2197-0025.
- [40]. Hrubíková K., Beťo M., Kutišová J., Tjarovská J., Gajdošová A., Ostrolucká G., Hricová A., Libiaková G. 2009: Explantátové kultúry rastlín. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra p. 127, ISBN 978-80-552-0323-2.
- [41]. Hussein S., Ibrahim R., Kiong A.L.P., Fadzillah N.M., Daud S.K. 2005: Micropropagation of *Eurycoma longifolia* jack via formation of somatic embryogenesis. *Asian Jurnal Plant Science* 4: 472-485.
- [42]. Chacón K. R. 2014: Producción y demanda del aceite vegetal de Sacha Inchi. online: <http://www.monografias.com/trabajos57/aceite-vegetal-sacha-inchi/aceite-vegetal-sachainchi.shtml> cit. 20.07.2014.
- [43]. Chirinos R., Zuloeta G., Pedreschi R., Mignolet E., Larondelle Y., Campos D. 2013: Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry* 141: 1732-1739.
- [44]. Choi Y.E., Kim J.W., Yoon E.S. 1999: High frequency of plant production via static embryogenesis from casus or cell suspension cultures in *Eleutheracoccus sentiosus*. *Annals Botany* 83: 309-314.
- [45]. Iqbal M. M., Nazir F., Iqbal J., Tehrim S., Zafar Y. 2011: In vitro micropropagation of peanut (*Arachis hypogaea*) through direct somatic embryogenesis and callus culture. *International Journal of Agriculture and Biology* 13: 811-814.
- [46]. Jha T.B., Mukherjee P., Datta M.M. 2007: Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnol Rep* 1: 135-140.
- [47]. Koehler A.D., Carvalho C.R., Abreu I.S., Clarindo W.R. 2013: Somatic embryogenesis from leaf explants of hermaphrodite *Carica papaya*: A new approach for clonal propagation. *African Journal of Biotechnology* 12: 2386-2391.
- [48]. Kordestani G. K., Karami O. 2008: Picloram-induced somatic embryogenesis in leaves of strawberry (*Fragaria ananassa* L.). *Acta Biologica Cracoviensia Botanica* 50 (1): 69-72.
- [49]. Kovač J. 1992: Explantátové kultúry rastlín. Ústí nad Labem: Pedagogická fakulta UJEP, 1. vyd. 146 s. ISBN 80-7044-036-8.
- [50]. Krivankova B., Polesny Z., Lojka B., Lojkova J., Banout J., Preininger D. 2007: Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*, Euphorbiaceae): a promising oilseed crop from Peruvian Amazon, Utilisation of diversity in land use systems: Sustainable and organic approaches to meet human needs. Tropentag, Witzenhausen, Germany.
- [51]. Lagarda M. J., García-Llatas G., Farré R. 2006: Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1486-1496.
- [52]. Langhansov L, Konrdov H, Vanek T. 2004: Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell Reports* 22:725-730.

- [53]. Li CH. H., Liu B.G., Kim T.D., Moon H.K. & Choi Y.K. 2008: Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite genotypes of *Picea koraiensis*. *Plant Biotechnik Report* 2: 259-265.
- [54]. Lo Schiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nutironchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M. 1989: DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics* 77:325-331.
- [55]. Loyd G., McCown B. H. 1980: Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Int. Plant Prop. Soc., Comb. Proc.* 30: 421-427.
- [56]. Luštinec J., Zárský V. 2005: Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Nakladatelství Karolinum, Praha, 261 s, ISBN 80-246-0563-3.
- [57]. Manco E. 2006: Cultivo de sachá inchi. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA), San Martín, 86 p.
- [58]. Matkowski A. 2004: Isoflavonoid production in callus from different organs of (Wild.) Ohwi. *Journal of Plant Physiology* 161: 343-346.
- [59]. Martin K. P., Sunandakumair C., Chithra M., Mudhusoodanan P.V. 2005: Influence of Auxins in Direct In vitro Morphogenesis of *Euphorbia nivulia*, a Proteinaceous Medicinal Plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 41 (3): 314-319.
- [60]. Mathews H., Schopke C., Carcamo R., Chavarriaga P., Fauquet C., Beachy R. N. 1993: Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Reports* 12 (6): 328-333.
- [61]. Maurer N.E., Hatta-Sakoda B., Psacual-Chagman G., Rodriguez-Saona L.E. 2012: Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, Sachá Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chemistry* 134 (2): 1173-1180.
- [62]. Metzger J.D. 1987: Hormones and reproductive development. In: *Davis PJ*, (ed.) *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Boston: Martinus Nijhoff, 431-462.
- [63]. Mohajer S., Taha R. M., Khorasani A., Yaacob J. S. 2012: Induction of different types of callus and somatic embryogenesis in various explants of Sainfoin (*Onobrychis sativa*). *Australian Journal of Crop Science* 6(8): 1305-1313.
- [64]. Moreau R. A., Whitaker B. D., Hicks K. B. 2002: Phytosterols and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis and healthpromoting uses. *Progress in Lipids Research* 41: 457-500.
- [65]. Murashige T., Skoog F., 1962: A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* Vol. 15. p. 473-497.
- [66]. Murphy A., Peer W. A., Taiz L. 2000: Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 211 (3): 315-324.
- [67]. Oka S., Ohyama K. 1982: Sugar utilization in mulberry (*Morus alba* L.) bud culture. In: *Plant Tissue Culture*. (ed.) A. Fujiwara. Proc. 5th Int. Cong. Plant Tiss. Cell Cult., Tokyo, Japan, 67-68.
- [68]. Oliveira S. A. G., Lopes M. T. G., Chaves F. C. M., Martins C. C., Alves E. U. 2013: Estimation of genetic parameters of *Plukenetia volubilis* L. seed germination. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, v. 56, n. Supl., 49-54 p.
- [69]. Omar R. 2003: Optimization strategies, kinetics and modeling of cell growth and triterpenoids production in *Centella Asiatica* cell culture. MSc Thesis. Universiti Putra Malaysia. Serdang, Malaysia.

- [70]. Ormerod M. G. 1994: Flow Cytometry. Second Edition, IRL Press, Practical Approach, 2nd, University Press, Oxford, England, 320 pp.
- [71]. Pax F. A. 1890: *Euphorbiaceae*. In: Engler A and Prantl K. [eds]: Die natuerlichen Pflanzenfamilien. III. W. Engelmann, 1-119 p.
- [72]. Petersen W. L., Sulc S., Armstrong C. L. 1992: Effect of nurse cultures on the production of macro-calli and fertile plants from maize embryogenic suspension culture protoplasts, Plant Cell Reports 10: 591-594.
- [73]. Pierik R. L. M., Oosterkamp J., Ebbing M. A. C. 1997: Factors controlling adventitious root formation of explants from juvenile and adult *Quercus robu* „*Fastigiata*“. Scientia Horticulturae 71: 87-92.
- [74]. Pilco E. 2014: Use of in vitro technologies in sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Faculty of Tropical Agri Sciences, Dep.: SIC, List qualification work.
- [75]. Popelka J. C., Altpeter F. 2001: Interactions between genotypes and culture media components for improved in vitro response of rye (*Secale cereale* L.) inbred lines. Plant Cell Rep 20: 575-582.
- [76]. Rai R., Misra K. K. 2003: Micropropagation of Karonda (*Carissa carandas*) through shoot multiplication. Scientia Horticulturae 103: 227-232.
- [77]. Raemaekers J. J. M., Jacobsen E., Richard G. F. 2001: Direct Cyclic Somatic Embryogenesis of Cassava for Mass Production Purposes Krit. Physiologia Plantarum 111: 196-205.
- [78]. Rambabu M., Upender M., Ujwala D., Ugandhr T., Praveen M., Swamy N. R., 2006: In vitro zygotic embryo culture of an endangered forest tree *Givotia Rottleriformis* and factor affecting its germination and seeding growth. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 42: 418-421.
- [79]. Richard D., Lescot M., Inze D., Vaylder D. L. 2002: Effect of auxin, cytokinin and sucrose on the cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 167-176.
- [80]. Sahoo Y., Pattnaik S. K., Chand P. K. 1997: Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. from seedlings and mature plants. Scientia Horticulturae 69: 85-98.
- [81]. Salajová T., Salaj J., Kormuťák A. 1999: Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arnold. Plant Science 145: 33-40.
- [82]. Seman I. 1990: Biotechnologické metody v šľachtení poľných plodín. Bratislava: Príroda, p. 272, ISBN 80-07-00237-5.
- [83]. Siang T. CH., Soong S. T., Su Yien A. T. 2012: Plant regeneration studies of *Jatropha curcas* using induced embryogenic callus from cotyledon explants. African Journal of Biotechnology 11(31): 8022-8031.
- [84]. Silveira V. 2003: Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension culture of *Pinus taeda*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 53-60.
- [85]. Skoog F., Miller C. O. 1957: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. XI. 118-131.
- [86]. Smulders M. J. M., Klerk G. J. 2011: Epigenetics in plant tissue culture. Plant Growth Regulation 63: 137-146.
- [87]. Stamp J. A., Henshaw G. G. 1987: Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. Plant Cell Tissue and Organ Culture 10: 227-233.

- [88]. Stasolla C., Craig D., Li D., Wenbin Z., Van Zyl., Stederoff Z. 2003: The effect of polyethylene glycol (PEG) on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology* 131: 49-60.
- [89]. Stasolla C., Loukanina N., Ashihara H., Yeung E. C., Thorpe T. A. 2001: Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. *Tree Physiology* 21 (6): 359-367.
- [90]. Sun Y., Zhang X., Jin S., Liang S., Nie Y. 2003: Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 247-253.
- [91]. Svobodová H., Albrechtová J., Kumštýřová L., Lipavská H., Vágner M., Vondráková Z. 1999: Somatic embryogenesis in Norway spruce. Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 209-221.
- [92]. Szabados L., Hoyos R., Roca W. 1987: In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Reports* 6: 248-251.
- [93]. Tautorus T., Fowke L., Dusitan D. 1991: Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany* 69: 1873-1899.
- [94]. Taylor N. J., Mason M. V., Carcamo R., Ho T., Schopke Ch., Fauquet C. M. 2001: Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 120: 25-34.
- [95]. Te-chato S., Rungnoi O. U. 2000: Induction of static embryogenesis from leaves of Sado Chang (*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs). *Scientia Horticulturae* 86: 311-321.
- [96]. Tellez A. C. 2008: Colecta, identificación, determinación taxonomica, y análisis de de la concentración de ácidos grasos de ecotipos de Sacha Inchi en la región Amazonas. *Perúbiodiverso*. Lima, Perú, 28 p.
- [97]. Thilaga S., Largia M.J.V., Parameswari A., Nair R.R., Ganesh D. 2013: High frequency somatic embryogenesis from leaf tissue of „*Embliba officinalis*“ Gaertn. - A high valued tree for non-timber forest products. *Australian Journal of Crop Science* 7(10): 1480-1487.
- [98]. Tian L., Brown D. C. W., Watson E. 2002: Continuous long-term static embryogenesis in Alfaalfa. *In Vitro Cellular Developmental Biology* 28: 279-284.
- [99]. Trigiano R. N., Gray D. J. 2005: *Plant Development and Biotechnology*. RC Press, Boca Raton, 357 pp.
- [100]. Vágner M., Fischerová L., Špačková J., Vondráková Z. 2005: Somatic embryogenesis in Norway spruce. *Protokol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Journal of Forestry Sciences* 77: 141-155.
- [101]. Vásquez R. 1997: Flórula de las Reservas Biológicas de Iquitos, Perú: Allpahuayo- Mishana, Explornapo Camp, Explorama Lodge. *Monogr. Annals of the Missouri Botanical Garden* 63: 297-298.
- [102]. Vega C. 2008: Mesa técnica de Sacha Inchi. Producto de conservación: Sacha Inchi, Desarrollo Estratégico en la región Amazonas.
- [103]. Ward K. A., Jordan M. C. 2001: Callus formation and plant regeneration from immature and mature embryos of rye (*Secale cereale* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37: pp 361-368.

-
- [104]. Wang H. C., Chen J.T., Chang W. C. 2006: Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. *Biologia Plantarum* 50 (2): 279-282.
- [105]. Webster F.B., Roberts D.R., McInnis S. M., Sutton B.C.S. 1990: Propagation of interior spruce by static embryogenesis. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 1759-1765.
- [106]. Webster G. 1975. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. *Taxon* 24 (5/6): 593-601.
- [107]. Winkelmann T., Sangwan R. S., Schwenkel H. G. 1998: Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill.: relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Report* 17: 400-404.
- [108]. Yeoman M.M., Macleod A. J. 1973: Tissue (callus) culture techniques. In: Street H.E. (ed.), *Plant tissue and cell Culture*. Blackwell Scientific Publications, *Oxford*. 31-59 p.
- [109]. Zaccheria F., Psaro R., Ravasio N. 2009: Selective hydrogenation of alternative oils: a useful tool for the production of biofuels. *Green Chemistry* 11: 462-465.
- [110]. Zaccheria F., Psaro R., Ravasio N., Bondioli P. 2012: Standardization of vegetable oils composition to be used as oleochemistry feedstock through a selective hydrogenation process. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114: 24-30.
- [111]. Zuleta E. C., Rios L.A., Benjumea P.N. 2012: Oxidative stability and cold flow behavior of palm, sachai, jatropa and castor oil biodiesel blends. *Fuel Processing Technology* 102: 96-101.